

Année 2018

2018 TOU3 1702

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

Lucie COSTER

Le 12 avril 2018

**Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aiguës lymphoblastiques
pédiatriques : perspectives et limites**

Directeur de thèse : Pr Éric DELABESSE

JURY :

Monsieur le Professeur Éric DELABESSE	Président
Monsieur le Professeur Pierre SIÉ	Assesseur
Madame le Dr Véronique DE MAS	Assesseur
Madame le Dr Isabelle LUQUET	Assesseur
Madame le Dr Marlène PASQUET	Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2017

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques	Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
		Professeur Honoraire	M. CLANET Michel

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur MURAT	Professeur SIMON Jacques
Professeur MANELFE Claude	Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur LOUVET P.	Professeur ARBUS Louis
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CARATERO Claude	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur ADER Jean-Louis	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur LAZORTHES Yves	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis	Professeur CHAP Hugues
Professeur JOFFRE Francis	Professeur LAURENT Guy
Professeur BONEU Bernard	Professeur MASSIP Patrice
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique	Nutrition
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAUAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian	Hématologie
M. RISCHMANN Pascal	Urologie
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie

P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane Médecine Générale

P.U. - P.H.
2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVIALLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. BUREAU Christophe	Hépto-Gastro-Entéro
M. CALVAS Patrick	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépto-Gastro-Entérologie
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme SAVAGNER Frédéricque	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre Médecine Générale

P.A Médecine générale

POUTRAIN Jean-Christophe Médecine Générale

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIÈRE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve Médecine Générale

M.C.U. - P.H.

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAINAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M.C.U. - P.H.

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
Mme ESCOURROU Brigitte

Médecine Générale
Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOLAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge
Dr BIREBENT Jordan
Dr LATROUS Leila

Remerciements aux membres du jury

Au Professeur Eric Delabesse, merci de m'avoir confié ce travail et de l'avoir encadré, pour vos conseils dans les moments critiques et pour m'avoir poussée à faire plus que je ne m'en serais crûe capable en un temps si court. Soyez assuré de mon profond respect.

Au Professeur Pierre Sié, pour m'avoir accueillie dans votre service lors de mon premier semestre d'internat de Biologie. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir profiter de votre enseignement de l'Hémostase, c'est un plaisir de vous écouter parler de l'inhibition du facteur XII, ou du fonctionnement des NET dans les coagulopathies. Soyez assuré de mon profond respect.

Au Docteur Véronique De Mas, pour me faire l'honneur de faire partie de ce jury malgré ton emploi du temps déjà bien rempli. Merci aussi pour ton implication pour les internes du service d'Hématologie, pour ta bonne humeur, les discussions de voyage et l'enseignement de l'hématologie cellulaire.

Au Docteur Marlène Pasquet, merci d'avoir accepté de juger mon travail, de me faire l'honneur de faire partie de ce jury et d'y apporter vos compétences de clinicienne.

Au Docteur Isabelle Luquet. Merci de tout ce que vous m'avez apporté au cours de ces deux dernières années. Merci de m'avoir transmis votre goût pour la cytogénétique hématologique, pour vos conseils avisés concernant mon parcours et pour votre bienveillance à mon égard. J'ai un profond respect pour vos compétences et votre rigueur professionnelles. Je n'en serais pas arrivée là sans vous.

***Remerciements à toutes les personnes ayant permis
l'aboutissement de ce travail.***

A Eric Delabesse et Claude Preudhomme pour avoir permis la construction de ce projet.

A Nicolas Duployez, pour sa réactivité, sa gentillesse, et pour avoir rendu la collaboration avec le CHU de Lille sur ce projet à la fois simple et agréable.

A Emma Delabesse, pour son efficacité dans l'art ardu de la collecte de données.

A Naïs Pradé, pour ses explications claires et son œil avisé.

A tous les biologistes, pédiatres et attachés de recherche clinique des centres de Lille, Toulouse, Amiens, Lyon, Marseille, Poitiers, Reims, Rouen, Saint-Louis et Bordeaux qui ont permis le recueil de données.

A mes collègues et mes proches

A l'équipe de cytogénétique passée et actuelle, Stéphanie, Francisca, Rolande, Françoise, Laetitia, Brigitte, Jean-Marie, Olivier et Isabelle. Pour les petits-déjeuners, les trucs et astuces et les bons plans, les discussions sérieuses et toutes les autres. J'ai appris mon métier avec vous, et c'est grâce à vous que je me sens chez moi en cytogénétique. J'attends avec plaisir les années à venir.

Aux techniciennes et ingénieures de biologie moléculaire, Magalie, Cynthia, Christine, Stéphanie, Nais et Cathy. Merci de m'avoir accueillie pendant 6 mois dans le service et pour tous les bons moments partagés passés et à venir.

Aux pétillantes secrétaires du service, Aurélie (pour ne jamais manquer une occasion de faire une blague), Nelly (l'inestimable gardienne des trombones) et Sandrine (l'ambiance ne sera plus la même sans toi).

A tous mes co-internes rencontrés en stage, en garde ou à l'internat, pour tous ces bons moments passés ensemble depuis 4 ans. La liste est longue mais vous vous reconnaitrez.

Aux techniciens et techniciennes des services dans lesquelles j'ai passé mes deux premières années d'internat et avec qui j'ai partagé de longues nuits de gardes. A votre patience devant l'éternel renouvellement semestriel des internes.

A mes amies depuis la fac et avant, Laure B, Alice, Carole, Nadia et Laure P. Je vous adore les filles, ne changez pas. Les années nous ont éparpillées à travers la France et ailleurs, mais loin des yeux ne veut pas dire loin du cœur. Vous avez ouvert la voie pour la thèse, les appartements et maisons et les enfants. J'ai mis un peu plus de temps mais attention j'arrive.

Aux amis de Toulouse, qui m'ont rendue la vi(II)e bien agréable. Laetitia et Lilian, David et Marion, Fabien, Vincent et ceux qui sont déjà repartis vers d'autres horizons. En vrac, pour la fantastique année et demi passée à la colocation, pour les randos, les soirées, les poireaux, pour l'aide dans les déménagements, pour cash game et grosse blinde qui ont vaguement un sens pour moi maintenant. Je n'ajouterai qu'une chose : la tomme céronnée c'est le top.

A ma famille

Papa, Maman. Merci pour tout. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez transmis, pour votre soutien indéfectible, et pour votre gentillesse. Vous m'avez permis de grandir dans un environnement heureux et vous m'avez enseigné les valeurs de la campagne. Vous avez toujours été là pour moi, même dans les moments difficiles. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix et m'avez éclairé sur tous les petits problèmes de la vie qu'on ne nous enseigne à résoudre ni à l'école ni dans les livres. Dédicace spéciale à Maman pour les « crop circles » et son expertise dans l'utilisation d'excel et publisher.

A mes frères Mathieu et David, pour votre humour, pour les moments passés ensemble depuis toujours et pour ceux à venir. Il n'y a rien de meilleur qu'une fondue savoyarde après une journée de ski ou la course de l'Escalade. Je suis fière de vous les frangins. Et Dav, merci de m'avoir présenté Pat.

A Tatie, parce que des taties comme ça on n'en a pas deux. Je te remercie pour les barbecues à Grésy, pour m'avoir donné le goût du voyage et m'avoir ouvert la voie vers les métiers de la santé.

A Céline, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi et de discuter de grandes théories et de petites histoires. Les moments qu'on a passé ensemble depuis toutes petites me sont précieux.

A Pépé et Mémé, qui ne sont plus parmi nous. Vous me manquez.

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines, neveux et nièces.

A Pat, pour partager ma vie depuis 3 ans. Nos métiers respectifs nous ont pas mal fait vadrouiller (surtout toi) mais nos vadrouilles communes en vacances sont des moments formidables. J'ai enfin trouvé mon point d'attache après toutes ces années d'études et j'attends avec impatience le moment où ta vie professionnelle nous permettra de profiter autant des moments du quotidien que de nos randonnées à pied, à vélo et qui sait à moto.

Table des matières

Abréviations et définitions	1
1 Généralités	2
1.1 La leucémie aiguë lymphoblastique, un cancer rare.....	2
1.1.1 Les grands acteurs de la description des leucémies	2
1.1.2 L'histoire naturelle des lymphocytes B	3
1.1.3 Epidémiologie des leucémies aiguës lymphoblastiques B	7
1.2 Prise en charge du patient	8
1.2.1 Les étapes du diagnostic	8
1.2.2 La définition du pronostic	18
1.2.3 Le traitement.....	19
2 La place de la CGH array dans la LAL.....	20
2.1 Les limites des méthodes « traditionnelles » du diagnostic génétique	20
2.2 Historique : la CGH sur étalement métaphasique.....	20
2.3 L'avancée technologique de la CGH array	22
2.4 La SNP array	23
3 Objectifs de l'étude	24
4 Matériel et méthodes	25
4.1 Recueil de données	25
4.2 CGH array Cytoscan HD	26
4.2.1 Description de la technique	26
4.2.2 Caractéristiques de la puce Cytoscan™ HD	28
4.2.3 Nexus copy number.....	28
4.3 Mesure de la maladie résiduelle : la MRD Ig/TCR.....	37
4.3.1 Principe général.....	37
4.3.2 Description de la technique	38
4.4 Les analyses de cytogénétique.....	41
4.4.1 Le caryotype	41
4.4.2 La FISH	44
5 Résultats.....	46
5.1 Caractéristiques de la population	46
5.2 Recensement des CNA courants d'intérêt	50

5.2.1	Les délétions du gène <i>IKZF1</i>	50
5.2.2	Les délétions du gène <i>ERG</i>	51
5.2.3	Les délétions des gènes <i>CDKN2A</i> et <i>CDKN2B</i>	52
5.2.4	Les délétions et les réarrangements du gène <i>PAX5</i>	53
5.2.5	Les délétions du gène <i>ETV6</i>	57
5.2.6	Les délétions du gène <i>BTG1</i>	57
5.2.7	Les délétions du gène <i>RB1</i>	58
5.2.8	Les délétions de la région <i>PAR1</i>	59
5.2.9	Les délétions du gène <i>TP53</i>	60
5.2.10	Réflexions sur les évènements secondaires (rechute et décès) et les CNA courants 61	
5.3	Résultats de l'analyse GISTIC.....	62
5.3.1	Délétions des gènes <i>CD200/BTLA</i>	62
5.3.2	Délétions 6p22	63
5.3.3	Gains.....	64
5.4	La recherche d'anomalies pronostiques par l'analyse GISTIC.....	65
5.4.1	La recherche d'anomalies pronostiques au sein de la cohorte complète	65
5.4.2	La recherche d'anomalies pronostiques au sein de la cohorte à l'exclusion des aneuploïdies	66
5.4.3	La recherche d'anomalies pronostiques dans les LAL hyperdiploïdes.....	68
5.4.4	La recherche d'anomalies pronostiques dans les LAL B other.....	68
5.5	Autres résultats notables	69
5.5.1	Discordances entre le caryotype et la CGH array.....	69
5.5.2	L'apport de la CGH array dans l'identification des LAL Ph-like	70
5.5.3	La CGH array et les LAL avec <i>iAMP21</i>	72
5.5.4	L'apport de la CGH array dans la stratification pronostique des LAL B other.....	73
6	Conclusion	73
7	Bibliographie	75

Abréviations et définitions

CGH array : analyse permettant la recherche de gains et de délétions de régions génomiques sur puce à ADN.

CNV, CNA : chaque segment génomique est présent en deux copies chez un individu (une héritée de chaque parent). L'augmentation (gain) ou la diminution (délétion) de ce nombre de copies est appelée CNV pour variant du nombre de copies (copy number variant). Il s'agit soit d'un polymorphisme, soit d'une situation pathologique. Un CNV pathologique est appelé CNA pour anomalie du nombre de copies (copy number abnormality).

CSH : cellule souche hématopoïétique.

Cryptique : caractère d'une anomalie génétique qui n'est pas visible au caryotype.

Délétion / gain : perte d'une ou des deux copies d'une région du génome / gain d'une ou de plusieurs copies d'une région du génome.

Ig : immunoglobuline.

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique. Pathologie maligne résultant d'un blocage de différenciation et de la prolifération de cellules hématopoïétiques immatures engagées dans la lignée lymphoïde.

LOH : Perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity). Perte d'une des deux copies d'origine parentale d'un gène, d'une région génomique, voire d'un chromosome entier.

MRD : Maladie résiduelle. Mesure de la présence et du taux de cellules pathologiques dans un échantillon. Elle est réalisée par cytométrie en flux ou en biologie moléculaire. La MRD1 est réalisée après le traitement d'induction, la MRD2 pendant le traitement de consolidation.

Pb, kb, Mb : paire de bases, kilobase, mégabase. Unité de mesure de la taille d'un acide nucléique (ADN ou ARN). Une paire de bases correspond à une distance d'un nucléotide, un kilobase correspond à mille nucléotides et un mégabase correspond à un million de nucléotides.

SNP : Single nucleotid polymorphism. Modification d'une paire de bases dans le génome, sans conséquence physiologique ou pathologique, et existant chez au moins 1% de la population.

SNP array : Etude des SNP sur puce à ADN.

UPD : Disomie uni parentale (uniparental disomy). LOH avec un nombre de copies neutre.

1 Généralités

1.1 La leucémie aiguë lymphoblastique, un cancer rare

1.1.1 Les grands acteurs de la description des leucémies

Le premier cas de leucémie rapporté est attribuable à Peter Cullen (1769-inconnu). Ce chirurgien anglais publie en 1811 un cas de « splenitis acutus » (hyperplasie aiguë de la rate) chez un patient de 35 ans. Il observe la coloration blanche du sang de son patient, qu'il pense due à la présence de graisses¹.

En 1827, Alfred Velpeau (1795-1867), chirurgien français, fait la même observation chez un patient présentant une splénomégalie et une hépatomégalie massives. Il attribue la coloration laiteuse du sang à la présence de pus circulant.

C'est en 1844 que la raison de la coloration blanche du sang est découverte. Alfred Donné (1801-1878), chimiste utilisant la microscopie, décrit pour la première fois l'abondance de « globules muqueux », d'aspect proche mais différent des « globules du pus ». Il est le premier à évoquer un arrêt de différenciation de ces « globules » (appelés aujourd'hui leucocytes).

Le médecin pathologiste allemand Rudolf Virchow (1821-1902), l'un des fondateurs de l'anatomo-pathologie, introduit en 1847 le terme de « leukämie » pour décrire l'association d'un sang laiteux et d'un gonflement de la rate ou des ganglions lymphatiques, terme qui a été conservé jusqu'à aujourd'hui.

Actuellement, la leucémie n'est plus considérée comme une maladie unique mais un groupe de maladies. On distingue des pathologies chroniques telles que la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphoïde chronique, et des pathologies aiguës ; la leucémie aiguë myéloïde et la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (Fig 1). Cette dernière se subdivise en LAL T, qui consiste en une prolifération de cellules immatures de la lignée lymphoïde T, et en LAL B lorsque ce sont des cellules immatures lymphoïdes B qui prolifèrent.

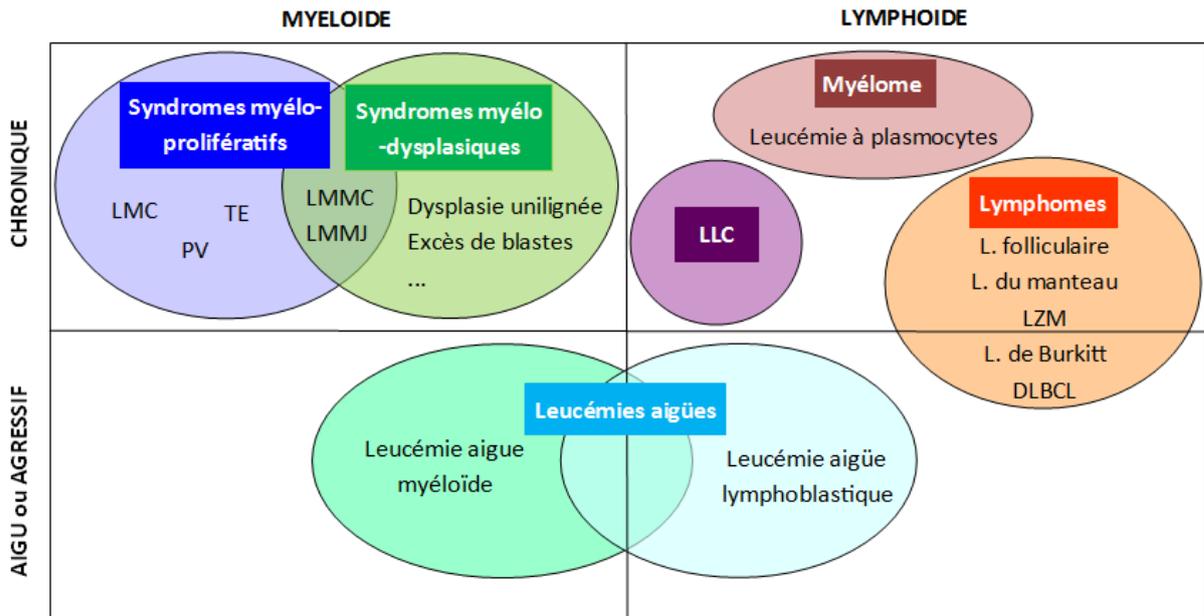


Fig 1. Représentation des maladies hématopoïétiques responsables d'une « leucémie ». Les syndromes myélodysplasiques sont représentés mais ne sont pas responsables d'hyperleucocytose. LMC : leucémie myéloïde chronique. TE : thrombocytémie essentielle. PV : polyglobulie de Vaquez. LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique. LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile. LZM : lymphome de la zone marginale. DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules.

1.1.2 L'histoire naturelle des lymphocytes B

Les cellules sanguines, plaquettes, globules rouges, ainsi que tous les leucocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, monocytes et lymphocytes B, T et NK), proviennent tous d'une cellule souche commune, la cellule souche hématopoïétique (CSH).

Les CSH ne sont pas distinguables morphologiquement des autres cellules immatures de la moelle osseuse mais elles présentent des marqueurs phénotypiques et de fonctionnalité qui ont permis leur étude. Elles sont notamment Kit+ et Sca-1+.

Elles représentent moins d'une cellule sur 10 000 dans la moelle osseuse hématopoïétique et sont localisées au niveau de deux niches, la niche endostéale où elles sont en état de quiescence, et les niches périvasculaires (périartériolaire et péricapillaire) où elles ont préférentiellement un rôle d'auto-renouvellement. Elles

constituent un pool de cellules pluripotentes qui s'autorenouvelle et produit les cellules sanguines tout au long de la vie de l'individu.

La CSH se divise de façon asymétrique, entraînant la production d'une CSH (auto-renouvellement) et d'une cellule entrant en différenciation. Au fur et à mesure de sa différenciation, la cellule s'engage de plus en plus dans une lignée et perd sa capacité à produire des cellules d'une autre lignée.

Des données récentes suggèrent que le choix de la lignée survient très tôt dans la cellule, probablement à un stade où la cellule a encore un phénotype de cellule souche. Ceci a été bien démontré pour les cellules dendritiques².

La différenciation de ces CSH en cellules hyperspécialisées productrices d'anticorps, les lymphocytes B, est un processus multi-étapes qui implique l'expression d'un programme de différenciation permettant l'acquisition des caractéristiques spécifiques de la lignée (spécification) en parallèle de la perte progressive de la capacité de se différencier en une cellule d'une autre lignée (engagement).

La régulation de ce processus implique des facteurs de transcription qui interviennent non pas séquentiellement au cours de la différenciation mais qui constituent un réseau complexe. Ils s'interconnectent par des liaisons de type feedback, feedforward ou d'antagonisme réciproque (deux facteurs de transcription guidant la différenciation dans des lignées différentes vont dans certains cas s'inhiber réciproquement)³.

De nombreux facteurs de transcription sont impliqués. Parmi eux, les facteurs de transcription IKZF1, RUNX1, TCF3 et FOXO1 entraînent des modifications épigénétiques autorisant l'action de facteurs de transcription spécifiques de la lignée B, parmi lesquels EBF1 et PAX5. Le programme de transcription ainsi activé permet l'expression de gènes spécifiques de lignée et la répression du potentiel de différenciation vers d'autres lignées⁴. Ces gènes régulateurs de la différenciation sont impliqués de façon récurrente dans la pathogénèse de la LAL, via des mutations, des pertes ou des réarrangements empêchant leur fonction normale. La perte de fonction entraîne un blocage de différenciation des cellules B immatures, qui avec la prolifération est l'un des grands mécanismes de la maladie.

La différenciation en lymphocyte B est un processus continu. Schématiquement, elle se déroule en trois étapes. Les deux premières se déroulent dans la moelle osseuse, et le foie chez le fœtus (Fig 2).

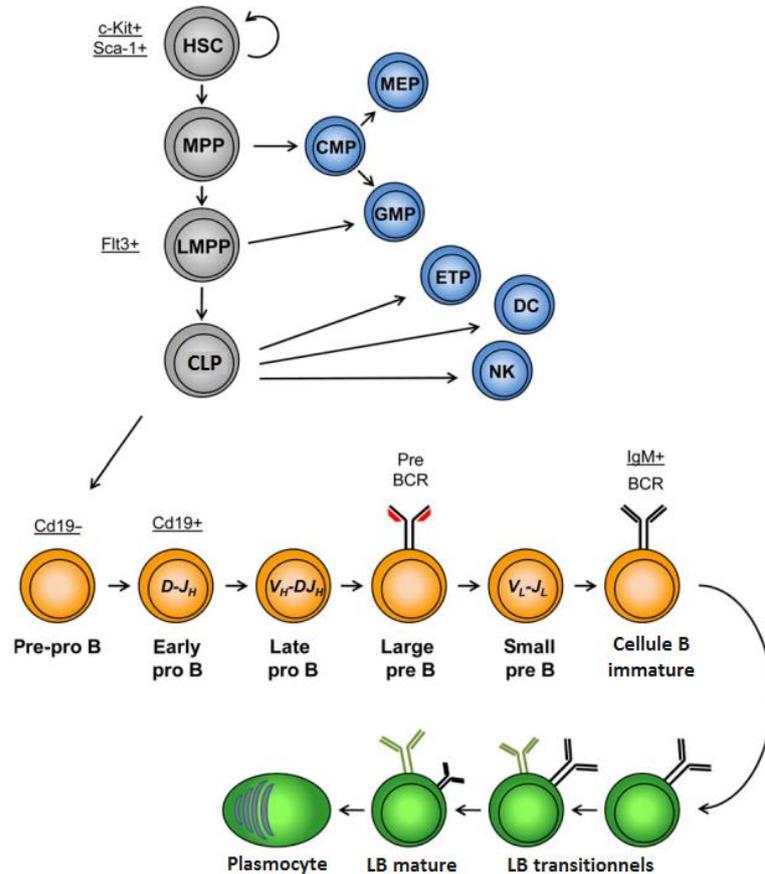


Fig 2. Schéma de la lymphopoïèse. En gris sont représentées les cellules ayant un potentiel de différenciation en cellules B et non B, en bleu les lignées non B, en jaune les cellules engagées dans la lignée B en phase de différenciation précoce (localisées dans la moelle osseuse hématopoïétique) et en vert les cellules en phase tardive de différenciation (localisées dans les organes lymphoïdes secondaires). Les marqueurs de surfaces sont soulignés. Les stades de différenciation sont écrits en gras. HSC, cellule souche hématopoïétique; MPP, progéniteur multipotent; LMPP, progéniteur multipotent lymphoïde primé; CLP, progéniteur lymphoïde commun; CMP, progéniteur myéloïde commun; MEP, progéniteur mégakaryocyte/érythrocyte; GMP, progéniteur granulocyte/macrophage; ETP, progéniteur thymique précoce; DC, cellule dendritique; NK, lymphocyte naturel tueur. Adapté de Boller et Grosschedl⁴.

Dans la première étape, les cellules conservent un potentiel à se différencier vers plusieurs lignées. Cette capacité se restreint progressivement. Trois stades cellulaires sont décrits. Le progéniteur multipotent (MPP) issu de la CSH est à la croisée des chemins entre la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Il peut donner un progéniteur myéloïde commun qui a le potentiel de se différencier en toute cellule myéloïde, ou un MPP dit «lymphoïd primed» (LMMP) qui conserve une aptitude à se différencier en macrophage ou cellule granulocytaire mais va dans la majorité des cas s'orienter vers une différenciation lymphocytaire. Il est caractérisé par l'expression à la membrane du récepteur tyrosine kinase FLT3. Le stade suivant est le progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui est à l'origine de tous les lymphocytes T, B, NK et des cellules dendritiques.

A l'étape suivante, l'engagement dans la lignée lymphoïde B est complet, les cellules ont perdu tout potentiel de différenciation vers d'autres lignées, et acquièrent leurs fonctions de cellule spécialiste. Elle débute au stade de lymphocyte pré-pro B jusqu'au lymphocyte B immature qui quitte la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Au stade proB a lieu le réarrangement des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig) par l'action des endonucléases Rag 1 et Rag 2. Les chaînes légères sont réarrangées au stade préB. Le lymphocyte B immature exprime à sa surface un hétérotétramère constitué de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères : le récepteur des cellules B (BCR). Les lymphocytes qui reconnaissent les antigènes du soi sont éliminés⁵.

Une chaîne d'Ig est constituée de la région variable codée par la juxtaposition d'un segment V, d'un segment D (pour les chaînes lourdes uniquement) et d'un segment J, et de la région constante. Les gènes des Ig comportent de nombreux segments V, D et J différents, et un unique segment C codant pour la région constante. Au cours de la différenciation lymphocytaire, un réarrangement des gènes des Ig a lieu au cours duquel un segment D est réarrangé avec un segment J puis un segment V pour les chaînes lourdes. Pour les chaînes légères, un segment V se réarrange avec un segment J (absence de segment D) (Fig 3). Ainsi, une très grande diversité combinatoire est générée. Ce mécanisme physiologique permet la diversité des BCR et ainsi la reconnaissance de très nombreux antigènes.

Les réarrangements V(D)J sont utilisés dans les LAL pour détecter et suivre la clonalité. Dans un prélèvement constitué de cellules lymphoïdes normales, chaque lymphocyte exprimera une chaîne lourde et une chaîne légère différentes des autres lymphocytes suite aux réarrangements aléatoires VDJ et VJ. Au contraire, dans une population maligne où toutes les cellules lymphoïdes sont homogènes car issues d'une même cellule (clone), un réarrangement sera prédominant. Ces réarrangements V(D)J sont utilisés pour suivre la maladie résiduelle par des techniques de biologie moléculaire (voir partie méthodes).

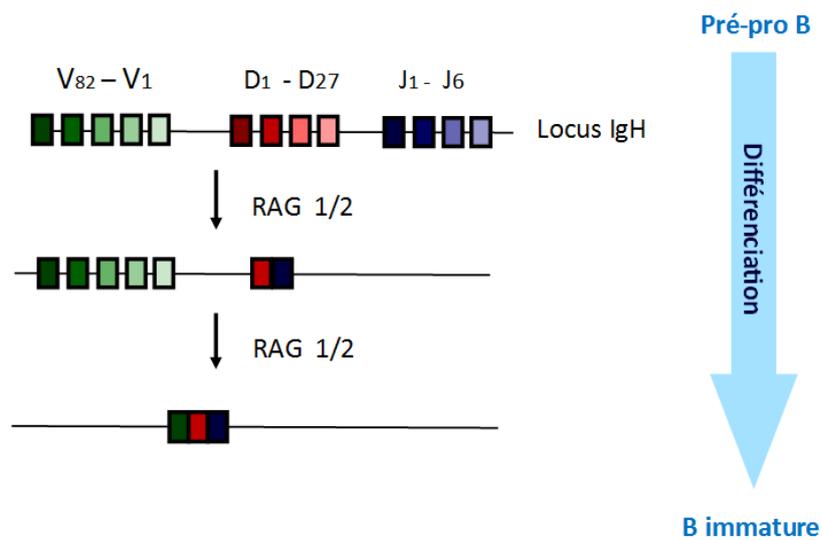


Fig 3. Recombinaison VDJ du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines

Les lymphocytes B immatures partent dans la circulation périphérique pour rejoindre la rate et les ganglions. A ce niveau a lieu la rencontre avec l'antigène, ce qui induit les hypermutations somatiques et la commutation isotypique.

1.1.3 Epidémiologie des leucémies aiguës lymphoblastiques B

C'est une pathologie rare selon la définition du groupe européen RARECARE, avec un taux d'incidence annuel standardisé à la population mondiale de l'ordre d'un cas pour 100 000 habitants. C'est néanmoins le cancer le plus fréquent des enfants. Le pic d'incidence se situe entre 1 et 4 ans, à 70 cas par million et par an (données de l'Institut National du Cancer).

Chez l'adulte, les leucémies aiguës sont plus fréquemment myéloïdes que lymphoblastiques. Les LAL sont environ trois fois moins fréquentes que chez l'enfant, et la plupart surviennent après 50 ans. Dans la suite de ce document, nous nous intéresserons exclusivement aux cas pédiatriques.

Avant l'utilisation des chimiothérapies, l'issue était constamment fatale. Le pronostic s'est amélioré de façon drastique depuis les années 1960 et l'utilisation des polychimiothérapies^{6,7}. Actuellement, ces traitements, auxquels s'ajoute l'allogreffe de moelle osseuse dans certains cas, permettent l'obtention d'une rémission complète pour plus de 90% des enfants atteints de LAL B.

Néanmoins, les polychimiothérapies ont des effets à échéance tardive (séquelles, cancers secondaires...) qui revêtent une importance majeure lorsque l'on prend en charge des enfants qui vivront de longues années avec les conséquences des chimiothérapies. C'est l'un des enjeux actuels de la recherche en hématologie. La prise en charge des patients au sein d'essais cliniques permet d'adapter de plus en plus finement le traitement en fonction du pronostic individuel, afin d'avoir un bon compromis entre l'obtention d'une rémission complète et la limitation de la toxicité des chimiothérapies.

La stratification du risque est essentielle dans ce contexte. Elle s'effectue sur des données cliniques et biologiques, avec un impact fort des caractéristiques génétiques du clone leucémique. La connaissance des anomalies génétiques des LAL est donc nécessaire pour une prise en charge thérapeutique adaptée des patients.

1.2 Prise en charge du patient

1.2.1 Les étapes du diagnostic

1.2.1.1 *La présentation clinique*

La LAL est une pathologie aiguë et le diagnostic est rarement fortuit. Les patients présentent des symptômes secondaires à la prolifération des cellules malignes.

L'envahissement de la moelle osseuse par les lymphoblastes réduit l'hématopoïèse et est responsable des trois versants du syndrome d'insuffisance médullaire :

- le syndrome anémique avec une diminution rapide du taux d'hémoglobine qui est fréquemment mal tolérée.
- le syndrome hémorragique, sous forme d'hémorragies cutanées ou muqueuses en rapport avec la thrombopénie, et qui peut être aggravé par un syndrome de coagulation intravasculaire disséminée.
- et le syndrome infectieux, pouvant prendre toute forme, la plus classique étant une infection ORL résistante aux antibiotiques. Il est en rapport avec la neutropénie, allant souvent jusqu'à l'agranulocytose c'est-à-dire un taux de polynucléaires neutrophiles inférieur à 0,5 G/L.

Un syndrome tumoral est également fréquent par envahissement des organes hématopoïétiques et se traduisant par une splénomégalie et la présence d'adénopathies.

Un syndrome de leucostase peut survenir en cas de très forte hyperleucocytose, à des taux dépassant 100 G/L. Les patients présentent alors au niveau pulmonaire une hypoxie voire une détresse respiratoire, et au niveau cérébral des troubles de la conscience allant jusqu'au coma.

L'envahissement de l'espace méningé par les cellules malignes a un impact pronostic péjoratif majeur et la symptomatologie est à type de céphalées et de paralysie des nerfs crâniens. Chez les hommes et les garçons, un envahissement testiculaire est également possible. Enfin, des localisations osseuses, prédominant aux diaphyses proximales sont principalement retrouvées chez les enfants et sont responsables de douleurs.

1.2.1.2 Le diagnostic biologique

1.2.1.2.1 Le prélèvement sanguin

Les cytopénies liées à l'envahissement médullaire sont objectivables sur un prélèvement sanguin. Anémie, thrombopénie et neutropénie sont fréquemment toutes trois présentes, réalisant une pancytopénie. L'anémie est normochrome, normocytaire et arégénérative. La neutropénie peut être profonde, jusqu'à l'agranulocytose. La leucocytose est très variable, de la leucopénie à l'hyperleucocytose majeure, dépassant

parfois 500 G/L. Ceci dépend de la présence des lymphoblastes dans le sang, fréquente mais inconstante, et de leur abondance.

La blastose sanguine est détectable par les automates de cytologie. Ils signalent la présence de cellules anormales par des alarmes, et le graphique croisant la taille de la cellule et sa granularité permet de visualiser la population anormale.

La présence de lymphoblastes circulants est recherchée sur un frottis sanguin en cas d'alarmes de l'automate, de cytopénies ou sur demande du clinicien devant un tableau évocateur. Ce sont le plus souvent des cellules de taille moyenne, à rapport nucléocytoplasmique très élevé (le cytoplasme est presque invisible), le noyau a un contour irrégulier et une chromatine intermédiaire (Fig 4).

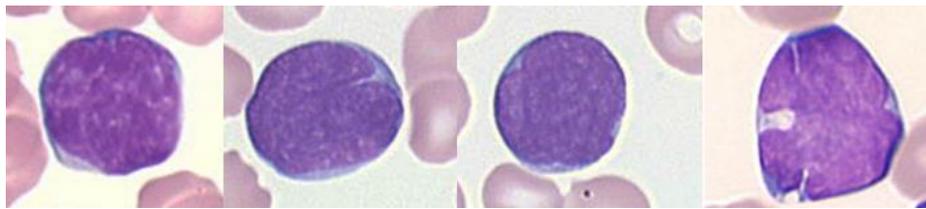


Fig 4. Différents aspects de lymphoblastes dans le sang. Images en microscopie optique objectif x100 après coloration May Grünwald Giemsa, issues des prélèvements de quatre patients différents.

5 à 10% des LAL présentent des granulations grises ou orangées, différentes des granulations myéloïdes. Les granulations myéloïdes et des corps d'Auer (agrégats en forme de bâtonnet de ces granulations, retrouvés uniquement dans les leucémies aiguës myéloïdes) sont recherchés pour le diagnostic différentiel.

La distinction entre blastes myéloïdes et lymphoblastes peut être malaisée sur le frottis sanguin, et elle est parfois plus facile sur le frotti médullaire. La cytochimie sur moelle osseuse et l'immunophénotypage des blastes sur sang ou sur moelle sont indispensables dans certains cas pour distinguer une leucémie aiguë lymphoblastique d'une leucémie aiguë myéloïde avec différenciation minime ou sans maturation (selon la classification FAB des LAM).

1.2.1.2.2 Le myélogramme

Une ponction médullaire au trocart de Mallarmé est essentielle au diagnostic. Elle se réalise au niveau du sternum ou de la crête iliaque (la moelle des os plats étant le siège essentiel de l'hématopoïèse chez les individus de plus de 4 ans), et au niveau du tibia chez les nourrissons. Elle nécessite une anesthésie générale chez les enfants en bas âge.

Elle permet d'affirmer le diagnostic lorsque le décompte des blastes dépasse 20% des cellules nucléées hématopoïétiques. La richesse médullaire est généralement augmentée à cause de l'envahissement par les cellules malignes, alors que les lignées médullaires normales (lignées granuleuse, érythroblastique et mégacaryocytaire) sont diminuées. L'envahissement est variable, jusqu'à la quasi-absence des cellules normales de la moelle osseuse. L'aspect des lymphoblastes de la moelle osseuse est généralement proche de celui des lymphoblastes circulants (Fig 5).

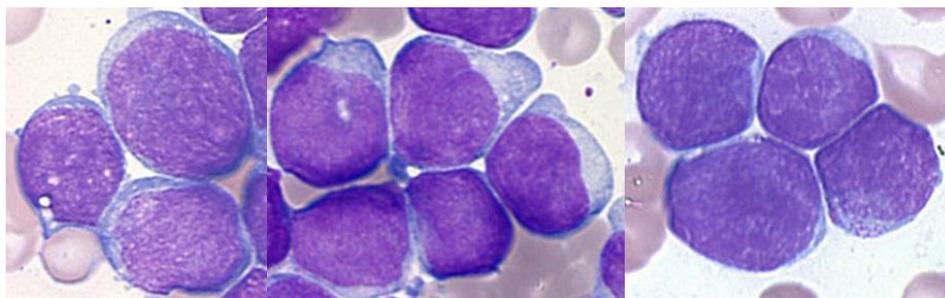


Fig 5. Lymphoblastes médullaires. Images en microscopie optique objectif x100 après coloration May Grünwald Giemsa, issues des prélèvements de trois patients différents.

En cas de difficulté à réaliser l'aspiration médullaire, une biopsie ostéo-médullaire, permettant de prélever une carotte de moelle osseuse, peut s'avérer nécessaire.

1.2.1.2.3 L'immunophénotypage des blastes

Il est réalisé sur un prélèvement de moelle osseuse ou à défaut sur du sang si la blastose sanguine est suffisante.

Il permet la distinction entre lymphoblastes et blastes myéloïdes via l'utilisation d'anticorps marqués ciblant des antigènes de surface ou intracytoplasmiques des cellules.

Ces antigènes varient suivant le type de cellule, myéloïde ou lymphoïde, et en fonction de la différenciation de la cellule.

Le marquage est détecté cellule par cellule par la mesure de la fluorescence émise.

Les marqueurs CD45, antigène panleucocytaire, et CD34, marqueur d'immatunité des cellules hématopoïétiques, permettent de centrer l'analyse sur les blastes.

Au sein des blastes, les marqueurs myéloïdes (CD13, CD33 et CD117) sont généralement négatifs bien qu'il existe une expression aberrante de marqueurs myéloïdes dans certaines LAL (notamment les LAL avec un réarrangement BCR-ABL1). L'immunophénotypage est une analyse majeure pour différencier les LAL et les LAM lorsque l'analyse morphologique ne permet pas de trancher. Il permet également de différencier les LAL B et les LAL T. Toutes les LAL B ont au moins deux des trois antigènes suivants : CD19, CD22 (de surface ou cytoplasmique) et CD79a cytoplasmique.

Les autres marqueurs lymphoïdes, CD10, chaîne μ intracytoplasmique et immunoglobulines de surface, permettent de classer la LAL selon la classification de l'EGIL (European Group for the Immunological characterization of Leukemias) (Tab 1). Elle reprend les stades normaux de maturation des cellules lymphoïdes dans la moelle osseuse et le thymus, de B-I le plus immature, à B-IV le plus mature. La LAL B-II, également appelée LAL B commune est la plus fréquente.

	cCD79a, CD22, CD19	CD10	μ	Ig de surface
B-I (Pro-B)	+	-	-	-
B-II (B commune)	+	+	-	-
B-III (Pré-B)	+	+	+	-
B-IV (B mature)	+	+/-	+/-	+

Tableau 1. Classification de l'EGIL. μ : chaîne μ intracytoplasmique. cCD79a : CD79a cytoplasmique.

La cytométrie en flux est un outil qui permet également le calcul de l'index ADN. Cet index reflète le nombre de chromosomes présent par cellule et permet l'identification d'hyperdiploïdies lorsque le ratio dépasse 1,16 et d'hypodiploïdies lorsque le ratio est inférieur à 0,85. Il est particulièrement utile lors des échecs de culture ou lorsqu'un clone hypodiploïde dupliqué mime une hyperdiploïdie (voir plus loin) mais il n'est pas réalisé dans tous les centres.

Enfin, la cytométrie en flux permet de réaliser le suivi des patients car elle est l'un des moyens de mesure de la maladie résiduelle (l'autre méthode étant la biologie moléculaire).

1.2.1.3 Le statut génétique des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par la présence d'anomalies génétiques pouvant impacter des gènes suppresseurs de tumeur et des oncogènes, qui sont le substrat du développement de la maladie. Sous l'entité commune de LAL, différents sous-groupes homogènes de la maladie existent. Les voies de leucémogénèse sont variées, les caractéristiques génétiques et épigénétiques différentes et la réponse thérapeutique plus ou moins favorable, tous ces critères étant intriqués.

L'étude génétique des cancers est basée principalement sur la cytogénétique de manière historique. Elle est au fil des années devenue l'un des piliers de la stratification du risque des hémopathies malignes. Cette technique est actuellement renforcée par la FISH et la biologie moléculaire qui contrairement au caryotype sont des méthodes ciblées, mais plus sensibles pour la détection d'anomalies de petite taille (à l'échelle de 200 kb pour la FISH, et jusqu'à l'échelle de la base pour les techniques de séquençage).

La biologie moléculaire a par ailleurs un rôle majeur, en parallèle de la cytométrie en flux, pour la détermination de la maladie résiduelle du fait d'une grande sensibilité. Elle est applicable à la très grande majorité des LAL par la quantification des réarrangements clonaux des Ig/TCR, qui sont identifiés dans la quasi-totalité des LAL (voir partie méthodes). La quantification des transcrits de fusion permet également le suivi de la maladie résiduelle, mais n'est possible que si un gène de fusion est présent.

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) reconnaît un certain nombre d'anomalies récurrentes dans la LAL B. On identifie des anomalies de nombres (gains ou pertes de chromosomes entiers) et des anomalies de structure (translocation, délétion, inversion, amplification...). Les anomalies de structure les plus significatives dans les LAL sont les translocations réciproques.

La classification OMS sépare les LAL avec anomalies génétiques récurrentes, des autres dites « not otherwise specified » (B other). La classification de 2008 retient sept anomalies récurrentes. Elle a été mise à jour en 2016, avec l'intégration de deux autres anomalies récurrentes.

Chez l'enfant, deux anomalies représentent à elles seules 50% des LAL pédiatriques, l'hyperdiploïdie et la translocation t(12;21).

La plus fréquente est l'hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes. Les gains chromosomiques ne sont pas aléatoires et concernent le plus souvent les chromosomes X, 4, 6, 10, 17, 18 et 21. Le chromosome 21 est fréquemment en quatre exemplaires. Les hyperdiploïdies à plus de 54 chromosomes sont particulièrement de bon pronostic, et celles à plus de 57 chromosomes avoisinent 100% de survie globale⁸.

La translocation t(12;21)(p13;q22) est cryptique c'est-à-dire invisible au caryotype. Elle est fréquemment accompagnée par une ou plusieurs anomalies caryotypiques : trisomie 21, délétion 9p, délétion 12p ou tétraploïdie⁹. Elle réarrange les gènes *ETV6* et *RUNX1* et est détectable en FISH par une sonde de fusion *ETV6-RUNX1*. La translocation t(12;21) est une anomalie de bon pronostic, avec néanmoins des rechutes tardives mais qui répondent bien à la chimiothérapie.

La sonde *ETV6-RUNX1* permet également de détecter les amplifications intrachromosomiques du chromosome 21 (iAMP21), ainsi que de suggérer les hyperdiploïdies méconnues au caryotype.

Le réarrangement du gène *KMT2A* (*MLL*) est une entité génétique particulièrement fréquente chez l'enfant de moins de un an et représente 80% des cas à cet âge. *KMT2A* est un gène se réarrangeant avec plus de 30 partenaires dans les LAL¹⁰. Le plus fréquent est le gène *AFF1* (*AF4*), localisé en 4q21 et réalisant la translocation t(4;11)(q21;q23). Les autres partenaires fréquents sont le gène *MLLT1* (*ENL*) en 19p13 et le gène *MLLT3* (*AF9*)

en 9p22. Ces réarrangements sont fréquemment associés à des LAL hyperleucocytaires et/ou avec envahissement du système nerveux central. Le pronostic varie en fonction du gène partenaire et de l'âge du patient mais est globalement défavorable.

La translocation t(1;19)(q23;p13) fusionne dans la très grande majorité des cas les gènes *TCF3* et *PBX1*. Très rarement, cette translocation correspond à une fusion MEF2D-DAZAP1, ces deux gènes étant localisés dans les mêmes bandes chromosomiques que les gènes *TCF3* et *PBX1*¹¹. Enfin dans un nombre limité de cas, cette translocation correspond à un gain 1q impliquant aléatoirement le chromosome 19 et sans fusion génique. Dans le cas de la fusion TCF3-PBX1, la translocation est souvent déséquilibrée et le caryotype met en évidence deux chromosomes 1 normaux, un chromosome 19 normal et un dérivé 19 issu de la translocation. Le pronostic initialement intermédiaire tend vers un pronostic favorable avec l'adaptation des protocoles de chimiothérapie. Très rarement, le gène *TCF3* peut fusionner avec le gène *HLF* par une translocation t(17;19)(q22;p13). Cette fusion est de pronostic très défavorable et est fréquemment associée à une coagulation intravasculaire disséminée et une hypercalcémie^{12,13}.

La translocation t(9;22)(q34;q11) réalise une fusion entre les gènes *BCR* et *ABL1*. C'est la première anomalie génétique récurrente acquise décrite. Le chromosome 22 dérivé de cette translocation a été baptisé chromosome Philadelphie, du nom de la ville où il a été découvert en 1960 par Peter Nowell et David Hungerford dans les leucémies myéloïdes chroniques. Depuis, il a été également identifié comme une anomalie récurrente des LAL. Alors que dans les leucémies myéloïdes chroniques les transcrits les plus fréquemment mis en évidence sont les transcrits b2a2 et b3a2 (réarrangeant l'exon 13 ou 14 du gène *BCR* avec l'exon 2 du gène *ABL1*, et traduits en une protéine de fusion de 210 kDa), le transcrit le plus fréquemment identifié dans les LAL est e1a2 (qui réarrange l'exon 2 du gène *BCR* avec l'exon 2 du gène *ABL1*, et qui est traduit en une protéine de 190kDa). Une délétion du gène *IKZF1* est associée dans 80% des cas. L'expression aberrante de marqueurs myéloïdes (CD33+ et CD13+) par les blastes est fréquente. Ces LAL sont de mauvais pronostic, malgré l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase en combinaison avec la chimiothérapie, ce qui a amélioré considérablement le pronostic des patients. C'est une anomalie rare chez l'enfant (3%) mais qui représente un quart des LAL de l'adulte.

Les LAL hypodiploïdes sont divisées en deux groupes. L'hypodiploïdie sévère à 30-39 chromosomes, et la quasi-haploïdie à 23-29 chromosomes. Les hypodiploïdies à 40-43 chromosomes sont rarissimes et de pronostic mal déterminé. Les hypodiploïdies à 44-45 chromosomes constituent un groupe à part dans lequel les fusions ETV6-RUNX1 et les chromosomes dicentriques sont fréquents¹⁴. Cette catégorie ne fait donc pas partie de l'entité des LAL hypodiploïdes. Comme dans les hyperdiploïdies, le profil n'est pas aléatoire et certains chromosomes sont plus fréquemment perdus, le chromosome 7 étant systématiquement perdu. Dans l'hypodiploïdie sévère, les chromosomes 1 et 6 sont généralement conservés. Dans la quasi-haploïdie, les chromosomes X, Y, 14, 18 et 21 sont habituellement conservés. Le clone peut se dupliquer au sein de la même cellule, et le caryotype comporte alors 46 à 78 chromosomes, constitué du dédoublement du clone hypodiploïde. La connaissance des profils de gains et de pertes de chromosomes prend alors tout son sens pour ne pas confondre ce clone dupliqué avec une LAL hyperdiploïde. A noter que l'index ADN peut être d'un grand secours dans ces situations, et montrera la coexistence du clone hypodiploïde et du clone dupliqué. Les profils transcriptionnels et mutationnels de la quasi-haploïdie et de l'hypodiploïdie sévère sont très différents. Dans la quasi-haploïdie l'altération des tyrosines kinases, des gènes de la voie RAS et du gène *IKZF3* sont fréquents, tandis que dans l'hypodiploïdie sévère, les mutations du gène *TP53* dominant^{15,16}. Celles-ci sont fréquemment constitutionnelles chez l'enfant en bas âge dans le cadre d'un syndrome de Li Fraumeni¹⁴. L'hypodiploïdie sévère est de mauvais pronostic, et la quasi-haploïdie est pire encore.

La translocation t(5;14)(q31;q32) réarrangeant le gène *IL3* avec le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines est une entité très rare mais néanmoins retenue dans la classification OMS du fait de sa présentation cytologique particulière, une forte hyperéosinophilie pouvant masquer le clone LAL.

Lors de la révision de la classification de l'OMS en 2016, deux nouvelles entités ont été ajoutées : l'amplification intrachromosomique du chromosome 21, et les LAL BCR-ABL1-like¹⁷(Tab 2).

L'amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21) est classiquement détectée par FISH, avec une sonde RUNX1 (ou ETV6-RUNX1) qui montre 5 copies ou plus du gène, ou plus de 3 copies sur le même chromosome 21 anormal en FISH

métaphasique. RUNX1 est utilisé comme marqueur de l'anomalie chromosomique, mais n'est pas considéré être à lui seul responsable de l'impact de l'iAMP21. Cette anomalie est générée par des mécanismes de type cassure-fusion-pont (breakage-fusion-bridge, survenant lors de mitoses successives suite à la perte des télomères) et chromothripsis (de chromos pour chromosome et du grec thripsis pour briser en éclats, dans lequel de multiples réarrangements chromosomiques se produisent au cours d'un seul évènement)¹⁸. Certains cas décrits suggèrent que l'instabilité du chromosome 21 peut dans certains cas aboutir non pas à un chromosome 21 anormal unique mais à plusieurs chromosomes additionnels porteurs de l'amplification^{19,20}. Cette anomalie touche 2% des enfants avec une LAL, plus fréquemment le grand enfant, et la présentation est généralement non hyperleucocytaire. C'est une anomalie de mauvais pronostic mais le traitement de type haut-risque améliore nettement le pronostic¹⁸.

Leucémie/lymphome B, NOS

Leucémie/lymphome B avec anomalies cytogénétiques récurrentes

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(v;11q23) ; MLL (maintenant KMT2A) réarrangé

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(12;21)(p13;q22) ; TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hyperdiploïdie

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hypodiploïdie

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(5;14)(q31;q32) ; IL3-IGH

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(1;19)(q23;p13.3) ; TCF3-PBX1

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B, BCR-ABL1 - like

Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec iAMP21

Tableau 2. Classification OMS 2016 des LAL B. En gras, les nouvelles catégories par rapport à la classification de 2008.

Les LAL BCR-ABL1-like ou Ph-like ont été initialement décrites sur l'observation d'un groupe de LAL non classées selon l'OMS 2008, de mauvais pronostic et présentant le même profil transcriptomique que les LAL BCR-ABL1²¹.

Les LAL Ph-like forment un groupe hétérogène partageant des caractéristiques communes. Elles présentent des anomalies des gènes des facteurs de transcription de la lignée lymphoïde B (*PAX5*, *IKZF1*), ainsi qu'une dérégulation des voies des récepteurs des cytokines (*CRLF2*) et des tyrosines kinases (*ABL1*, *PDGFRA/B*, *JAK2*). Notamment, les réarrangements du gène *CRLF2* sont fréquents. Il fusionne soit avec le gène *IGH* par translocation $t(X;14)(p22;q32)$ ou $t(Y;14)(p11;q32)$, soit avec le gène *P2RY8* par microdélétion sur un gonosome. Dans les deux cas le réarrangement entraîne une hyperexpression du récepteur de cytokines *CRLF2*. Les réarrangements des gènes des tyrosines kinases de la classe ABL, des gènes *JAK2* et du récepteur à l'EPO *EPOR*, ainsi que les mutations activatrices des voies JAK-STAT et RAS, et de façon plus rare les mutations des gènes de diverses kinases (*FLT3*, *TYK2*, *NTRK3*, *BLNK* et *PTK2B*) sont les autres anomalies génétiques identifiées dans ce groupe. Ces altérations pourraient constituer des cibles thérapeutiques. Les réarrangements des gènes des tyrosines kinases de la classe ABL (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRA* et *PDGFRB*) répondent aux inhibiteurs de tyrosines kinases tels que l'imatinib et le dasatinib²², tandis que les LAL avec activation de la voie JAK-STAT sont sensibles aux inhibiteurs de JAK2 dans les essais précliniques²³. Néanmoins, l'identification en routine des LAL Ph-like est difficile, du fait de leur définition transcriptomique et de l'absence actuelle d'utilisation de cette technique dans les laboratoires de diagnostic. L'identification des réarrangements du gène *CRLF2*, qui sont les anomalies les plus fréquentes, est réalisée en FISH.

Les catégories cytogénétiques des LAL B de notre cohorte ont été assignées suivant la classification OMS 2016. Lorsqu'aucune anomalie génétique de la classification n'était identifiée, la maladie était assignée à la catégorie LAL « B other ».

D'autres classes génétiques sont en train d'émerger, tels que les réarrangements des gènes *MEF2D* et *ZNF384*, et les dérégulations de *DUX4/ERG*²⁴.

1.2.2 La définition du pronostic

Nous avons d'ores et déjà introduit certains facteurs pronostics tels que la maladie résiduelle ou les caractéristiques génétiques. Nous allons maintenant les aborder de façon succincte mais plus exhaustive. Les facteurs pronostics classiquement reconnus

comprennent des facteurs liés au patient, des facteurs liés à la maladie, et des facteurs liés à la réponse au traitement.

Le principal facteur lié au patient est l'âge. La survenue d'une LAL chez le nouveau-né et le nourrisson (soit avant un an) est de mauvais pronostic. Ceci est en grande partie lié à la fréquence élevée des remaniements du gène *KMT2A*, qui est une anomalie de pronostic péjoratif. Entre un et quatre ans, au pic d'incidence de la maladie chez l'enfant, le pronostic est plus favorable. Il décroît ensuite jusqu'à l'adolescence où le pronostic est le plus défavorable.

L'un des facteurs liés à la maladie est la leucocytose au diagnostic. Un chiffre élevé est en faveur d'une « masse tumorale » forte et est indicatrice d'une maladie plus agressive. L'envahissement de sites extramédullaires est également défavorable, en particulier l'envahissement du système nerveux central, peu accessible à la chimiothérapie et qui nécessite des injections intrathécales. Les caractéristiques génétiques du clone tumoral sont un indicateur fort du risque de résistance au traitement et du risque de rechute.

Enfin, la bonne réponse au traitement et l'élimination rapide des cellules tumorales sont en faveur d'une évolution ultérieure favorable. La corticosensibilité est évaluée à J8 du traitement par le taux de blastes circulants. La chimiosensibilité est définie par un myélogramme (taux de blastes < 5% après 7 jours de chimiothérapie d'induction). Enfin, la maladie résiduelle (MRD) en cytométrie en flux et/ou en biologie moléculaire (par suivi du taux d'un transcrite ou du réarrangement clonal Ig/TCR) en post-induction et au cours de la consolidation est un facteur prédictif fort de rechute quand celle-ci est élevée.

La combinaison de ces marqueurs de risque permet d'adapter le traitement : plan et posologies de la chimiothérapie, utilisation de thérapies ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinase dans les LAL BCR-ABL1 et certaines LAL Ph-like) et choix de greffe hétérologue de cellules souches hématopoïétiques.

1.2.3 Le traitement

Le traitement des LAL comprend classiquement une préphase de corticothérapie d'une semaine permettant la diminution de la masse tumorale, suivie de plusieurs séquences de polychimiothérapie. L'induction et la consolidation ont pour objectif l'élimination du

clone tumoral. Des injections intrathécales de méthotrexate sont réalisées à visée préventive ou curative. Une greffe de CSH peut être nécessaire suivant les critères cités plus haut. Enfin un traitement d'entretien de longue durée (de l'ordre de 2 ans, variable selon les protocoles et le sexe) permet dans de nombreux cas la prévention efficace de rechute.

2 La place de la CGH array dans la LAL

2.1 Les limites des méthodes « traditionnelles » du diagnostic génétique

Le caryotype est une analyse génétique non ciblée, en ceci qu'elle permet de visualiser l'intégralité du génome d'une cellule maligne. Sa résolution est néanmoins faible (10-20 Mb), limitée par la taille du chromosome et à ce que l'œil peut voir. De plus, elle dépend beaucoup de la morphologie des chromosomes après culture. Or, dans le cas de cellules malignes, la morphologie est parfois altérée. Ceci est particulièrement vrai pour les lymphoblastes dont les chromosomes peuvent être difficilement reconnaissables, et les anomalies chromosomiques d'autant plus difficiles à identifier.

La FISH a une meilleure résolution (de l'ordre de 200 kb, selon les sondes utilisées), mais l'analyse est nécessairement ciblée et ne permet pas d'avoir une vision globale des anomalies. Il en est de même pour le séquençage classique et la RT-PCR.

La CGH array a une place dans le diagnostic du fait de sa couverture globale et de sa bonne résolution.

2.2 Historique : la CGH sur étalement métaphasique

L'hybridation génomique comparative a été initialement développée sur étalements chromosomiques (CGH : comparative genomic hybridization). Au début des années 1990, Anne Kallionemi décrit cette technique qu'elle a développée avec son équipe dans un article paru dans Science²⁵ (Fig 6). Elle extrait de l'ADN de lignées cellulaires tumorales à laquelle elle intègre de la biotine par nick translation. Un ADN de référence est marqué de la même manière par de la digoxigénine. Les deux ADN sont simultanément hybridés sur

un étalement métaphasique issu d'un témoin sain, avec un ADN Cot-1 (ADN contenant la plupart des séquences répétitives du génome et pratiquement aucune des séquences uniques, non répétitives, il permet de limiter l'hybridation non spécifique). La préparation est ensuite incubée avec de l'avidine marquée à la rhodamine (fluorescence rouge) et un anticorps anti-digoxigénine marqué au FITC (fluorescence verte). L'hybridation de l'ADN tumoral est ainsi mesurée par la fluorescence rouge, tandis que l'hybridation de l'ADN de référence est mesurée par la fluorescence verte. Les quantités relatives d'ADN tumoral et de référence liées à un certain locus dépendent de l'abondance relative de ces séquences dans les deux ADN, qui peut être mesurée par le ratio de fluorescence rouge/verte. Ainsi, la duplication ou l'amplification d'un locus dans l'ADN tumoral entraîne une augmentation du ratio rouge/vert, tandis qu'une délétion entraîne une diminution de ce ratio.

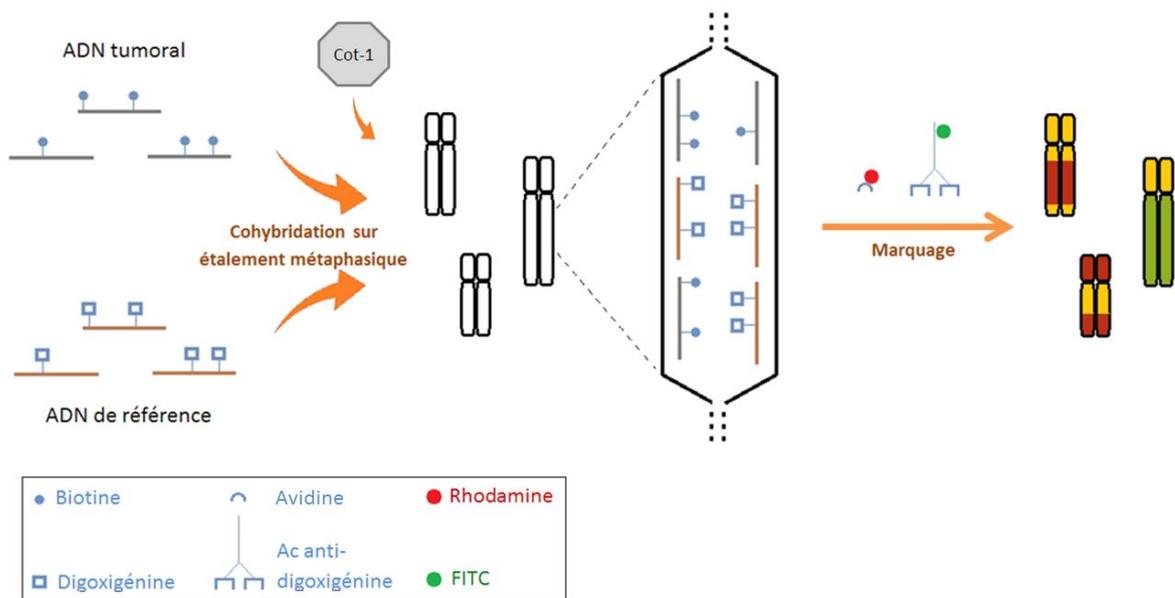


Fig 6. Schéma de la CGH suivant le protocole décrit par Kallioniemi *et al.* en 1992²⁵.

Cette technique a été largement utilisée à l'époque en recherche et a permis d'identifier de nouvelles régions associées aux cancers^{26,27}.

Alors que la CGH avait été principalement utilisée dans les cancers solides, en 1998 Larramendy *et al.* applique cette technique aux LAL²⁸. Les techniques de culture sont à l'époque moins efficaces que celles utilisées aujourd'hui, et le caryotype est un échec

(moins de 20 mitoses analysables sans anomalie détectée) dans plus d'un tiers des cas²⁹. La CGH, qui ne nécessite pas de métaphases clonales puisque ce sont des métaphases de témoin sain qui sont utilisées, présente donc un atout majeur. Dans l'étude de Larramendy, dans un échec du caryotype sur 5, la CGH a permis d'apporter des informations, et dans plus d'un cas sur 3 elle apportait un complément d'information au caryotype. La CGH se présente comme une technique prometteuse pour l'étude génétique des LAL.

Il est intéressant de noter qu'aujourd'hui encore, le caryotype des LAL est l'un des plus difficiles en onco-hématologie. Le taux d'échec est faible mais les chromosomes ont dans la très grande majorité des cas une morphologie très altérée. En guise d'exemple, le taux d'échec des caryotypes de LAL au CHU de Toulouse oscille entre 2 et 3% selon les années.

2.3 L'avancée technologique de la CGH array

La CGH a elle aussi évolué et est maintenant réalisée par hybridation sur des séquences d'ADN courtes et non plus sur chromosomes. La résolution a considérablement augmenté. Alors que la CGH hybride des fragments d'ADN de 600 à 2500 kb sur quelques étalements chromosomiques, les puces à ADN sont recouvertes de millions de sondes, généralement des sondes oligonucléotidiques de 25 à 200 pb, autorisant une résolution de l'ordre du kilobase, soit bien supérieure aux 10-20 Mb du caryotype, ou aux 5-10 Mb de la CGH sur chromosome.

Deux types de puces sont disponibles. Les puces pangénomiques ont des sondes qui couvrent l'intégralité du génome, de la manière la plus uniforme possible. Au contraire, les puces ciblées ont des sondes couvrant des régions d'intérêt, qui varient en fonction de la pathologie analysée. Il existe également des puces ciblées sur un chromosome, ou sur les régions codantes.

La sensibilité, bien que limitée, a également progressé et permet la détection d'anomalies récurrentes. Lorsque la blastose est inférieure à 20%, la CGH array ne permet pas dans la plupart des cas la détection des anomalies du clone. Néanmoins, dans les LAL, l'infiltration blastique est majeure dans la plupart des cas, dépassant 80%. C'est donc plus la détection de sous-clones de petite taille qui peut être mise en échec.

Malgré la progression technologique, le principe de la CGH array est similaire à celui de la CGH. L'ADN de l'échantillon est extrait, fragmenté et marqué. Il est hybridé sur la puce, soit seul, soit en même temps qu'un ADN témoin marqué différemment. La puce est scannée pour détecter la fluorescence, les données sont analysées sur un logiciel dédié et traduites en gain ou perte de matériel chromosomique, également appelés CNV pour copy number variant (Fig 7).

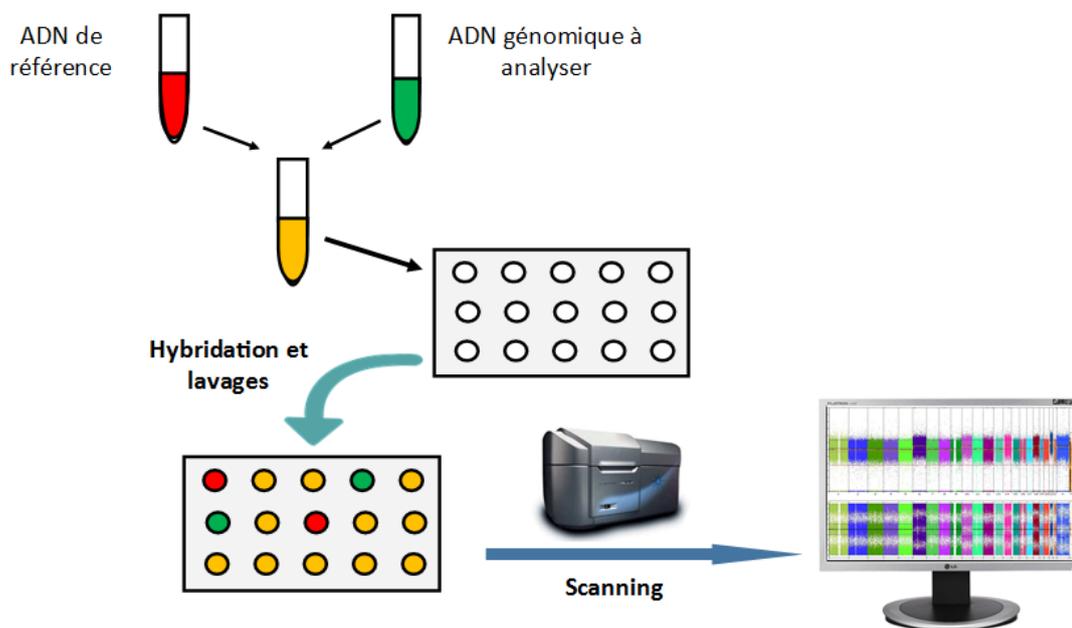


Fig 7. Schéma du principe de la CGH array

2.4 La SNP array

Un SNP (Single Nucleotid Polymorphism) est la variation génétique d'un nucléotide. Il doit par définition apparaître dans au moins 1% de la population et n'avoir aucune conséquence directe (phénotypique ou pathologique). La SNP array est utilisée pour le génotypage des populations. Elle est par ailleurs utile dans les pathologies malignes pour détecter les pertes d'hétérozygotie (LOH) ainsi que les disomies uniparentales (UPD). La perte d'hétérozygotie correspond à la présence d'un seul allèle à un locus donné, avec perte du second allèle. Elle peut être consécutive à la délétion d'une région génomique, et dans certains cas à la délétion d'une région avec duplication de la région restante. Dans le second cas, il y a une perte d'hétérozygotie avec un nombre normal de copies, il s'agit

de la disomie uniparentale (présence de deux copies par délétion de la copie qui provient d'un parent, et duplication de la copie qui provient de l'autre parent) (Fig 8).



Fig 8. Représentation schématique des LOH.

Les UPD ont une conséquence pathologique lorsqu'ils concernent un gène muté, avec perte de l'allèle normal et duplication du mutant.

Les LOH par délétion seule peuvent être leucémogènes par insuffisance allélique ou par délétion d'un allèle fonctionnel unique, l'autre allèle étant muté.

La puce utilisée dans ce travail permet la détection de certains SNP, permettant une analyse éventuelle de génotypage.

3 Objectifs de l'étude

A l'ère du NGS, certaines techniques d'étude du génome telle que la CGH array sont en perte de vitesse. Néanmoins cette technique constitue un outil d'étude du génome dans sa globalité et avec une résolution élevée. Cette technique est récente et a encore une contribution à apporter à la connaissance des cancers, dont les LAL.

Notre objectif principal est de réaliser une analyse statistique des résultats de CGH array d'une cohorte de patients pédiatriques ayant une LAL B, afin d'identifier des marqueurs pronostiques complémentaires à la classification pronostique existante.

Celle-ci est imparfaite est en constante évaluation et évolution. Certains patients atteints de LAL B sans facteur pronostique péjoratif, voire avec des caractéristiques permettant selon les connaissances actuelles de prévoir une bonne évolution, rechutent contre toute attente. L'identification de nouveaux facteurs pronostiques pourrait permettre d'identifier ces patients dès le diagnostic et d'adapter le traitement.

Les taux de survie étant heureusement élevés dans les LAL, notre cohorte n'est pas de taille suffisante pour réaliser une analyse de survie avec une puissance statistique satisfaisante. Nous avons donc choisi d'utiliser la maladie résiduelle mesurée en post-induction comme critère pour distinguer les LAL de pronostic favorable ou défavorable. Il s'agit donc d'un critère intermédiaire qui reflète avant tout la réponse au traitement.

Nous rechercherons des facteurs pronostiques globaux dans un premier temps, puis dans différents sous-groupes génétiques.

Nous nous intéresserons également à d'autres problématiques, telle que la concordance entre les résultats de CGH array et le caryotype, à travers l'exemple des LAL hyperdiploïdes, ainsi qu'à l'apport de cette technique pour le diagnostic de certaines entités génétiques, telles que les LAL Ph-like et les iAMP21.

4 Matériel et méthodes

4.1 Recueil de données

Le recueil de cas a été principalement réalisé auprès de huit centres hospitaliers universitaires, Amiens, Lille, Lyon, Marseille, Poitiers, Reims, Rouen et Toulouse. Le CHU de Bordeaux et l'hôpital Saint-Louis ont été interrogés pour un cas chacun. Le recueil des données a été réalisé grâce à l'aimable collaboration des biologistes, des pédiatres et des attachés de recherche clinique. Tous les cas de LAL pour lesquels une analyse CGH array a été réalisée ont été recensés. Les analyses CGH array et de maladie résiduelle Ig/TCR des patients de Toulouse et de Bordeaux ont été réalisées au laboratoire du CHU de Toulouse, celles des autres centres ont été réalisées au laboratoire du CHU de Lille. Le laboratoire de Lille a réalisé les analyses de CGH array de manière prospective. Le laboratoire de Toulouse a réalisé les analyses de CGH array de manière prospective pour les diagnostics

établis entre 2012 et 2013, et de manière rétrospective pour les diagnostics antérieurs, le diagnostic le plus ancien datant de 2004. Les critères d'inclusion sont les LAL B pédiatriques au diagnostic pour lesquels les données pouvaient être recueillies. Nous avons donc exclu les LAL T, les patients de 18 ans et plus et les rechutes. Suite au constat de la moins bonne qualité des résultats de CGH array réalisés sur la puce à ADN Whole Genome en comparaison des puces Cytoscan HD, et pour conserver l'homogénéité des résultats, les premières ont été retirées de l'analyse.

Les données recueillies comprennent des données démographiques : âge au diagnostic et sexe ; des données d'évolution : rechute, décès, durée du suivi ; des données biologiques : taux de leucocytes sanguin, résultats des analyses classiques de génétique (caryotype, FISH et biologie moléculaire), la maladie résiduelle IgTCR en post-induction (MRD1) et en cours de consolidation (MRD2) ; ainsi que des données de prise en charge : le protocole dans lequel a été inclus le patient ou à défaut d'inclusion, le protocole qui a été suivi pour la prise en charge, et la notion de greffe.

4.2 CGH array Cytoscan HD

4.2.1 Description de la technique

L'analyse a été réalisée par sur la puce Cytoscan™ HD d'Affymetrix, suivant les recommandations du fournisseur (Fig 9 et 10).

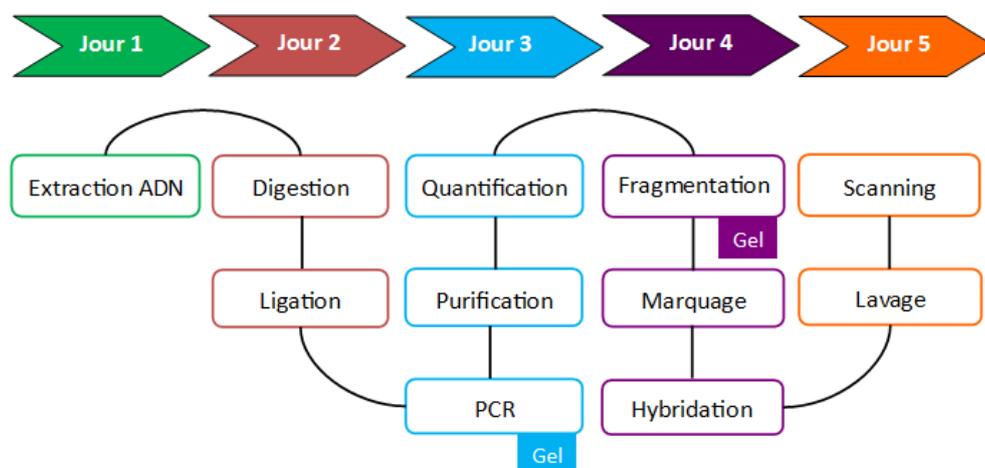


Fig 9. Workflow du Cytoscan™ assay

L'ADN est extrait d'un prélèvement médullaire réalisé sur tube EDTA par la méthode Qiagen. Il est quantifié par Nanodrop et dilué à 50 ng/μL avec un tampon low EDTA TE.

Les échantillons sont distribués sur plaque 96 puits avec un mix de digestion contenant l'enzyme de restriction NspI.

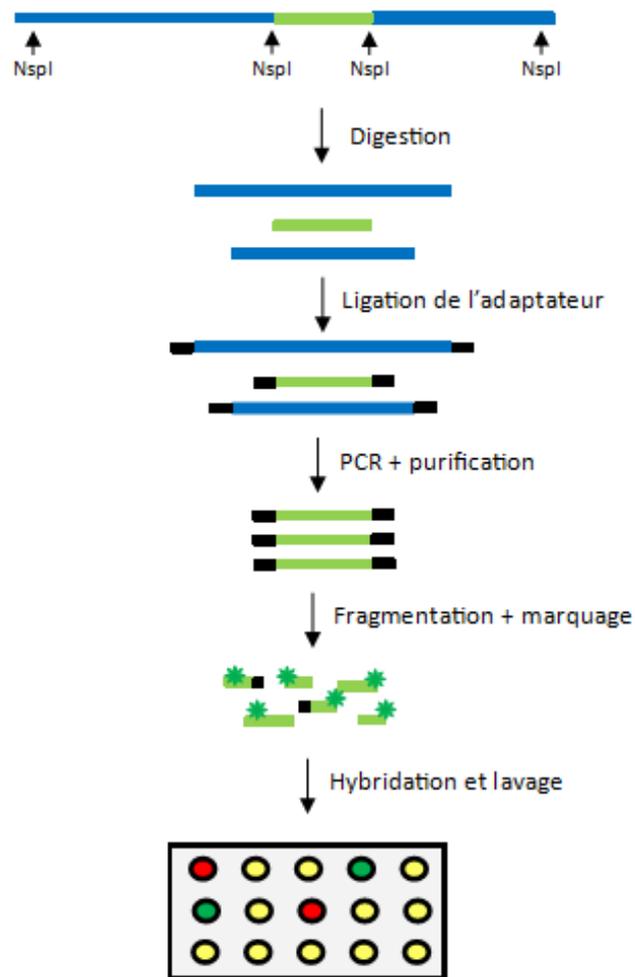


Fig 10. Schéma des étapes du Cytoscan™ assay. NspI : enzyme de restriction

Des adaptateurs sont ensuite liés aux extrémités des fragments digérés. Ils contiennent la séquence complémentaire des amorces qui sont utilisées pour l'amplification par PCR à l'étape suivante. L'amplification est contrôlée par migration sur gel. Pour chaque échantillon, quatre PCR sont réalisées. Les produits de la PCR sont ensuite poolés, purifiés et quantifiés.

Les amplicons poolés sont fragmentés par la DNase I, avec un contrôle par migration sur gel d'électrophorèse. Ils sont ensuite marqués par l'intermédiaire de l'enzyme terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT), qui permet l'insertion de nucléotides marqués au sein des séquences d'ADN. Les fragments d'ADN ainsi marqués sont dénaturés et chargés sur la puce. L'hybridation dure 16 à 18h, à 50°C.

Après lavage, la puce est scannée pour la détection du signal fluorescent générant un fichier .cel chargé sur le logiciel Nexus Copy Number™ pour analyse. A noter que le logiciel ChAS™ a également été utilisé pour la relecture individuelle de quelques résultats, ce logiciel permettant une visualisation plus facile.

4.2.2 Caractéristiques de la puce Cytoscan™ HD

La puce Cytoscan™ HD est une puce pangénomique, c'est-à-dire que les sondes à sa surface sont réparties sur l'ensemble du génome humain. C'est une puce à très haute résolution. Elle est constituée de 2,7 millions de sondes, 750 000 pour la détection de SNP et les autres pour la détection de CNV. Les sondes couvrent plus précisément 526 gènes associés aux cancers, avec un espacement moyen de 550 bases entre chaque sonde. Elles couvrent également des gènes associés à des pathologies constitutionnelles. Au total, plus de 36 000 gènes référencés par le projet NCBI Reference Sequence sont couverts (96%) avec au minimum 25 sondes par 100 kb.

4.2.3 Nexus copy number

Nexus copy number, abrégé Nexus dans la suite de ce document, est un logiciel d'interface permettant la visualisation des résultats de CGH array, de SNP array et également de séquençage NGS. Une licence annuelle de ce logiciel a été spécifiquement acquis par le laboratoire pour l'analyse des résultats de notre cohorte de patients grâce au don de l'association 111 des Arts.

Lorsqu'on visualise individuellement un échantillon, une piste représente le log R ratio et l'autre la fréquence du polymorphisme. De façon simplifiée, le log R ratio correspond à la quantification d'une région génomique. C'est le logarithme du rapport du nombre de copies pour un marqueur (qui correspond à une sonde de la puce à ADN) entre l'ADN de

l'échantillon et l'ADN de référence. Un log R ratio nul correspond à un nombre de copies équivalent entre l'échantillon et la référence. Un log R ratio négatif correspond à une délétion du marqueur dans l'échantillon, et un log R ratio positif correspond à un gain du marqueur dans l'échantillon (Fig 11).

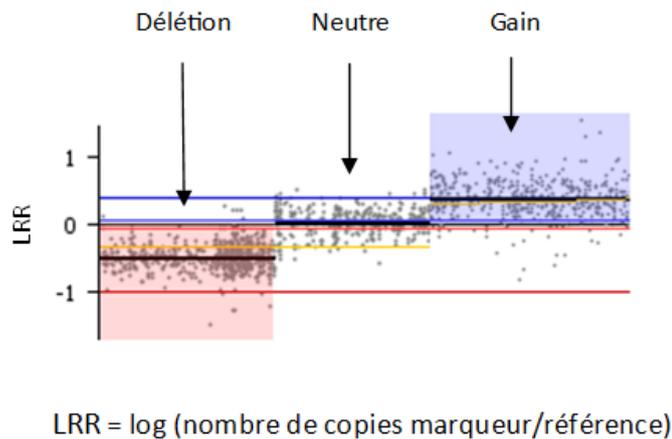


Fig 11. Log R ratio (LRR) d'une délétion et d'un gain.

L'évaluation du polymorphisme se fait sur la mesure de la fréquence de l'allèle alternatif B. Normalement, la moitié du génome d'un individu est d'origine paternelle, et l'autre moitié est d'origine maternelle. Pour chaque SNP, un individu peut être soit homozygote lorsqu'il a reçu le même allèle de ses deux parents (AA ou BB, ce qui correspond à une fréquence de l'allèle B de 0% ou de 100%, respectivement), soit hétérozygote lorsqu'il a reçu deux allèles différents (AB, avec une fréquence de l'allèle B de 50%). Dans une situation normale, les SNP sont donc répartis selon ces trois fréquences, 0, 50 ou 100%. En cas de délétion d'une région génomique, le génotype est soit A (fréquence de l'allèle B = 0%), soit B (fréquence de l'allèle B = 100%) et la fréquence de l'allèle B de 50% est perdue, c'est ce qu'on appelle la perte d'hétérozygotie (LOH). Ces pourcentages sont également observés dans les disomies uniparentales (UPD) où une région parentale est délétée et la région correspondante issue de l'autre parent est dupliquée (génotype AA ou BB). Ces anomalies ne peuvent pas être vues sur une sonde unique mais sur plusieurs sondes consécutives dont aucune ne présente la fréquence de l'allèle B de 50%.

En cas de gain d'une copie, les génotypes seront AAA, BBB, AAB et BBA, et les fréquences de l'allèle B 0, 100, 33 et 66% respectivement.

L'analyse de la fréquence de l'allèle B dans les cas de cancer est compliquée par la coexistence dans l'échantillon de cellules saines et de cellules malignes générant une mosaïque. La fréquence de l'allèle B pour un SNP sera alors intermédiaire entre la fréquence de l'allèle B dans les cellules saines et les cellules malignes (Fig 12).

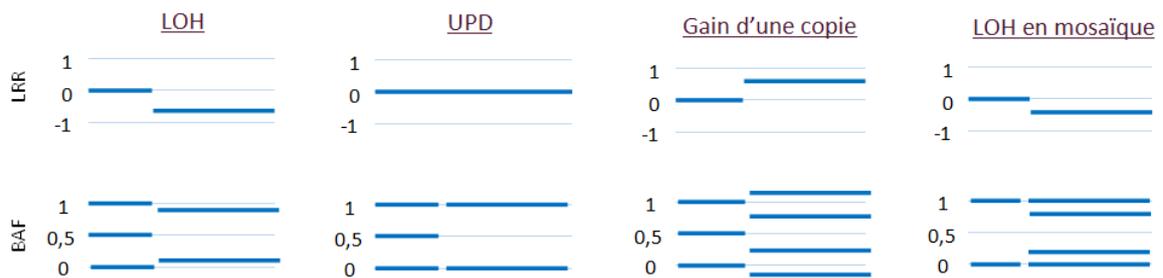


Fig 12. Représentation du log R ratio (LRR) et de la fréquence de l'allèle B (BAF) pour quatre situations pathologiques courantes.

Contrairement au logiciel ChAS du fournisseur de la puce Cytoscan HD, Nexus permet de consulter simultanément les résultats de plusieurs échantillons. Il est adapté à l'analyse de grandes séries, et possède des outils permettant la réalisation d'analyses de survie.

La recherche de CNV par locus ou par gène est possible et permet le tri de tous les échantillons présentant un CNV particulier. Les variants non pathogènes du nombre de copies sont exclus par comparaison des CNV obtenus avec les anomalies non pathogènes recensées dans la Database of Genomic Variant (DGV). Un recouvrement de plus de 50% fait exclure le CNV. Les anomalies restantes sont considérées comme des CNA, c'est-à-dire des CNV associés à la pathologie. Dans le sens inverse, un outil appelé GISTIC (genomic identification of significant targets in cancer) permet la recherche de régions significativement délétées ou amplifiées dans un groupe d'échantillons.

4.2.3.1 GISTIC

GISTIC est un outil mathématique développé par Beroukhim *et al.* pour identifier les CNA significativement associés aux cancers, et qui a été initialement validé sur une tumeur solide, le gliome³⁰. Il a ensuite été utilisé dans d'autres cancers et a permis l'identification de nouvelles régions génomiques associées aux cancers³¹. Deux auteurs ont utilisé cet outil pour la recherche de CNA dans les LAL, dont R. Beroukhim^{31,32}. L'outil GISTIC est intégré au logiciel Nexus.

La méthode procède en deux étapes. Premièrement un score (G-score) est calculé, il prend en compte la fréquence de survenue d'un CNA au sein de la cohorte et sa taille. C'est un score d'amplitude de l'anomalie. Ensuite, le G-score est comparé aux scores de résultats qui seraient dus au hasard grâce à un test de permutations. Ceci permet de calculer la valeur q-bound qui correspond à la probabilité que l'anomalie étudiée soit due au hasard (Fig 13).

Pour l'analyse, nous avons choisi un q-bound à 0,05, ce qui correspond à une probabilité que l'anomalie soit due au hasard de 5%.

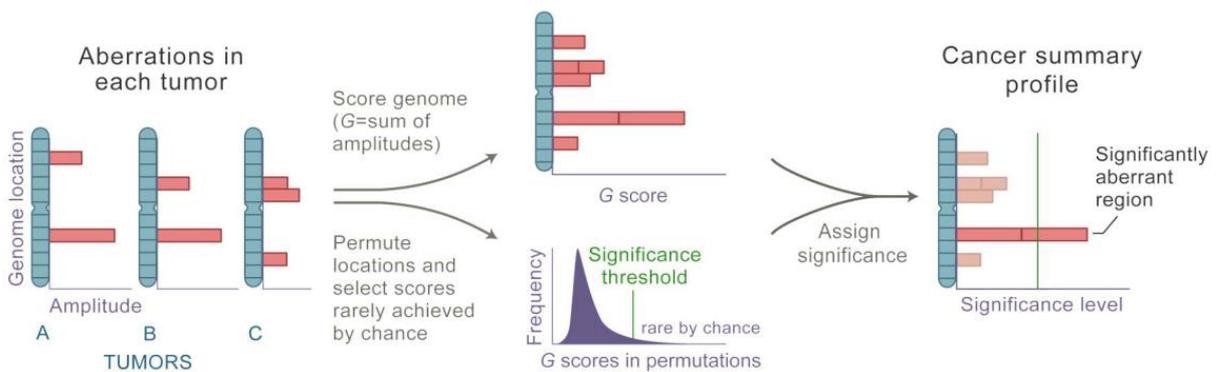


Fig 13. Etapes de la méthode GISTIC. Extrait de Beroukhim *et al.*³⁰

4.2.3.2 Méthodologie de l'analyse sur Nexus

Pour répondre à l'objectif principal de notre étude, l'extraction des résultats depuis le logiciel Nexus s'est déroulée en trois étapes.

Dans un premier temps, nous avons recherché neuf CNA récurrents connus dans les LAL B grâce à l'outil de requête de Nexus. Les anomalies trouvées ont été vérifiées individuellement sur le profil de log R ratio, et leur taille a été recensée (focal, large, délétion d'un bras d'un chromosome ou du chromosome entier) ainsi que les exons impliqués dans le cas des délétions focales. Les CNA concernés sont les délétions sur les gènes *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B*, *ETV6*, *RB1*, *TP53*, *BTG1*, *ERG* et *EBF1*. Ils ont été sélectionnés parmi les autres CNA récurrents connus en raison de leur fréquence et/ou de leur impact pronostique³³⁻³⁷.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché tous les CNA qui n'étaient statistiquement pas dus au hasard grâce à l'outil GISTIC. Cette approche, complémentaire de la première, permet la recherche des CNA les plus fortement associés à la maladie.

Enfin une analyse de survie est réalisée pour rechercher les CNA ayant un impact pronostic. Pour cela, un facteur doit être choisi pour classer les LAL en pronostic favorable ou défavorable, et comparer les CNA entre les deux groupes. La survie est le critère pronostic le plus fort. Les taux de survie sont élevés dans les LAL (224/236 patients de notre cohorte sont en vie), et l'utilisation de ce paramètre ne permet donc pas une puissance statistique suffisante. En deuxième intention, nous avons choisi d'utiliser la première maladie résiduelle (réalisée en post-induction) mesurée par la méthode Ig/TCR comme évènement pour distinguer une maladie de bon pronostic ($MRD1 < 10^{-3}$) d'une maladie de mauvais pronostic ($MRD1 > 10^{-3}$). Ce seuil est celui généralement utilisé dans les protocoles de recherche clinique pour évaluer la réponse au traitement et décider d'un éventuel changement de bras de traitement. C'est un marqueur pronostic fort. L'analyse a été effectuée dans la cohorte globale puis dans deux sous-groupes génétiques fortement représentés, les hyperdiploïdies et les LAL B other. Le projet initial prévoyait d'explorer également le groupe des translocations t(12;21) TCF3-PBX1, mais un seul patient ayant une MRD1 dépassant le seuil, les résultats ne seraient pas probants. L'objectif est d'identifier des CNA marqueurs de pronostic favorable ou défavorable au sein de ces différentes catégories, ce qui pourrait permettre d'affiner la stratification pronostique existante.

D'autres questions d'intérêt ont été abordées, notamment la corrélation entre les résultats du caryotype et de la CGH array, dont nous décrivons les résultats plus loin.

Au préalable, une longue étape de réglage du logiciel a été nécessaire pour pouvoir extraire les données de façon pertinente.

4.2.3.3 Les réglages réalisés

4.2.3.3.1 Normalisation du log R ratio des aneuploïdies

La valeur nulle du log R ratio, correspondant à la présence d'un marqueur en 2 copies (absence de CNV), est calculée par Nexus comme la moyenne des log R ratios de toutes les sondes. Cette méthode n'est pas adaptée pour les aneuploïdies, le log R ratio nul est surestimé dans les hyperdiploïdies, et sous-estimé dans les hypodiploïdies. Il a été normalisé manuellement sur les régions diploïdes (en général sur les chromosomes 2 et 3 pour les hyperdiploïdies, et au cas par cas pour les hypodiploïdies) pour les 88 échantillons aneuploïdes (84 hyperdiploïdies et 5 hypodiploïdies). 32 autres pistes de log R ratio ont dû être normalisées (cas de gains ou de délétions de chromosomes entiers ou partiels n'entrant pas dans le cadre des hyperdiploïdies et des hypodiploïdies mais faisant dévier la piste de log R ratio).

4.2.3.3.2 Choix des seuils de taille des CNA

Les CNA couvrent des régions génomiques plus ou moins grandes, allant de quelques paires de bases à un chromosome entier. Dans le cas de la délétion d'un chromosome entier, des milliers de sondes présentent un log R ratio diminué, et la délétion ne fait généralement pas de doute. Au contraire, concernant les délétions de très petite taille, le nombre de sondes recouvrant la région peut être faible. Si seulement quelques sondes présentent un log R ratio diminué, il devient nécessaire de faire la distinction entre un artefact et une authentique délétion.

Pour cela, nous avons déterminé deux seuils : la taille minimum de l'anomalie en nombre de bases, et la taille en nombre de sondes consécutives présentant un log R ratio diminué ou augmenté. Au-dessus de ces seuils, l'anomalie est considérée comme un authentique CNA, en-dessous elle est considérée comme un artefact. Nous avons utilisé neuf gènes connus pour présenter des délétions récurrentes dans les LAL pour déterminer les seuils : *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B*, *ETV6*, *RB1*, *TP53*, *BTG1*, *ERG* et *EBF1*³³⁻³⁷. Les CNA ont été

recherchés sans filtre de taille, et leur authenticité a été validée sur l'observation de leur profil de log R ratio. Puis différents seuils ont été testés (nombre de sondes : 3, 5, 10, 20, 30 et taille en kb : 5, 10, 20). Aux seuils testés, tous les CNA des gènes *PAX5*, *CDKN2A/B*, *ETV6*, *RB1*, *TP53*, *BTG1*, *ERG* et *EBF1* étaient détectés par le logiciel. Pour le gène *IKZF1*, au-delà des seuils de 20 sondes un CNA n'est pas détecté. Au-delà de 10 kb, ce sont deux CNA qui ne sont pas détectés. Ces seuils sont conservés pour l'analyse car ils permettent la détection d'un maximum de CNA tout en limitant les artefacts.

4.2.3.3.3 Choix des seuils de log R ratio pour la détection des gains et des délétions

Nexus utilise des seuils de log R ratio en-dessous et au-dessus desquels une région est considérée comme une délétion ou un gain. Les seuils proposés par défaut manquaient de sensibilité. Certains CNA n'étaient pas détectés, et d'autres étaient détectés à une amplitude moindre que celle suggérée par la piste du log R ratio de l'échantillon. Ces seuils ont donc été redéfinis. Pour cela nous nous sommes basés sur les seuils proposés par Baughn *et al.* et les nouveaux réglage ont été validés sur leur efficacité dans la détection de CNA connus dans notre cohorte³⁸.

Trois seuils sont réglables : celui des gains, celui des délétions et celui des amplifications. Une amplification est le gain de plusieurs copies, la définition standard étant le gain de 5 copies ou plus, cas rarement retrouvé dans les LAL en dehors des iAMP21. Nous avons choisi d'utiliser le seuil des amplifications pour déterminer les gains de 2 copies ou davantage, ce qui nous permettait de détecter les tétrasomies (présence de 4 copies d'un chromosome) dans les LAL hyperdiploïdes.

Pour le seuil de délétion, nous avons choisi d'utiliser les résultats de MLPA pour la recherche des délétions du gène *IKZF1* lorsqu'ils étaient disponibles, et les résultats de l'analyse sur ChAS pour cette même délétion dans les autres cas. Nous les avons comparés aux résultats de la CGH array sur Nexus. Cette comparaison a été effectuée uniquement pour les patients toulousains du fait de la disponibilité immédiate des données et du nombre suffisant d'échantillons.

IKZF1 est un gène fréquemment délété dans les LAL (44/236 ; 18,6% dans notre cohorte). La délétion peut porter sur le gène entier ou sur un nombre limité d'exons. Le MLPA est

une technique de biologie moléculaire permettant de détecter cette anomalie génétique et son étendue, avec de très bonnes sensibilité et spécificité.

Parmi les 12 patients toulousains présentant une délétion du gène *IKZF1* identifiés par MLPA (n=5) ou ChAS (n=7), tous sont identifiés avec une délétion sur Nexus avec le seuil par défaut (log R ratio = -0,1). Néanmoins, pour deux patients, la délétion reconnue par Nexus est de plus petite taille. Pour le premier cas, la délétion des exons 4 à 6 est détectée mais pas celle de l'exon 7. Pour le second cas, la délétion apparaît limitée au deuxième intron, et pourrait passer pour un artéfact, alors qu'en réalité elle comprend les exons 2 et 3. L'utilisation d'un seuil de délétion fixé à -0,07 pallie à ces défauts de détection³⁸ (Fig 14). Aucun faux positif n'est détecté parmi les patients toulousains (n=69). Ce seuil de -0,07 a donc été conservé. Sa valeur inverse est utilisée pour la détection des gains (seuil de log R ratio pour les gains = 0,07).



Fig 14. Deux cas de délétions du gène *IKZF1* de tailles discordantes. Les résultats avec les seuils de délétion -0,1 et -0,07 sont représentés. Le seuil -0,07 donne les mêmes résultats que les techniques standards (MLPA ou CGH array analysée sur le logiciel ChAS).

Pour la détermination du seuil de gains de deux copies ou plus, nous avons utilisé les cas hyperdiploïdes. Nous aurions pu utiliser le caryotype comme référence mais ce n'est pas un bon « gold standard » en l'occurrence. En effet, la morphologie des chromosomes de lymphoblastes est généralement très altérée, ce qui entraîne des erreurs de classement des chromosomes. Nous nous sommes donc basés sur le profil de log R ratio, en effet l'observation du profil permet une identification aisée des gains chromosomiques (Fig15).

La tétrasomie (présence de 4 copies d'un chromosome, soit un gain de 2 copies) du chromosome 21 est la plus fréquente. Pour un premier réglage, nous nous sommes basés sur 20 cas avec tétrasomie 21. Le seuil par défaut est fixé à un log R ratio = 1, ce qui ne permet de détecter aucune tétrasomie. Elles sont toutes considérées comme le gain d'une seule copie. En abaissant le seuil à 0,4, 19/20 tétrasomies sont détectées. Le cas non détecté présente un profil de log R ratio aplati avec un log R ratio de 0,3 pour le chromosome 21 (donc en-dessous du seuil défini). Ceci pourrait être expliqué par la petite taille du clone leucémique, la forte proportion de cellules saines dans l'échantillon tamponnerait les anomalies des cellules malignes (Fig 15). Néanmoins, nous n'avons pas pu obtenir le résultat du myélogramme pour confirmer cette hypothèse.

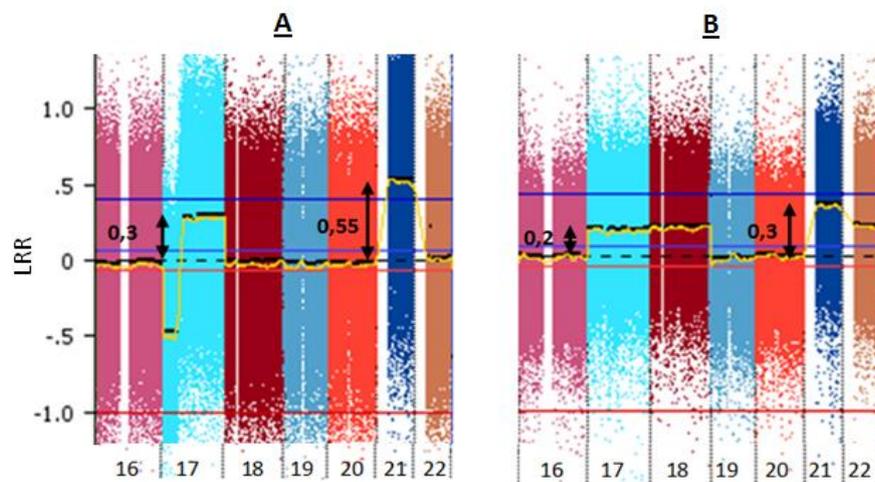


Fig 15. Profils de log R ratio de deux cas hyperdiploïdes, l'un est normal (A) et l'autre apparaît aplati (B). Les chromosomes 16 à 22 sont représentés. Les flèches doubles représentent le niveau de log R ratio des gains. La ligne bleue représente le seuil des amplifications (LRR = 0,4). A. Profil classique, CNA : délétion 17p, gain 17q et tétrasomie 21. B. Profil aplati, CNA : trisomies 17, 18 et 22, tétrasomie 21.

En abaissant le seuil à 0,3, toutes les tétrasomies sont détectées, mais trois faux positifs apparaissent et rendent ce seuil inadapté.

La sensibilité et la spécificité du seuil à 0,4 a ensuite été évaluée sur l'ensemble des cas hyperdiploïdes. Aucun faux positif n'est détecté. Sur un total de 74 cas avec tétrasomie(s), 5 ne sont pas détectés, et ont des profils de log R ratio aplatis. Un seuil de 0,35 a été testé pour essayer d'améliorer la sensibilité, mais comme pour le seuil à 0,3 des faux positifs apparaissent. La détection des gains de 2 copies n'étant pas critique dans les LAL, le seuil

de log R ratio = 0,4 semble un bon compromis et est conservé. Il est intéressant de noter que les amplifications intrachromosomiques du chromosome 21 sont toutes détectées à l'exception d'un cas dont nous parlerons ultérieurement.

Les seuils ont été réglés individuellement pour les aneuploïdies présentant un profil de log R ratio aplati (diminution des seuils pour permettre la détection des gains, des délétions et des gains de 2 copies ou plus), ainsi que pour 19 échantillons présentant une ondulation importante de la courbe de log R ratio (les seuils ont été dans ces cas augmentés au cas par cas afin de limiter les faux positifs).

Ces seuils ont été utilisés pour la détection manuelle de CNA. Pour l'utilisation de l'outil GISTIC, ils sont trop sensibles et génèrent la détection de très nombreux faux positifs qui masquent les authentiques CNA. Ces seuils ont donc été augmentés pour l'analyse GISTIC à 0,15 pour les gains et -0,2 pour les délétions, puis abaissés à nouveau pour rechercher manuellement les CNA détectés par l'analyse GISTIC.

4.3 Mesure de la maladie résiduelle : la MRD Ig/TCR

4.3.1 Principe général

Pendant la différenciation précoce des lymphocytes B, un réarrangement des segments V, (D,) et J des immunoglobulines a lieu, et chaque lymphocyte présente ainsi une combinaison spécifique de ces segments qui code pour le domaine variable des immunoglobulines.

Au cours de ce réarrangement, l'enzyme TdT (terminal désoxynucléotidyl transférase) entraîne l'insertion et la délétion aléatoires de nucléotides à la jonction des segments V, (D,) et J, responsable ainsi d'une diversité jonctionnelle qui constitue en quelque sorte une « empreinte digitale » unique dans chaque lymphocyte. De la même manière, le gène du récepteur des lymphocytes T, le TCR, subit un réarrangement avec une diversité jonctionnelle. Les réarrangements des gènes des immunoglobulines ou du TCR sont presque systématiques dans les LAL B et sont utilisés pour le suivi de la maladie résiduelle. Il s'agit d'un marqueur, qui n'est pas impliqué dans la pathogénèse.

L'identification et le séquençage des jonctions d'intérêt sont réalisés au moment du diagnostic. Des amorces complémentaires des jonctions (AJO) sont fabriquées pour chaque patient. Lors du suivi, ces amorces sont utilisées pour amplifier les régions jonctionnelles par PCR quantitative en temps réel (Q-PCR), ce qui permet la mesure de la maladie résiduelle.

4.3.2 Description de la technique

Nous décrivons ici la détection de la maladie résiduelle Ig/TCR telle qu'elle est réalisée au CHU de Toulouse. Elle se déroule en deux étapes. L'étape préalable d'analyse de l'échantillon de diagnostic pour trouver des cibles est suivie de la détection de la maladie résiduelle proprement dite lors des suivis.

4.3.2.1 *Au diagnostic*

Le prélèvement doit être réalisé sur tube EDTA. Les tubes héparinés ne sont pas adaptés, l'héparine étant un inhibiteur de PCR. Les étapes sont résumées dans la figure 16.

Le principe général de l'extraction est basé sur quatre étapes : la lyse des cellules, la protéolyse, la déprotéinisation et enfin l'isolement et la purification de l'ADN génomique. Elle est réalisée par la technique manuelle Promega, utilisant le kit Wizard suivant les recommandations du fournisseur. La concentration d'ADN est déterminée sur un spectrophotomètre et l'échantillon est dilué à 150 ng/ μ l.

Lors du diagnostic, la recherche et le séquençage du réarrangement Ig/TCR sont réalisés par technique NGS (séquençage de nouvelle génération) sur une plateforme Illumina MiSeq.

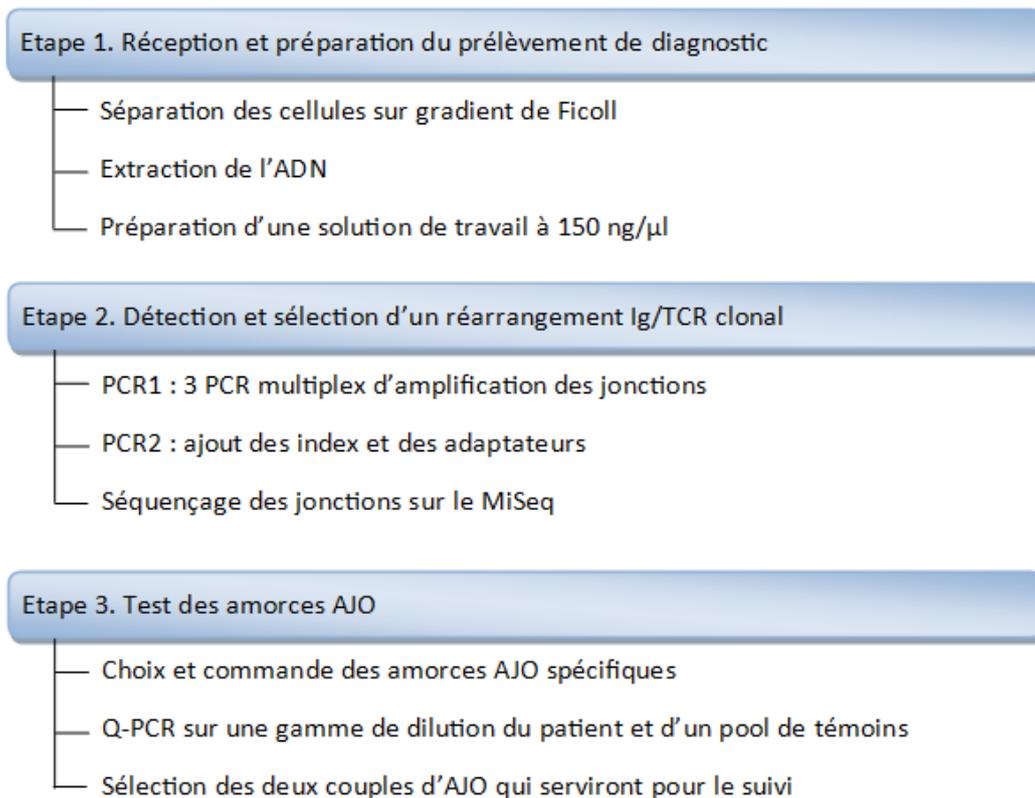


Fig 16. Workflow des étapes réalisées au diagnostic pour la mesure ultérieure de la maladie résiduelle Ig/TCR.

La première étape consiste à constituer la librairie de séquençage par deux PCR successives.

Pour amplifier les jonctions, trois PCR multiplex sont réalisées (PCR1). Les amorces sont complémentaires d'une sélection de segments V, D et J des gènes *IGH*, *IGK*, *TCRB*, *TCRD* et *TCRG* et permettent l'amplification des jonctions comprises entre les amorces. Dans la très grande majorité des cas, au moins deux jonctions clonales sont amplifiées. Il est important d'avoir deux cibles, car il existe une certaine instabilité des marqueurs de clonalité, et il arrive d'en perdre un au cours de l'évolution de la maladie. Après purification sur billes magnétiques, les bandes clonales sont révélées par migration électrophorétique des produits de PCR sur l'appareil TapeStation.

Une seconde PCR (PCR2) est réalisée pour ajouter les index spécifiques de chaque échantillon (étiquette moléculaire permettant de retrouver l'échantillon d'origine lors de l'analyse NGS), et les adaptateurs qui permettent l'hybridation de la librairie sur la

flowcell de séquençage. Les amorces de la seconde PCR sont complémentaires des queues flottantes des amorces de la première de la PCR, et leurs propres queues flottantes sont constituées des index et des adaptateurs. Les produits PCR sont purifiés sur bille magnétique, dosés et poolés avec d'autres produits PCR à séquencer. La librairie ainsi constituée est séquencée sur le MiSeq d'Illumina selon les recommandations du fournisseur.

Les séquences sont analysées grâce à l'outil informatique Vidjil. Des amorces complémentaires de la jonction AJO sont choisies. Deux amorces AJO sont commandées par cible identifiée. A réception, elles sont testées par PCR quantitative sur une gamme de dilution de l'échantillon du diagnostic pour tester leur efficacité, et sur un pool contrôle constitué d'un mélange d'ADN de quatre témoins sains (extrait de sang fourni par l'EFS) pour s'assurer de leur spécificité. Les deux meilleurs couples d'amorces sont conservés pour le suivi du patient.

4.3.2.2 *Mesure de la maladie résiduelle*

Les conditions de prélèvement et la préparation de l'échantillon sont similaires à celles du diagnostic. Les étapes sont résumées dans la figure 17.

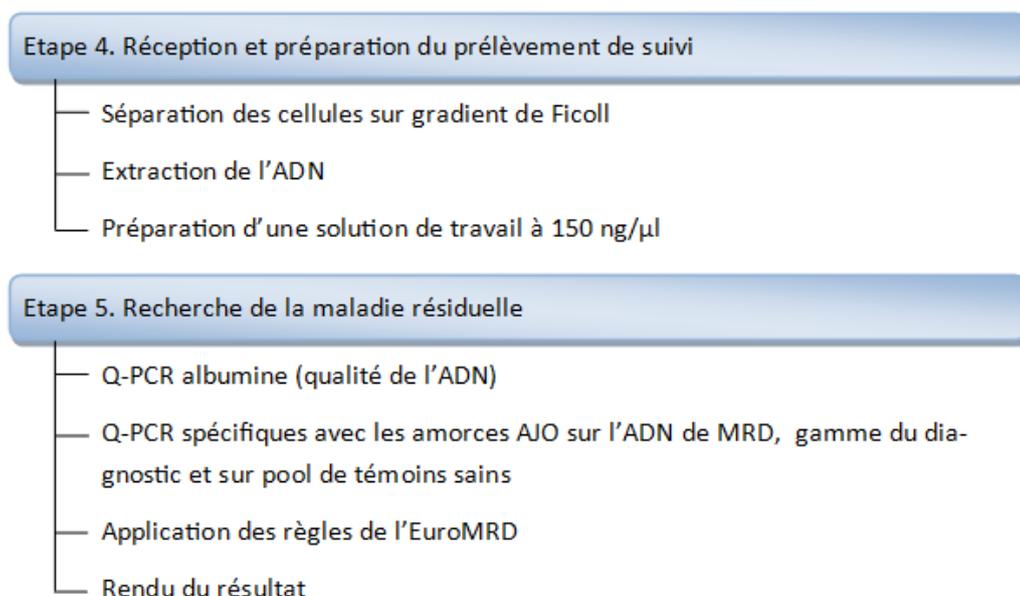


Fig 17. Workflow de la mesure de la maladie résiduelle Ig/TCR.

Une PCR quantitative est réalisée sur un gène non réarrangé, l'albumine, pour s'assurer de la qualité de l'ADN.

Les PCR quantitatives spécifiques pour les deux cibles du patient sont réalisées grâce aux amorces précédemment obtenues. Elles sont réalisées en triple, et comparées à une gamme d'ADN du diagnostic (dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} et 10^{-5}). Un pool de témoins est testé en double, en triple ou en sextuple selon la détection lors des tests AJO d'une hybridation non spécifique.

L'interprétation suit les règles de l'European Study Group on MRD detection in ALL (EuroMRD)³⁹.

4.4 Les analyses de cytogénétique

4.4.1 Le caryotype

4.4.1.1 Principe général

Le caryotype permet l'observation des chromosomes des cellules leucémiques et la recherche d'anomalies du nombre de chromosomes (monosomies, trisomies, tétrasomies...) et/ou de leur structure (translocation réciproque, délétion, addition, inversion péri- ou paracentrique...). C'est une analyse peu résolutive (environ 10 Mb) mais permettant l'observation du génome complet des lymphoblastes et la détection d'éventuels sous-clones ayant génétiquement évolué à partir du clone primaire. Il est optimalement réalisé sur un prélèvement de moelle osseuse, mais peut également être fait sur un prélèvement de sang si la blastose sanguine est suffisante. Les étapes techniques de l'analyse sont résumées dans la figure 18.

4.4.1.2 Description de la technique

Nous décrivons ici la technique utilisée au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse. Des variations existent d'un centre de diagnostic à un autre.

Pour pouvoir observer les chromosomes, il est nécessaire d'obtenir des cellules en mitose. Pour cela, une culture cellulaire est réalisée. Les étapes de mise en culture se déroulent sous hotte à flux laminaire, avec du matériel stérile. Le prélèvement est reçu dans un tube avec de l'héparinate de lithium. Il est centrifugé pour faire apparaître la

couche des leucocytes. Celle-ci est recueillie et mise dans un tube Falcon avec du milieu de culture. Le milieu de culture est composé de RPMI, de glutamine, de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). La concentration cellulaire est mesurée sur automate. Deux flasques sontensemencées avec 10 millions de cellules dans 5 ml. Les flasques sont mises à l'étuve pour une durée de 18h à 24h. A la sortie de culture, 30 μ l de Colcémide (colchicine) concentré à 10 μ g/ml sont rajoutés. La colchicine est un poison du fuseau permettant le blocage des cellules en mitose. Le milieu contenant les cellules est transféré dans un tube après 15 minutes d'incubation avec la colchicine.

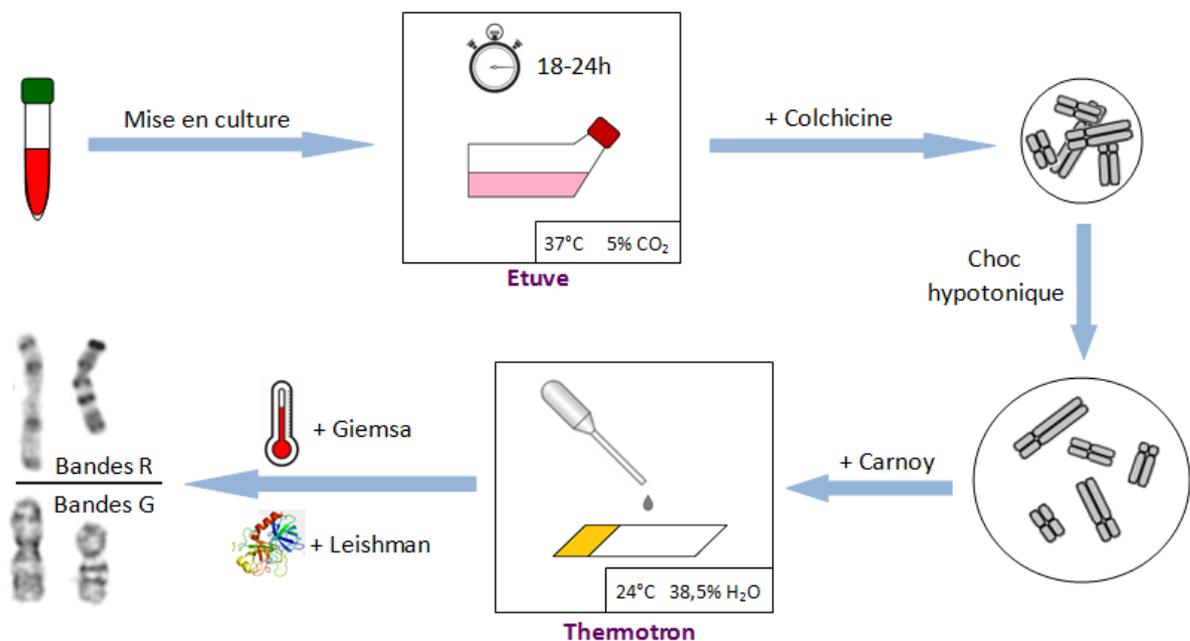


Fig 18. Etapes du caryotype. Giemsa, Leishman : colorants. Carnoy : solution de fixation. Thermotron : enceinte thermostatée.

A cette étape, les chromosomes sont très compactés au sein du noyau. Un choc hypotonique contrôlé est réalisé pour faire gonfler les cellules par différence de pression osmotique, et ainsi étaler les chromosomes. La membrane nucléaire est fragilisée mais ne doit pas rompre afin de ne pas répandre les chromosomes dans le milieu. Cette étape est automatisée. Après centrifugation, l'automate Cellsprint rajoute une solution hypotonique de chlorure de potassium à 0,075M au milieu. Puis il réalise plusieurs cycles de fixation : ajout de réactif de Carnoy (mélange d'un tiers d'acide acétique glacial et de

deux tiers de méthanol absolu) – centrifugation – rejet du surnageant. Le culot cytogénétique est ainsi obtenu.

Le lendemain, il est manuellement remis en suspension dans du fixateur de Carnoy fraîchement reconstitué, et étalé sur lames sous une enceinte à température et hygrométrie constantes (24°C +/- 1°C ; 38,5% H₂O +/- 2%). Le contrôle de ces conditions est nécessaire à la bonne qualité de l'étalement. Les lames sont laissées sous l'enceinte le temps du séchage.

Les étapes suivantes de dénaturation et de coloration permettent de faire apparaître les bandes claires et sombres sur les chromosomes. Deux types de « dénaturation » ou banding sont utilisés. Le banding enzymatique utilise l'action de la trypsine (bandes G pour GTG, Giemsa Trypsin Giemsa ou GTL, Giemsa Trypsin Leishman). Le banding thermique aboutit à un caryotype en bandes R ou RHG (Reverse Heat Giemsa) et fait apparaître des bandes inversées par rapport au banding enzymatique. Les deux techniques sont complémentaires car certaines anomalies sont plus visibles en bandes G, et d'autres en bandes R.

Pour le caryotype en bandes R, les lames sont immergées 5 minutes dans du méthanol pur, puis rincées dans deux bains d'eau distillées. Elles sont immergées dans une solution de phosphate dans un bain marie à 88°C. La durée d'immersion dépend du prélèvement et des conditions climatiques, une gamme de temps est donc réalisée pour obtenir au moins deux lames avec une bonne dénaturation (dans le cas contraire, des lames seront ré-étalées et le temps de dénaturation sera adapté). Les lames sont ensuite refroidies dans deux bains d'eau distillée à 20°C (+/- 2°C). Après séchage, elles sont colorées par immersion dans une solution de Giemsa à 4% pendant 2,5 à 3 minutes.

Pour le caryotype en bandes G, les lames étalées sont mises à vieillir 1h sur une plaque chauffante à 100°C. Elles sont ensuite immergées dans une solution de trypsine à 1% au bain marie à 30°C suivant une gamme de temps. La réaction est arrêtée par deux bains successifs dans une solution de NaCl à 0,9%. Après séchage, les lames sont colorées par une solution de Leishman pendant 1,5 à 2 minutes.

Les lames colorées et dénaturées (bandes GTL et RHG) sont chargées sur un microscope automatique Metafer (Metasystems) qui recherche les mitoses. Après une seconde

sélection manuelle, les mitoses sont capturées et transférées sur le logiciel Ikaros (Metasystems) qui permet le classement et l'analyse des caryotypes. Un minimum de 20 mitoses est analysé, afin de ne pas méconnaître un clone de petite taille.

La culture des LAL est une culture difficile. Les lymphoblastes sont fragiles et nécessitent un acheminement rapide du prélèvement pour une mise en culture sans délai. Malgré ces précautions, le nombre de mitoses obtenues est souvent faible en comparaison d'autres hémopathies malignes. Le prélèvement est dans l'idéal réalisé avant le début de la corticothérapie, les corticoïdes inhibant la pousse des lymphoblastes. Si la corticothérapie a été débutée, le caryotype sera souvent un échec, et une recherche des anomalies récurrentes par FISH sera nécessaire.

4.4.2 La FISH

4.4.2.1 Cadre d'utilisation

La FISH est réalisée au cas par cas en fonction des résultats du caryotype ou de façon systématique selon les exigences prévues par les protocoles des essais cliniques (cas du CAALL-F01) (Tab 3).

<p>Caryotype informatif</p> <p>Présence d'anomalies récurrentes "spécifiques": t(9;22)(q34;q11) ou Ph t(4;11)(q21;q23) Hyperdiploïdie > 50 Hypodiploïdie < 40</p>	<p>Caryotype non informatif</p> <p>Normal ou échec</p>				<p>Caryotype informatif mais anomalies rares ou non spécifiques</p> <p>Anomalies de type secondaire (6q-, 9p-, 12p-...) Anomalies de nombre autres que hypo/hyperdiploïdie Remaniements de structure non spécifiques Points de cassure évocateurs d'une translocation variante</p>		
<p>Pas d'indication de FISH</p> <p>Sauf si : Discordance avec RT-PCR ou non faite/échec : BCR-ABL1</p>	<p>RT-PCR positive</p> <p>FISH pour confirmer</p>	<p>RT-PCR négative</p> <p>FISH pour explorer : BCR-ABL1 KMT2A</p>	<p>RT-PCR non faite/échec</p> <p>FISH pour explorer : BCR-ABL1 KMT2A ETV6-RUNX1 TCF3</p>	<p>Index ADN anormal</p> <p>FISH pour confirmer : Sondes centromériques</p>	<p>RT-PCR positive</p> <p>FISH pour confirmer</p>	<p>RT-PCR négative</p> <p>FISH pour explorer : BCR-ABL1 KMT2A</p>	<p>RT-PCR non faite/échec</p> <p>FISH pour explorer : BCR-ABL1 KMT2A ETV6-RUNX1 TCF3</p>

Tableau 3. Recommandations du GFCH pour la prise en charge cytogénétique des LAL-B au diagnostic. Ces recommandations sont contemporaines de nos cas patients mais ne sont pas celles utilisées pour les patients traités en 2017-2018 suivant le protocole CAALL.

Elle peut être réalisée pour confirmer une anomalie douteuse au caryotype, pour rechercher une anomalie suspectée par les autres examens de biologie mais non vue au

caryotype (par exemple, suspicion de translocation t(9;22) BCR-ABL1 sur la présence de marqueurs myéloïdes aberrants en cytométrie de flux), ou en cas de caryotype non informatif pour rechercher des anomalies cryptiques (translocation t(12;21) ETV6-RUNX1, insertions) ou grevant le pronostic (réarrangements du gène *KMT2A* et fusion BCR-ABL1).

4.4.2.2 Description de la technique

La FISH est basée sur le principe de complémentarité des bases de l'ADN. Elle permet d'hybrider des sondes, spécifiques de gènes ou de toute autre séquence d'intérêt, marquées par des fluorochromes (FITC et Texas Red principalement) sur des chromosomes, des noyaux ou des coupes tissulaires.

Le culot cytogénétique est étalé sur lame sous une enceinte à température et hygrométrie constantes (24°C, 38,5%) après dilution au fixateur de Carnoy à la concentration adaptée pour obtenir un bon espacement des mitoses et des noyaux sur la lame.

Elles sont laissées à vieillir pendant une nuit à température ambiante.

Le deuxième jour, les lames et les sondes sont individuellement dénaturées afin d'obtenir de l'ADN simple brin :

- Pour les lames : elles sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (3 minutes dans chaque bain, de 70, 80, 90 et 100%). Sous une hotte à toxiques, 125 µL d'une solution de formamide 70%/2xSSC à pH7 sont déposés sur chaque lame, ensuite couverte d'une lamelle avant de la déposer 3 minutes sur une plaque chauffante à 70°C pour dénaturer l'ADN. La formamide doit être manipulée sous une hotte et avec des gants en raison de sa toxicité. La lamelle est ensuite retirée et une nouvelle série de déshydratations à l'éthanol est réalisée (3 minutes dans des bains à 4°C à 70, 80, 90, 100%, puis dans un bain à température ambiante à 100%). Les lames sont à nouveau laissées à sécher.
- Dénaturation des sondes : 5 µL de sonde par lame sont distribués dans des microtubes de 0,5 mL qui sont ensuite placés dans un bain-marie à sec. Le programme de dénaturation est adapté à la sonde utilisée (pour les sondes

utilisées pour l'étude : 5 minutes à 73°C, puis 15 minutes à 45°C et enfin 3 minutes à 75°C).

Après dénaturation, 5 µL de sonde sont déposés sur la lame, ensuite couverte avec une lamelle. La lamelle est lutée avec du ruber ciment et les lames incubent toute la nuit à 37°C dans une chambre humide. Cette étape permet l'hybridation de la sonde sur l'ADN du patient.

Le troisième jour, la lamelle est retirée. La lame est lavée dans un bain 0,4 SSC/0,3 NP40 à 68°C pendant 3 minutes puis dans un bain de 2 SSC/0,1 NP40 à température ambiante pendant 30 secondes afin d'enlever l'excès de sonde et d'éviter le bruit de fond.

Une goutte de DAPI est déposée sur chaque lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle. Le DAPI est un fluorochrome ayant une forte affinité pour l'ADN. Il fait office de contre-colorant en colorant l'ADN des noyaux et des mitoses en bleu.

Après au minimum 5 minutes de repos, la lame est lue au microscope à fluorescence. 200 noyaux, et dans la mesure du possible au moins une mitose sont comptés.

Toutes les étapes de manipulation des sondes doivent être réalisées dans la pénombre afin d'éviter l'exposition des fluorochromes à la lumière.

5 Résultats

5.1 Caractéristiques de la population

Au total, 388 patients ayant une LAL et pour lesquels une analyse de CGH array a été réalisée ont été identifiés. Après recueil des informations, nous avons exclu 52 patients adultes, 24 LAL T, 28 rechutes, 35 échantillons analysés sur puce Whole Genome, 4 patients pour lesquels le fichier .cel de la CGH array n'a pas été retrouvé, 6 patients dont les résultats de CGH array n'étaient pas analysables, 1 patient présentant des leucémies sans atteinte médullaire et 2 patients pour lesquels le centre ayant réalisé la prise en charge n'a pas pu être identifié.

Ainsi, 236 patients pédiatriques présentant une LAL B et ayant un résultat de CGH array réalisée au moment du diagnostic sur puce Cytoscan HD ont été inclus dans l'étude.

Le CHU de Lille a mis à notre disposition les résultats de CGH array de 167 patients : 51 patients ont été pris en charge à Lille, 34 patients au CHU de Marseille, 32 patients à Lyon, 18 patients à Amiens, 14 patients à Rouen, 4 patients à Poitiers, 3 patients à Reims et 1 patient à l'hôpital Saint-Louis. Il s'agit de patients diagnostiqués pour une LAL B entre décembre 2013 et février 2016.

Le CHU de Toulouse a réalisé de la CGH array pour 69 patients, tous pris en charge à Toulouse à l'exception d'un patient du CHU de Bordeaux. Le diagnostic a été réalisé entre mars 2004 et mai 2013.

La médiane d'âge au moment du diagnostic est de 5 ans [3 mois – 17 ans]. Le ratio masculin/féminin est de 1/1. La médiane de la leucocytose au diagnostic est de 8,7 G/L [0,7 – 770 G/L]. 91 patients présentaient une LAL B de haut risque selon les critères du National Cancer Institute (NCI)/Rome (leucocytose au diagnostic supérieure à 50 G/L et/ou âge inférieur à un an ou supérieur à 9 ans). 4 patients ont une prédisposition génétique à développer une LAL : 3 patients ont un syndrome de Down (trisomie 21 constitutionnelle), et un patient a un syndrome de Li Fraumeni (par mutation du gène TP53).

Les caractéristiques de la population par ville sont visibles dans le tableau 4.

Les catégories génétiques (déterminées selon la classification OMS 2016) les plus représentées sont comme attendu les hyperdiploïdies (36%, n = 84) et les translocations t(12;21) ETV6-RUNX1 (17%, n = 41). Les translocations t(12 ;21) sont une anomalie de la LAL du petit enfant, elles sont moins fréquentes au-delà de 9 ans.

9 patients présentent un réarrangement du gène *KMT2A*, dont 4 des 5 enfants de moins d'un an. Une hyperleucocytose à plus de 50 G/L était présente dans les 9 cas.

	Lille		Toulouse	
Nombre	167		69	
Âge (années)				
Médiane	4		5	
Plage	0 - 17		0 - 15	
Sexe				
M	84	50%	39	57%
F	83	50%	30	43%
Leucocytose (G/L)				
Médiane	9,0		7,1	
Plage	0,8 - 769,8		0,7 - 345,7	
Catégorie OMS				
t(12;21)	24	14,4%	17	24,6%
Hyperdiploïdie	62	37,1%	22	31,9%
Hypodiploïdie	4	2,4%	1	1,4%
iAMP21	8	4,8%	1	1,4%
KMT2A	7	4,2%	2	2,9%
BCR-ABL1	4	2,4%		
Ph-like	7	4,2%	2	2,9%
t(1;19)	8	4,8%	1	1,4%
B other	43	25,7%	23	33,3%

	Lille		Toulouse	
Nombre	167		69	
Protocole				
EORTC	76	45,5%	62	89,9%
FRALLE	75	44,9%	2	2,9%
COOPRALL			2	2,9%
ESPHALL	2	1,2%		
Interfant	4	2,4%	1	1,4%
Inconnu	10	6,0%	2	2,9%
MRD1 < 10-3				
< 10-3	130	77,8%	56	81,2%
> 10-3	24	14,4%	7	10,1%
NI	13	7,8%	6	8,7%
MRD2 < 10-4				
< 10-4	105	62,9%	24	34,8%
> 10-4	13	7,8%	4	5,8%
NI	49	29,3%	41	59,4%
Evènements				
Décès	8	4,8%	4	5,8%
Rechute	13	7,8%	11	15,9%

Tab 4. Caractéristiques de la population par CHU. NI : non informatif.

4 cas présentent un réarrangement de type BCR-ABL1, tous sont hyperleucocytaires > 50 G/L. 9 patients ont des réarrangements de type Ph-like (réarrangement du gène *CRLF2*, n = 6 ; et une fusion de chacun des 3 types suivants, PAX5-JAK2, ETV6-JAK2 et EBF1-PDGFRB), 3 sont hyperleucocytaires > 50 G/L. Chez 66 patients (28%), aucune anomalie génétique récurrente de la classification de l'OMS n'a été identifiée, ils ont été regroupés dans la catégorie B other, qui correspond aux LAL NOS (not otherwise specified) dans la classification de l'OMS (Fig 19), bien qu'une anomalie primaire ait été identifiée dans un certain nombre de cas comme nous en reparlerons par la suite. 20 de ces patients ont un caryotype normal, avec au moins 20 mitoses analysées.

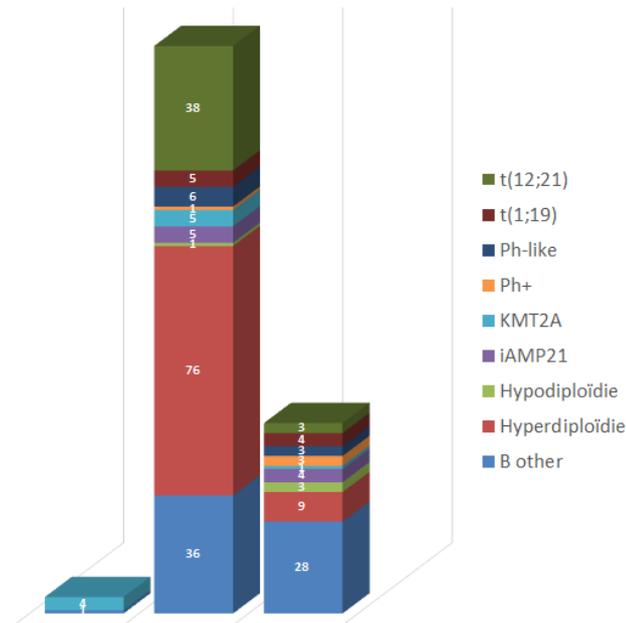


Fig 19. Répartition des catégories cytogénétiques par âge. Ph+ : t(9;22) BCR-ABL. Les seuils d'âge ont été choisis selon les critères de risque de la classification NCI/Rome.

La majorité des patients ont été traités suivant les protocoles EORTC ou FRALLE. Un nombre limité de patients ont été traités suivant les protocoles Interfant, COOPRALL et ESPHALL (moins de 10 patients en tout). Pour 12 patients, l'information n'a pas pu être récupérée.

La durée médiane de suivi est de 3 ans et 2 mois [1 mois – 11 ans]. Les patients actuellement en vie ont un suivi d'au moins 18 mois.

12 patients de la cohorte sont décédés. Une patiente est décédée de complications infectieuses au décours du traitement d'induction (septicémie à *Pseudomonas aeruginosa*) et les 11 autres sont décédés dans les suites d'une rechute précoce (n = 7) ou tardive (n = 4). 13 autres patients ont fait une rechute précoce (n = 1) ou tardive (n = 12).

La MRD1 était informative chez 217 patients. 31 patients avaient une MRD1 positive supérieure au seuil de 10^{-3} , 186 patients avaient une MRD1 négative avec une sensibilité de 10^{-3} ou davantage. Chez 19 patients la MRD1 n'était pas informative, soit elle n'a pas été réalisée, soit elle était négative avec une sensibilité moindre que 10^{-3} .

5.2 Recensement des CNA courants d'intérêt

Le logiciel détecte une médiane de 335 CNV [135-4279] par échantillon, incluant des polymorphismes et des artéfacts.

Nous avons recensé 9 CNA jugés d'intérêt du fait de leur fréquence et/ou de leur impact pronostique, en nous appuyant sur les données de la littérature³³⁻³⁷. La fréquence de ces CNA dans chaque groupe génétique est représentée dans la figure 25.

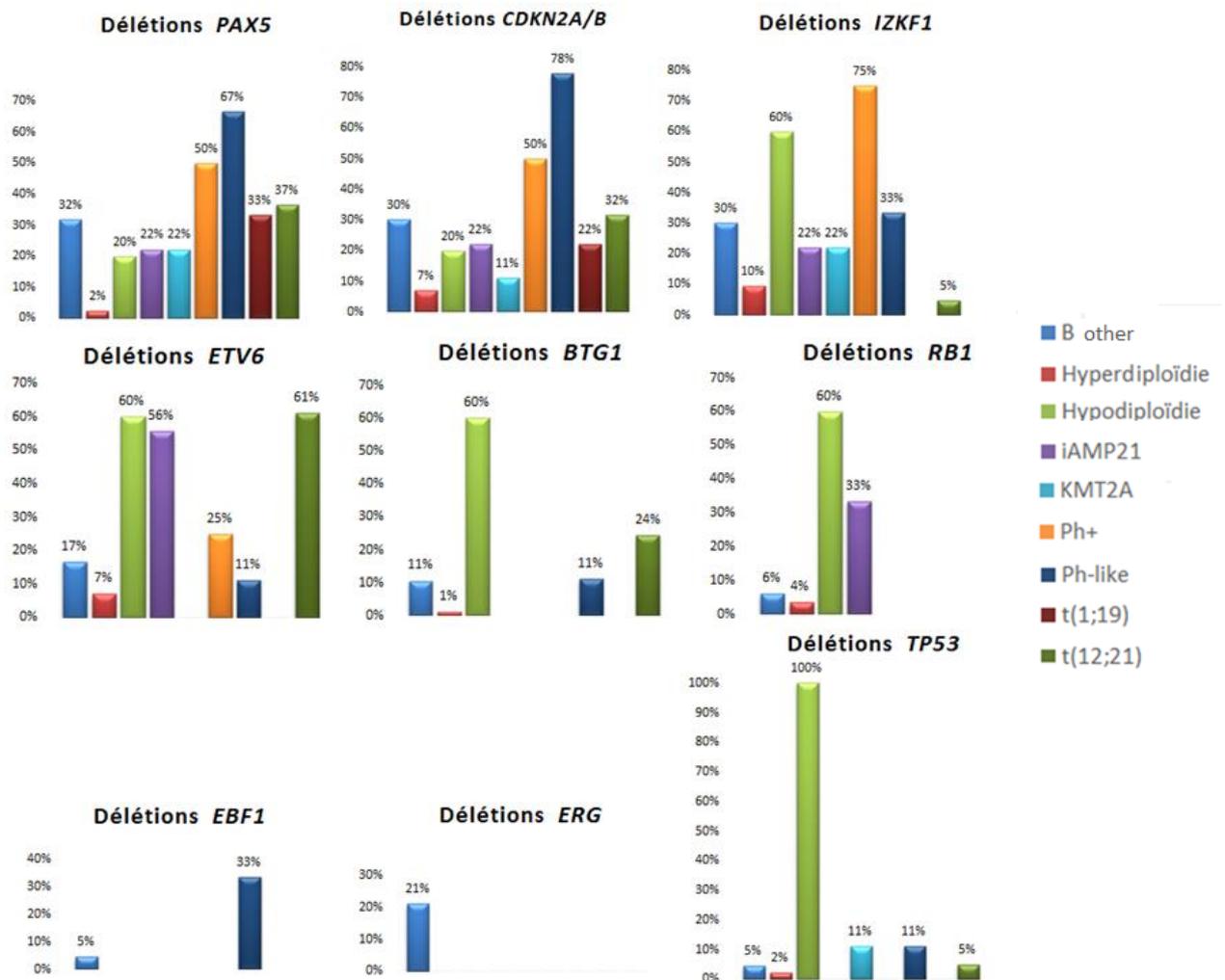


Fig 25. Fréquence des CNA par catégorie génétique de la classification OMS.

5.2.1 Les délétions du gène *IKZF1*

Le gène *IKZF1* code pour un facteur de transcription essentiel dans la lymphopoïèse B. Il est fréquemment délété dans les LAL B et est associé à un pronostic péjoratif à l'exception des cas où une délétion du gène *ERG* lui est associée⁴⁰. Il est délété chez 43

patients (18%). Les délétions sont de trois types. Les premières sont des délétions chromosome 7 entier (n = 5) ou de son bras court (n = 4). Elles délètent le gène *IKZF1* localisé en 7p12. Les délétions 7p sont parfois sous la forme d'un isochromosome 7q (duplication du bras long et perte du bras court, n = 1).

D'autres délétions sont focales mais englobent tout le gène (n = 11). Le dernier type de délétion n'emporte qu'une partie du gène (n = 24). Parmi ces dernières, les délétions les plus fréquentes sont les délétions des exons 4 à 6 ($\Delta e4-e6$, n = 7), suivies des $\Delta e4-e7$ (n = 3), des $\Delta e1-e3$ (n = 3), des $\Delta e2-e3$ (n = 3) et des $\Delta e4-e8$ (n = 2). Les délétions $\Delta e1-e4$, $\Delta e2-e7$, $\Delta e2-e8$, $\Delta e3-e8$, $\Delta e4-e5$ et $\Delta e4-e8$ sont chacune présentes dans un seul cas.

Dans un cas, la délétion du gène *IKZF1* est biallélique, combinant une délétion englobant tout le gène et une délétion $\Delta e4-e6$ sur le second allèle.

Une association avec une délétion du gène *ERG* est identifiée dans un seul cas. Il s'agit d'un garçon de 4 ans avec une LAL B other, non hyperleucocytaire et qui va bien à plus de 3 ans du diagnostic.

Le gène *IKZF1* est délété dans 3 cas sur 4 de LAL BCR-ABL1, et 3 cas sur 8 parmi les LAL Ph-like.

5.2.2 Les délétions du gène *ERG*

ERG est un facteur de transcription de la famille ETS. Il joue un rôle dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques. Son gène est délété dans 14 cas (6%). Il s'agit toujours de LAL B other, cette anomalie est donc exclusive des anomalies récurrentes de la classification OMS. Ceci suggère, comme cela a déjà été évoqué dans la littérature qu'il pourrait s'agir d'un nouveau sous-type de LAL B. Les délétions du gène *ERG* sont consécutives à un réarrangement du gène *DUX4* avec le gène *IGH*^{41,42}. Ces LAL sont décrites de pronostic favorable⁴⁰. Une patiente a néanmoins fait une rechute tardive 6 ans après le diagnostic. Les 13 autres patients sont en rémission complète sans évènement secondaire. Ce CNA touche préférentiellement les enfants les plus grands⁴⁰. La médiane et la moyenne d'âge sont toutes les deux à 10 ans, ce qui est compatible avec les données de la littérature.

La taille des délétions est très reproductible d'un cas à un autre (50 à 65 kb), emportant la région comprise entre l'exon 2 ou 3 et les exons 7 à 10. Une délétion est plus large (115 kb) et couvre la région comprise de l'exon 1 à l'exon 9.

5.2.3 Les délétions des gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*

L'une des délétions les plus fréquentes est celle des gènes *CDKN2A* et *CDKN2B* (22% des cas, n = 52). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (inhibition des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6, et inhibition de la dégradation de p53 par interaction avec l'E3 ubiquitine ligase MDM2). Ils sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeur.

Ces deux gènes sont voisins sur le bras court du chromosome 9. Toutes les tailles de délétion sont possibles, on identifie une monosomie 9, 10 cas de délétions 9p, 34 délétions larges > 1 Mb et 24 délétions de petite taille (< 1 Mb). Dans 32 cas, ces délétions sont combinées et sont responsables d'une délétion biallélique des gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*. Les délétions de grande taille emportent également le gène *PAX5*, ces gènes sont à 14,8 Mb de distance (Fig 20).

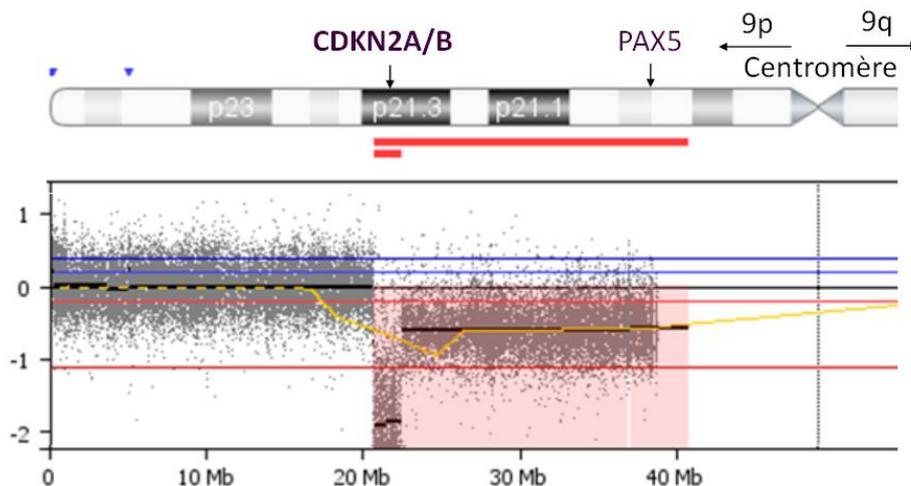


Fig 20. Exemple de délétion biallélique de *CDKN2A/B*, combinant deux délétions larges dont une qui couvre également le gène *PAX5*. Le bras court du chromosome 9 est représenté ainsi que sa piste de log R ratio (LRR). Les barres rouges représentent les délétions.

Les délétions de *CDKN2A/B* n'ont pas isolément fait la preuve de leur impact pronostique dans les LAL B pédiatriques, mais ce CNA est utilisé dans la classification proposée par Moorman *et al.* Cette classification prend en compte certains CNA pour affiner la classification pronostique génétique dans le groupe des LAL B de pronostic intermédiaire³³.

5.2.4 Les délétions et les réarrangements du gène *PAX5*

Le gène *PAX5*, comme le gène *IKZF1*, code pour un facteur de transcription régulant la lymphopoïèse. Il peut être le siège de délétions et de réarrangements.

5.2.4.1 Les réarrangements du gène *PAX5*

Certains remaniements impliquant le gène *PAX5* sont détectables en CGH array car ils sont déséquilibrés. Les réarrangements équilibrés, c'est-à-dire qui n'entraînent ni délétion ni gain de matériel génomique sont quant à eux indétectables en CGH array, et ne peuvent être identifiés que sur le caryotype ou par une recherche spécifique en FISH ou par des techniques de biologie moléculaire. Quatre cas ont été identifiés dans la cohorte.

Le premier cas est celui d'un patient de 5 ans de Lyon, hyperleucocytaire à 126 G/L, et présentant comme seule anomalie au caryotype un gain de matériel sur le chromosome 19 d'origine non identifiée. La FISH ne montre pas de réarrangement du gène *TCF3* (situé sur le chromosome 19) et le cas a donc été initialement considéré comme une LAL B other. Le laboratoire de Lille a réalisé une recherche des transcrits de type Ph-like par RT-PCR, ce qui a permis d'identifier un transcrite de fusion *PAX5-JAK2*. La fusion résulte d'une inversion paracentrique dans le bras court du chromosome 9. La CGH array montre des gains cryptiques au niveau des points de cassure (*PAX5* : gain en 9p13.2 de 1,8 Mb entre l'intron 5 de *PAX5* et la région centromérique ; *JAK2* : gain en 9p24.1 d'une taille de 1,4 Mb débutant en 5' du gène et allant jusqu'à l'intron 21).

Le deuxième cas est celui d'une patiente de 3 ans, avec une hyperleucocytose à 30 G/L, un caryotype présentant plusieurs anomalies dont un chromosome dicentrique dic(9;20)(p13;q11) (Fig 21). Les chromosomes dicentriques résultent du remaniement de deux chromosomes avec conservation des deux centromères sur le même chromosome

dérivé. La FISH montre un réarrangement du gène *PAX5* (séparation des signaux 3' et 5' d'une sonde break apart *PAX5* couvrante). La CGH array montre les délétions attendues du bras court du chromosome 9 et du bras long du chromosome 20 jusqu'aux bandes 9p13.2 et 20q11.2, les point de cassure se situant dans l'intron 6 du gène *PAX5* et l'intron 4 du gène *NOL4L*. Les données croisées de la cytogénétique et de la CGH array suggèrent fortement un réarrangement 5'*PAX5*-3'*NOL4L*, fusionnant les exons 6 du gène *PAX5* et 4 du gène *NOL4L*.

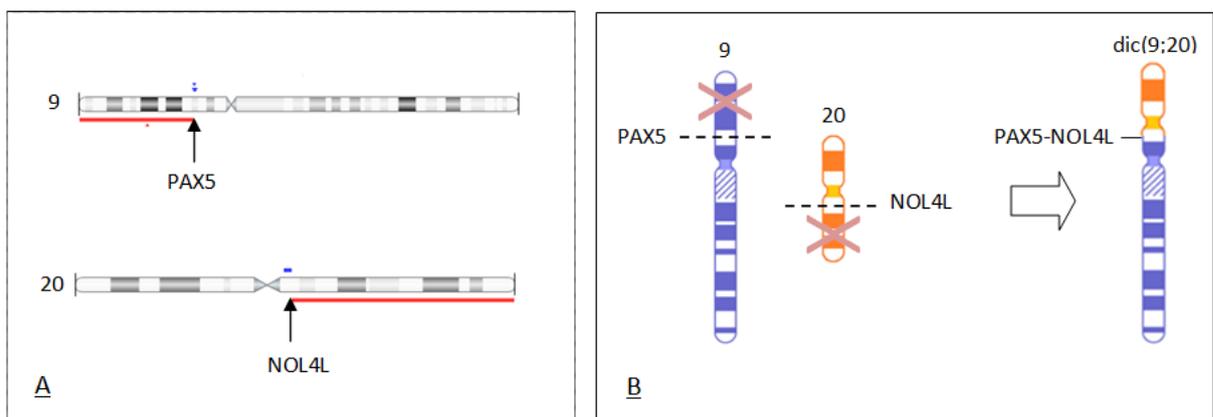


Fig 21. Dicentrique dic(9;20) de la deuxième patiente présentant un remaniement du gène *PAX5*. A. Résultats de la CGH array. Les chromosomes 9 et 20 sont représentés. Les flèches indiquent les points de cassure. Les barres rouges représentent des délétions, les barres bleues représentent des gains. B. Schéma du mécanisme générant un chromosome dicentrique dic(9;20) avec fusion *PAX5-NOL4L*. Les croix rouges représentent les régions délétées. Les pointillés représentent les points de cassure.

Le troisième cas présente également un chromosome dicentrique dic(9;20), associé à une trisomie 8 au caryotype (Fig 22). Il s'agit d'une jeune fille de 16 ans, présentant une hyperleucocytose à 100 G/L. Elle a eu une allogreffe de moelle osseuse en raison d'une MRD1 positive à 0,15%. L'aspect en CGH array sur le chromosome 9 est similaire au cas précédent, montrant une délétion 9p avec un point de cassure dans l'intron 6 du gène *PAX5*. L'aspect sur le bras long du chromosome 20 est plus complexe, montrant plusieurs remaniements avec une succession de gains et de délétions. Aucun point de cassure n'est situé dans un gène partenaire connu du gène *PAX5* sur le chromosome 20 (*ASXL1*, *NOL4L* et *KIF3B*). Ils sont tous situés dans des régions non codantes (en intergénique pour deux points de cassure, dans un pseudogène et dans un ARN non codant pour les deux autres).

Ce réarrangement conduit possiblement à un transcrit tronqué de *PAX5*, comme cela a déjà été décrit dans la littérature⁴³.

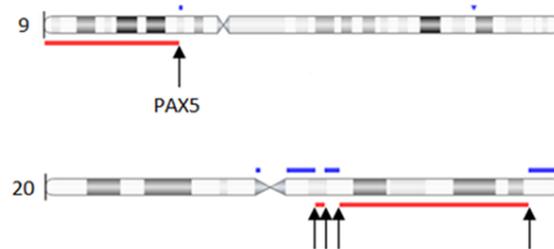


Fig 22. Dicentrique dic(9;20) du troisième patient présentant un remaniement du gène *PAX5*. Résultats de la CGH array. Les chromosomes 9 et 20 sont représentés. Les flèches indiquent les points de cassure. Les barres rouges représentent les délétions, les barres bleues représentent les gains.

Le quatrième patient est un jeune homme de 17 ans, présentant lui aussi une hyperleucocytose (95 G/L). Le caryotype met en évidence un chromosome dicentrique dic(9;12)(p13;p13). L'analyse en FISH montre un réarrangement des gènes *PAX5* et *ETV6* (localisé sur le chromosome 12), confirmé par la CGH array. Ce patient présente donc une fusion de type *PAX5-ETV6*. C'est le premier des réarrangements du gène *PAX5* à avoir été décrit⁴⁴.

Un dernier cas est très suspect de réarrangement du gène *PAX5*. Il s'agit d'une LAL B ne présentant pas d'anomalie récurrente de la classification OMS, avec une hyperleucocytose à 31 G/L et un aspect compatible en CGH array (délétion 9p partielle avec point de cassure dans le gène *PAX5*). Néanmoins, le bras court du chromosome 9 est le siège de réarrangements multiples avec les chromosomes 6 (2 réarrangements différents) et 16 (données de la cytogénétique), et la CGH array identifie plusieurs points de cassure en 9p. En l'absence de preuve formelle, nous considérerons donc ce cas dans les LAL B other.

Il est intéressant de noter que la présence au caryotype d'un chromosome dicentrique impliquant la bande 9p13 n'indique pas systématiquement un remaniement du gène *PAX5*. En effet, 2 patients de la cohorte présentent au caryotype un chromosome dicentrique dic(9;20)(p13;q11) avec un point de cassure distal au gène *PAX5*. Celui-ci est

donc délété mais pas remanié. Une étude par FISH à l'aide d'une sonde break apart PAX5 peut s'avérer utile dans ces situations.

5.2.4.2 Les délétions du gène PAX5

Le gène *PAX5* peut être remanié, et il est également délété dans certaines LAL B. C'est l'un des CNA les plus fréquents, il concerne 54 cas (23%) de notre cohorte. Les CNA les plus fréquents du gène *PAX5* sont représentés dans la figure 23.

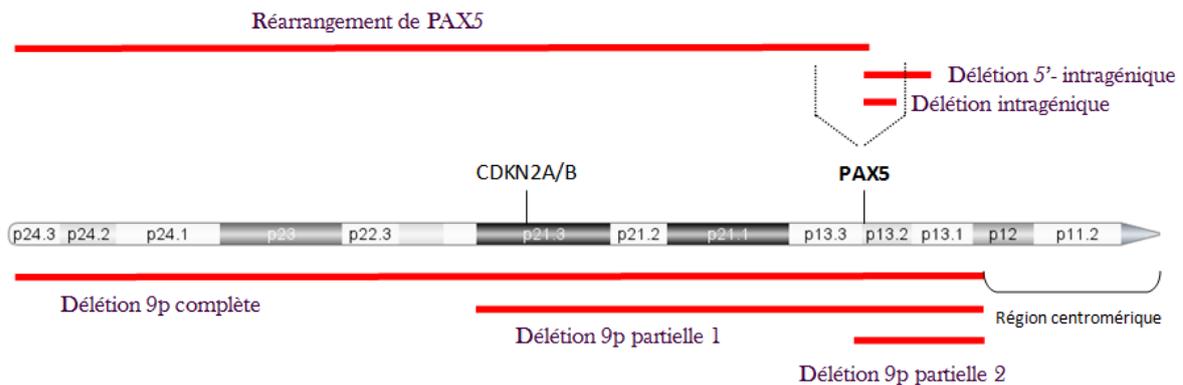


Fig 23. CNA les plus fréquents du gène PAX5. Le bras court du chromosome 9 est représenté. En haut sont représentées les délétions avec un point de cassure dans le gène *PAX5*. En bas sont représentées les délétions englobant le gène entier. Région centromérique : région à proximité du centromère du chromosome 9, aucune sonde de la puce à ADN n'est complémentaire d'une séquence de cette région.

Dans 1 cas, le gène *PAX5* est délété par monosomie du chromosome 9 chez un patient ayant une LAL hypodiploïde, et dans 9 cas par délétion complète du bras court du chromosome 9. Certaines délétions sont larges, allant du centromère jusqu'en amont immédiat du gène *PAX5* (n = 2) ou jusqu'en amont des gènes *CDKN2A/B* réalisant ainsi une délétion des 3 gènes (n = 6).

3 types de CNA présentent des points de cassure intragéniques à *PAX5*. Les premières sont des délétions de toute la partie terminale du bras court du chromosome 9 jusqu'au gène *PAX5* qui sont retrouvées dans les cas où ce gène est réarrangé (voir plus haut) (n = 4). Certaines délétions sont strictement intragéniques (n = 20), la plus fréquente étant la délétion $\Delta e2-e6$ (n = 10). Enfin, des délétions de petite taille (< 500 kb) sont identifiées avec un point de cassure intragénique et un point de cassure en 5' du gène (n = 11). Dans ces deux dernières situations, les exons 2 et/ou 3, qui codent pour le domaine de liaison à

l'ADN sont le plus souvent délétés. Une seule délétion a été identifiée avec un point de cassure intragénique et un point de cassure en 3' du gène, il s'agit là aussi d'une délétion de petite taille.

5.2.5 Les délétions du gène *ETV6*

Ce gène code pour un facteur de transcription de la même famille que le gène *ERG*, la famille ETS. C'est un gène indispensable à l'hématopoïèse.

Le gène *ETV6* est délété dans 51 cas (22%), ce qui en fait l'un des CNA les plus fréquents. La délétion est hétérozygote dans tous les cas. Sa taille est très variable, elle peut être focale et intragénique, ou large jusqu'à impliquer la délétion du bras court complet du chromosome 12. La délétion est concomitante de la translocation récurrente t(12;21) fusionnant les gènes *ETV6* et *RUNX1* dans 25 cas. La délétion de l'allèle non impliqué dans la translocation est fréquente et bien décrite⁴⁵. Dans 4 cas, la délétion du gène *ETV6* comprend les exons 6 à 8 et la région située en 3' du gène, et correspond très probablement à la délétion partielle du gène remanié. 16 cas de translocation t(12;21) ne sont pas associés à une délétion du gène *ETV6*. Ce gène est également partiellement délété dans la LAL Ph-like avec transcrite de fusion PAX5-*ETV6*, le réarrangement étant déséquilibré.

On retrouve des délétions du gène *ETV6* dans tous les sous-types génétiques de LAL B de la cohorte, à l'exception des translocations t(1;19) et des réarrangements du gène *KMT2A*. Ceci est en faveur du caractère secondaire de l'anomalie. 3 cas d'hypodiploïdie ont une monosomie 12 sur lequel est localisé le gène *ETV6*. Les délétions du gène *ETV6* semblent fréquemment associées aux iAMP21 (5/9 cas). Cette association a déjà été décrite dans la littérature⁴⁶.

5.2.6 Les délétions du gène *BTG1*

BTG1 est un petit gène de 5,6 kb comportant deux exons, localisé sur le chromosome 12. Il code pour une protéine régulatrice de la croissance cellulaire et de la différenciation. Il est délété dans les cellules leucémiques de 22 patients (9%) de la cohorte. Dans 3 cas, il s'agit d'une monosomie 12 dans le cadre d'une LAL hypodiploïde. Dans les 19 autres cas, il s'agit d'une délétion de petite taille (entre 300 et 600 kb) débutant en 3' centromérique

du gène. Le point de cassure télomérique est très reproductible d'un patient à un autre mais il est difficile à définir précisément en raison de l'absence de couverture de l'exon 1, de l'intron 1 et de la région située en 5' immédiat du gène (Fig 24). D'après les données de la CGH array, il est soit intragénique, soit localisé en 5' immédiat du gène. Les données de la littérature permettent de trancher en faveur d'un point de cassure intragénique dans le second exon⁴⁷.

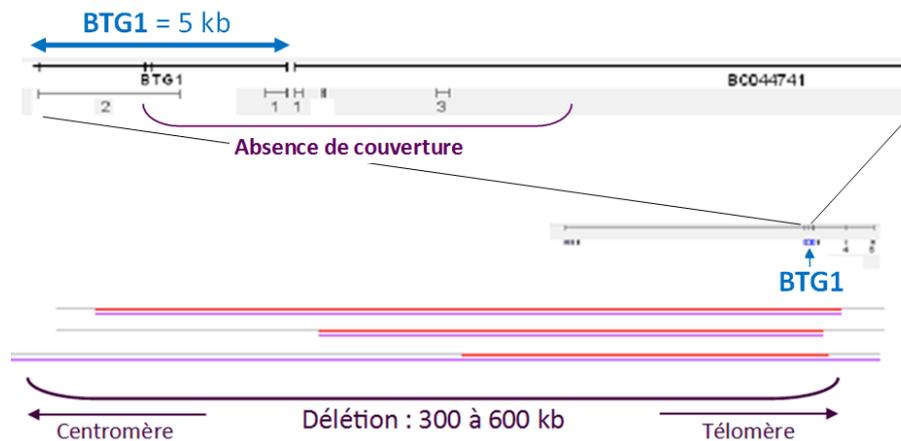


Fig 24. Représentation des délétions du gène *BTG1*. En haut : zoom sur le gène *BTG1* et la région 5' adjacente avec représentation de la région non couverte par les sondes de la puce à ADN. En bas : représentation de trois délétions de taille différente du gène *BTG1*. Les barres rouges représentent les délétions.

L'association la plus fréquemment identifiée est la t(12;21), 24% des t(12;21) présentent une délétion associée du gène *BTG1* (n = 10). Cet enrichissement a déjà été décrit dans la littérature. Dans ces cas, la délétion du gène *BTG1* serait secondaire à une activité aberrante des enzymes RAG 1/2 (les enzymes de la recombinaison V(D)J) et coopéreraient avec la translocation t(12;21) pour activer l'oncogène *BCL6*^{48,49}.

Les délétions du gène *BTG1* sont retrouvées dans d'autres sous-types de LAL B : 1 LAL Ph-like, 1 LAL hyperdiploïde et 7 LAL B other.

5.2.7 Les délétions du gène *RB1*

RB1 est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été décrit, il est le siège de mutations inactivatrices dans le rétinoblastome, et il tient son nom de ce cancer. Il est délété dans 13 cas (5%) de notre cohorte. 3 tailles de délétions sont possibles. Une

monosomie 13, présente dans 3 cas de LAL hypodiploïde et de façon assez surprenante dans un cas de LAL hyperdiploïde (avec par ailleurs les gains chromosomiques classiques), entraîne entre autres une délétion du gène *RB1*, situé sur ce chromosome. Dans 4 cas, la délétion est de petite taille, de l'ordre d'une centaine de kb, et comprend l'exon 18 jusqu'à l'extrémité 3' du gène. Dans les 5 derniers cas, la délétion est de grande taille, allant de 5 Mb à la quasi-intégralité du bras long du chromosome 13, et elle entraîne une délétion de tout le gène. Ce CNA est identifié dans différentes catégories génétiques. De façon notable, un tiers des iAMP21 (n = 3) est associé avec une délétion du gène *RB1*. Cette association a déjà été décrite dans la littérature⁵⁰.

5.2.8 Les délétions de la région PAR1

Les délétions dans la région PAR1 (région pseudo-autosomique, localisée sur les chromosomes sexuels) incluent les gènes *CSF2RA*, *IL3RA*, *ASMTL* et une partie du gène *P2RY8*. Cette microdélétion, invisible au caryotype, rapproche le gène *CRLF2* du promoteur du gène *P2RY8*, entraînant son hyperexpression. L'hyperexpression de *CRLF2* peut également être secondaire à une translocation t(X;14) ou t(Y;14) IGH-CRLF2. Les remaniements IGH-CRLF2 peuvent être équilibrés ou présenter une délétion associée de PAR1.

PAR1 est délété dans 4 cas de la cohorte. Dans 2 cas, le réarrangement P2RY8-CRLF2 a été confirmé par MLPA. Dans les deux autres cas, il peut s'agir d'un réarrangement P2RY8-CRLF2 aussi bien qu'IGH-CRLF2, même si la prévalence respective de ces anomalies rend le réarrangement P2RY8-CRLF2 plus probable. Le caryotype n'est d'aucune aide dans ces cas, les deux réarrangements étant cryptiques. En revanche, la FISH métaphasique peut mettre en évidence le chromosome partenaire, et la FISH IGH montre un remaniement du locus IGH en cas de réarrangement IGH-CRLF2.

Les 3 patients de la cohorte ayant un syndrome de Down ont tous un réarrangement du gène *CRLF2*. Ils ont 2, 5 et 12 ans au moment du diagnostic. L'enfant de 12 ans présentait une hyperleucocytose au diagnostic et ses MRD1 et MRD2 étaient positives. Il a rechuté de sa maladie 2 ans après le diagnostic et est décédé des suites de cette rechute. Les deux autres enfants n'étaient pas hyperleucocytaires et ont bien répondu au traitement, ils

sont actuellement toujours en rémission complète à respectivement 2 ans et 4 ans de suivi.

Le quatrième enfant présentant un réarrangement du gène *CRLF2* n'a pas de prédisposition génétique au cancer identifiée. Il avait 2 ans au moment du diagnostic, et était leucopénique. Il a été traité dans le groupe de risque standard suivant le protocole EORTC, les réarrangements du gène *CRLF2* et leur pronostic péjoratif n'étant pas encore décrits en 2007 au moment du diagnostic^{5,51}. Il a néanmoins bien répondu au traitement et est considéré guéri (11 ans de suivi).

5.2.9 Les délétions du gène *TP53*

TP53 est un gène suppresseur de tumeur, le plus fréquemment altéré dans les cancers. Dans notre cohorte il est délété chez 14 patients, toujours au sein d'une délétion large (absence de délétions intragéniques) allant d'une délétion de taille intermédiaire (n = 2, respectivement de 130 et 700 kb), à la délétion du bras court entier du chromosome 17 (supportant le gène *TP53*) (n = 9), voire du chromosome entier dans 3 cas hypodiploïdes.

La voie de *TP53* est donc plus fréquemment affectée dans les LAL B par la délétion du gène *CDKN2A* qui code pour deux protéines. L'une d'elle est la protéine ARF qui stabilise la protéine *TP53* par interaction avec MDM2. MDM2 est une E3-ubiquitine ligase qui adresse *TP53* au protéasome.

Les deux délétions de taille inférieure au bras entier sont en-dessous du seuil de résolution du caryotype. 7 délétions du bras entier ont été détectées par la cytogénétique conventionnelle (sur un nombre total de 9). 2 délétions ont été confirmées par une analyse en FISH grâce à une peinture du chromosome 17, permettant la confirmation de la présence d'un isochromosome i(17q), ou une sonde *TP53*. Une délétion du bras court a été considérée à tort comme une délétion du chromosome entier.

Le premier cas non détecté en cytogénétique conventionnelle présentait un add(13q) (gain de matériel non identifié sur le bras long du chromosome 13), la confrontation avec la CGH array a permis d'identifier une translocation déséquilibrée t(13;17) responsable de la délétion 17p.

Le second cas non détecté présente un caryotype normal 46,XY[20], et les sondes FISH utilisées (BCR-ABL1, ETV6-RUNX1 et KMT2A) n'identifient pas de réarrangement, ni d'anomalie de nombre. La CGH array met en évidence une hyperdiploïdie. La normalité des résultats de cytogénétique conventionnelle pour ce cas s'explique très probablement par un échec de la culture cellulaire (par défaut de pousse des lymphoblastes).

Aucune délétion du gène *TP53* n'est identifiée ou évoquée en cytogénétique conventionnelle sans être retrouvée en CGH array.

5.2.10 Réflexions sur les évènements secondaires (rechute et décès) et les CNA courants

12 patients de la cohorte sont décédés. Une patiente est décédée de complications infectieuses au décours du traitement d'induction (septicémie à *Pseudomonas aeruginosa*) et les 11 autres sont décédés dans les suites d'une rechute précoce (n = 7) ou tardive (n = 4). 13 autres patients ont fait une rechute précoce (n = 1) ou tardive (n = 12) et vont actuellement bien.

Parmi les patients décédés, 2 ne présentaient aucun facteur de mauvais pronostic classique au diagnostic (1 an < âge < 9 ans, leucocytose < 50 G/L, absence d'anomalie génétique défavorable) et avaient une MRD1 post-induction < 10⁻³. Ils sont tous les deux décédés dans les suites d'une rechute tardive.

Chez ces deux patients, la CGH array permet d'identifier des anomalies de mauvais pronostic : le premier patient a une délétion partielle du gène *IKZF1*. Il a rechuté de façon très tardive, 11 ans après le diagnostic initial. Le second patient a une délétion du bras court du chromosome 17 (délétion 17p) qui n'avait pas été identifiée au caryotype. En effet celui-ci retrouve une hyperdiploïdie avec les gains de chromosomes classiques, ainsi qu'un gain de matériel chromosomique sur le chromosome 13 d'origine non identifiée. Le croisement des données du caryotype et de la CGH array permet d'identifier une translocation t(13;17) déséquilibrée entraînant une délétion 17p. Cette délétion comprend le gène *TP53*, qui est un gène suppresseur de tumeur, fréquemment délété ou muté dans de nombreux cancers, dont les LAL. Il serait intéressant de savoir chez ce patient si l'allèle *TP53* non délété est muté, car les délétions seules, contrairement à la combinaison d'une délétion et d'une mutation inactivatrice, n'ont pas fait la preuve de

leur association à un mauvais pronostic dans les LAL B pédiatriques^{15,16}. La délétion du gène *IKZF1* est quant à elle associée à un mauvais pronostic³⁵. Chez ces patients, la CGH array permettait donc l'identification de facteurs d'alerte.

Il est par ailleurs intéressant de noter que 2 patients de la cohorte présentent à la fois une hyperdiploïdie et une délétion 17p, tous deux sont décédés suite à une rechute. L'hyperdiploïdie était à moins de 54 chromosomes dans les deux cas, c'est un seuil connu de pronostic moins favorable dans les LAL hyperdiploïdes⁹.

13 patients ont fait une rechute précoce (n = 1) ou tardive (n = 12) et sont actuellement en rémission complète. 8 d'entre eux ne présentaient aucun facteur classique de pronostic défavorable au moment du diagnostic. Parmi ces 8 patients, aucun n'avait une MRD1 supérieure à 10^{-3} , un seul avait un CNA de mauvais pronostic (délétion du gène *IKZF1*). Un patient avait une délétion des gènes *CDKN2A* et *CDKN2B* qui est décrite de mauvais pronostic chez les adultes mais pas chez les enfants³⁶. Deux patients avaient des CNA associés à un bon pronostic : délétions des gènes *BTG1* et *ERG*^{34,40}.

5.3 Résultats de l'analyse GISTIC

L'utilisation de l'outil GISTIC, comme décrit dans la partie matériel et méthode, a permis d'identifier six CNA significatifs supplémentaires (2 délétions et 4 gains).

5.3.1 Délétions des gènes *CD200/BTLA*

Les gènes *CD200* et *BTLA* sont adjacents sur le bras long du chromosome 3. Ils sont délétés chez 16 patients de la cohorte. 4 délétions sont de très grande taille (par monosomie 3 chez 3 patients hypodiploïdes, et une délétion partielle du bras long du chromosome 3 > 60 Mb chez un patient avec une LAL B other). Les 12 autres patients présentent des délétions très similaires entre elles, de taille inférieure à la résolution du caryotype (de 160 à 190kb) et englobant les deux gènes. Une délétion de ces deux gènes est ainsi identifiée chez des patients avec différents sous-types génétiques : LAL B other (n = 6), hypodiploïdie (n = 3), translocation t(12;21) (n = 3), hyperdiploïdie (n = 2) et iAMP21 (n = 1).

Un patient présente une délétion monoallélique du gène *CD200* et biallélique du gène *BTLA*. Les 11 autres ont une délétion monoallélique de ces deux gènes. Les points de cassure, bien que difficiles à déterminer précisément sur la CGH array, semblent localisés soit en 5' immédiat du gène *BTLA* soit dans son intron 1 du côté télomérique soit, et du côté centromérique entre l'intron 4 du gène *CD200* et la région 3' immédiate (le point de cassure centromérique le plus distal étant intragénique à un ARN non codant immédiatement adjacent au gène *CD200*). Ghazavi *et al.* a déterminé les points de cassure par une PCR spécifique dont le principe est basé sur la combinaison d'amorces. Elle décrit des points de cassures systématiquement extragéniques, situés à moins de 10 paires de bases de séquences de liaison des enzymes RAG 1/2 (5 cas)⁵². Une activité aberrante des enzymes de la recombinaison V(D)J est certainement impliquée dans la délétion, tout comme dans les délétions des gènes *BTG1* et *ERG*. Cet auteur suggère également un pronostic péjoratif associé à cette délétion (56/1154 cas LAL B avec le CNA).

Ce CNA est identifié dans différents sous-groupes génétiques (hyperdiploïdie, translocation t(12;21), Ph+, iAMP21 et B other) sans qu'une association soit évidente.

La glycoprotéine de membrane CD200 est exprimée par les lymphocytes B et a un rôle important dans l'immunosuppression et la régulation de l'activité anti-tumorale et aurait donc plutôt un rôle suppresseur de tumeur. La protéine BTLA est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines, ayant également un rôle dans l'activité anti-tumorale. L'impact de la délétion de ces gènes dans la pathogénèse des LAL n'est donc pas évident, et il s'agit probablement d'évènements génétiques secondaires.

5.3.2 Délétions 6p22

L'analyse GISTIC identifie également une délétion récurrente en 6p22, chez 16 patients. La délétion s'étend sur 25 à 140 kb et comprend uniquement des gènes codants pour des histones chez 12 patients. La délétion est homozygote dans 5 cas. Elle est centrée sur les gènes *HIST1H2BE* et *HIST1H4D* et comprend 2 à 19 gènes des histones. 4 patients ont une délétion plus large du côté centromérique (n = 2) et qui comprend le gène *HFE* (métabolisme du fer), ou du côté télomérique (n = 2) et qui comprend des gènes codants pour des ARN de transfert (rôle dans la traduction protéique).

Les deux patients ayant à la fois un syndrome de Down et une LAL Ph-like avec réarrangement du gène *CRLF2* ont également une délétion 6p22. Le troisième patient avec un syndrome de Down (LAL hyperdiploïde) a également une délétion de cette région. Un autre patient avec une LAL Ph-like (fusion de type PAX5-JAK2) présente ce CNA. Ces différentes entités apparaissent liées, comme cela a déjà été décrit par Loudin *et al.*⁵³. Cet auteur décrit également l'association des délétions homozygotes 6p22 avec une modification du profil de méthylation et d'expression du génome.

Par ailleurs, une monosomie 6 et une délétion large dans le bras court du chromosome 6 est identifiée chez deux autres patients, ces anomalies génèrent également une délétion des gènes des histones localisés en 6p22.

5.3.3 Gains

L'analyse GISTIC permet la détection de 4 gains statistiquement associés aux LAL de notre cohorte. La recherche de gains a été réalisée sur la cohorte complète à l'exclusion des cas hyperdiploïdes, les gains de chromosomes entiers masquant les gains de plus petite taille.

Le gain d'une copie des gènes *DLX5* et *DLX6*, situés sur le bras long du chromosome 7, est identifié dans 15 cas. Ils appartiennent à différents groupes génétiques : LAL B other (n = 6), translocation t(12;21) (n = 3), remaniement du gène *KMT2A* (n = 2), iAMP21 (n = 2), translocation t(1;19) (n = 1) et Ph-like (n = 1). Aucune anomalie du chromosome 7 n'est visible au caryotype. Les gènes de la famille DLX codent pour des facteurs de transcription à homéobox. Ils ont été décrits hypo-exprimés dans les LAL avec remaniement du gène *KMT2A*⁵⁴.

Le gain d'une copie du gène *GAS1* localisé en 9q21 est trouvé chez 11 patients. Ce CNA est présent dans différents sous-groupes génétiques : LAL B other (n = 4), translocation t(12;21) (n = 4), remaniement du gène *KMT2A* (n = 1), iAMP21 (n = 1) et translocation t(1;19) (n = 1). Ce gain est cryptique. Le gène *GAS1* est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, et il s'agit donc plutôt d'un gène suppresseur de tumeur.

Un gain intragénique du gène *CEP290*, codant pour une protéine du centrosome, est identifié chez 13 patients. Ce CNA est présent dans différents sous-groupes génétiques, sans prévalence notable d'un groupe.

Enfin, le gain d'une copie du gène *FOXP1* est identifié chez 10 patients. Ce gène est localisé en 14q12 et code pour un facteur de transcription. 6 patients présentent une LAL B other, et un cas de chacun des groupes suivants est identifié : translocation t(12;21), translocation t(1;19), fusion BCR-ABL1 et iAMP21. Un patient présente un gain du bras long du chromosome 14 sous forme d'un isochromosome i(14q), chez les 9 autres patients l'anomalie est cryptique.

Il est possible que ces gains constituent des anomalies secondaires, dites « passager » par opposition aux anomalies « driver » c'est-à-dire conductrices de la maladie et impliquées dans la leucémogénèse, ce qui concorderait avec leur présence dans de nombreux sous-types génétiques différents.

Parmi les cas présentant ces gains, nous remarquons un enrichissement en prélèvements avec un profil de log R ratio très oscillant (pour les 4 gains à l'exception des CNA du gène *GAS1*). Il est possible que dans une partie des cas, ces CNA soient des artéfacts et que la prévalence soit moindre que celle suggérée par notre analyse.

5.4 La recherche d'anomalies pronostiques par l'analyse GISTIC

Nous avons ensuite utilisé l'outil GISTIC pour détecter des CNA associés à une moins bonne réponse moléculaire. Nous avons pour ceci distingué les LAL avec une MRD1 supérieure ou inférieure à 10^{-3} , et cherché grâce l'outil GISTIC quels CNA étaient statistiquement plus fréquents dans un groupe ou l'autre.

Nous avons effectué cette analyse dans la cohorte entière puis dans des sous-groupes.

5.4.1 La recherche d'anomalies pronostiques au sein de la cohorte complète

Lorsqu'on compare les CNA entre les patients ayant une MRD supérieure ou inférieure à 10^{-3} , Les gains des chromosomes 10 et 21 entiers apparaissent comme des anomalies liées à une bonne réponse moléculaire. Le gain du chromosome 21 est systématique dans les LAL hyperdiploïdes et le gain du chromosome 10 fait partie des gains classiques. Le bon pronostic de ces CNA est donc lié au pronostic favorable des LAL hyperdiploïdes.

Aucun autre CNA pronostique n'est identifié en appliquant le GISTIC à la cohorte complète, probablement masqués par les gains des chromosomes 10 et 21. Nous avons poursuivi l'analyse dans le sous-groupe des LAL sans aneuploïdies (exclusion des hyperdiploïdies, des hypodiploïdies et d'une hypotriploïdie).

Nous explorerons ensuite deux catégories de la classification OMS : les LAL hyperdiploïdes et les LAL B other.

5.4.2 La recherche d'anomalies pronostiques au sein de la cohorte à l'exclusion des aneuploïdies

Ce groupe contient toutes les LAL à l'exclusion des LAL hyperdiploïdes, hypodiploïdes et hypotriploïdes selon leur définition dans la classification OMS. Les LAL présentant des gains ou des pertes de chromosome(s) ne rentrant pas dans un de ces trois cadres ont été prises en compte dans l'analyse, soit 147 cas au total.

5.4.2.1 Gains 1q

Les gains du bras long du chromosome 1 sont détectés comme des CNA associés à une mauvaise réponse moléculaire. 7 cas sur 11 de gains 1q sont dus à une translocation t(1;19) TCF3-PBX1 déséquilibrée. Ce sont des gains 1q partiels allant du gène *PBX1*, localisé en 1q23, jusqu'au télomère. Deux cas de t(1;19) présentent un gain 1q complet en plus du gain partiel dû à la translocation déséquilibrée.

Deux patients avec une translocation t(1;19) déséquilibrée présentent une MRD1 supérieure au seuil, ainsi qu'un patient avec une LAL other et un gain 1q complet. Les translocations t(1;19) sont identifiées comme des facteurs de moins bon pronostic, bien que le renforcement de la chimiothérapie dans les protocoles les plus récents rattrape le pronostic.

5.4.2.2 Délétions 3q

Deux patients présentent une délétion large (> 15 Mb) de la région 3q12.3 - 3q13.31. Tous deux avaient une LAL B other, une MRD1 supérieure au seuil et ont rechuté. Cette délétion est identifiée par l'analyse GISTIC comme de mauvais pronostic. Cette délétion large doit être différenciée des délétions focales des gènes *CD200/BTLA* localisés en 3q13.2 qui ne sont pas associées à un pronostic défavorable dans notre analyse.

5.4.2.3 Délétions 4q

Les délétions de la région 4q sont également associées à une mauvaise réponse moléculaire, ces délétions semblent centrées sur le gène *LEF1*. 3 cas présentent une délétion intragénique et 3 cas présentent des délétions larges > 30 Mb. Il s'agit dans tous les cas de LAL B other. Un patient a rechuté et deux présentaient une MRD1 supérieure au seuil. Le gène *LEF1* code pour un facteur de transcription impliqué dans la voie Wnt et l'augmentation de l'expression du TCR. Sa délétion dans les LAL B a déjà été décrite, sans que l'association avec le pronostic soit évaluée⁵⁵.

5.4.2.4 Délétions 7p

L'analyse GISTIC identifie plusieurs régions significativement associées à un moins bon pronostic sur le bras court du chromosome 7. En recensant les différentes délétions concernées, on s'aperçoit que toutes comprennent le gène *IKZF1* dont nous avons déjà parlé.

5.4.2.5 Gains 8

Les gains 8pter - 8q12 sont également reconnus par le GISTIC comme associé à un pronostic défavorable. 6 patients avec une LAL B other ont une trisomie 8. Un patient avec une LAL Ph+ a un gain 8q lié à un isochromosome 8q. Et deux patients avec une translocation t(12;21) ont un gain 8q12.3 - 8qter (non associé à un pronostic défavorable), l'un avec un chromosome dicentrique dic (8;12) et l'autre avec un échec du caryotype. Le patient avec une LAL BCR-ABL1 a rechuté, et deux patients avec des LAL B other présentaient une MRD1 > 10⁻³ et ont été allogreffés.

5.4.2.6 Gains 11q

De façon intrigante, l'analyse GISTIC fait ressortir le gain focal du gène *KMT2A* comme CNA de pronostic défavorable. Seuls deux patients présentent cette anomalie, et n'ont pas été considérés comme des LAL avec remaniement du gène *KMT2A* au moment du diagnostic (la sonde *KMT2A* en FISH ne mettait pas en évidence de réarrangement, et le caryotype n'identifiait pas d'anomalie de la bande 11q23, la localisation du gène *KMT2A*). Les gains sont de petite taille dans les deux cas (65 et 84 kb) et débutent en 5'*KMT2A* jusqu'en intragénique. Or, les réarrangements du gène *KMT2A* réarrangent la partie 5' de *KMT2A* avec la partie 3' d'un autre gène. Il semblait donc légitime de se demander si le gain observé pouvait correspondre à une insertion de très petite taille de la partie 5' de

KMT2A dans un gène partenaire. Néanmoins, le point de cassure intragénique est localisé dans l'intron 24 pour un cas, et dans l'intron 28 pour l'autre cas, soit en dehors du BCR (breakpoint cluster region, région du gène où surviennent les points de cassure quand le gène est réarrangé) du gène *KMT2A*, rendant très improbable son réarrangement.

Des duplications partielles du gène *KMT2A*, avec insertion dans un gène partenaire, sont décrites dans les leucémies aiguës myéloïdes, mais pas dans les LAL⁵⁶. Ces duplications sont de plus grande taille, et avec des points de cassures différents de nos deux cas.

5.4.3 La recherche d'anomalies pronostiques dans les LAL hyperdiploïdes

Les LAL hyperdiploïdes ont de manière générale une évolution favorable. Néanmoins certains patients répondent moins bien au traitement. Nous avons cherché parmi les 84 LAL hyperdiploïdes de la cohorte des CNA indicateurs d'un pronostic moins favorable.

Les gains des chromosomes 10 et 21 sont tous deux corrélés au pronostic. La réponse moléculaire post-induction est meilleure, et le risque de rechute est plus faible pour les tétrasomies 21 (rechutes = 7% ; MRD1 supérieure au seuil = 9%) par rapport aux trisomies 21 (rechutes = 14% ; MRD1 supérieure au seuil = 21%). De même le pronostic est meilleur en cas de tétrasomie 10 (absence de rechutes et de MRD1 supérieure au seuil) par rapport aux trisomies 10 (rechutes = 4% ; MRD1 supérieure au seuil = 6%) et à l'absence de gain du chromosome 10 (rechutes = 16% ; MRD1 supérieure au seuil = 16%).

Ces gains sont corrélés au nombre modal (nombre de chromosome par mitose), or plus le nombre modal est élevé dans une hyperdiploïdie, plus le pronostic est favorable. Nos résultats sont donc concordants avec les connaissances actuelles.

Ce sont les seuls CNA liés aux taux de MRD1 détectés par l'analyse GISTIC dans les LAL hyperdiploïdes.

5.4.4 La recherche d'anomalies pronostiques dans les LAL B other

L'utilisation de l'outil GISTIC dans les LAL B other retrouve certaines anomalies déjà identifiées dans la cohorte complète : les délétions 3q12.3 - q13.31, et les trisomies 8. Un seul CNA supplémentaire est identifié.

De façon intéressante, le gain partiel du gène *ZNF384* et de la région située en 3' immédiat est identifié comme associé à une moins bonne réponse moléculaire. Ce CNA est présent chez deux patients. Il couvre une région de 41 kb chez l'un, et 259 kb chez l'autre, de la région 3' du gène jusqu'à l'intron 2. *ZNF384* est un gène qui est fusionné de manière récurrente à différents partenaires dans les LAL B^{42,57}. Un remaniement à type de fusion ne peut pas être exclu ici.

5.5 Autres résultats notables

5.5.1 Discordances entre le caryotype et la CGH array

Nous avons cherché à comparer les résultats de deux analyses pangénomiques : le caryotype et la CGH array. Pour cela nous nous sommes intéressés aux cas hyperdiploïdes et avons comparé les gains recensés par le caryotype, en comparaison des gains observés en CGH array.

Nous avons déjà abordé la difficulté de l'analyse caryotypique des LAL. Les lymphoblastes sont fragiles et poussent mal en culture (en particulier les lymphoblastes hyperdiploïdes). De plus, la pousse est inhibée par les corticoïdes lorsque le traitement a été débuté avant le prélèvement. Enfin, même dans les conditions optimales de culture, le classement des chromosomes est rendu difficile par la morphologie de ceux-ci, qui est fréquemment altérée et complique l'identification des anomalies.

72 LAL hyperdiploïdes ont été prises en compte, pour lesquelles nous disposons des données du caryotype tel qu'il a été rendu indépendamment des résultats de CGH array.

Le caryotype était en échec dans 8 cas. 2 cas ne retrouvaient que des mitoses normales (défaut de pousse des lymphoblastes), et les 6 autres identifiaient des mitoses anormales avec un nombre augmenté de chromosomes mais avec une morphologie trop altérée pour permettre leur identification. Le nombre de mitoses clonales était généralement faible dans ces cas (<4), en dehors d'un cas avec 8 mitoses clonales et d'un cas avec 18 mitoses clonales. Pour un cas, nous avons l'information que la corticothérapie avait été débutée avant le prélèvement. Pour les 7 autres cas, l'information n'était pas disponible. Dans tous les cas, l'analyse FISH et/ou la mesure de l'index ADN ont permis de conclure à une très probable LAL hyperdiploïde. Aucun diagnostic n'a donc été manqué.

Pour les 64 cas avec un succès du caryotype, le profil de gain retenu a permis de conclure à une LAL hyperdiploïde. Néanmoins, des discordances sont observées entre les résultats du caryotype et le profil de la CGH array.

25 cas (39%) montraient au moins une discordance (médiane = 2 différences, moyenne = 3 différences). Nous avons comptabilisé 1 discordance pour chaque gain de chromosome recensé par une analyse et pas par l'autre. En conséquence, si un chromosome a été considéré par le caryotype comme un +8 et que la CGH array identifie un +X, nous avons comptabilisé 2 discordances.

La présence d'erreurs dépend du nombre de mitoses clonales analysables, il y avait au moins une erreur dans 75% des cas avec moins de 5 mitoses clonales (12 cas en tout). Le nombre d'erreur varie aussi en fonction du centre. Trois centres ont plus de dix cas hyperdiploïdes, permettant d'avoir un échantillonnage assez représentatif. Un centre avait des discordances dans 64% des caryotypes, et les deux autres centres avaient des discordances dans environ 20% des cas (19% et 24% respectivement). Cette différence inter-centres peut être expliquée par les techniques utilisées dans chaque centre permettant d'obtenir des mitoses de plus ou moins bonne qualité, par l'expérience des équipes de cytogénétique, et par les habitudes des cliniciens des centres (prélèvement réalisé avant ou après corticothérapie).

5.5.2 L'apport de la CGH array dans l'identification des LAL Ph-like

Les LAL Ph-like ont un transcriptome homogène, mais des anomalies génétiques hétérogènes²². Le transcriptome n'étant pas réalisé en routine, l'identification de ces cas est problématique.

Les anomalies équilibrées ne peuvent pas être détectées par la CGH array. En revanche, deux anomalies résultent de délétions invisibles au caryotype et sont détectables par la CGH array : les fusions P2RY8-CRLF2 qui rapprochent le gène *CRLF2* du promoteur du gène *P2RY8* par délétion de la région PAR1 située entre ces deux gènes, et les fusions EBF1-PDGFRB qui résultent également d'une microdélétion. Le réarrangement P2RY8-CRLF2 est classiquement détecté en FISH à l'aide d'une sonde complémentaire de la région délétée. La CGH array a permis la détection de 5 cas avec ce réarrangement.

Un cas de fusion EBF1-PDGFRB a été détecté, et confirmé en RT-PCR par le laboratoire de Lille.

Un cas de fusion IGH-CRLF2 identifié par la combinaison de deux sondes de FISH (sondes break apart IGH et CRLF2) est consécutif à une translocation t(X;14) cryptique. Ce cas n'est pas détectable en CGH array. Certaines de ces translocations sont déséquilibrées et la région PAR1 est délétée, ce qui n'est pas le cas pour cette patiente.

Et enfin, un patient présentait une translocation déséquilibrée t(9;12), avec des points de cassure en CGH array dans les gènes *ETV6* et *JAK2*. La RT-PCR réalisée à Lille a permis de confirmer la présence d'un transcrite de fusion ETV6-JAK2.

Le laboratoire de Lille a recherché des transcrits de fusion de type Ph-like dans leurs cas locaux de LAL B other (39 cas) ce qui a permis l'identification d'un cas supplémentaire, avec un transcrite de fusion PAX5-JAK2. L'anomalie est équilibrée, et la CGH array ne montre aucune anomalie au niveau de ces deux gènes. Nous notons que le caryotype ne permettait pas non plus de suggérer l'existence de cette anomalie.

Les anomalies de type Ph-like sont exclusives des autres anomalies de la classification OMS. Nous avons cherché dans les caryotypes toulousains de LAL B other des anomalies avec des points de cassure pouvant correspondre à des gènes sujets à des réarrangements dans les LAL Ph-like, c'est-à-dire *ABL1* (9q34), *ABL2* (1q25), *CSF1R* (5q33), *EPOR* (19p13), *JAK2* (9p24), *NTRK3* (15q25), *PDGFRB* (8q21), *TSLP* (5q22) et *TYK2* (19p13). Aucun réarrangement identifié au caryotype ne correspondait à la localisation d'un de ces gènes lorsqu'on prenait en compte la sous-bande. Etant donné la morphologie des chromosomes de LAL, nous nous sommes intéressés à tous les réarrangements localisés dans le bras d'un chromosome porteur d'un des gènes précédemment cités (bras 1q, 5q, 8q, 9p, 9q, 15q et 19p). 10 cas présentaient des réarrangements (translocations, additions ou délétions) dans un de ces bras. Nous avons cherché en CGH array des points de cassure au niveau des gènes correspondants, sans résultat.

En conclusion, la CGH array permet l'identification de deux types d'anomalies Ph-like cryptiques résultant de microdélétions : la fusion P2RY8-CRLF2, qui est l'anomalie la plus fréquente dans les LAL Ph-like, et la fusion EBF1-PDGFRB. Elle permet également dans certains cas de détecter d'autres anomalies, lorsqu'elles sont déséquilibrées, qui doivent

être confirmées dans un second temps, par exemple par des techniques de RT-PCR ou de FISH.

5.5.3 La CGH array et les LAL avec iAMP21

9 cas de la cohorte présentent une amplification intrachromosomique du chromosome 21 identifiée en FISH selon les critères de l'OMS (présence d'au moins 5 signaux RUNX1 dont 4 regroupés). L'anomalie est évidente en CGH array dans 8 cas. Le profil de log R ratio du chromosome 21 montre une amplification partielle du chromosome, avec un log R ratio qui dépasse 0,8 dans les régions les plus fortement amplifiées (Fig 26A).

Un cas n'est pas détecté avec nos paramètres standards (seuil de gain de plus de 2 copies fixé à un log R ratio de 0,4). La CGH array montre en effet un gain partiel du chromosome 21 mais avec une faible amplitude (Fig 26B). Il s'agit certainement d'un profil « aplati » comme nous en avons déjà repéré dans certains cas hyperdiploïdes. Une attention particulière doit donc être apportée aux gains du chromosome 21 afin de ne pas méprendre une iAMP21 pour une trisomie 21 (auquel cas le gain sera un gain du chromosome entier). L'aspect « aplati » du profil de log R ratio n'est pas expliqué ici par un tamponnement par l'ADN des cellules saines, en effet le taux de blastes dans le prélèvement est élevé (86%).

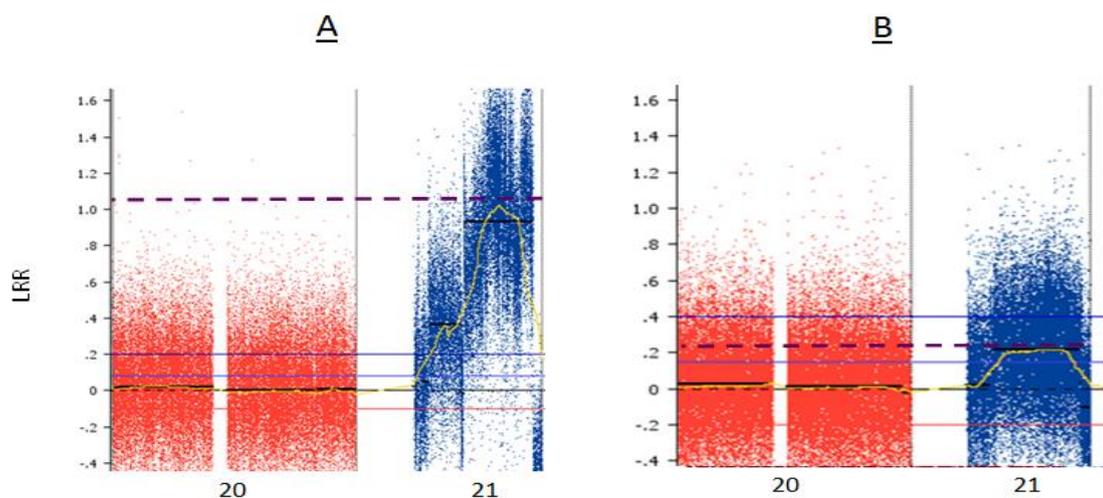


Fig 26. Piste de log R ratio de deux cas avec une iAMP21. Les log R ratio des chromosomes 20 et 21 sont représentés. A : cas avec une amplification évidente en CGH array. B : cas non détecté avec les paramètres standards. LRR : log R ratio.

5.5.4 L'apport de la CGH array dans la stratification pronostique des LAL B other

66 patients de la cohorte présentent une LAL B other selon la classification OMS 2016. La CGH array permet de mettre en évidence une anomalie primaire chez 17 patients, avec un risque associé variable.

Dans 14 cas, le gène *ERG* est délété, avec un risque favorable associé dont nous avons déjà discuté.

Une patiente présente une fusion de type TCF3-HLF, résultant d'une translocation t(17;19). Il s'agit d'une patiente de 13 ans, non hyperleucocytaire au moment du diagnostic. Les MRD1 et MRD2 étaient supérieures aux seuils et la patiente a été allogreffée. Elle se porte bien à 3 ans du diagnostic. La fusion TCF3-HLF est rare et difficile à détecter sur le caryotype, néanmoins il s'agit d'une anomalie associée à une résistance à la chimiothérapie et à un pronostic péjoratif⁵⁸. L'anomalie est déséquilibrée, et la CGH array met en évidence des points de cassures classiques, dans l'intron 13 du gène *TCF3* et l'intron 3 du gène *HLF*. Le réarrangement du gène *TCF3* a également été identifié en FISH par une sonde break apart, montrant la perte de la partie 3' du gène.

Enfin, 2 patients présentent un réarrangement avéré du gène *PAX5*, sans association pronostique démontrée. Les deux patients sont respectivement âgés de 3 ans et 17 ans, ils sont hyperleucocytaires lors du diagnostic (95 et 30 G/L), et les MRD1 et MRD2 sont inférieures aux seuils. Les patients sont en rémission complète à respectivement 21 et 22 mois de suivi.

6 Conclusion

La CGH array est une analyse pangénomique à haute résolution permettant de détecter des gains et des délétions. Cette analyse génère une grande quantité de données par échantillon, parmi lesquelles il est nécessaire de trier les artéfacts, les variants non pathogènes, les CNA associés à la pathologie et ceux associés au pronostic. La technique et son interprétation sont chronophages, et ne sont pas nécessairement adaptées à une pratique de routine. La CGH array présente par contre un intérêt en recherche appliquée, pour découvrir de nouveaux CNA et leur impact pronostic. Ces CNA peuvent ensuite être

recherchés par des techniques de mise en œuvre plus simple comme la FISH pour les CNA de grande taille ou le MLPA, pour les CNA de plus petite taille.

Dans notre cohorte, l'analyse par CGH array a permis de dépister de façon fiable certains sous-types de LAL. Les délétions du gène *ERG* sont un marqueur constant des réarrangements du gène *DUX4*. Les fusions géniques P2RY8-CRLF2 et EBF1-PDGFRB appartiennent au groupe des LAL Ph-like et sont associées à une microdélétion entre les gènes réarrangés.

Certaines autres anomalies supposées primaires sont détectées mais de façon non exhaustive, car toutes ne sont pas déséquilibrées. Il s'agit des réarrangements du gène *PAX5*, et de certaines LAL Ph-like autres que celles précédemment citées (un cas avec un réarrangement PAX5-ETV6 est détecté en CGH array).

Elle permet également d'identifier des CNA pronostiques déjà connus, tel que la délétion du gène *IKZF1*.

Enfin, l'application de l'outil GISTIC a permis de mettre à jour 5 CNA pronostiques qui n'ont pas encore été décrits dans la littérature. Il s'agit des délétions de la région 3q12-q13, des délétions 4q comprenant le gène *LEF1* dans leur région minimale de délétion, de la trisomie 8 (hors cas hyperdiploïdes) et des duplications partielles des gènes *KMT2A* et *ZNF384*. Ces CNA sont identifiés chez un nombre limité de patient, entre 2 et 7, et nécessitent donc d'être validés par d'autres études.

Tous les CNA récurrents dans les LAL ne sont probablement pas encore identifiés, en particulier ceux qui sont peu fréquents, et nécessiteraient l'analyse de cohortes de grande taille pour être mis en évidence.

7 Bibliographie

1. Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res.* **36**, 6–13 (2012).
2. Lee, J. *et al.* Lineage specification of human dendritic cells is marked by IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Nat. Immunol.* **18**, 877–888 (2017).
3. Laurenti, E. & Göttgens, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **553**, 418–426 (2018).
4. Boller, S. & Grosschedl, R. The regulatory network of B-cell differentiation: A focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunol. Rev.* **261**, 102–115 (2014).
5. Russell, L. J. *et al.* lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia Deregulated expression of cytokine receptor gene , CRLF2 , is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 2688–2698 (2009).
6. Freireich, E. J. The history of leukemia therapy - A personal journey. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **12**, 386–392 (2012).
7. Simone, J. V. History of the treatment of childhood ALL: A paradigm for cancer cure. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **19**, 353–359 (2006).
8. Dastugue, N. *et al.* Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood* **121**, 2415–2423 (2013).
9. Laurence, B. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et de l'adulte : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **74**, 547–560 (2016).
10. Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* **2**, 273–284 (2018).
11. Yuki, Y. *et al.* Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci.* **95**, 503–507 (2004).
12. Inukai, T. *et al.* Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia : frequent implication of parathyroid hormone-related peptide and E2A-HLF from translocation 17 ; 19. *Leukemia* **21**, 288–296 (2007).
13. Dahéron, L. E2A / HLF fusion gene in an acute lymphoblastic leukemia patient with disseminated intravascular coagulation and a normal karyotype. *Hematol. J.* **3**, 153–156 (2002).
14. Holmfeldt, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **45**, 242–252 (2013).

15. Stengel, A. *et al.* TP53 mutations occur in 15.7 % of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood* **124**, 251–259 (2014).
16. Stengel, A. *et al.* The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* **31**, 705–711 (2017).
17. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
18. Harrison, C. J. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood* **125**, 1383–1386 (2015).
19. Tsuchiya, K. D., Davis, B. & Gardner, R. A. Is intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) always intrachromosomal? *Cancer Genet.* **218–219**, 10–14 (2017).
20. Johnson, R. C. *et al.* Cytogenetic Variation of B-Lymphoblastic Leukemia with Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21 (iAMP21): A Multi-Institutional Series Review. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 103–112 (2015).
21. Boer, M. L. Den *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* **10**, 125–134 (2009).
22. Roberts, K. G. *et al.* Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1005–1015 (2014).
23. Roberts, K. G. *et al.* Oncogenic role and therapeutic targeting of ABL-class and JAK-STAT activating kinase alterations in Ph-like ALL. *Blood Adv.* **1**, 1657–1671 (2017).
24. Iacobucci, I. & Mullighan, C. G. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **35**, 975–983 (2017).
25. Kallioniemi, A. *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (80-)*. **258**, 818–821 (1992).
26. Visakorpi, T. *et al.* Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **55**, 342–347 (1995).
27. Levin, N. A. *et al.* Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* **54**, 5086–91 (1994).
28. Larramendy, M. L. *et al.* Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **12**, 1638–44 (1998).
29. Stewart, E. L. & Secker-Walker, L. M. Detection of the chromosomally abnormal clone in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **23**, 25–35 (1986).
30. Beroukhi, R. *et al.* Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20007–20012 (2007).

31. Beroukhir, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).
32. Forero-Castro, M. *et al.* Genome-wide DNA copy number analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new genetic markers associated with clinical outcome. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
33. Moorman, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **101**, 407–416 (2016).
34. Moorman, A. V *et al.* A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **124**, 1434–1444 (2014).
35. Mullighan, C. G. *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *October* **360**, 1–11 (2009).
36. Xu, N. *et al.* CDKN2 gene deletion as poor prognosis predictor involved in the progression of adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients. *J. Cancer* **6**, 1114–1120 (2015).
37. Schoumans, J. *et al.* Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosom. Cancer* **55**, 480–491 (2016).
38. Baughn, L. B. *et al.* Integration of cytogenomic data for furthering the characterization of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: A multi-institution, multi-platform microarray study. *Cancer Genet.* **208**, 1–18 (2015).
39. Velden, V. Van der & Hochhaus, A. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013–1034 (2003).
40. Clappier, E. *et al.* An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia* **28**, 70–77 (2014).
41. Zhang J; McCastlain K; Yoshihari H, *et al.* Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **48**, 1481–1489 (2016).
42. Liu, Y.-F. *et al.* Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine* **8**, 173–183 (2016).
43. Coyaud, E. *et al.* Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: A Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique study. *Blood* **115**, 3089–3097 (2010).
44. Cazzaniga, G. *et al.* The Paired Box Domain Gene PAX5 Is Fused to ETV6 / TEL in an Acute Lymphoblastic Leukemia Case. *Cancer Res.* **61**, 4666–4670 (2001).
45. Kempski, H. M. & Sturt, N. T. The TEL-AML1 fusion accompanied by loss of the untranslocated TEL allele in B-precursor acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Leuk. Lymphoma* **40**, 39–47 (2000).

46. Harrison, C. J. *et al.* An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): Cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* **28**, 1015–1021 (2014).
47. Waanders, E. *et al.* The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
48. Papaemmanuil, E. *et al.* RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **46**, 116–125 (2014).
49. Tijchon, E. *et al.* Tumor suppressor BTG1 limits activation of BCL6 expression downstream of ETV6-RUNX1. *Exp. Hematol.* **60**, 57–62.e3 (2018).
50. Schwab, C. J. *et al.* Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica* **98**, 1081–1088 (2013).
51. Mullighan, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor and Down Syndrome associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **41**, 1243–1246 (2010).
52. Ghazavi, F. *et al.* CD200/BTLA deletions in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the EORTC-CLG 58951 protocol. *Haematologica* **100**, 1311–1319 (2015).
53. M. Loudin, J. W. *et al.* Genomic profiling in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia identifies histone gene deletions associated with altered methylation profiles. *Leukemia* **25**, 1555–1563 (2011).
54. Ferrari, N. *et al.* DLX genes as targets of ALL-1 : DLX 2 , 3 , 4 down-regulation in t (4 ; 11) acute lymphoblastic leukemias. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 302–305 (2003).
55. Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764 (2007).
56. Fukushima, H. *et al.* The Partial Duplication of the 5' Segment of *KMT2A* Revealed *KMT2A - MLLT10* Rearrangement in a Boy with Acute Myeloid Leukemia. *Case Rep. Pediatr.* **2017**, 1–3 (2017).
57. Gu, Z. *et al.* Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
58. Hunger, S. P. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia : clinical features and molecular pathogenesis. *Blood* **87**, 1211–1224 (1996).

AUTEUR : Lucie COSTER

TITRE : Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aigues lymphoblastiques pédiatriques : perspectives et limites

DIRECTEUR DE THESE : Eric DELABESSE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Médecine de Rangueil, le 12 avril 2018

Résumé en français

Les leucémies aigues lymphoblastiques (LAL) constituent le cancer pédiatrique le plus fréquent. Elles sont responsables d'une mortalité non négligeable sans traitement, et peuvent entraîner des séquelles à long terme. La détermination des facteurs pronostiques propres à chaque patient est essentielle afin d'adapter le traitement, par l'utilisation de thérapies ciblées, l'adaptation du protocole de chimiothérapie et la décision de réaliser ou non une allogreffe de moelle osseuse. Les caractéristiques génétiques des cellules tumorales sont un facteur pronostique fort. L'analyse par CGH/SNP array permet de détecter les gains et les délétions dans le génome tumoral. Nous montrons que cette technique est efficace pour la détection d'anomalies de pronostic défavorable telles que les délétions du gène IKZF1 et la fusion des gènes CRLF2 et P2RY8. Par ailleurs, nous explorons les résultats de la CGH array de 236 LAL B pédiatriques grâce à l'outil mathématique GISTIC à la recherche d'anomalies pronostiques, en nous basant sur la réponse moléculaire au traitement pour distinguer les LAL de pronostic favorable et défavorable. Nous abordons ainsi l'utilisation de cette technique à des fins de recherche appliquée.

Titre et résumé en anglais

CGH/SNP array in pediatric acute lymphoblastic leukemias : potential and limits

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent pediatric cancer and is a major cause of childhood death due to cancer. The determination of individual prognosis factors allows personal treatment adjustment regarding chemotherapy plan, use of targeted therapy and allograft decision. Genetic characteristics of the cancer cells are a potent prognosis factor. CGH/SNP arrays permits detection of gains and losses in tumoral genome. We demonstrate the efficiency of this technic to detect unfavorable abnormalities such as IKZF1 deletion and P2RY8-CRLF2 fusions. We then explore 236 pediatric LAL B results through GISTIC mathematic tool in order to highlight prognostic markers, using molecular response to treatment to differentiate two groups of favorable and unfavorable prognostic.

Mots-Clés :

CGH array, SNP array, leucémie aigue lymphoblastique, pédiatrique, CNA, délétion, gain, pronostic

Discipline administrative : BIOLOGIE MEDICALE

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 - France