

Université de Montréal

**Stratégie de détection des anomalies chromosomiques
dans les leucémies aiguës pédiatriques**

par

Mélanie Roy-Tourangeau

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales
option générale

Mars, 2013

© Mélanie Roy-Tourangeau, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire s'intitule:

Stratégie de détection des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës
pédiatriques

Présenté par :
Mélanie Roy-Tourangeau

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Albert Moghrabi, président-rapporteur
Raouf Fetni, directeur de recherche
Nicole Lemieux, co-directrice
Caroline Laverdière, membre du jury

Résumé

L'analyse des anomalies génomiques récurrentes est importante pour établir le diagnostic, le pronostic et pour orienter la thérapie des leucémies aiguës pédiatriques. L'objectif de notre étude est d'élaborer une stratégie optimale pour détecter les anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloïdes (LAM) des enfants. Pour ce faire, nous avons caractérisé au caryotype, avec des panels d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), par RT-PCR et par l'index d'ADN 253 leucémies *de novo* reçues au CHU Sainte-Justine entre 2005 et 2011 (186 LAL-B, 27 LAL-T et 40 LAM). Nous avons réussi à optimiser la détection des anomalies chromosomiques dans les trois types de leucémies, avec des fréquences de 93,5% dans les LAL-B (174/186), 66,7% dans les LAL-T (18/27) et 90% dans les LAM (36/40). Nos résultats suggèrent d'utiliser plusieurs tests génétiques concomitants afin d'optimiser la détection des anomalies génomiques dans les LAL et les LAM *de novo* pédiatriques.

Mots-clés : cytogénétique, leucémie aiguë, anomalies chromosomiques, FISH, panel de FISH, pédiatrie, anomalies génétiques, micropuces, aSNP, protocole

Abstract

Analysis of recurrent genomic abnormalities is important for the diagnosis, prognosis and therapeutic choices in paediatric acute leukemia. The aim of our study is to establish a strategy optimizing the detection of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML). To do so, we have characterized childhood AML and ALL cases received in cytogenetic laboratory of CHU Sainte-Justine (Montreal, Canada) between 2005 and 2011. Overall, 253 *de novo* cases have been analyzed (186 B-ALL, 27 T-ALL and 40 AML) by karyotyping, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) panels, RT-PCR and DNA index. Chromosomal abnormalities detection rates achieved 93,5% in B-ALL (174/186), 66,7% in T-ALL (18/27) and 90% in AML (36/40). Our results suggest the analysis of both molecular and cytogenetic tests to optimize the detection of genomic abnormalities in new cases of childhood AML and ALL.

Keywords: cytogenetic, acute leukemia, chromosomal abnormalities, FISH, FISH panel, paediatric, genomic abnormalities, microarrays, SNP arrays, method

Table des matières

1 INTRODUCTION	1
1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1.1 GÉNÉRALITÉS ET STATISTIQUES DU CANCER	1
1.2 CANCÉROGENÈSE	3
1.2.1 DÉFINITION	3
1.2.2 INITIATION TUMORALE	4
1.2.3 PROGRESSION TUMORALE	7
1.3 CANCÉROGENÈSE PÉDIATRIQUE	8
1.3.1 ORIGINE PRÉNATALE DE CERTAINES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES.....	8
1.3.2 ÉTIOLOGIE DES LEUCÉMIES.....	11
1.3.2.1 Facteurs génétiques.....	12
1.3.2.2 Facteurs environnementaux	15
1.3.2.3 Mécanismes moléculaires à l'origine des anomalies chromosomiques.....	18
1.4 HÉMATOPOÏÈSE NORMALE	22
1.5 RÔLES DE LA CYTOGÉNÉTIQUE EN ONCOLOGIE HÉMATOLOGIQUE PÉDIATRIQUE	25
1.5.1 THÉRAPIES GÉNÉTIQUES CIBLÉES	26
1.6 DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC DES LEUCÉMIES AIGUËS PÉDIATRIQUES.....	27
1.6.1 CLASSIFICATIONS DES LEUCÉMIES	27
1.6.1.1 Classification franco-américaine britannique.....	27
1.6.1.2 Classification 2008 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).....	29
1.6.2 THÉORIE DES CELLULES-SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	31
1.6.3 LEUCÉMIES AIGUËS LYMPHOBLASTIQUES (LAL).....	35
1.6.3.1 Diagnostic.....	35
1.6.3.2 Pronostic et stratification du risque.....	36
1.6.3.3 Anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B.....	37

1.6.3.3.1 Anomalies chromosomiques numériques.....	39
1.6.3.3.2 Anomalies chromosomiques structurales.....	42
1.6.3.4 Anomalies chromosomiques dans les LAL-T	43
1.6.3.5 Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques.....	46
1.6.4 LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES (LAM) ET SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES (SMD)	50
1.6.4.1 Anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAM et les SMD.....	50
1.7 TECHNIQUES CYTOGÉNÉTIQUES ACTUELLEMENT UTILISÉES EN HÉMATOLOGIE CLINIQUE	54
1.8 NOUVELLES TECHNOLOGIES EN CYTOGÉNÉTIQUE (MICROPUCES)	58
1.9 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE	59
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
2.1 SÉLECTION DES SUJETS	62
2.2 CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS	63
2.3 RÉSUMÉ DES TECHNIQUES UTILISÉES	65
2.4 LES ANALYSES CYTOGÉNÉTIQUES	66
2.4.1 MISE EN CULTURE ET PRÉPARATION DES LAMES.....	66
2.4.2 MARQUAGE GTG ET ANALYSE CHROMOSOMIQUE.....	68
2.5 HYBRIDATION <i>IN SITU</i> EN FLUORESCENCE (FISH).....	69
2.5.1 PANELS DE FISH (ENSEMBLE DE SONDÉS COMMERCIALES)	69
2.4.2 CARACTÉRISATION CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE PAR BACS	71
2.4.3 TECHNIQUE DE LA FISH	74
2.4.3.1 Prétraitements des lames et préparation des sondes.....	75
2.4.3.2 Hybridation et coloration.....	77
2.4.3.3 Analyse microscopique	78
2.6 RT-PCR.....	79
2.7 STATISTIQUES.....	80

3. RÉSULTATS	82
3.1 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES MÉDULLAIRES	82
3.2 OPTIMISATION DES PANELS DE FISH	85
3.2.1 SEUIL DES SONDÉS UTILISÉES PAR FISH	88
3.3 CORRÉLATION ENTRE LES CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES ET LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES LAM	92
3.4 FRÉQUENCE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DANS LES LEUCÉMIES AIGÜES PÉDIATRIQUES	95
3.4.1 ANOMALIES PRIMAIRES	95
3.4.1.1 Réarrangements du gène MLL (11q23).....	97
3.4.2 ANOMALIES SECONDAIRES	100
3.4.2.1 Hyperdiploïdie et hypodiploïdie dans les LAL-B	102
3.4.2.2 Valeur pronostique des anomalies chromosomiques secondaires	105
3.5 CARACTÉRISATION CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES ANOMALIES RARES	108
3.5.2 QUATRE NOUVELLES TRANSLOCATIONS IDENTIFIÉES DANS LES LAL-B	120
4. DISCUSSION	125
4.1 OPTIMISATION DE LA DÉTECTION DES ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES ET VALEUR PRONOSTIQUE DES ANOMALIES PRIMAIRES	125
4.2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES MÉDULLAIRES	129
4.3 MISE AU POINT ET OPTIMISATION DES PANELS DE FISH.....	131
4.3.1 PANEL LAL-B	131
4.3.2 PANEL LAL-T.....	133
4.3.3 PANEL LAM	136
4.3.4 SEUIL DES SONDÉS	137
4.4 COMPLÉMENTARITÉ ET DISCORDANCES DES TECHNIQUES GÉNÉTIQUES.....	141

4.5 STRATÉGIE POUR CARACTÉRISER LES CAS RARES PAR FISH AVEC DES BACS	146
4.5.1 Réarrangements rares du gène MLL.....	146
4.5.2 Nouveau réarrangement impliquant le gène PAX5	149
4.5.3 Nouveaux réarrangements impliquant la bande chromosomique 14q32 dans les LAL pédiatriques	150
4.5.4 Nouveau gène de fusion ETV6-FOXO1	151
4.6 FRÉQUENCE ET VALEUR PRONOSTIQUE DES ANOMALIES SECONDAIRES.....	153
4.6.1 Anomalies secondaires à l'hyperdiploïdie	153
4.6.2 Anomalies secondaires à la fusion ETV6-RUNX1	155
4.7 INTÉGRATION DES MICROPUCES EN HÉMATOLOGIE CLINIQUE	156
4.7.1 Pertinence de l'intégration des micropuces en clinique cytogénétique oncologique	156
4.7.2 Stratégies pour intégrer les micropuces en hématologie	159
4.7.3 Défis entourant l'analyse des micropuces	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE.....	165
BIBLIOGRAPHIE	I
ANNEXE 1: PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA FISH.....	XX
ANNEXE 2 : ARTICLE PUBLIÉ DANS MÉDECINE SCIENCES AMÉRIQUE, 2012	I
CURRICULUM VITAE	XXI

Liste des tableaux

Tableau I. Principales caractéristiques des anomalies chromosomiques primaires et secondaires	6
Tableau II. Association entre la classification FAB des LAM et les anomalies chromosomiques	28
Tableau III. Principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B pédiatriques.	38
Tableau IV. Principales anomalies récurrentes dans les LAL-T pédiatriques.....	45
Tableau V. Principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAM et les SMD pédiatriques.	53
Tableau VI. Comparaison des avantages et des limites de chacune des techniques cytogénétiques actuellement utilisées pour le diagnostic des leucémies.	57
Tableau VII. Principales caractéristiques cliniques des patients.....	64
Tableau VIII. Prétraitements des lames pour la FISH interphasique et métaphasique.	76
Tableau IX. Préparation des dilutions pour les sondes de la marque Vysis ou pour les BACs de Toronto.	77
Tableau X. Gènes de fusion classiques dans les LAL et les LAM pédiatriques détectés par RT-PCR.....	80
Tableau XI. Proportion de mitoses anormales selon les conditions de culture dans huit cas de LAL-B <i>de novo</i>	83
Tableau XII. Détermination du seuil des sondes utilisées par FISH dans le panel LAL-B.	91
Tableau XIII. Caractéristiques cliniques des patients atteints de LAM <i>de novo</i> en fonction des sous groupes cytogénétiques.....	94
Tableau XIV. Cinq cas de LAL-B <i>de novo</i> avec co-existence d'un clone hyperdiploïde et d'un clone hypodiploïde détectés au caryotype, par FISH et/ou par l'index d'ADN.	104

Tableau XV. Fréquence et valeur pronostique des anomalies secondaires à l'hyperdiploïdie et à la translocation t(12;21)(p13;q22).	106
Tableau XVI. Caractérisation de cinq cas d'anomalies chromosomiques rares et identification des gènes impliqués par FISH avec des BACs.	109
Tableau XVII. Identification de nouvelles translocations chromosomiques dans quatre cas de LAL-B.	120
Tableau XVIII. Comparaison des taux de détection des anomalies chromosomiques dans notre étude et dans la littérature.	126
Tableau XIX. Stratégie de détection des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques à chacune des étapes de la maladie, du diagnostic jusqu'à la fin du traitement.....	143
Tableau XX. Quatre cas de LAL <i>de novo</i> présentant une discordance entre les résultats de la cytogénétique standard, de la cytogénétique moléculaire, de la RT-PCR et/ou de l'index d'ADN.	145

Liste des figures

Figure 1. Fréquence de diagnostic des cancers pédiatriques (nouveaux cas) en fonction du groupe d'âge.....	2
Figure 2. Taux d'incidence et de mortalité de tous les cancers et des leucémies chez les enfants et les jeunes (0-19 ans) au Canada entre 1985 et 2011.....	3
Figure 3. Tumeurs d'origine monoclonale ou polyclonale.	5
Figure 4. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'aneuploïdie et de la polyploïdie : les fuseaux mitotiques multipolaires et les centrosomes multiples.	22
Figure 5. Hématopoïèse normale.	24
Figure 6. Évolution clonale entre les anomalies chromosomiques détectées au diagnostic et à la rechute des leucémies aiguës pédiatriques.	35
Figure 7. Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques.	49
Figure 8. Stratégie utilisée au CHU Sainte-Justine pour caractériser les leucémies aiguës pédiatriques (LAL et LAM).....	65
Figure 9. Description des panels de FISH utilisés pour les leucémies aiguës pédiatriques <i>de novo</i>	71
Figure 10. Méthode pour caractériser le réarrangement d'un gène rare par FISH avec des BACs.....	74
Figure 11. Détection de la translocation t(12;21)(p13;q22) par FISH avec trois sondes différentes.....	87
Figure 12. Fréquences d'anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques <i>de novo</i> au CHU Sainte-Justine.....	97
Figure 13. Variété des translocations impliquant le gène <i>MLL</i> en 11q23 dans les LAL-B et les LAM pédiatriques.....	98
Figure 14. Translocation t(9;11)(p22;q23) avec réarrangement du gène <i>MLL</i> chez une patiente avec une LAM <i>de novo</i>	99

Figure 15. Fréquence des anomalies secondaires additionnelles à la translocation t(12;21)(p13;q22) et à l'hyperdiploïdie dans les LAL-B..	101
Figure 16. Détection d'hypodiploïdie et d'hyperdiploïdie par l'index d'ADN et par FISH.	103
Figure 17. Courbes de Kaplan Meier pour la survie sans évènement (EFS) à sept ans des LAL-B avec hyperdiploïdie seule et des LAL-B avec hyperdiploïdie au sein d'un caryotype complexe.	107
Figure 18. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une LAL-B <i>de novo</i> avec une translocation complexe impliquant les chromosomes 9 et 14 chez la patiente 1.....	111
Figure 19. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une LAM M5 <i>de novo</i> avec une translocation complexe impliquant les chromosomes 10, 11 et 21 chez la patiente 2.	113
Figure 20. Caractérisation cytogénétique moléculaire de deux cas (patients 3 et 4) avec réarrangement du gène <i>MLL</i> ..	117
Figure 21. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une translocation rare t(12;13) chez une patiente atteinte d'une LAM M1 <i>de novo</i>	120
Figure 22. Nouvelle translocation t(2;14)(p16;q32) n'impliquant pas les gènes classiques <i>IGH</i> et <i>BCL11A</i> dans une LAL-B <i>de novo</i>	123
Figure 23. Comparaison de deux méthodes statistiques pour le calcul des seuils des sondes du panel LAL-B.	139
Figure 24. Proposition d'une stratégie d'investigation génomique globale pour le diagnostic et le suivi des LAL-B et des LAM pédiatriques.	162

Liste des abréviations

aCGH : hybridation génomique comparative sur micropuces

ACMG : Collège Américain des Médecins Généticiens

AGT : association des technologistes en cytogénétique

aSNP : polymorphisme d'un seul nucléotide sur micropuces (*array SNP*)

BAC: *bacterial artificial chromosome*

CAP : Collège Américain des Pathologistes

CCMC: *Cancer Cytogenomics Microarray Consortium*

CCMG : Collège Canadien des Médecins Généticiens

Cep : centromère d'un chromosome

CN-LOH : perte d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies

COG: *Children Oncology Group*

CRC : consortium de recherche sur les leucémies lymphocytiques chroniques

der: chromosome anormal dérivé

DGV: *Database of Genomic Variants*

DI: index d'ADN

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EFS : survie sans évènement

ELF-MF : champs électromagnétiques avec des radiations non-ionisantes à fréquences extrêmement basses

FDA : *Food and Drug Administration*

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence

FITC : fluorescéine

GMO: greffe de moelle osseuse

GWAS: études d'associations pangénomiques

iAMP21 : amplification intra chromosomique du chromosome 21

ISCA : *International Standard Cytogenomic Array consortium*

ISCN : Système international de la nomenclature cytogénétique humaine

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

LAL-ETP: *early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LAM-t : leucémie myéloïde secondaire à la thérapie

LAM-SD : leucémie aiguë myéloïde reliée au syndrome de Down

LOH : perte d'hétérozygotie

Mb: mégabase

MRC : *Medical Research Council*

MTHFR : méthylentétrahydrofolate réductase

NHEJ : Non-Homologue End-Joining

NQO1 : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) quinone oxydoréductase

OS : survie globale

Q-PCR : PCR quantitatif

RT-PCR: la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse

SMD : syndrome myélodysplasique

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide

TdT : transférase deoxynucleotidyle terminale

À ma mère Danielle et à mon père Gérald

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement le docteur Raouf Fetni, mon directeur de recherche et mon mentor. Merci pour votre immense dévouement, merci d'avoir consacré beaucoup de temps et d'énergie dans ma formation et surtout, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours été là pour moi.

Je voudrais remercier la docteure Nicole Lemieux, ma co-directrice, qui a été la première à m'initier à la cytogénétique. Merci pour votre patience, votre aide et votre grand talent d'enseignante.

Je tiens aussi à remercier les pathologistes du CHU Sainte-Justine, particulièrement les docteurs Luc Laurier Oigny et Pierre Brochu pour leur accueil et pour m'avoir accordé des bourses durant mes études au département de pathologie. Merci également aux docteurs Natalie Patey, Dorothée Bouron Dal Soglio, Hervé Sartelet et Victor Kokta pour leurs précieux conseils scientifiques, leur collaboration et leur support.

Je voudrais aussi souligner l'importante collaboration des hématologues du Centre de Cancérologie Charles-Bruneau du CHU Sainte-Justine, particulièrement la docteure Caroline Laverdière, responsable du programme des leucémies aiguës lymphoblastiques. Un merci très spécial à Isabelle Delorme, coordonnatrice en hématologie spéciale, pour son apport et ses conseils concernant l'index d'ADN et l'hématologie clinique.

Merci également à toute l'équipe du laboratoire de cytogénétique postnatale du CHU Sainte-Justine. Je remercie chaleureusement Diane Lachance, coordonnatrice du laboratoire, qui a été essentielle dans ma formation en cytogénétique et surtout pour ses précieux encouragements et son support tout au long de mes études. Un merci particulier à Joanie Rochon, Louise Montreuil, Mélanie Vachon et Deborah Fico pour leur grande

collaboration et leur enseignement de la FISH. Merci aussi à Annie Vigneault, Lyne Bordeleau, Van Hong Nguyen et Danie Turmel pour leur aide avec les caryotypes de moelles osseuses et la culture cellulaire. Merci à Lysanne Le Brock (coordonnatrice du laboratoire), Vanessa Drysdale, Josée Brunelle, Claudine Leblanc, Catherine Drolet, Mathieu Burelle, Sophie Decelles et Karine St-Louis.

Je voudrais remercier la docteure Mélanie Beaulieu Bergeron, pour son enseignement de la FISH, des micropuces et surtout d'avoir été pour moi un modèle d'excellence, de réussite et de détermination. Merci aussi aux docteurs Fléchère Fortin et Amanda Fortier pour leur enseignement et pour leurs réponses à mes nombreuses questions.

Je remercie la docteure Li Fan, directrice du laboratoire de biologie moléculaire au CHU Sainte-Justine, pour son implication avec la RT-PCR.

Merci à mes collègues Thi Can Van Pham et à tous les résidents de pathologie.

Merci au docteur Raouf Fetni, aux pathologistes du CHU Sainte-Justine, au département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal (Madame Christine Léonard) et à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (programme de sciences biomédicales) de m'avoir accordé des bourses d'études et de rédaction.

Je voudrais remercier le président du jury (le docteur Albert Moghrabi) ainsi que tous les membres du jury (les docteurs Caroline Laverdière, Raouf Fetni et Nicole Lemieux) d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mon mémoire de maîtrise.

Finalement, je remercie du fond du cœur mes parents Gérald, Danielle, ma famille et mes ami(e)s pour leur support, leur patience et leur grande compréhension.

1 Introduction

1.1 Introduction générale

1.1.1 Généralités et statistiques du cancer

Le cancer est la principale cause de mortalité au Canada. En 2011, on estime que 177 800 nouveaux diagnostics et 75 000 décès sont survenus au pays par cette maladie (1). En termes de taux d'incidence et de prévalence, il s'agit d'une maladie affectant principalement les adultes (le risque de cancer augmente avec l'âge). Néanmoins, l'oncologie pédiatrique demeure une problématique de société importante (1). La leucémie, une tumeur maligne caractérisée par une prolifération clonale de cellules indifférenciées (blastes) de la moelle osseuse, est le cancer pédiatrique le plus fréquent. La leucémie aiguë représente 31,5% des cancers chez les enfants de moins de 14 ans (2). Chez l'enfant, la prévalence de la leucémie par rapport aux autres types de cancer varie en fonction de l'âge des patients, avec un pic d'incidence entre 1 et 4 ans pour la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (Figure 1) (2, 3). Outre l'âge, les données épidémiologiques montrent que plusieurs facteurs influencent la distribution de ce type de cancer tels que le genre (ratio hommes: femmes = 1,2 à 1,8 :1) et l'origine ethnique (les personnes de race blanche et les non hispaniques sont davantage affectés que les noirs et les hispaniques) (3-5).

L'évolution de la médecine moderne a nettement permis d'augmenter les taux de survie des patients atteints de leucémies aiguës pédiatriques: le taux de survie sans événement (EFS-*event free survival*) à 5 ans était d'environ 1% dans les années 1950, 50% dans les années 1960, 80% en 1990 et pourrait atteindre 90% en 2012 (Figure 2) (5, 6). Ceci peut

s'expliquer par différents facteurs tels que l'amélioration substantielle des stratégies thérapeutiques (chimiothérapie, radiothérapie et autres), la mise en place d'essais cliniques sur de nouveaux traitements et l'amélioration du diagnostic et de la stratification du risque de chaque patient (5-7). Il est aussi important de donner des thérapies appropriées aux patients atteints de leucémies afin d'éviter la toxicité; c'est pourquoi il est préférable d'ajuster les traitements en fonction de critères cliniques et biologiques précis spécifiques à chaque type de cancer (8). La mise en évidence d'anomalies chromosomiques récurrentes constitue un facteur de diagnostic et de pronostic essentiel.

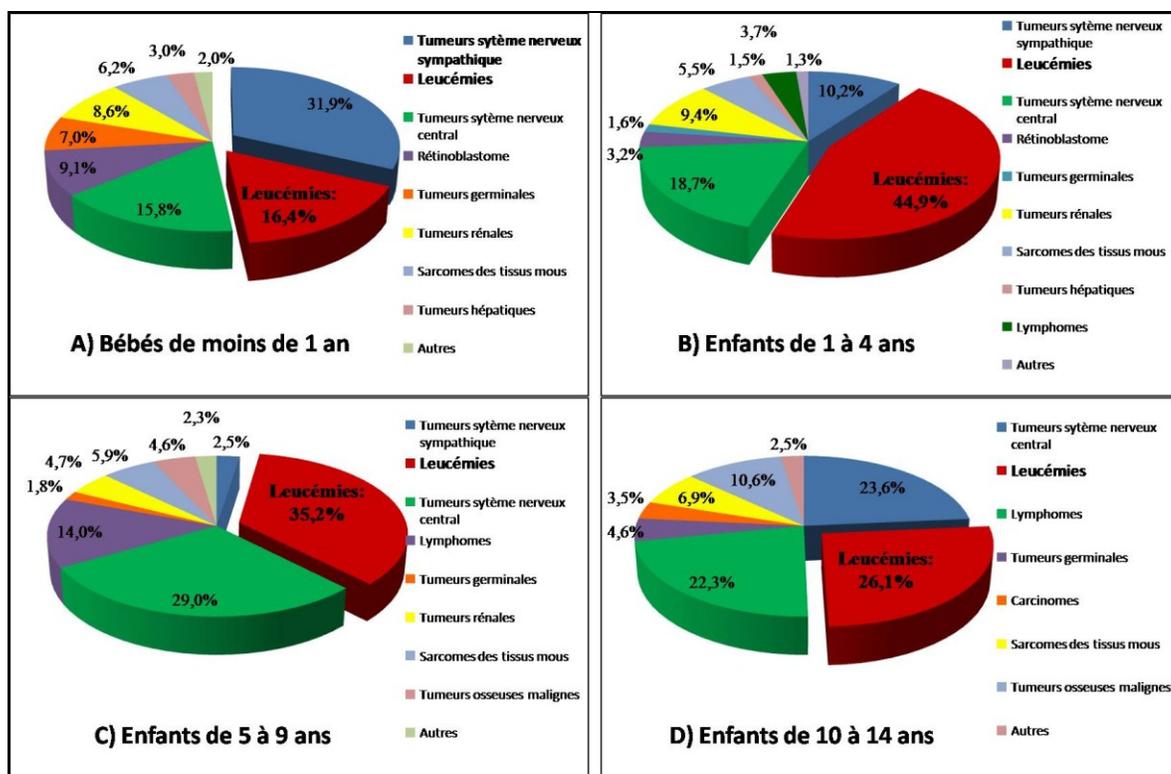


Figure 1. Fréquence des nouveaux cas de cancers pédiatriques en fonction du groupe d'âge [inspiré de Kaatsch, 2010 (2)] : A. Bébé de moins de un an, B. Enfants de un à quatre ans, C. Enfants de cinq à neuf ans et D. Enfants de dix à quatorze ans. La leucémie

est la néoplasie pédiatrique la plus fréquente, sauf pour le groupe des moins de un an, dans lequel les cancers du système nerveux sympathique sont plus communs.

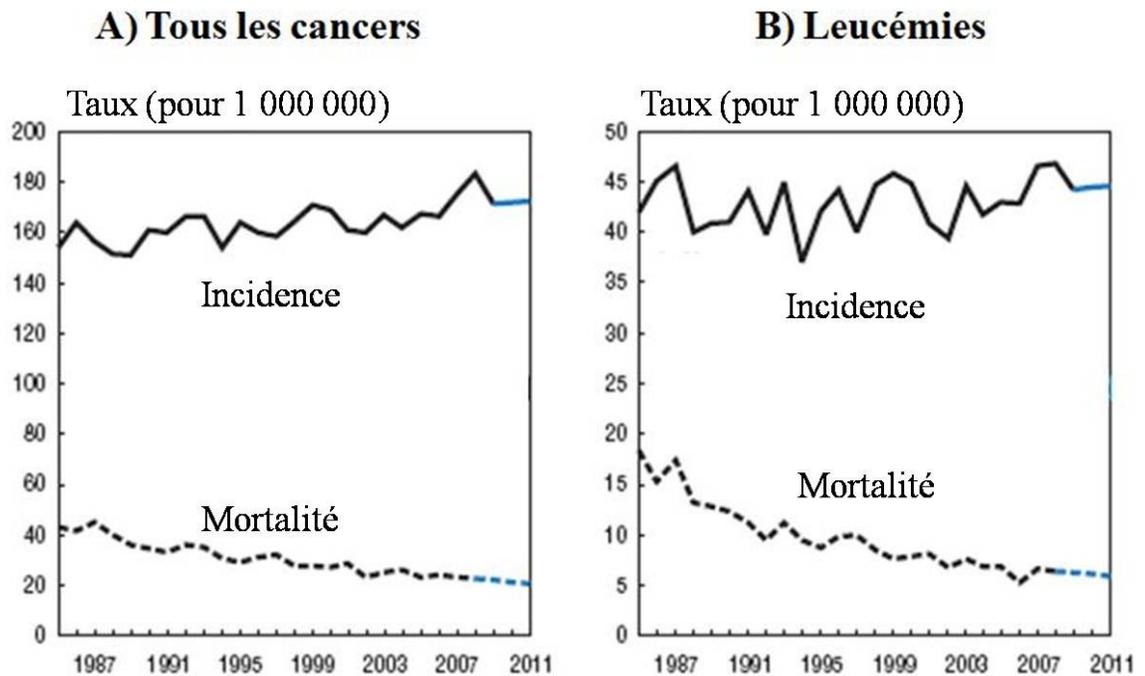


Figure 2. Taux d'incidence et de mortalité A) de tous les cancers et B) des leucémies chez les patients de 0 à 19 ans au Canada entre 1985 et 2011. Les sections de courbes en bleu représentent des estimations (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2011) (1).

1.2 Cancérogénèse

1.2.1 Définition

Le cancer est une maladie complexe multifactorielle caractérisé par un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. La cancérogénèse est un processus en plusieurs étapes au cours desquelles se produit la transformation maligne. Cette

tumorigenèse requiert l'acquisition de plusieurs caractéristiques clés qui confèrent un avantage prolifératif aux cellules tumorales (9). En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé six propriétés biologiques essentielles: augmentation des signaux de prolifération cellulaire, blocage des signaux d'inhibition de la croissance cellulaire, résistance à la mort cellulaire, capacité d'immortalité répliquative, induction de l'angiogenèse et activation de l'invasion et de la formation de métastases (10). En 2011, quatre nouvelles altérations cellulaires ont été ajoutées, soit la dérégulation du métabolisme énergétique, l'évasion du système immunitaire, la promotion de l'inflammation et l'instabilité génomique (9, 11, 12).

Plusieurs évènements sont nécessaires à la transformation néoplasique, soit l'initiation, la promotion et la progression tumorale.

1.2.2 Initiation tumorale

Un clone est une population cellulaire provenant d'une seule cellule. Pour qu'une anomalie chromosomique soit considérée comme clonale, elle doit être présente dans au moins deux cellules (gain chromosomique ou anomalie structurale) ou trois cellules (perte chromosomique) (13, 14). Il a été suggéré que les tumeurs ont une origine monoclonale, c'est-à-dire que toutes les cellules d'une masse cancéreuse dérivent d'une seule cellule anormale (cellule progénitrice commune) (Figure 3) (15). En fait, la majorité des néoplasies ont une origine monoclonale, cependant certains carcinomes ont toutefois une origine polyclonale (16). Parmi les étapes précoces, l'initiation de la cancérogenèse est déclenchée par l'activation d'oncogènes (conversion d'un proto-oncogène en oncogène actif) ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Différents mécanismes moléculaires ou génétiques sont impliqués, tels que les mutations ponctuelles, l'amplification et les translocations chromosomiques (pour l'activation des oncogènes), la méthylation des îlots CpG, les délétions et les monosomies (pour l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs). Ce dérèglement d'un gène clé contrôlant le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose altère une cellule normale (qui devient alors

anormale), ce qui constitue le premier événement à l'origine d'une tumeur (d'où le terme initiation tumorale). Il s'agit d'une lésion irréversible, bien que des altérations subséquentes soient nécessaires pour parvenir à la cancérogenèse complète (17).

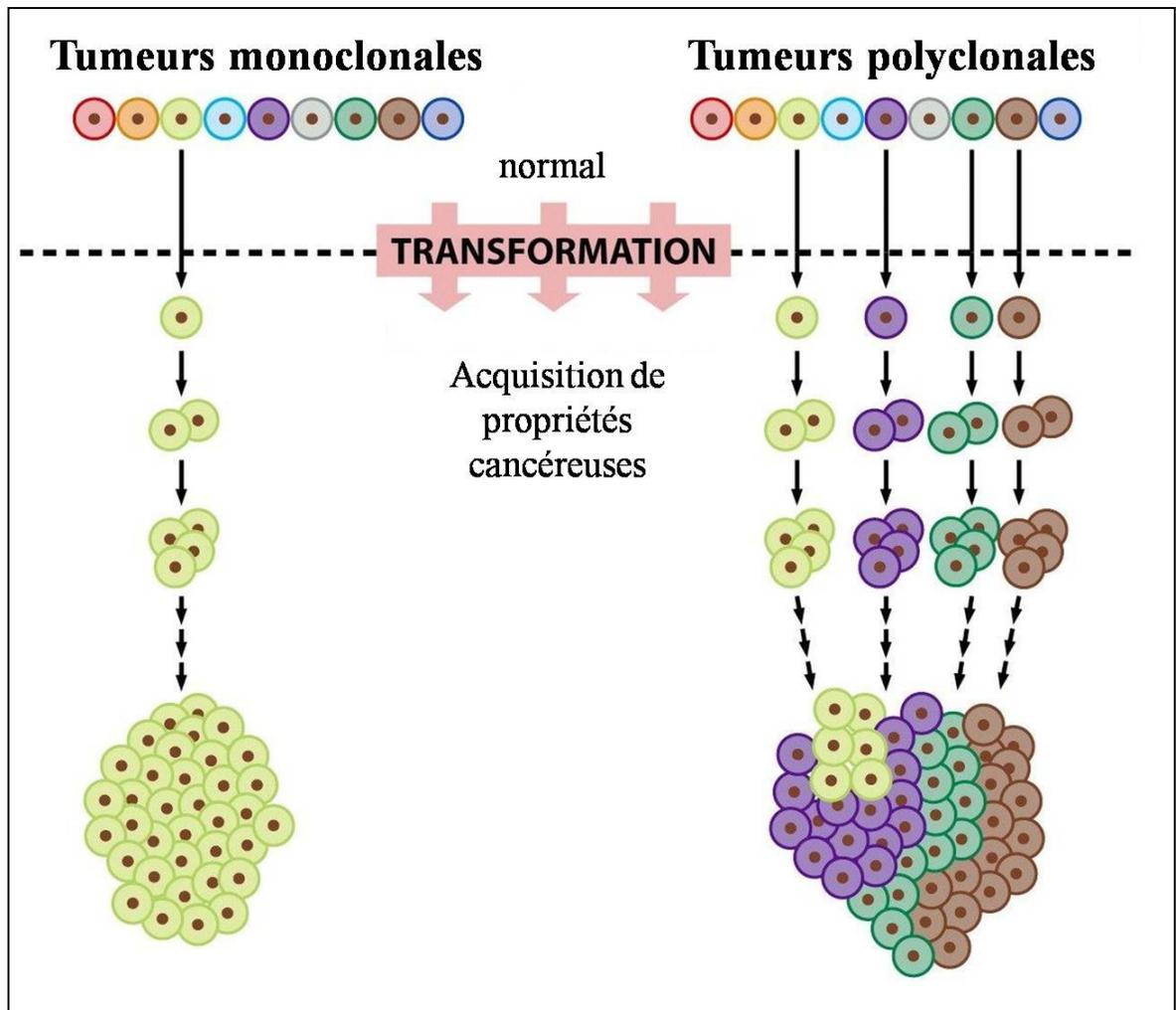


Figure 3. Tumeurs d'origine monoclonale ou polyclonale (modifié de Weinberg, 2007 (15), p.40, figure 2.17). Les tumeurs monoclonales proviennent de la transformation maligne d'une seule cellule normale qui acquiert diverses propriétés cancéreuses, alors que les tumeurs polyclonales dérivent de plusieurs cellules différentes qui ont traversé la frontière de la malignité.

Au niveau génétique, il existe 2 types d'anomalies chromosomiques clonales: les anomalies chromosomiques primaires et secondaires (Tableau I). Les anomalies primaires sont des réarrangements géniques spécifiques à certains cancers et sont impliqués dans l'initiation tumorale, alors que les anomalies secondaires se développent dans les cellules présentant déjà une anomalie primaire (anomalie additionnelle) et jouent plutôt un rôle dans la progression tumorale (16).

Tableau I. Principales caractéristiques des anomalies chromosomiques primaires et secondaires

Anomalie chromosomique primaire	Anomalie chromosomique secondaire
Souvent la seule anomalie de la tumeur	Rarement seule (souvent associée à d'autres anomalies)
Rôle dans l'initiation tumorale (premiers stades de la cancérogenèse)	Rôle dans la progression tumorale (stades plus avancés de la cancérogenèse)
Spécifique à la tumeur	Peu spécifique à la tumeur (dépend de l'anomalie primaire déjà présente)
Principalement des réarrangements géniques (translocations chromosomiques)	Principalement des anomalies génomiques déséquilibrées (gains et pertes)

Par la suite, la deuxième étape de la cancérogenèse implique la sélection clonale des cellules initiées ayant subi une première altération génétique : il s'agit de la promotion tumorale (17). Elle est favorisée par des mécanismes modulant l'expression génique et provoque une augmentation de la prolifération cellulaire et/ou une diminution de l'apoptose. Contrairement à l'initiation tumorale déclenchée par une exposition à des

agents cancérigènes génotoxiques, les agents promoteurs du cancer ne provoquent pas d'altérations directes à l'ADN, mais interviennent plutôt par des mécanismes épigénétiques affectant des voies de signalisations clés ou en stimulant l'inflammation (17).

1.2.3 Progression tumorale

Lors de la progression tumorale, des altérations génomiques supplémentaires se développent et permettent de générer une tumeur maligne. Cette étape de la cancérogenèse est associée à une grande instabilité génomique et chromosomique. La présence d'un clone présentant une anomalie chromosomique primaire, acquise lors de l'initiation tumorale, perturbe différents processus cellulaires dans la tumeur (des altérations du fuseau mitotique). Ceci crée un environnement propice à l'acquisition d'anomalies additionnelles (anomalies secondaires), d'où la grande variabilité génétique (16).

Les cellules qui émergent constituent différents sous-clones; leur co-existence génère une hétérogénéité génétique. Ces cellules subissent alors une sélection clonale de type *Darwinienne*. En effet, l'évolution clonale peut être expliquée par le modèle de Charles Darwin de la progression tumorale (sélection naturelle darwinienne des cellules cancéreuses) (15, 18). Selon ce modèle, lors de l'évolution clonale, il y a généralement émergence d'un clone dominant ayant un avantage prolifératif (augmentation des signaux de prolifération cellulaire, blocage des signaux d'inhibition de la croissance cellulaire et/ou résistance à l'apoptose) (18). La croissance des cellules de ce clone dominant sera alors favorisée au détriment des autres cellules qui deviendront alors des clones mineurs.

Par la suite, la complexité du génome tumoral peut évoluer lorsque la tumeur infiltre la membrane basale (formation de métastases) ou lors des traitements (16). Durant la thérapie, certains clones présentant un phénotype et des anomalies distinctes deviennent résistants, ce qui sélectionne des sous-clones mineurs et peu nombreux lors du diagnostic et qui peuvent ensuite entraîner une rechute (19).

1.3 Cancérogenèse pédiatrique

Puisque la cancérogenèse est un processus en différentes étapes qui s'échelonne généralement sur plusieurs années (parfois même plusieurs décennies), il est pertinent de se questionner sur les mécanismes permettant d'accélérer la transformation maligne rapidement pour que des enfants voire des bébés soient déjà affectés; aussi des altérations impliquant des gènes clés du contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose ou de la réparation de l'ADN peuvent expliquer la leucémogénèse rapide (20-22). Certaines aberrations génomiques qui surviendraient avant la naissance peuvent également en être la cause (8, 23).

1.3.1 Origine prénatale de certaines anomalies chromosomiques

Dans les leucémies pédiatriques, plusieurs évidences suggèrent que certaines anomalies chromosomiques surviennent avant la naissance, durant l'hématopoïèse fœtale (8, 23). L'acquisition d'une première anomalie prénatale, au niveau d'une cellule hématopoïétique immature, permet de générer un clone pré-leucémique, mais n'est toutefois pas suffisante pour que la leucémie se développe puisque des altérations subséquentes sont essentielles à la pathogénèse (24). Les principales anomalies chromosomiques ayant une origine *in utero* sont, dans les LAL, la fusion *ETV6-RUNX1* [translocation t(12;21)(p13;q22)], les réarrangements du gène *MLL* (11q23) l'hyperdiploïdie et dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), la fusion *RUNX1-ETO* [translocation t(8;21)(q22;q22)] (8, 20).

- **t(12;21)(p13;q22) en prénatal**

Des études sur des jumeaux identiques monozygotiques ont montré qu'une anomalie clonale (par exemple la fusion *ETV6-RUNX1*) est acquise chez un premier jumeau

(*in utero*) et diffuserait au deuxième jumeau par une anastomose vasculaire intraplacentaire (via les vaisseaux foetaux) durant la grossesse (25). Les deux jumeaux partagent donc un clone commun pré-leucémique [avec la translocation $t(12;21)(p13;q22)$] puis peuvent développer tous les deux une leucémie aiguë lymphoblastique après la naissance. L'émergence d'anomalies secondaires survenant en postnatal, principalement des variations du nombre de copies (CNV) (telle que la délétion hémizygote du deuxième allèle du gène *ETV6*), favoriserait la progression de la leucémogénèse (25, 26). Des études de polymorphismes d'un seul nucléotide sur micropuces (aSNP : *array SNP*) ont montré que les LAL précurseur-B présentant le gène de fusion chimérique *ETV6-RUNXI* ont en moyenne deux à six CNV additionnels (pouvant varier entre 0 et 14 CNV), principalement des microdélétions récurrentes impliquant des gènes importants pour la différenciation des cellules B ou le contrôle du cycle cellulaire (26-29). Ceci concorde avec le modèle en plusieurs étapes de la pathogénèse de la leucémie : initiation tumorale prénatale par la fusion *ETV6-RUNXI* (générant un clone pré-leucémique), puis transformation maligne des progéniteurs lymphoïdes par l'acquisition d'anomalies génomiques additionnelles (favorisant l'émergence de cellules-souches leucémiques).

Plusieurs arguments illustrent cette évolution clonale des LAL. D'abord, les jumeaux identiques avec une leucémie concordante partagent les mêmes marqueurs moléculaires clonaux, tels que les réarrangements de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) ou du récepteur des cellules T (*TCR*) (8, 25). Par contre, puisque les anomalies secondaires à la translocation $t(12;21)$ sont discordantes entre les deux jumeaux (la délétion du gène *ETV6* est présente chez un seul des jumeaux ou de taille très différente), cela suggère que ces événements surviennent après la naissance (26).

De plus, des études évaluant la fréquence de translocations chromosomiques (par exemple la fusion *ETV6-RUNXI*) dans le sang de cordons de nouveau-nés normaux ont montré que 0,1-1% des cas présentent une translocation $t(12;21)(p13q22)$, bien que ces bébés ne soient pas atteints de leucémie (8, 30). Ceci correspond à des taux environ 100

fois plus élevés que le risque cumulatif d'avoir une leucémie pédiatrique [1 :12 000 pour les LAL avec t(12;21)] (8, 26). En d'autres termes, cela signifie qu'un nouveau-né sain porteur de la t(12;21) à la naissance aurait une probabilité de 1/100 de développer une LAL-B, suggérant que des anomalies additionnelles sont critiques et essentielles pour compléter la transformation maligne (23).

Enfin, le taux de concordance de LAL-B chez les jumeaux génétiquement identiques est d'environ 10-15% (la probabilité qu'un clone pré-leucémique évolue en leucémie est donc d'environ 1/10, ce qui est 10 fois supérieur à ce qu'on retrouve dans la population en général) (18, 23). La discordance dans 85-90% des cas (un seul des deux jumeaux est atteint de leucémie) pourrait s'expliquer par des facteurs environnementaux survenant en postnatal et contribuant à la variabilité génétique interindividuelle.

- **Réarrangements du gène *MLL* en prénatal**

Dans la leucémie du nouveau-né (LAL avec réarrangement du gène *MLL* en 11q23), le taux de concordance chez les jumeaux avoisine 100% (18). Plus de 90% des leucémies chez les bébés de moins de 1 an sont des LAL avec un stade de différenciation pro-B et sont caractérisés par le gène de fusion *MLL-AF4* issu de la translocation t(4;11)(q21;q23) (31). On retrouve également une origine prénatale des réarrangements de *MLL* chez les enfants et les bébés atteints de LAM (32).

Puisque ces entités surviennent très tôt dans la vie (très brève latence de la leucémogénèse), il a été suggéré qu'une exposition prénatale à des composés génotoxiques (par la diète de la mère durant la grossesse) pourrait expliquer l'origine *in utero* des translocations impliquant *MLL* (31). Or, un gène de fusion impliquant *MLL* (par exemple le gène de fusion *MLL-AF4*) comme seule anomalie génétique semble insuffisant pour causer la leucémie (31). Ces réarrangements affectent toutefois drastiquement la stabilité génomique, en favorisant l'acquisition rapide d'anomalies subséquentes lors d'une exposition prénatale chronique à des agents génotoxiques (dérégulation du cycle cellulaire,

diminution de la capacité de la réparation de l'ADN ou la suppression de l'apoptose médiée par TP53) (8, 32, 33). Les aberrations du gène *MLL* pourraient ainsi accélérer l'évolution clonale, expliquant la très brève latence des leucémies chez ces bébés.

- **Hyperdiploïdie prénatale**

Par le test des cartes de Guthries (test de dépistage sanguin de certaines maladies congénitales des nouveau-nés), il est possible de détecter des cellules leucémiques par l'analyse des réarrangements de la chaîne lourde des immunoglobulines (gène *IGH*) et les blastes précurseurs-B des LAL présentant un réarrangement spécifique. Dans une étude utilisant ce test, 63% des enfants atteints de LAL-B présentent des clones pré-leucémiques et ce taux augmente à 91% (10/11) chez les patients avec une LAL hyperdiploïde, ce qui est significativement supérieur aux groupes sans hyperdiploïdie (34). De plus, des cellules pré-leucémiques hyperdiploïdes ont été détectées dans le sang du cordon d'un nouveau-né qui a par la suite développé une LAL avec hyperdiploïdie (35). Ces résultats concordent avec une origine prénatale de l'hyperdiploïdie (36, 37).

Globalement, ces données suggèrent une étiologie complexe multifactorielle survenant en plusieurs étapes pour expliquer la leucémogénèse pédiatrique, impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux (21, 38).

1.3.2 Étiologie des leucémies

La leucémie implique des altérations des différentes voies biologiques régulant le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou l'hématopoïèse (20-22). Bien que les causes exactes et les mécanismes responsables de l'étiologie des leucémies ne soient pas encore totalement élucidés, il est certain qu'une interaction de plusieurs facteurs de risque (anomalies constitutionnelles germinales ou prédispositions héréditaires, exposition

environnementale et anomalies génomiques acquises) contribue à la leucémogénèse (39, 40). Par ailleurs, les différents types de leucémies (LAL-B, LAL-T et LAM) peuvent avoir une étiologie distincte.

1.3.2.1 Facteurs génétiques

Contrairement à plusieurs tumeurs solides qui ont souvent une composante héréditaire importante (par exemple les mutations de *BRC1* ou de *BRC2* dans le cancer du sein, les mutations de *MSH2* ou de *MLH1* dans le cancer du côlon héréditaire, le HNPCC ou une mutation du gène *RB* dans le rétinoblastome), une faible proportion des leucémies chez l'enfant est causée par une anomalie génétique familiale (héritée) (22).

Certains syndromes génétiques congénitaux, notamment les syndromes d'instabilité chromosomiques, le syndrome de Down, et la neurofibromatose de type 1 représentent un facteur de risque héréditaire pouvant expliquer au total environ 5-10% des cas de leucémies aiguës (20, 38, 39, 41). Les patients atteints de syndromes avec une prédisposition aux hémopathies malignes souffrent souvent d'une importante toxicité suite aux thérapies standards, d'où l'importance d'un diagnostic précoce pour assurer un suivi approprié (41).

- **Syndromes d'instabilité chromosomique**

Environ 10% des cas avec anémie de Fanconi développent une leucémie (LAM à pronostic défavorable avec monosomie 7 ou duplication 1q), ce qui représente un risque 600 et 5000 fois plus élevé d'avoir une LAM ou un syndrome myélodysplasique (SMD), respectivement, que la population en général (41). Ceci pourrait s'expliquer par une sénescence prématurée des cellules-souches hématopoïétiques chez ces patients (38). Puisque 25% de ces cas sont phénotypiquement normaux, le syndrome est identifié uniquement au moment du diagnostic de leucémie, d'où les risques élevés de toxicité. La thérapie doit par la suite être adaptée (éviter les agents alkylants et la radiation) et une greffe de cellules-souches hématopoïétiques peut être requise (41). Chez les patients avec

le syndrome de Bloom, le risque de leucémie est estimé à 15% (principalement des LAM avec délétion 7q). Le cancer constitue la principale cause de mortalité précoce chez ces enfants. Dans l'ataxie telangiectasie, le risque de LAL-T est augmenté de 70 fois, avec des translocations récurrentes impliquant le récepteur des cellules T (*TCR*). Leur cancer présente un pronostic défavorable (risque très élevé de mortalité liée au traitement et à la toxicité) et leur sensibilité extrême aux radiations provoque des leucoencéphalopathies et des tumeurs cérébrales secondaires. Il est donc recommandé de réduire les doses de chimiothérapie (particulièrement le méthotrexate et les agents alkylants) (41).

- **Syndrome de Down**

En présence du syndrome de Down (trisomie 21 constitutionnelle), on note une augmentation de 500 fois du risque de développer une LAM mégacaryoblastique (M7 selon la classification FAB) (16). Les enfants présentant une LAM liée au syndrome de Down (LAM-SD) ont des anomalies cytogénétiques distinctes des autres LAMs (16, 42). Ces patients présentent principalement une dup(1q), del(6q), del(7p), dup(7q), trisomie 8, trisomie 11 et une del(16q); mais l'on retrouve rarement les anomalies récurrentes classiques des LAMs non SD comme la t(8;21), le réarrangement *MLL*, l'inv(16), la t(15;17) ou la monosomie 7. Ainsi, les LAM-SD représentent clairement une entité unique, d'ailleurs reconnue par la classification de l'OMS (43). Ces patients (particulièrement les jeunes enfants de moins de trois ans) répondent bien à la chimiothérapie avec la cytarabine et les anthracyclines, d'où le pronostic favorable (42). Cependant, les enfants atteints du syndrome de Down ont une probabilité 10 à 24 fois plus élevée d'avoir une LAL que dans la population en général (41). Les patients avec une LAL liée à ce syndrome (LAL-SD) ont un pronostic défavorable; aussi d'importants taux de mortalité sont observés (survie sans événement-EFS à 10 ans de 55% par rapport à 73% chez les LAL de risque standard sans syndrome de Down). Ceci pourrait s'expliquer par l'absence d'anomalies cytogénétiques à bon pronostic telle que l'hyperdiploïdie avec les trisomies combinées 4, 10 et 17 ou la translocation t(12;21)(p13;q22). Les LAL-SD sont plutôt associées à la

translocation t(8;14)(q11;q32) et aux délétions des gènes *ETV6* (12p13), *CDKN2A* (9p21.3) et *PAX5* (9p13.2) (42).

- **Polymorphismes génétiques**

L'implication de polymorphismes dans des gènes clés du métabolisme ou de la détoxification de certains produits chimiques cancérigènes semble jouer un rôle dans l'étiologie de la leucémie (40). Des polymorphismes alléliques constitutionnels modulant l'activité de la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1 : enzyme qui détoxifie les quinones), de la méthylentétrahydrofolate réductase (MTHFR : enzyme impliquée dans le métabolisme du folate), sont plus fréquents chez les bébés atteints de LAL avec une translocation de *MLL* que chez les contrôles (39, 44). De plus, un polymorphisme du gène *CYP3A4* du cytochrome P-450 (allèle *CYP3A4-V*) est associé à un risque plus élevé de développer une leucémie myéloïde secondaire à la thérapie (LAM-t) suite à l'utilisation des épipodophyllotoxines (39).

Des polymorphismes dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (allèle *HLA-DPBI*0201*), complexe impliqué dans la réponse immunitaire adaptative, sont associés à une augmentation du risque de LAL avec hyperdiploïdie (37). Le poids du bébé à la naissance semble être également un facteur de risque; les bébés pesant plus de 4 kg ont un risque accru de développer une LAL avec hyperdiploïdie ou avec la fusion *TCF3-PBX1* [t(1;19)(q23;p13)] (37). Une étude sur plus de 7820 cas de leucémies a montré que le risque de LAL avec hyperdiploïdie augmente de 12% pour chaque tranche supérieure de 0,5 kg de poids et de 41% pour les LAL avec la fusion *TCF3-PBX1* (45). Il n'y a toutefois aucune corrélation significative avec le risque de LAM (45).

Récemment, des études d'associations pangénomiques (GWAS- *Genome Wide Associations Studies*) sur de larges cohortes de patients et de contrôles ont identifié plusieurs facteurs importants de risque pour les hémopathies malignes. Plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), impliquant des gènes critiques pour le

développement des cellules B, la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, constituent des facteurs de risques génétiques confirmés dans l'étiologie des LAL-B pédiatriques (22). Notamment, des locus en 7p12.2 (gène *IKZF1*), 10q21.2 (gène *ARID5B*) et 14q11.2 (gène *CEBPE*) contiennent des variations génétiques qui perturbent la différenciation des progéniteurs des cellules B et sont associés à une augmentation significative du risque de développer une LAL-B chez l'enfant (22). Une récente étude du *Children Oncology Group* (COG) a par ailleurs identifié certains polymorphismes du gène *ARID5B* associés à un pronostic défavorable (46). De plus, une variation au niveau de l'intron 1 du gène *CDKN2A* (9p21.3), un gène suppresseur de tumeur, influence significativement le risque de LAL de lignée B et T des enfants (47). Ces allèles de susceptibilité sont communs dans l'ensemble de la population, mais ont une faible pénétrance : la leucémogénèse serait donc attribuable à l'interaction entre la présence de multiples variants génétiques (qui confèrent un faible risque) et une exposition environnementale à des produits cancérigènes.

1.3.2.2 Facteurs environnementaux

Des études épidémiologiques ont montré que l'exposition environnementale à certains produits chimiques ou aux radiations ionisantes est liée à une augmentation du risque de leucémies (20). L'association entre une exposition aiguë à forte dose de radiations (les bombes atomiques de Nagasaki et d'Hiroshima en 1945) et l'augmentation de l'incidence de leucémies (aiguës et chroniques) est bien connue et documentée, toutefois les conséquences d'une exposition chronique à faibles doses (exposition occupationnelle) sont moins claires (20, 39, 40).

Les lignes électriques à très haut voltage constituent une source de champs électromagnétiques avec des radiations non-ionisantes à fréquences extrêmement basses (ELF-MF), soit entre 0 et 100 kilohertz (48, 49). Contrairement aux radiations ionisantes tels que les rayons X, les radiations non-ionisantes n'ont pas suffisamment d'énergie pour

briser les molécules d'ADN (49). L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer a classifié les ELF-MF comme cancérigène possible (groupe 2B) chez l'humain (48). Dans la leucémogénèse, des études cas-contrôles ont montré une augmentation significative du risque de développer une leucémie pédiatrique de 1,4 à 1,7 fois lorsque le niveau d'exposition aux est supérieur à 0,3 μ T (39, 49). Cette association est encore plus importante pour les enfants de moins de quatre ans dont le lieu de résidence est inférieur à 50 mètres à la source d'exposition (le risque d'avoir une leucémie aiguë est alors augmenté de 2,6 fois) (48). Toutefois, la contribution exacte de l'exposition environnementale aux ELF-MF sur l'incidence globale des leucémies pédiatriques demeure controversée et les mécanismes biologiques impliqués peu connus (39, 40, 49, 50).

- **Agents génotoxiques**

L'exposition à des produits chimiques causant des dommages génotoxiques à l'ADN (directement ou indirectement via l'activation ou l'accumulation de métabolites cancérigènes) peut aussi contribuer à l'initiation ou à la promotion de la leucémogénèse. La fumée de cigarette (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les pesticides, les solvants utilisés à la maison, la peinture et la diète de la mère ou de l'enfant sont des facteurs potentiels de risque (20). L'exposition maternelle à la peinture durant la grossesse augmente les risques de développer une LAL chez l'enfant (20, 51). Cette association est limitée aux LAL avec la t(12;21)(p13;q22) (risque 4 fois plus élevé que chez les contrôles non exposés à la peinture), ce qui pourrait expliquer l'origine prénatale de la fusion *ETV6-RUNX1*. L'exposition prénatale aux solvants de pétrole augmente de 3,5 fois les risques d'avoir une LAM avec anomalies cytogénétiques favorables (51). Le benzène est une cause des néoplasies *de novo* de la lignée myéloïde.

- **Agents utilisés en chimiothérapie**

Certains agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie peuvent causer des leucémies myéloïdes secondaires à la thérapie (LAM-t) (20). Le type de médicaments

utilisés influence la vitesse de la transformation maligne de la LAM-t ainsi que les anomalies génomiques présentes. D'abord, les LAM-t induites par des agents alkylants nécessitent une latence de 1 à 20 ans (moyenne de 5 ans), la transformation maligne étant souvent précédée d'un syndrome myélodysplasique (SMD) (16, 40). Ces leucémies présentent un caryotype complexe hypodiploïde avec des anomalies génomiques déséquilibrées telles que les monosomies partielles 5q-, 7q- ou les monosomies complètes des chromosomes 7, 18 et 21. Par contre, les LAM-t induites par les inhibiteurs de la topoisomérase II se développent plus rapidement (1 à 3 ans après l'exposition, sans phase SMD). Le mécanisme d'action des inhibiteurs de la topoisomérase II consiste à augmenter et à stabiliser les complexes de clivages de l'ADN; ce qui induit des coupures dans l'ADN puis l'apoptose de la cellule (40). Ces LAM-t sont caractérisées par des translocations équilibrées au sein d'un caryotype paradiploïde et sont majoritairement monocytiques ou myélomonocytiques (type M4 ou M5b selon la classification franco-américainebritannique, FAB) (Tableau II) (40). Par exemple, les médicaments épipodophyllotoxines telles que le téniposide (VP-26) et l'étoposide (VP-16), utilisés en chimiothérapie intensive pour les LAL à haut risque, le neuroblastome ou le lymphome de Hodgkin, sont associés aux LAM-t avec réarrangements du gène *MLL* (11q23). Les traitements aux anthracyclines (par exemple le doxorubicin, le daunorubicin et d'autres types d'inhibiteurs de la topoisomérase II) induisent des translocations impliquant *MLL*, mais également les gènes *CBFβ* (16q22) ou *RUNX1* (21q22) (16, 39).

- **Exposition occupationnelle**

On retrouve plusieurs sources environnementales d'inhibiteurs de la topoisomérase II, telles que certains médicaments (quinolones), produits chimiques (laxatifs naturels, podophylle, dérivés du benzène et oestrogènes synthétiques) et aliments (flavonoïdes) (44). Ces expositions durant la grossesse contribuent à augmenter le risque pour le nouveau-né de développer une leucémie. L'usage de pesticides durant la grossesse ou la consommation de dipryone (un anti-inflammatoire non stéroïdien) est associé à une

augmentation significative du risque de leucémie avec réarrangement de *MLL* pour le fœtus (44). Certains composés induisent spécifiquement des bris au niveau du gène *MLL* du fœtus (notamment les bioflavonoïdes alimentaires), mais n'affectent pas le génome de la mère, dont les mécanismes de réparation de l'ADN sont déjà développés et efficaces pour contrer ces cassures (31). Le moment de l'exposition maternelle semble toutefois critique, particulièrement lors des premiers mois de vie durant lesquels le site de l'hématopoïèse passe du sac vitellin vers le foie (44).

Par la suite, malgré la présence de clones pré-leucémiques générés par une première anomalie génomique (anomalies acquises suite à une exposition environnementale ou anomalies génétiques constitutionnelles), l'acquisition d'anomalies subséquentes est nécessaire et souvent critique pour compléter la leucémogénèse. La progression de la leucémie est influencée par différents facteurs, notamment par une dérégulation de la réponse du système immunitaire lors d'une exposition à des infections (20). Ainsi, l'interaction entre le génotype de la mère, du bébé et l'exposition environnementale à certains composés peut expliquer l'étiologie multifactorielle de la leucémie.

1.3.2.3 Mécanismes moléculaires à l'origine des anomalies chromosomiques

Au niveau moléculaire, plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'origine des translocations chromosomiques ou de l'hyperdiploïdie retrouvées dans les hémopathies malignes.

- **Translocations chromosomiques**

Pour qu'une translocation chromosomique soit formée, plusieurs évènements sont requis : deux cassures double-brin de l'ADN (une sur chacun des deux chromosomes impliqués dans la translocation), une réparation erronée de l'ADN et l'acquisition d'un avantage de survie dans la cellule avec cette translocation (les translocations non

fonctionnelles ou létales ne favoriseront pas le développement de la leucémie). Certaines régions du génome semblent plus susceptibles aux bris de l'ADN (*hot spots*) à cause de petites homologies de séquences ou de sites physiologiques de clivage par certaines enzymes telles que la topoisomérase II (enzyme régulant la topologie et la structure tridimensionnelle de l'ADN) ou les endonucléases apoptotiques (8). Ceci pourrait expliquer pourquoi certains locus sont des sites récurrents d'anomalies chromosomiques, que ce soit des translocations ou des variations du nombre de copies (CNV).

Les territoires chromosomiques (architecture et organisation du matériel génétique au sein de différents domaines dans le noyau interphasique) génèrent aussi une proximité physique propice aux réarrangements chromosomiques au niveau de certains points de cassures (16). Par exemple, les locus impliqués dans les translocations t(9;22)(q34;q11.2) (fusion *BCR-ABL1*) ou t(15;17)(q22;q21) (fusion *PML-RARA*) semblent avoir une proximité spatiale. Ensuite, des erreurs dans la réparation de l'ADN, principalement lors de la réparation des extrémités non homologues de l'ADN (NHEJ : Non-Homologue End-Joining), peuvent survenir et provoquer une recombinaison illégitime.

La recombinaison V(D)J, un mécanisme constitutif de recombinaison durant lequel est établi le répertoire des antigènes immunologiques, peut également causer des fusions aberrantes oncogéniques (8). Ce mécanisme est particulièrement fréquent chez les enfants dans les LAL-T impliquant le récepteur des cellules T (c'est le cas de la translocation t(11;14)(p13;q11) associée à la fusion *LMO2-TCR*).

- **Aneuploïdie**

Plusieurs mécanismes moléculaires, principalement des erreurs de ségrégation des chromosomes à la mitose, peuvent causer de l'aneuploïdie (52).

D'abord, le dysfonctionnement de la réplication des centrosomes, qui conduit à des centrosomes multiples (*supernumerary centrosomes*), semble intervenir dans l'aneuploïdie

retrouvée dans les leucémies (Figure 4). Le centrosome, le centre organisateur des microtubules, doit normalement se dupliquer et se séparer afin de former les deux pôles opposés du fuseau mitotique (fuseau mitotique bipolaire), ce qui est essentiel afin d'assurer la ségrégation adéquate des chromosomes lors de la cytokinèse (Figure 4A). Cependant, lorsque la duplication du centrosome n'est pas coordonnée avec la réplication de l'ADN chromosomique, il se forme des fuseaux mitotiques aberrants tripolaires ou multipolaires, ce qui conduit à des erreurs dans la ségrégation des chromosomes (53). En effet, les cellules ayant des fuseaux mitotiques tripolaires peuvent effectuer la cytokinèse et les cellules qui réussissent à survivre sont aneuploïdes (Figure 4B). Par contre, lorsque les cellules contiennent des fuseaux multipolaires (>3 pôles), il n'y a généralement pas de cytokinèse. Par contre, si elles poursuivent le cycle cellulaire, lorsque p53 est absent ou inactivé, cela entraîne la formation de cellules polyploïdes (Figure 4C) (53).

Un attachement inadéquat entre le kinétochore et les microtubules, tel qu'un attachement mérotélique (un kinétochore lié aux microtubules provenant des deux pôles opposés du fuseau) ou un kinétochore complètement détaché des microtubules (défaut du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique permettant la progression du cycle cellulaire) peut également être à l'origine d'une ségrégation inégale des chromosomes lors de l'anaphase (52). Une séparation prématurée des chromatides-sœurs (anomalies dans le complexe de cohésion) peut aussi générer des cellules-filles aneuploïdes. Lors des divisions cellulaires successives, tous ces mécanismes peuvent contribuer à l'accumulation de l'aneuploïdie et à l'instabilité chromosomique des cellules cancéreuses (54).

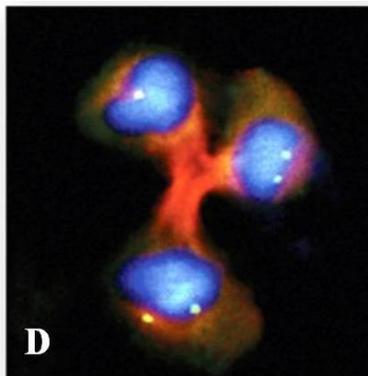
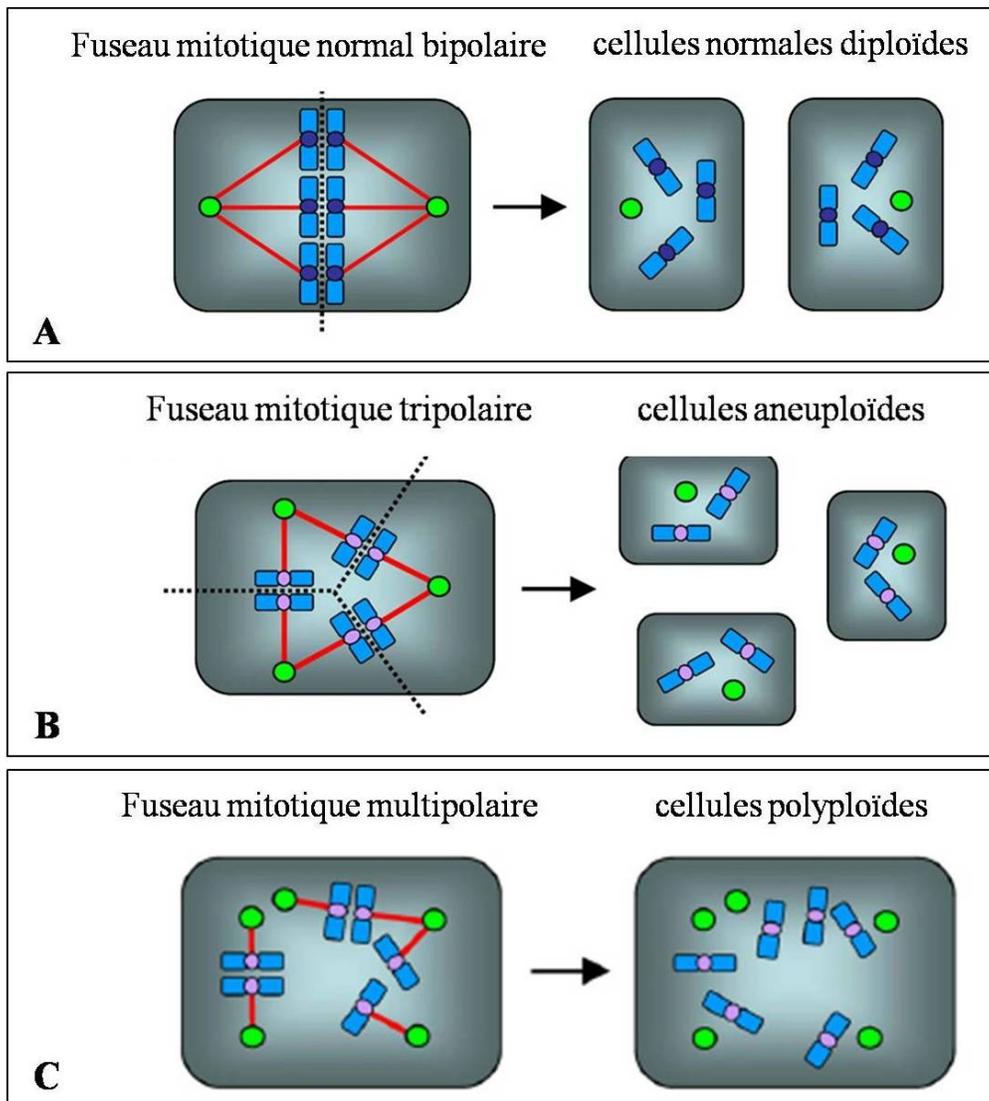


Figure 4. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'aneuploïdie et de la polyploïdie : les fuseaux mitotiques multipolaires et les centrosomes multiples. A) Fuseau mitotique normal bipolaire générant des cellules diploïdes. B) Fuseau anormal tripolaire (3 centrosomes) générant des cellules aneuploïdes. C) Fuseau anormal multipolaire (5 centrosomes) donnant des cellules polyploïdes. D) Marquage immunohistochimique d'un fuseau mitotique tripolaire (rouge) se divisant en 3 noyaux (colorés en bleu au DAPI). Modifié de Fukasawa et al, 2008 (53) (ABC) et de Weinberg, 2007 (15), p.515, figure 12.38A (D).

1.4 Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est un processus physiologique normal permettant la génération et le renouvellement de l'ensemble des cellules du sang périphérique à partir de cellules-souches hématopoïétiques. Le développement hématopoïétique est hautement régulé par les stimulations du microenvironnement (facteurs de croissance, cytokines, etc.) qui déterminent l'autorenouvellement, la quiescence ou la différenciation des cellules-souches hématopoïétiques en cellules progénitrices, en cellules précurseurs puis en cellules différenciées de la lignée lymphoïde ou myéloïde (Figure 5) (55, 56). La Figure 5A présente le modèle classique linéaire de l'hématopoïèse (*clonal succession model*), dans lequel les cellules matures dérivent toutes d'un seul ensemble de cellules-souches hématopoïétiques. Des études récentes suggèrent toutefois l'existence de plusieurs populations de cellules-souches hétérogènes ayant la capacité de se différencier en deux lignées (lymphoïde et myéloïde) en fonction du microenvironnement (*clonal diversity model*) (56).

Plusieurs gènes ont un rôle critique dans l'hématopoïèse (Figure 5B). Par exemple, les gènes *TALI*, *RUNX1* et *MLL* sont impliqués dans la génération (émergence et maturation) des cellules-souches hématopoïétiques. *IKAROS* est un régulateur clé de la

différenciation lymphoïde; *ETV6*, un facteur de transcription de la famille Ets et agit comme un répresseur transcriptionnel; *MYB* et *GATA3* sont impliqués dans la différenciation des cellules lymphoïdes T alors que *PAX5* et *TCF3/E2A* dans la différenciation des cellules lymphoïdes B (23, 55, 57, 58). Les anomalies chromosomiques qui entraînent la dérégulation de ces gènes clés perturbent l'hématopoïèse normale et peuvent favoriser l'émergence de cellules pré-leucémiques spécifiques à la lignée cellulaire (myéloïde, lymphoïde B ou lymphoïde T) altérée.

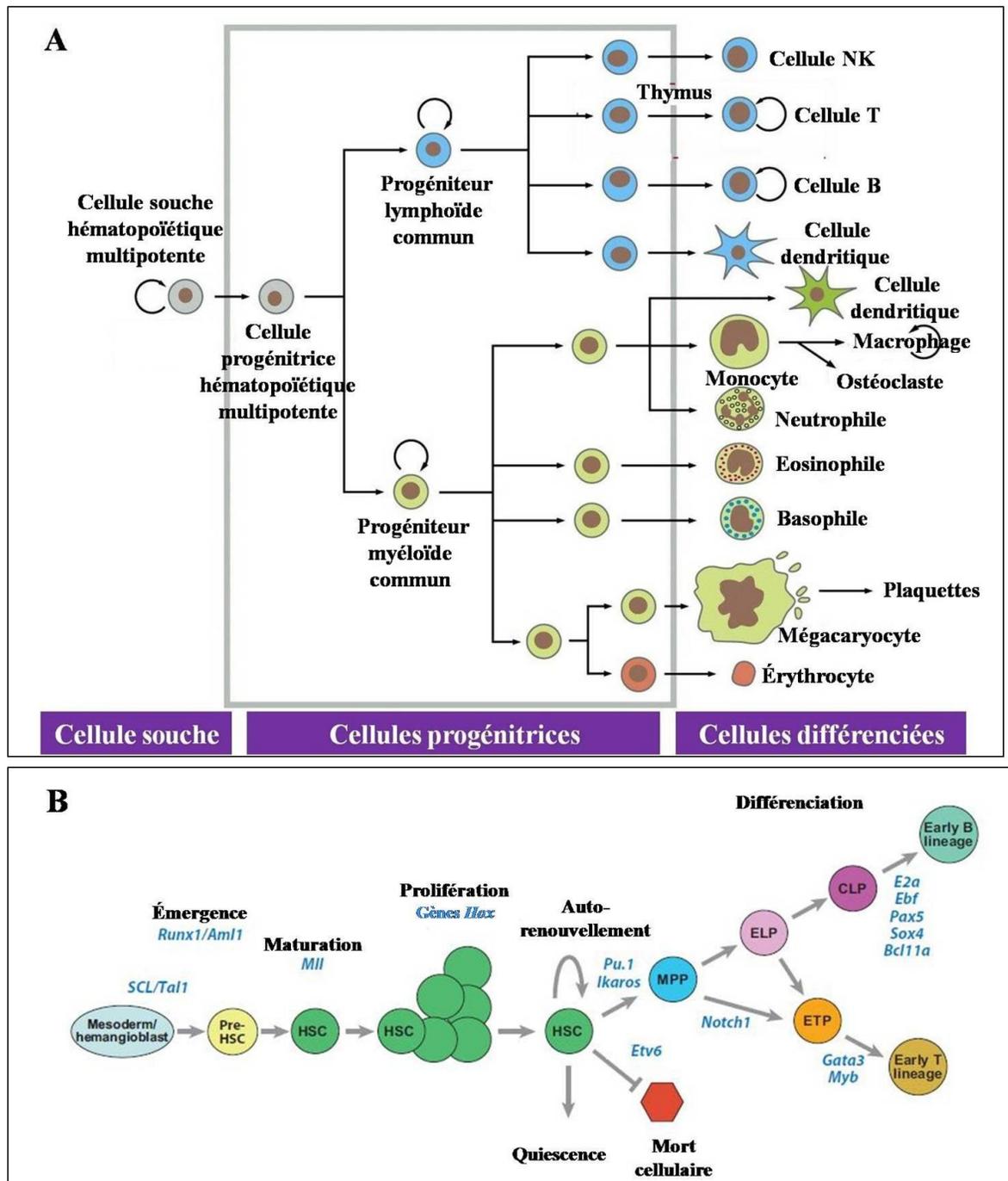


Figure 5. Hématopoïèse normale. A) Schéma illustrant les cellules-souches hématopoïétiques, les cellules progénitrices et les cellules différenciées matures de la lignée

lymphoïde et myéloïde (modifié de Weinberg, 2007 (15), fig 12.4). B) Rôle des principaux facteurs de transcription et des gènes régulant la chromatine au cours des différentes étapes du développement et de la différenciation hématopoïétique. La dérégulation de ces gènes clés de l'hématopoïèse par des anomalies chromosomiques (surtout des translocations) peut favoriser la leucémogénèse (LAL-B ou LAL-T) [modifié de Teitell et Pandolfi, 2009 (55)].

Légende : HCS : cellules souche hématopoïétique, MPP : progéniteur multipotent, ELP : progéniteur lymphoïde précoce, CLP : progéniteur lymphoïde commun, ETP : précurseurs précoces des cellules T

1.5 Rôles de la cytogénétique en oncologie hématologique pédiatrique

La cytogénétique, qui est l'étude de la chromatine chromosomique, est essentielle pour établir le diagnostic, le pronostic et pour orienter la thérapie des hémopathies malignes. Plusieurs anomalies chromosomiques récurrentes sont impliquées dans l'initiation ou la progression tumorale. Plus spécifiquement, la majorité des leucémies aiguës pédiatriques sont caractérisées par des translocations entre deux chromosomes qui génèrent des gènes de fusion ou dérégulent l'expression normale de gènes impliqués dans des processus clés de l'hématopoïèse tels que le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Les rôles de la cytogénétique seront approfondis dans les sections 1.5.1 (thérapies génétiques ciblées, page 26) et 1.6 (diagnostic et pronostic des leucémies, page 27).

1.5.1 Thérapies génétiques ciblées

La cytogénétique a aussi contribué à la mise au point de thérapies ciblées qui révolutionnent le traitement de certaines hémopathies malignes. La première thérapie ciblée découle de la découverte de la translocation pathognomonique t(15;17)(q22;q21) spécifique aux LAM M3 (leucémie aiguë promyélocytaire). La caractérisation des points de cassures de cette translocation a mis en évidence le gène de fusion *PML-RARA*, impliquant le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (*RARA*), d'où la mise au point de la thérapie à l'acide rétinoïque (*all-trans retinoic acid and anthracycline*) (59). Les patients ayant la t(15;17) peuvent donc bénéficier de cette thérapie ciblée, qui, en combinaison avec le trioxyde d'arsenic, entraîne des taux de survie globale (OS) de l'ordre de 75 à 85%, ce qui constitue l'entité avec le meilleur pronostic dans les LAM (7, 60).

Initialement, l'imatinib mésylate (STI-571 ou Gleevec®) a été développé pour inhiber spécifiquement le récepteur *PDGFR* dans les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs avec un réarrangement du gène *PDGFRα* (4q22) ou *PDGFRβ* (5q33) (16, 43). Il est cependant aussi efficace sur d'autres tyrosines kinases, telles qu'*ABL* et *c-KIT*. Le STI-571 a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis en 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, caractérisées par le gène de fusion *BCR-ABL1* (19). En effet, cet inhibiteur de tyrosine kinase cible ce gène de fusion issu de la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11) (chromosome de Philadelphie : Ph). Au niveau moléculaire, l'imatinib se lie à la poche catalytique du domaine tyrosine kinase d'*ABL* et bloque l'accès à l'ATP, conférant à la protéine chimérique *BCR-ABL1* une conformation inactive, induisant un arrêt de prolifération (55). Le STI-571 est également utilisé comme thérapie dans les LAL Ph+, la fusion *BCR-ABL1* étant présente dans environ 5% des LAL-B pédiatriques (7). Le STI a aussi été utilisé dans de rares cas de LAL-T avec le gène de fusion *NUP214-ABL* issu de la translocation t(9;9)(q34;q34) (61).

1.6 Diagnostic et pronostic des leucémies aiguës pédiatriques

1.6.1 Classifications des leucémies

1.6.1.1 Classification franco-américaine britannique

La classification franco-américaine-britannique (FAB-*French American British*) des leucémies, basée sur le stade de maturation de la tumeur (caractéristiques morphologiques et cytochimiques des blastes), a été établie en 1976 puis révisée en 1985 et 1991 (4, 62). Ultimement, pour les LAM, 11 sous-types ont été établis de M0 (leucémie indifférenciée) à M7 (leucémie mégacaryoblastique) (Tableau II) (16). Pour les LAL, 3 sous-types sont reconnus par ce système de classification: L1, L2 (prolifération des cellules pré-B ou T) et L3 (prolifération des cellules B, lymphome de Burkitt). Les LAL L1 présentent des petites cellules leucémiques avec une chromatine nucléaire homogène et un noyau de forme régulière. Cette catégorie constitue la majorité des cas de LAL pédiatriques. Les LAL L2 ont de plus larges cellules leucémiques avec une chromatine de distribution variable et un noyau de forme plus irrégulière que les L1 (il y a parfois même plusieurs noyaux). Cette entité représente environ 25% des cas de LAL pédiatriques (16). Autant les LAL L1 que les L2 peuvent provenir d'une lignée de cellules B ou T. Enfin, la morphologie des LAL L3 est caractérisée par de grosses cellules leucémiques homogènes avec une architecture de la chromatine normale et un noyau régulier, présentant souvent d'importantes vacuoles dans le cytoplasme basophile. Le type L3 est associé à l'immunophénotype des cellules B matures et correspond aux leucémies de type Burkitt (équivalent au lymphome de Burkitt). Il s'agit d'une catégorie plus rare (1-2% des cas de LAL des enfants), mais constitue une entité distincte caractérisée par la translocation $t(8;14)(q24;q32)$ et le gène de fusion *c-MYC-IGH* (16). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette translocation $t(8;14)$ sont expliqués dans la section 1.6.4.6 (Figure 7).

Tableau II. Association entre la classification FAB des LAM et les anomalies chromosomiques ^A

Type de LAM	Différenciation (4, 16)	Anomalie chromosomique	Gènes impliqués	Fréquence de l'anomalie (63, 64)
M0	LAM avec différenciation minimale	monosomie 5/délétion 5q, caryotype complexe		15-25% et 20% LAM M0
M1	Leucémie myéloblastique sans maturation	Caryotype normal		32% LAM M1
M2	Leucémie myéloblastique avec maturation	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-ETO</i>	40% LAM M2
M3	Leucémie promyélocytaire, hypergranulaire, typique	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARA</i>	> 95% des LAM M3
M3v	Leucémie promyélocytaire, microgranulaire, hypogranulaire, atypique	t(5;17)(q35;q21) ou autres translocations variantes 17q21	<i>NPM1-RARA</i>	Très rare, <1% des LAM M3v (16)
M4	Leucémie myélomonocytaire	Réarrangement 11q23, monosomie 7/délétion 7q	<i>MLL</i>	18-27% et 12% LAM M4
M4eo	Leucémie myélomonocytaire avec éosinophiles	inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>	95-100% LAM M4eo
M5a	Leucémie monoblastique (faiblement différenciée)	Réarrangement 11q23, trisomie 8	<i>MLL</i>	57-61% et 12% LAM M5
M5b	Leucémie monocytique (différenciée)	Réarrangement 11q23	<i>MLL</i>	57-61% LAM M5
M6	Érythroleucémie	Monosomie 7/délétion 7q, monosomie 5/délétion 5q, caryotype normal (65)		Rare (7) 73% LAM M6
M7	Leucémie mégacaryoblastique	Caryotype complexe, trisomie 21 constitutionnelle, t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15-MKLI</i>	41%, 41% et 50% LAM M7 (3)

^A. Ce tableau n'est pas exhaustif; seules les principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAM pédiatriques sont présentées. Ces anomalies chromosomiques ont été

retrouvées dans les différents sous-types FAB, mais ne font pas partie intégrante de cette classification.

Il est important de préciser que la classification FAB ne tient pas compte des caractéristiques génétiques ou cytogénétiques. Bien qu'elle apporte des critères pour établir le diagnostic des leucémies aiguës, une faiblesse de la classification FAB est qu'elle est peu ou pas informative sur la valeur pronostique de chacune des entités (4). C'est pourquoi une classification plus récente des hémopathies malignes, notamment celle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), est désormais plus pertinente et davantage utilisée par les cliniciens. Les principales anomalies chromosomiques des LAL seront présentées selon la classification OMS aux chapitres suivants.

1.6.1.2 Classification 2008 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

Tout d'abord, outre les critères cliniques tels que l'âge, la morphologie, le pourcentage de blastes et l'immunophénotype, la classification 2008 des hémopathies malignes de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) inclut également les caractéristiques génétiques de la leucémie (43). Cette classification fait l'objet d'un consensus mondial utilisé par les cliniciens pour le diagnostic et le pronostic des leucémies. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B, l'anomalie numérique la plus fréquente est l'hyperdiploïdie (25% des cas pédiatriques) et l'anomalie structurale la plus fréquente est la translocation pathognomonique $t(12;21)(p13;q22)$. Cette dernière génère le gène de fusion *ETV6-RUNX1* (25% des LAL-B des enfants) (7). Les LAL-T sont caractérisées par des réarrangements de gènes récepteurs des cellules T, principalement le gène *TCRA/D* (14q11) ou le *TCRB* (7q34), retrouvés dans environ 20 à 35% des cas pédiatriques (66). Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les réarrangements du gène

MLL (11q23) constituent les anomalies les plus prévalentes, présentes dans environ 18% des LAM pédiatriques (7, 63). Actuellement, il existe 104 translocations chromosomiques impliquant *MLL* et 66 différents gènes partenaires ont été identifiés au niveau moléculaire (32, 64, 67-69). L'on retrouve ces translocations dans divers types d'hémopathies malignes, autant dans les LAM et LAL *de novo* (nouveau diagnostic) que dans les leucémies induites par la thérapie (inhibiteurs de la topoisomérase II) (16, 69). Les translocations t(4;11)(q21;q23) (fusion *MLL-AF4*) et la t(9;11)(p22;q23) (fusion *MLL-AF9*) sont les plus fréquentes dans les LAL et les LAM respectivement.

En résumé, voici les anomalies génétiques incluses dans la classification 2008 de l'OMS pour les LAM et les LAL-B (43):

LAM avec anomalies génétiques récurrentes :

- ❖ LAM avec t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
- ❖ LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- ❖ Leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q22;q21); *PML-RARA*
- ❖ LAM avec t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
- ❖ LAM avec t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- ❖ LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *RPNI-EVII*
- ❖ LAM mégacaryoblastique avec t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKLI*
- ❖ LAM avec mutation du gène *NPM1*
- ❖ LAM avec mutation du gène *CEBPA*

Leucémies/lymphomes lymphoblastiques B avec anomalies génétiques récurrentes :

- ❖ LAL-B/lymphome avec t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
- ❖ LAL-B/lymphome avec t(v;11q23); réarrangement *MLL*
- ❖ LAL-B/lymphome avec t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*
- ❖ LAL-B/lymphome avec hyperdiploïdie
- ❖ LAL-B/lymphome avec hypodiploïdie (LAL hypodiploïde)
- ❖ LAL-B/lymphome avec t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*
- ❖ LAL-B/lymphome avec t(1;19)(q23;p13.3); *E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)*

Les anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B, les LAL-T et les LAM seront expliquées en détail dans les sections 1.6.3.3 (Tableau III), 1.6.3.4 (Tableau IV) et 1.6.4 (Tableau V) respectivement.

1.6.2 Théorie des cellules-souches hématopoïétiques

Les cellules-souches hématopoïétiques sont des cellules normales quiescentes qui ont la capacité de se différencier et de régénérer l'ensemble des cellules du système hématopoïétique. Elles sont localisées dans des domaines spécifiques dans la moelle osseuse (niches ostéoblastiques), le sang périphérique (niches vasculaires) ou le cordon ombilical. Elles sont régulées par des stimulations du microenvironnement (tel que les ostéoblastes, les cellules endothéliales, certains facteurs de croissance ou des cytokines) qui détermine le destin et la survie des cellules-souches hématopoïétiques : quiescence, auto-

renouvellement, différenciation ou apoptose (56). Leur immunophénotype est constitué principalement des marqueurs CD34+ et CD38-.

Les cellules-souches leucémiques présentent des caractéristiques similaires aux cellules-souches hématopoïétiques (quiescence, capacité d'auto-renouvellement illimitée), mais constituent des cellules pré-cancéreuses (70). Lorsque des patients atteints de leucémie ont des rechutes, la résistance au traitement est attribuable à la survie et à la prolifération des cellules-souches leucémiques, qui ne sont pas ciblées par les thérapies actuelles, d'où l'intérêt de développer des nouvelles approches spécifiques à ce type de cellules.

Plusieurs anomalies chromosomiques [par exemple : translocations t(4;11)(q21;q23), t(9;22)(q34;q11.2)] semblent survenir au niveau de ces cellules-souches primitives CD34+CD19- et il a été suggéré que cela pourrait expliquer leur pronostic défavorable dans les LAL-B pédiatriques (56). Plus spécifiquement, le gène de fusion *MLL-AF4* issu de la t(4;11) a été détecté dans des cellules-souches mésenchymateuses de bébés atteints de LAL-B du nouveau-né (31). Ainsi, les réarrangements du gène *MLL* pourraient être à l'origine de la transformation maligne des cellules-souches hématopoïétiques en cellules-souches leucémiques (71). L'implication des cellules-souches leucémiques a également été montrée dans les leucémies de la lignée myéloïde. Par exemple, la protéine de fusion chimérique *PML-RARA* confère la capacité d'auto-renouvellement aux promyélocytes, un événement crucial à la leucémogénèse de la leucémie aiguë promyélocytique (56).

Selon le modèle des cellules-souches cancéreuses (ou des cellules leucémiques initiatrices), les cellules-souches leucémiques seraient les principales responsables de l'évolution clonale et de la résistance thérapeutique (72). Une récente étude a montré que la pathogénèse des LAL Ph+ est initiée par plusieurs sous-clones de cellules-souches leucémiques présentant une diversité génétique (variations du nombre de copies distinctes),

suggérant une évolution multi-clonale complexe dynamique (pas linéaire) (72). Ceci remet en doute le dogme de l'origine monoclonale du cancer (10) (Figure 3), mais illustre surtout l'importance de la mise au point de thérapies capables d'éradiquer tous les sous-clones intra-tumoraux (72). Deux modèles peuvent expliquer l'évolution clonale (Figure 6). Selon le modèle classique (Figure 6A), le clone dominant au diagnostic acquiert des anomalies additionnelles spécifiques à la rechute et demeure le clone principal. Selon un nouveau modèle (Figure 6B et C), dans certains cas de LAL et de LAM, un sous-clone mineur au diagnostic résiste à la thérapie et émerge lors de la rechute, avec des altérations génomiques distinctes de celles détectées initialement (19, 73, 74). Ce sous-clone devient donc dominant à la rechute, au détriment du clone initial (éliminé par la chimiothérapie). Ceci suggère l'existence d'un clone ancestral pré-diagnostic (au niveau d'une cellule-souche pré-leucémique) qui génère deux lignées clonales indépendantes : un premier clone dominant au diagnostic et un deuxième clone dominant à la rechute (72, 75).

De plus, les cellules-souches leucémiques ont un profil d'expression génique (signature génique) spécifique associé à un pronostic défavorable dans les LAM. Ces cellules expriment différemment 52 gènes (21 sont moins exprimés et 31 sont surexprimés par rapport à d'autres sous-populations de cellules plus différenciées); ce qui permet d'établir une note ou une valeur des cellules-souches leucémiques-*LSC score*, basé sur un algorithme mathématique (76). Ce *LSC score* constitue un nouveau marqueur pronostique indépendant (notamment chez les patients avec un caryotype normal) fortement corrélé à une diminution de la survie globale (OS) et de la survie sans événement (EFS) des patients atteints de LAM (76, 77). Ceci soulève l'importance de développer de nouveaux marqueurs génétiques des cellules-souches leucémiques afin d'établir des thérapies ciblant spécifiquement ces cellules résistantes.

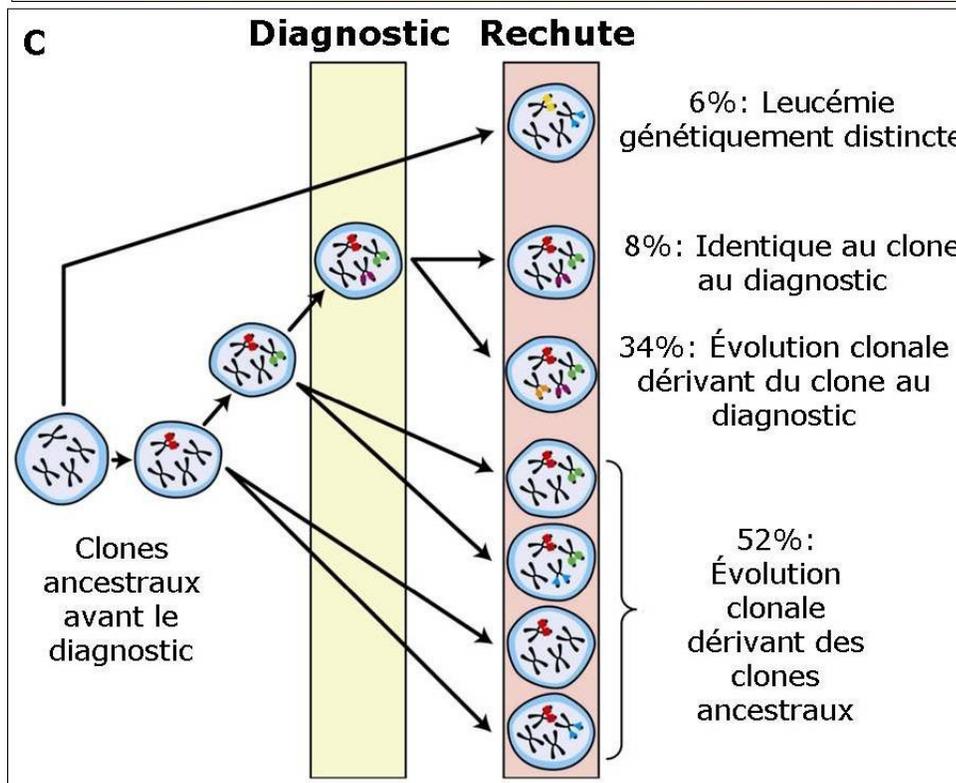
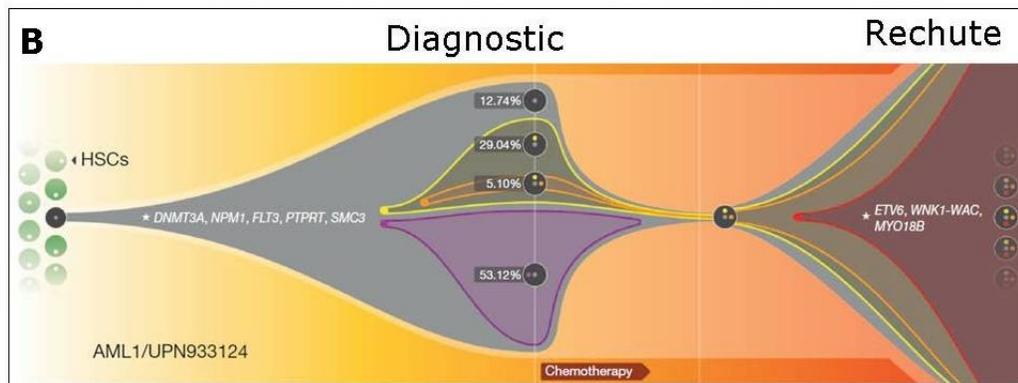
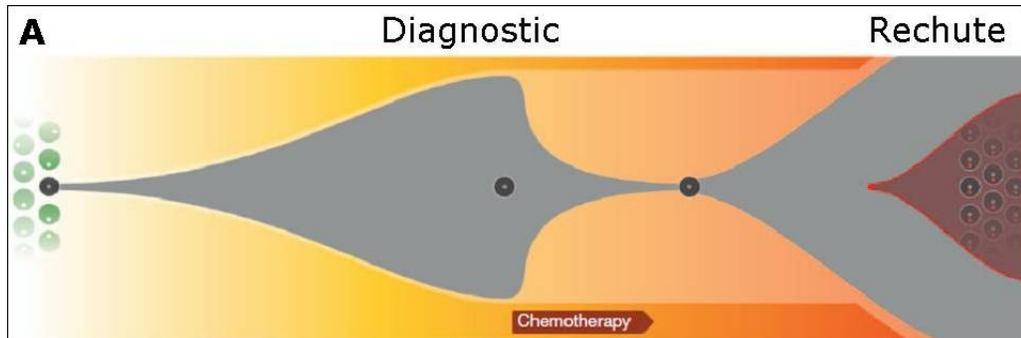


Figure 6. Évolution clonale des anomalies chromosomiques détectées au diagnostic et à la rechute des leucémies aiguës pédiatriques. A) Modèle classique de l'évolution clonale des LAM. Le clone détecté à la rechute provient du clone dominant au diagnostic. B) Nouveau modèle de l'évolution clonale des LAM. Le clone principal à la rechute découle d'un clone secondaire au diagnostic. C) Nouveau modèle de l'évolution clonale des LAL. La plupart des clones détectés à la rechute dérivent de clones ancestraux au niveau des cellules-souches leucémiques (A et B : tirés de Ding et al, 2012; C : modifié de Mullighan et al, 2008) (74, 75).

1.6.3 Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

1.6.3.1 Diagnostic

Les LAL sont caractérisées par une accumulation de cellules immatures de la lignée lymphoïde dans la moelle osseuse et aussi, dans la majorité des cas, dans le sang périphérique (16). Parmi les LAL pédiatriques, la majorité des cas proviennent de la lignée des cellules B (LAL-B : 85%) et environ 15% de la lignée des cellules T (LAL-T) (3, 16, 43). Le diagnostic des LAL est effectué principalement selon la classification de l'OMS 2008 (section 1.6.1.2).

Par ailleurs, l'immunophénotype permet d'identifier, par des anticorps monoclonaux, les antigènes cytoplasmiques, nucléaires ou à la surface, exprimés par les cellules leucémiques (16). L'immunophénotype est spécifique à chacun des stades de différenciation des cellules de la moelle osseuse durant l'hématopoïèse. Par exemple, les LAL-B se divisent en plusieurs sous-classes (16):

- 1) LAL précurseur B précoce, pro-B ou *early pre-B ALL* (exprimant le CD19, le complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR et la transférase deoxynucleotidyle terminale (TdT) : 10% des cas de LAL pédiatriques)
- 2) LAL commun ou *common ALL* (exprimant le CD19, la TdT et le CD10 : 60% des LAL pédiatriques)
- 3) LAL précurseur B ou *pre-B ALL* (exprimant le CD19, la TdT, le CD10, le CD19b et l'immunoglobine : 20-25% des cas)
- 4) LAL des cellules B matures ou *mature B-cell ALL* (exprimant des immunoglobulines avec une seule chaîne légère à la surface cellulaire : 2% des cas).

1.6.3.2 Pronostic et stratification du risque

Des études portant sur de grandes cohortes de patients de LAL et de LAM pédiatriques ont permis d'établir la valeur pronostique des anomalies chromosomiques récurrentes. En outre et comme nous l'avons déjà mentionné, un rôle important de la cytogénétique est d'orienter le choix du traitement afin qu'il soit le plus adapté possible au profil génétique des cellules leucémiques de chaque patient.

Tout d'abord, la détection des anomalies chromosomiques ayant une valeur pronostique connue permet d'améliorer la stratification du risque des patients (risque faible, intermédiaire ou élevé). Ceci influence les décisions thérapeutiques telles que l'intensification et la durée des cycles de chimiothérapie (78). Par exemple, une hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes (sans anomalie secondaire additionnelle), particulièrement en présence des trisomies 4, 10 et 17, est associée à un très bon pronostic dans les LAL (79). Par conséquent, si les autres facteurs cliniques sont également de pronostic favorable, une chimiothérapie moins agressive est indiquée. Par contre, les LAL

qui présentent un réarrangement du gène *MLL* constituent une catégorie à haut risque avec des tumeurs très agressives, spécialement chez les enfants de moins de quatre ans (80). La survie sans évènement (EFS – *event free survival*) se définit par la durée de survie (en mois ou en années) sans rechute hématologique (plus de 5% de blastes dans la moelle osseuse) ou sans rechute cytogénétique (présence d'anomalies chromosomiques clonales dans la moelle osseuse) (81, 82). En effet, le taux de survie sans évènement (EFS) à 5 ans des bébés présentant un réarrangement de *MLL* est estimé entre 30 à 40%, et ce, malgré une chimiothérapie intensive (7). Une greffe de cellules-souches hématopoïétiques est souvent considérée et de nouveaux protocoles incluant une intensification de la chimiothérapie pour ce sous-groupe de patients est sous investigation actuellement (83, 84).

1.6.3.3 Anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B

Les principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL pédiatriques de la lignée B sont présentées dans le Tableau III. Les caractéristiques cytogénétiques des anomalies pertinentes pour ce mémoire sont décrites dans les sections qui suivent 1.6.3.3.1 et 1.6.3.3.2.

Tableau III. Principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B pédiatriques.

Anomalie chromosomique	Gène de fusion	Fréquence	Pronostic	Mécanisme moléculaire (8)
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>	25%	Favorable	Facteur de transcription chimérique (répression transcription) (85)
Hyperdiploïdie 50-68 chromosomes		25%	Favorable	Augmentation du dosage génique
Réarrangements <i>MLL</i> : t(4;11)(q21;q23) t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL-AF4</i> <i>MLL-ENL</i>	5-6% ¹ (71, 86) 2% (7)	Défavorable	Altération de la structure de la chromatine
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>	5% ² (7, 64, 87)	Intermédiaire (80), excellent pronostic avec méthotrexate (7)	Facteur de transcription chimérique
Délétion <i>p16</i> (9p21)		11-27% (80, 88, 89)	Controversé (88)	Perte d'un gène suppresseur de tumeur
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	2-4% (7)	Défavorable	Protéine chimérique active l'activité tyrosine kinase d' <i>ABL</i>
Hypodiploïdie <39 chromosomes		1-2%	Défavorable	Dérégulation du dosage génique
Amplification intra chromosomique <i>RUNX1</i> (21q22) (iAMP21)		2-3% (7, 90)	Défavorable (90, 91)	

Légende : 1. Chez les bébés de moins de 12 mois atteints de LAL-B, la fréquence des réarrangements de *MLL* est de 61-79% (86). 2. Dans les LAL-pré B, la fréquence de fusion *TCF3-PBX1* est de 20-25% (55, 64).

1.6.3.3.1 Anomalies chromosomiques numériques

- **Hyperdiploïdie**

L'anomalie chromosomique numérique la plus fréquente dans les LAL-B est l'hyperdiploïdie, présente dans 25% des cas pédiatriques (7). Cette anomalie est caractérisée par un immunophénotype précurseur B (les blastes exprimant les marqueurs CD10+, CD19+ et souvent CD34+), une classification FAB de type L1, des pourcentages de blastes très élevés (médiane entre 95-100%) et avec un pic d'incidence chez les enfants entre 2 et 4 ans (16, 37, 43). Selon la plus récente nomenclature du Système international de la nomenclature cytogénétique humaine (ISCN 2013), une hyperdiploïdie se définit comme une constitution chromosomique à plus de 46 chromosomes (13, 14). Or, en hématologie clinique, on désigne « hyperdiploïdie à bon pronostic » (*high-hyperdiploidy*) les LAL ayant entre 51 et 65 chromosomes (index d'ADN >1,16), le nombre modal le plus fréquent étant de 55 chromosomes (16). Les chromosomes surnuméraires impliqués dans l'hyperdiploïdie ne sont pas aléatoires, les plus fréquents étant les chromosomes 4 (78% des cas), 6 (85%), 10 (63%), 14 (84%), 17 (68%), 18 (76%), 21 (90-99%, tétrasomie 21 dans 70% des cas) et X (89%) (16). La survie globale des enfants atteints de LAL-B avec cette hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes est d'environ 90% et l'EFS à 5 ans est de 70-80% (37, 64). La présence simultanée des trisomies 4, 10 et 17 confère particulièrement un excellent pronostic. Une étude du groupe d'oncologie pédiatrique (*Children's Oncology Group* : COG) sur plus de 5400 patients a montré une EFS à 8 ans de 90% avec une thérapie dans le groupe de risque standard (79). Ceci suggère qu'une hyperdiploïdie avec des trisomies spécifiques 4, 10 et 17 est un facteur de pronostic indépendant plus important que le nombre total de chromosomes impliqués dans l'hyperdiploïdie.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer le bon pronostic que confère l'hyperdiploïdie, principalement concernant la bonne réponse à la chimiothérapie. D'abord, les copies supplémentaires de *SLC19A1* (21q22.3) seraient responsables de la grande sensibilité aux traitements avec le méthothrexate (agent chimiothérapeutique antifolate). Ce gène, trisomique ou tétrasomique dans la majorité des LAL hyperdiploïdes, code pour le transporteur cellulaire du méthothrexate, ce qui favorise l'accumulation de ce médicament et de ses métabolites, les polyglutamates, dans les cellules leucémiques hyperdiploïdes (37, 92). Il s'agit d'ailleurs d'une cible thérapeutique potentielle. La sensibilité à la chimiothérapie avec la L-asparaginase est attribuée à une diminution de l'expression du gène codant pour l'asparagine synthase dans les LAL-B hyperdiploïdes ou avec la fusion *ETV6-RUNX1*(93). Enfin, les blastes leucémiques hyperdiploïdes ont une propension à l'apoptose spontanée, notamment à cause d'une augmentation de l'expression du gène pro-apoptotique *CAS-P8AP2* en 6q15 (37, 79).

Bien que l'hyperdiploïdie est une anomalie récurrente dans les leucémies, il est controversé de déterminer si l'aneuploïdie (ou l'hyperdiploïdie) est une cause ou une conséquence du cancer (52). Elle pourrait promouvoir la cancérogenèse par l'amplification d'oncogènes ou en favorisant l'instabilité génomique. Il a été suggéré de développer des thérapies ciblant spécifiquement l'aneuploïdie, soit au niveau des voies de signalisations impliquées dans la réponse cellulaire à l'aneuploïdie (protéasome, chaperonnes ou autophagie) ou des gènes clés sur les chromosomes aneuploïdes (52).

Environ 50% des LAL-B pédiatriques avec une hyperdiploïdie entre 51 et 65 chromosomes présentent également des anomalies structurales (16, 64). Il a été suggéré que la présence de ces anomalies de structures additionnelles pourrait conférer un pronostic défavorable (94). En fait, certaines translocations récurrentes à mauvais pronostic [t(9;22)(q34;q11.2) et réarrangements de *MLL*] additionnelles à l'hyperdiploïdie constituent l'anomalie primaire et sont donc responsables du pronostic défavorable (contrecarre l'effet

bénéfique de l'hyperdiploïdie) (22, 64). L'isochromosome 17q au sein d'un caryotype hyperdiploïde semble aussi corrélé à un risque élevé de rechute.

- **Hypodiploïdie**

La ploïdie est un facteur pronostique important dans les LAL-B des enfants puisque l'hypodiploïdie (35-45 chromosomes) et la para-haploïdie (moins de 34 chromosomes) sont à un spectre opposé à l'hyperdiploïdie et sont considérées comme des marqueurs de pronostic défavorable avec une survie réduite des patients (la survie globale à 8 ans est estimée à 50% et l'EFS à 8 ans est d'environ 39%) (95-97). La définition stricte de l'hypodiploïdie se réfère aux cellules ayant ≤ 45 chromosomes (13), toutefois l'entité clinique des LAL-B hypodiploïdes à pronostic défavorable est restreinte aux néoplasies dont les blastes contiennent moins de 44 ou même 39 chromosomes (7, 43, 80, 98). Différents sous-groupes ont été établis et le nombre de chromosomes est corrélé avec le pronostic : les tumeurs avec 44 chromosomes ayant une EFS à 8 ans supérieure à celles avec une importante hypodiploïdie (30-39 chromosomes) ou une para-haploïdie (23-29 chromosomes) (43, 96).

- **Hyperdiploïdie et hypodiploïdie**

Certains patients présentent à la fois un clone hypodiploïde et un clone hyperdiploïde. Il a été suggéré que la lignée hyperdiploïde résulte de l'endoreduplication du clone hypodiploïde. Dans des études sur de larges cohortes de LAL pédiatriques, cette entité rare a été décrite comme à pronostic défavorable, similaire aux cas présentant uniquement de l'hypodiploïdie (96, 97). Le mécanisme d'endoreduplication du clone hypodiploïde semble assez fréquent, soit retrouvé dans environ 65 % des cas de LAL para-haploïdes (37). Cette entité est toutefois difficile à détecter au caryotype car le clone hyperdiploïde, ayant un avantage prolifératif, masque souvent le clone hypodiploïde (64).

1.6.3.3.2 Anomalies chromosomiques structurales

Plusieurs anomalies chromosomiques de structure sont récurrentes dans les LAL-B, principalement des translocations, mais également des délétions, duplications et amplifications (Tableau III).

- **Translocation t(12;21)(p13;q22)**

L'anomalie chromosomique structurale la plus fréquente dans les LAL-B pédiatriques est la fusion *ETV6-RUNXI* issue de la translocation t(12;21)(p13;q22), présente dans 25% des cas. Les facteurs de transcription *ETV6 (TEL)* et *RUNXI (AML1* ou *CBFA2)* jouent un rôle majeur dans l'hématopoïèse et dans la leucémogénèse (58, 64). La protéine chimérique qui découle de ce gène de fusion possède une activité dominante négative, c'est-à-dire qu'elle agit comme un répresseur de la transcription des gènes cibles de *RUNXI* (43). Par ailleurs, des études d'expression génique ont montré que le gène de fusion *ETV6-RUNXI* altère plusieurs voies biologiques essentielles. D'une part, il diminue l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN médiée par p53, le développement et la différenciation des cellules B [la t(12;21) surviendrait au niveau des cellules pré-B II]. D'autre part, il augmente l'expression des marqueurs de cellules-souches hématopoïétiques (en conférant des propriétés d'autorenouvellement illimité) et des gènes impliqués dans les voies de la prolifération cellulaire PI3K/AKT/mTOR (85). Ceci suggère que la translocation t(12;21) aurait un rôle dans l'initiation, la promotion et le maintien de la leucémogénèse (85).

La t(12;21) est une anomalie cryptique (invisible à la résolution du caryotype) et doit donc être détectée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou par réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse (RT-PCR) (98, 99). Il s'agit d'une entité à pronostic favorable, l'EFS à 5 ans est d'environ 89% et la survie globale à 5 ans de 96% (7, 80). Cependant, la majorité des cas (62-79%) présentent des anomalies cytogénétiques additionnelles et leur valeur pronostique est actuellement

controversée dans la littérature (24, 27, 100). L'anomalie secondaire la plus fréquemment observée est la perte du 2^e allèle d'*ETV6* (12p13) (25-59% des cas de LAL-B avec cette translocation) (24, 29, 100, 101). Ceci permettrait l'inactivation complète d'*ETV6* (un allèle réarrangé et un allèle délété) ce qui semble constituer une étape critique dans la leucémogénèse des LAL avec la t(12;21) (102). La fusion *ETV6-RUNX1* est également associée à une trisomie/tétrasomie 21, un gain du 2^e allèle du gène *RUNX1*, une duplication du dérivé 21 (contenant le gène de fusion), des délétions en 9p21.3 (*CDKN2A/B*), 9p13.2 (*PAX5*), 6q et une duplication Xq (27, 29, 99, 103). Des études d'aSNP ont aussi montré des microdélétions focales (< 1Mb) récurrentes en 14q32.33, 7p14.1, 3q26.32 (gène *TBL1XR1*) et 22q11.22 associées à 12-21% des cas de t(12;21); cependant l'impact pronostique de ces petites pertes génomiques n'a pas encore été étudié (27, 29). Les anomalies du gène *TBL1XR1* (3q26.32) sont particulièrement intéressantes car ce gène est impliqué dans la réponse du récepteur hormonal nucléaire « *nuclear hormone receptor* » (les délétions de *TBL1XR1* surexpriment les cibles des récepteurs de l'hormone thyroïdienne et de l'acide rétinoïque) et *TBL1XR1* joue un rôle dans le métabolisme des glucocorticoïdes (29). De plus, certaines microdélétions retrouvées à la rechute de patients avec la fusion *ETV6-RUNX1* pourraient expliquer la résistance aux traitements aux glucocorticoïdes (102). En effet, des pertes récurrentes en 15q15.1 (gène *BMF*, un médiateur central de l'apoptose induite par les glucocorticoïdes), en 5q31.3 (gène *NR3C1*, un récepteur des glucocorticoïdes), en 2p21 et en 3p21.3 (gènes *MSH2* et *MLH1* respectivement, impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN « *mismatch repair pathway* ») reflètent l'évolution clonale des cellules avec la t(12;21) chez les patients qui subissent une rechute (102).

1.6.3.4 Anomalies chromosomiques dans les LAL-T

Les LAL-T sont des tumeurs malignes des cellules-souches hématopoïétiques caractérisées par un phénotype de cellules T immatures (3). Un minimum de 20-25% de

blastas doit être retrouvé dans la moelle osseuse pour que l'hémopathie soit désignée comme une leucémie T *de novo* (43). Les blastes des tumeurs lymphoblastiques T présentent une morphologie hétérogène, mais expriment tous des antigènes des cellules T (les marqueurs les plus spécifiques étant TdT+ et CD3+ cytoplasmique; alors que les principaux marqueurs des lymphoblastes des précurseurs T sont CD99+, CD34+ et CD1a) (43). Chez les enfants, l'incidence des LAL-T augmente avec l'âge et est supérieure chez les garçons, le pic d'incidence pouvant atteindre environ 29% chez les adolescents masculins de 15 à 18 ans (43, 64). De façon générale, les LAL-T sont considérées à pronostic plus défavorable que les LAL-B, principalement en raison d'une fréquence supérieure de caractéristiques cliniques à haut-risque (atteinte du système nerveux central, âge et taux de leucocytes sanguins, « *white blood cell count* », plus élevé) (43, 64). Les anomalies cytogénétiques les plus récurrentes sont les réarrangements de gènes récepteurs des cellules T (*TCR*) avec une variété de gènes partenaires (Tableau IV) (43). Ces translocations causent, dans la majorité des cas, une dérégulation de la transcription de gènes impliqués dans le développement ou la différenciation des cellules T par la juxtaposition d'un de ces gènes au niveau de la région régulatrice du locus de *TCR* (section 1.6.3.5 et Figure 7). La surexpression aberrante de ces facteurs de transcription oncogéniques a permis d'établir différents sous-groupes génétiques correspondant à des stades spécifiques de développement des cellules T (3, 7, 43, 104). Ces anomalies sont mutuellement exclusives, suggérant une pathogenèse distincte :

- *LYL1* (19p13) + : thymocyte pro-T précoce
- *HOX11/TLX1* (10q24) + : thymocyte cortical précoce
- *TALI* (1p32) + : thymocyte cortical tardif

Tableau IV. Principales anomalies récurrentes dans les LAL-T pédiatriques.

Anomalie chromosomique	Fréquence	Pronostic
Délétion 9p21 (gènes <i>CDKN2A/B</i>)	40-70% (16, 88, 104, 105)	Controversé (pas un facteur pronostic indépendant) (88, 105)
Réarrangement des gènes TCR : <i>TCRA/D</i> (14q11) ou <i>TCRB</i> (7q34)	20-35%	Variable en fonction du gène partenaire
t(5;14)(q35;q11.2) fusion <i>HOX11L2-TCR</i>	20-24%	Défavorable (7, 104)
Anomalies du gène <i>TALI</i> : délétion interstitielle cryptique 1p32 (fusion <i>SIL-TALI</i>) ou réarrangement de <i>TALI</i>	15-30%	Controversé (7, 64, 104)
Duplication 6q23 (gène <i>MYB</i>)	8-15%	Inconnu (16)
t(11;14)(p13;q11) fusion <i>LMO2-TCR</i>	5-10%	Inconnu (16)
t(10;14)(q24;q11) fusion <i>HOX11-TCRD</i>	7-8%	Favorable (7, 66, 104)

Outre ces anomalies fréquentes, certaines anomalies récurrentes plus rares ont une valeur pronostique importante. Par exemple, l'amplification 9q34 [épisodes extra-chromosomiques contenant le gène de fusion *NUP214-ABL1* issu de la translocation t(9;9)(q34;q34)] et la translocation t(9;22)(q34;q11.2) (fusion *BCR-ABL1*) sont retrouvées dans 3-6% des cas de LAL-T pédiatriques. Ces anomalies sont associées à un pronostic

défavorable, mais sont sensibles aux thérapies (imatinib) inhibant le récepteur tyrosine kinase (64, 106).

Récemment, un nouveau sous-type de LAL-T a été mis en évidence : les LAL des précurseurs précoces des cellules T, « *early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia* » (LAL-ETP), caractérisées par une expression aberrante de marqueurs myéloïdes ou des cellules-souches hématopoïétiques (notamment CD13, CD33, CD34 et CD117). Il s'agit d'une hémopathie maligne plus rare (15% de l'ensemble des LAL-T), mais très agressive, présentant une signature génomique distincte des autres LAL-T pédiatriques (107). Par ailleurs, une étude de séquençage de l'ensemble du génome « *whole-genome sequencing* », sur une cohorte de 106 LAL-T pédiatriques, a mis en évidence des mutations récurrentes de gènes régulant le développement hématopoïétique (*ETV6*, *RUNX1*, *IKAROS*, *EP300* et *GATA3*) et/ou impliqués dans la voie de signalisation de RAS (par exemple *FLT3*, *JAK3* et *JAK1*) retrouvés dans respectivement 58% et 67% des cas de LAL-ETP (significativement plus élevé que dans les autres LAL-T) (107). Globalement, les LAL-ETP montrent un profil d'expression génique similaire aux cellules-souches hématopoïétiques normales et aux cellules-souches leucémiques myéloïdes à pronostic défavorable. Ceci suggère que les clones des LAL-ETP subissent un arrêt de maturation et de différenciation à un stade précoce (cellules-souches leucémiques agressives), d'où l'intérêt d'ajouter des thérapies habituellement utilisées pour les LAM (fortes doses de cytarabine, thérapies ciblées inhibant la voie JAK) pour le traitement des LAL-ETP (107).

1.6.3.5 Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques

Les deux principaux mécanismes moléculaires qui découlent des translocations chromosomiques dans les leucémies sont la formation de gènes de fusion chimériques et la

dérégulation de l'expression normale des gènes clés de l'hématopoïèse. Ces deux mécanismes ont un rôle important dans la leucémogénèse (Figure 7) (71, 108, 109).

- **Formation de gènes de fusion chimériques**

Les translocations chromosomiques équilibrées peuvent générer un gène de fusion hybride avec une protéine chimérique ayant un potentiel oncogénique. Les gènes de fusion sont responsables d'environ 20% de la morbidité reliée à l'ensemble des cancers humains (108). Ce mécanisme est impliqué dans les réarrangements de tyrosines kinases telles qu'*ABL1* (fusion *BCR-ABL1* dans les LAL-B et les leucémies myéloïdes chroniques, fusion *NUP214-ABL1* dans les LAL-T), *PDGFRβ* (fusion *PDGFRβ-ETV6* dans les leucémies myélomonocytaires chroniques). Un gène de fusion chimérique peut également impliquer des facteurs de transcription tels que *RUNX1* et *ETV6* (fusion *ETV6-RUNX1* dans les LAL-B, fusion *RUNX1-ETO* dans les LAM). Par la suite, ces protéines chimériques altèrent des processus cellulaires essentiels (augmentation de la prolifération cellulaire, diminution de l'apoptose, perturbation de l'adhérence cellulaire, etc.). Les translocations impliquant *MLL*, une protéine de liaison à l'ADN, activent la transcription de gènes cibles en induisant des modifications épigénétiques de la chromatine. Certaines protéines hybrides peuvent aussi inhiber la transcription de gènes cibles. Par exemple, l'oncoprotéine *RUNX1-ETO* recrute une histone déacétylase (complexe répresseur) qui condense la chromatine, empêchant la transcription des gènes cibles de *RUNX1*. Ceci bloque la différenciation des cellules myéloïdes.

- **Dérégulation de l'expression génique normale**

La juxtaposition ou la relocalisation d'un proto-oncogène près du promoteur d'un gène fortement exprimé ou à expression constitutive altère l'expression génique normale et favorise sa conversion en oncogène. Par exemple, dans la translocation récurrente du

lymphome de Burkitt (LAL L3), la $t(8;14)(q24;q32)$, le proto-oncogène *c-MYC* (8q24) est activé par sa juxtaposition près du fort promoteur du gène des immunoglobulines *IGH* (14q32), entraînant une surexpression anormale et une prolifération cellulaire accrue et dérégulée de cellules lymphoïdes. Un mécanisme similaire se produit dans les LAL-T avec réarrangement du gène *TCR*.

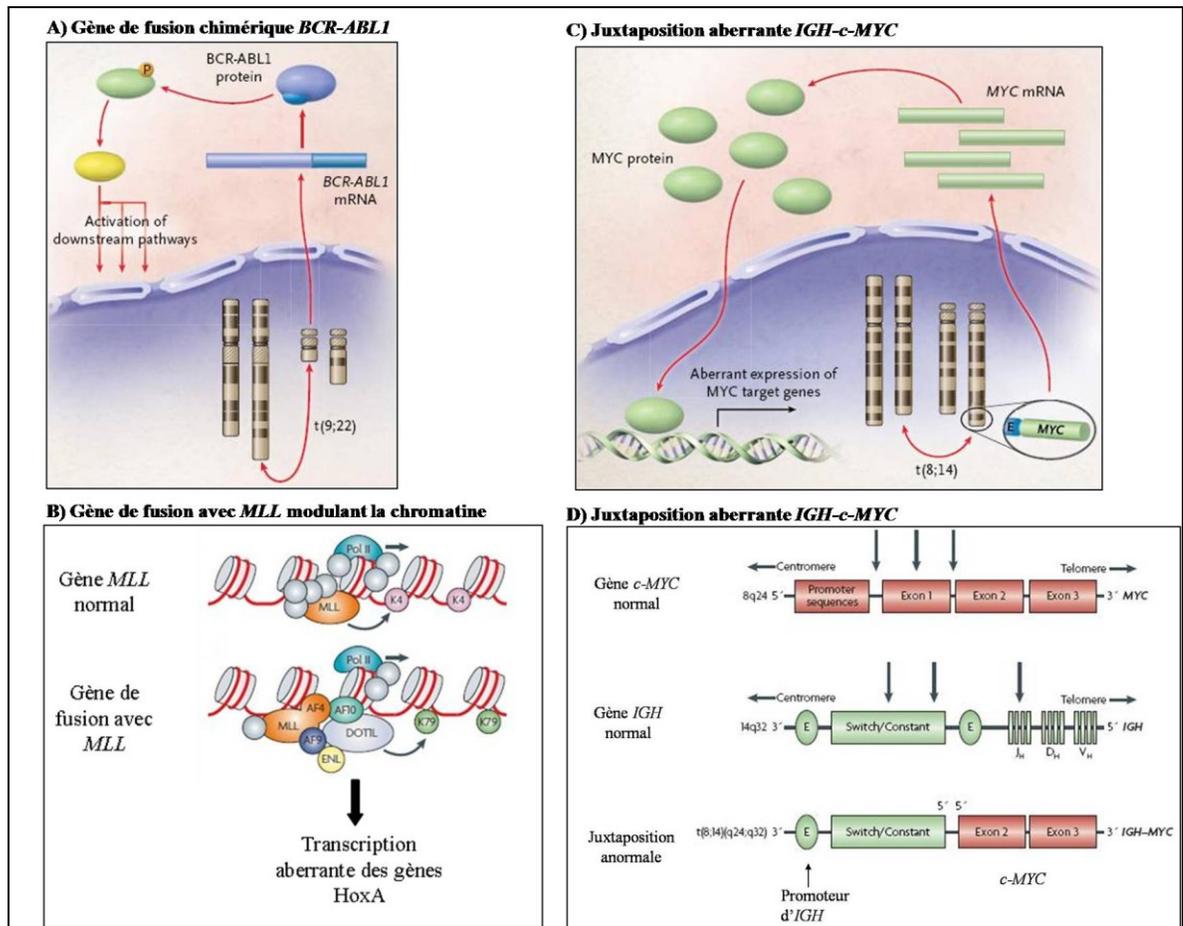


Figure 7. Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques (A et C, tirés de Frohling et Dohner, 2008; B et D modifiés respectivement de Krivtsov et Armstrong, 2007 et Mitelman et al, 2007) (71, 108, 109). A) Formation du gène de fusion chimérique *BCR-ABL1* issu de la $t(9;22)(q34;q11.2)$. B) Modulation de l'architecture de la chromatine par les gènes de fusion impliquant *MLL* (11q23). Normalement, le gène *MLL* médie la méthylation de l'histone H3K4, régulant l'expression de gènes cibles (notamment les gènes de la famille *HoxA*). Cependant, lorsqu'une translocation génère un gène de fusion, une méthyltransférase, *DOT1L*, est recrutée et favorise la méthylation de l'histone H3K79, conduisant à une expression aberrante des gènes *HoxA*. C) et D) Juxtaposition anormale de *c-MYC* près du promoteur de *IGH* causée par la $t(8;14)(q24;q32)$. D) Cette translocation

provoque une cassure au niveau d'un exon de *c-MYC* (ici entre l'exon 1 et 2) et au niveau de la région régulatrice « *switch* » ou constante d'*IGH*, les deux gènes se retrouvant dans la même orientation 5'-5'. Ceci provoque une activation constitutive de l'oncogène *c-MYC* (régulé par le promoteur d'*IGH*) et une expression aberrante de ses gènes cibles.

1.6.4 Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et syndromes myélodysplasiques (SMD)

Les LAM sont caractérisées par une accumulation excessive de blastes myéloïdes immatures dans la moelle osseuse (16). Cet arrêt de la maturation des cellules-souches empêche l'hématopoïèse normale et provoque un déficit de cellules différenciées (granulocytes, monocytes, thrombocytes et érythrocytes). La définition de l'OMS 2008 stipule que les LAM présentent plus de 20% de myéloblastes dans le sang ou la moelle osseuse (43). L'incidence des LAM est supérieure chez les adultes que chez les enfants (âge médian de 67 ans) : 50% des cas surviennent chez les patients de plus de 50 ans, alors qu'environ seulement 6% des cas touchent les moins de 20 ans (3). Les syndromes myélodysplasiques (SMD) constituent un groupe de maladies clonales des cellules-souches hématopoïétiques caractérisés par une cytopénie et une dysplasie dans la lignée myéloïde (43). Les SMD ont un risque accru de transformation maligne en LAM.

Le diagnostic des LAM et des SMD est établi en fonction des critères des classifications FAB et de l'OMS (sections 1.6.1.1 et 1.6.1.2).

1.6.4.1 Anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAM et les SMD

Contrairement aux LAL-B dans lesquelles on retrouve une importante récurrence d'hyperdiploïdie, les LAM pédiatriques sont plutôt caractérisées par des aneuploïdies

impliquant un seul chromosome ou un seul bras chromosomique (principalement -5/-5q, -7/-7q, trisomie 8) (Tableau V). On retrouve également des translocations récurrentes générant des gènes de fusion chimériques.

- Réarrangements du gène *MLL*

Les anomalies chromosomiques récurrentes les plus fréquentes dans les LAM pédiatriques sont les translocations impliquant le gène *MLL* (*mixed lineage leukemia*) en 11q23 (7, 32). Comme son nom l'indique, les réarrangements de *MLL* ne sont pas spécifiques aux LAM *de novo* des enfants, on les retrouve également dans les LAL et les leucémies aiguës myéloïdes secondaires à la thérapie (LAM-t).

Des études récentes montrent que les LAM pédiatriques avec réarrangement de *MLL* constituent une entité clinique et génétique hétérogène (32, 69). Le pronostic varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment le gène partenaire de *MLL*, la présence d'anomalies chromosomiques additionnelles, l'âge au diagnostic et le taux de leucocytes sanguins (WBC) (32). Ces anomalies sont associées à un groupe de risque intermédiaire ou élevé : l'EFS à 5 ans varie entre 32 et 59% et la survie globale (OS) à 5 ans entre 42% et 62% (32, 63, 98, 110). La translocation t(1;11)(q21;q23) (gène de fusion *MLL-MLLT11*) confère un excellent pronostic (OS à 5 ans de près de 100% et EFS à 5 ans de 92%), les patients avec cette entité bénéficieraient donc d'une thérapie moins intensive (111). La translocation la plus récurrente est la t(9;11)(p22;q23) (gène de fusion *MLL-MLLT3* ou *MLL-AF9*) et présente un pronostic similaire aux autres réarrangements de *MLL* (risque intermédiaire) (7, 110). Certaines études ont toutefois noté une meilleure sensibilité à la thérapie lorsque ce sous-groupe est associé à une morphologie FAB M5 (32), alors que d'autres équipes ont montré que la t(9;11) est stratifiée dans le groupe des LAM à risque élevé (pronostic défavorable) lorsque des anomalies additionnelles sont détectées (63). Les translocations t(6;11)(q27;q23) et t(10;11)(p12;q23) impliquant les gènes *MLLT4* (*AF6*) et *MLLT10* (*AF10*) respectivement constituent également des sous-groupes à pronostic

défavorable. Ceci illustre la pertinence clinique de caractériser les translocations impliquant *MLL*, par FISH ou par RT-PCR, afin d'identifier le gène partenaire. Aussi, près de la moitié des patients présentent des anomalies génomiques supplémentaires, dont environ 90% sont des anomalies déséquilibrées (69).

Tableau V. Principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAM et les SMD pédiatriques.

Anomalie chromosomique	Gène de fusion	Fréquence	Pronostic
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNXI-ETO (RUNXIT1)</i>	12%-14% (40% des LAM M2) (63, 110)	favorable
inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>	7%-9% (7)	favorable
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARA</i>	6%-12% (7, 63)	Excellent avec la thérapie à l'acide rétinoïque (43)
Réarrangements 11q23 (<i>MLL</i>)		15-25% (32)	Intermédiaire
t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL-AF9 (MLLT3)</i>	43% des LAM MLL+ ¹	Intermédiaire
t(1;11)(q21;q23)	<i>MLL-MLLT11 (AF1q)</i>	3% des LAM MLL+	Excellent (32)
t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL-MLLT4 (AF6)</i>	5% des LAM MLL+	défavorable
t(10;11)(p12;q23)	<i>MLL-MLLT10 (AF10)</i>	13% des LAM MLL+	défavorable
Monosomie 7 ou délétion 7q		2%-5% (7, 63)	défavorable
Monosomie 5 ou délétion 5q		2%	Intermédiaire (63) ou défavorable (7, 110)
Trisomie 8		2%-7% (7, 63)	Intermédiaire (63)
Délétion 17p13	<i>p53</i>	3% (64)	Défavorable (64)

¹ LAM MLL+ : leucémies aiguës myéloïdes avec réarrangement du gène *MLL* (11q23)

1.7 Techniques cytogénétiques actuellement utilisées en hématologie clinique

Différents outils génétiques sont actuellement utilisés en hématologie clinique : le caryotype, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse (RT-PCR) ainsi que la cytométrie en flux (index d'ADN) (16, 112, 113). Les différentes caractéristiques de ces techniques sont présentées au Tableau VI.

Caryotype

Dans les hémopathies malignes, le caryotype permet l'analyse des anomalies chromosomiques spécifiques aux cellules leucémiques. Les lymphocytes étalés sur des lames sont colorés un marquage morphologique en bandes GTG (bandes **G**, dénaturation à la Trypsine et coloration au **Gi**emsa), permettant d'identifier chacune des 23 paires de chromosomes. La résolution obtenue varie entre 10 et 20 Mb (114). Ceci donne une vue d'ensemble du génome (analyse non ciblée) (98, 114) et permet la détection des anomalies récurrentes, rares et secondaires, qu'elles soient équilibrées ou déséquilibrées. Le caryotype vise les cellules en phase mitotique et présente des difficultés techniques telles qu'un faible index mitotique des cellules leucémiques *in vitro* et une faible résolution des chromosomes (Tableau VI) (98, 114, 115). Le Collège Canadien des Médecins Généticiens (CCMG) recommande de détecter les anomalies chromosomiques clonales par la technique du caryotype pour tous les cas de LAL et de LAM *de novo*, ainsi que pour le suivi et à la rechute si une anomalie est identifiée au diagnostic (116).

Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet d'hybrider une sonde fluorescente avec une séquence d'ADN complémentaire sur les noyaux interphasiques (FISH interphasique) ou les cellules mitotiques (FISH métaphasique) du patient (16, 114). En cytogénétique hématologique, la FISH constitue un outil essentiel pour établir le diagnostic et le pronostic des leucémies (98, 108, 115, 117). Il existe une grande variété de sondes commerciales, principalement les sondes de fusion (pour la détection d'un gène de fusion) et les sondes de réarrangement (*breakapart*, pour la détection d'un réarrangement génique) (98, 112). Ces dernières sont surtout utilisées pour les gènes ayant un grand nombre de partenaires tel que *MLL* (112, 115, 118).

Pour le diagnostic des leucémies *de novo*, les laboratoires de cytogénétique clinique utilisent généralement une série « *panel* » de sondes spécifiques aux anomalies chromosomiques les plus fréquentes et/ou ayant une valeur pronostique importante selon le type de leucémie étudié. Toutefois, certains gènes ne sont pas couverts par une sonde commerciale (sondes utilisées dans les panels) et nécessitent une petite sonde ciblant une région génomique précise. Il est alors approprié d'utiliser des chromosomes artificiels de bactéries (*Bacterial artificial chromosomes-BACs*) ayant une taille d'environ 150-300 kb, permettant de cibler des séquences uniques au niveau d'un gène spécifique (16). Les BACs sont d'ailleurs particulièrement utiles pour préciser les points de cassure d'une translocation chromosomique rare (119). Pour caractériser les remaniements chromosomiques complexes ou pour identifier les chromosomes marqueurs d'origine inconnue, il est pertinent d'effectuer une FISH métaphasique (sur chromosomes) avec des peintures chromosomiques (ensemble de sondes à séquences uniques spécifiques à chaque paire de chromosomes homologues).

Réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse (RT-PCR)

La RT-PCR est une analyse qui utilise des amorces spécifiques à une séquence d'ARN du patient, puis plusieurs cycles d'amplification sont effectués. La RT-PCR est une technique spécifique et très sensible (10^{-6}) (98, 112, 118, 120), d'où l'augmentation du risque d'un résultat faux positif (contamination avec des produits PCR) (120, 121). Puisqu'en clinique, la RT-PCR est utilisée pour détecter les transcrits des gènes de fusion les plus fréquents, elle présente l'inconvénient du risque de résultats faux négatifs (dû à des translocations variantes avec des points de cassures moléculaires rares) (59, 98). Enfin, cette méthode ne permet pas la détection d'aneuploïdies telles que les trisomies et les monosomies ainsi que les anomalies de ploïdie telle que l'haploïdie et l'hypodiploïdie.

Index d'ADN

L'index d'ADN (cytométrie de flux) permet d'évaluer la ploïdie d'un échantillon en mesurant la quantité d'ADN par cellule (112). L'ADN est marqué avec un fluorochrome (l'iodure de propidium) qui émet de la fluorescence en présence d'une lumière laser émise par le cytomètre de flux. Un algorithme permet ensuite de distinguer les différentes phases du cycle cellulaire (G_0 , G_1/S et G_2/M) et de les comparer à un contrôle normal diploïde (index d'ADN = 1) (94). L'hyperdiploïdie (plus de 50 chromosomes) entraîne un bon pronostic et est caractérisée par un index d'ADN $> 1,16$, alors que l'hypodiploïdie sévère (moins de 39 chromosomes) amène un pronostic défavorable et est représentée par un index d'ADN $< 0,85$ (94, 95, 122).

Tableau VI. Comparaison des avantages et des limites de chacune des techniques cytogénétiques actuellement utilisées pour le diagnostic des leucémies.

Technique	Avantages	Limites
Caryotype (98, 114, 115)	Analyse génomique globale Détection des anomalies chromosomiques numériques (aneuploïdie et polyploïdie) et structurales (anomalies fréquentes et rares)	Faible résolution (environ 10 Mb) Cible uniquement les cellules en division et nécessite une quantité et une qualité adéquate des métaphases
FISH (16, 112, 115, 117)	Détection des anomalies chromosomiques numériques et structurales (permet la détection des anomalies cryptiques) Cible à la fois les mitoses et les noyaux interphasiques Détection de l'hétérogénéité clonale	Analyse ciblée Résolution environ 100 kb Nécessite l'utilisation de plusieurs sondes
RT-PCR (59, 98, 118, 120, 121)	Sensibilité permettant la détection de la maladie résiduelle	Analyse ciblée (détection des transcrits des gènes de fusion fréquents) Ne détecte pas les anomalies chromosomiques numériques et structurales rares Taux élevés de faux positifs et de faux négatifs
Index ADN (95, 112)	Détection des changements de ploïdie, de l'hyperdiploïdie et de l'hypodiploïdie	Seuil de détection élevé Ne détecte pas les anomalies de structure et les aneuploïdies impliquant 1 ou 2 chromosomes
aCGH (114, 123, 124)	Détection des réarrangements cryptiques déséquilibrés (gains et pertes) Détection des LOH à la suite d'une perte d'un allèle sans duplication compensatoire	Ne détecte pas les anomalies équilibrées Ne détecte pas les CN-LOH, la ploïdie et les petits clones
aSNP (125-127)	Détection des réarrangements cryptiques déséquilibrés (gains et pertes) Détection des LOH, des CN-LOH, de la ploïdie et de l'hétérogénéité clonale	Ne détecte pas les anomalies équilibrées

1.8 Nouvelles technologies en cytogénétique (micropuces)

Les micropuces permettent la détection des anomalies déséquilibrées, c'est-à-dire les gains (amplifications, duplications, translocations déséquilibrées) et les pertes (délétions, translocations déséquilibrées) de matériel génétique. Les études d'associations pangénomiques (GWAS) ont montré la présence d'aberrations chromosomiques cryptiques ayant une valeur pronostique cliniquement importante dans les cancers hématologiques (22). Par exemple, des délétions submicroscopiques récurrentes du gène *IKZF1/IKAROS* (7p12.2) sont associées aux LAL ayant un pronostic défavorable, avec une prévalence estimée à 80-95% dans les LAL-B présentant la fusion *BCR-ABL1* (Ph+) (22). De plus, les délétions du gène *IKZF1/IKAROS* sont également fréquentes dans les LAL Ph- et triplent le risque de résistance au traitement ou de rechute (19). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont soulevé la pertinence d'utiliser les micropuces comme test génétique de routine en hématologie clinique, particulièrement pour les cas où l'analyse du caryotype n'a pas permis de détecter d'anomalies (113, 114, 123, 125, 128, 129).

Il existe actuellement deux types de micropuces : l'hybridation génomique comparative sur micropuces (aCGH) et les polymorphismes d'un seul nucléotide sur micropuces (aSNP) (128). Différentes plateformes sont offertes pour chacune de ces deux techniques et quelques exemples, avec leurs caractéristiques respectives, sont présentés dans le Tableau VI. La nouvelle génération de micropuces intègre simultanément des sondes polymorphiques et des sondes non polymorphiques sur la même micropuce. L'avantage majeur des micropuces, comparativement aux autres outils cytogénétiques, est leur très grande résolution (< 1000 paires de bases pour certaines plateformes) (112, 125, 126). Cependant, seules les anomalies entraînant une perte d'hétérozygotie (LOH) et/ou un changement du nombre de copies (gain ou perte) peuvent être observées : les translocations

récioproques, les insertions et les inversions équilibrées ne sont donc pas détectables (112, 114, 123).

La principale différence entre les plateformes d'aCGH et d'aSNP est la discrimination de chacun des allèles des chromosomes homologues par les puces des aSNP (126). Ainsi, les deux plateformes permettent la détection de la perte d'hétérozygotie causée par une délétion hémizygote d'un allèle. Cependant, seules les sondes polymorphiques des aSNP peuvent détecter la perte d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies (CN-LOH) (125, 126, 129). Les CN-LOH observées dans les cellules tumorales correspondent à une disomie uniparentale acquise, car les deux chromosomes ou locus homologues proviennent d'un seul parent à la suite d'une perte de l'allèle paternel ou maternel et duplication de l'allèle subsistant (128, 130).

1.9 Hypothèse et objectifs du projet de maîtrise

Hypothèse :

Notre hypothèse de recherche principale est que l'implantation de notre stratégie, qui consiste à utiliser différentes techniques cytogénétiques concomitantes, permettra d'améliorer le taux de détection des anomalies chromosomiques. Ceci contribuera à améliorer le diagnostic, le pronostic et les choix thérapeutiques dans les leucémies aiguës pédiatriques.

Notre projet est pertinent et innovateur car il permettra d'une part, de mieux comprendre les anomalies chromosomiques qui influencent le pronostic et oriente les thérapies des leucémies et d'autre part, d'élaborer une stratégie efficace pour améliorer la détection de ces anomalies. Il s'agit de la première étude évaluant l'apport des panels de FISH en hématologie clinique au CHU Sainte-Justine. En perspective, l'optimisation des

outils cytogénétiques et l'augmentation du taux de détection des aberrations génomiques pourront contribuer à améliorer la prise en charge et à réduire les taux de rechute des patients atteints de leucémie aiguë pédiatrique.

Notre objectif principal est donc d'élaborer une stratégie optimale pour détecter les anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques. Plus spécifiquement, nous désirons déterminer une stratégie qui permettra d'utiliser en complémentarité les différents outils génétiques importants en hématologie clinique : la cytogénétique standard (caryotype), la FISH, la RT-PCR et l'index d'ADN (ploïdie). Nous voulons mettre au point une stratégie efficace pour le diagnostic des LAL et des LAM (leucémies *de novo*), le suivi de la maladie résiduelle et à la rechute.

Objectif 1 :

Mise au point, optimisation et évaluation 1) des conditions de culture des cellules médullaires et 2) des panels de FISH utilisés au laboratoire de cytogénétique clinique du CHU Sainte-Justine. Nous voulons aussi déterminer le seuil des sondes utilisées par FISH dans le panel LAL-B.

Objectif 2 :

Déterminer la fréquence et la valeur pronostique des anomalies chromosomiques primaires et secondaires dans une cohorte pédiatrique de LAL et de LAM du CHU Sainte-Justine.

Objectif 3 :

Effectuer une caractérisation cytogénétique moléculaire des anomalies rares.

Objectif 4 :

Établir une stratégie pour intégrer les micropuces en hématologie pédiatrique clinique.

2. Matériel et méthodes

Afin d'atteindre nos objectifs et de vérifier nos hypothèses, une étude rétrospective des dossiers médicaux des patients atteints de leucémies aiguës pédiatriques (LAL et LAM) a été réalisée au laboratoire de cytogénétique postnatale du CHU Sainte-Justine (Montréal, Québec, Canada). Nous avons analysé tous les cas reçus entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2011 puisque c'est en 2005 qu'ont été introduits les panels (ensemble de plusieurs sondes) de FISH en oncologie clinique à Sainte-Justine.

2.1 Sélection des sujets

La direction des affaires médicales et universitaires (DAMU) du CHU Sainte-Justine a autorisé l'accès aux dossiers médicaux pour ce projet. La sélection des patients a été effectuée à partir des dossiers médicaux et la confidentialité des données a été respectée en tout temps.

Les participants ont été sélectionnés selon les critères suivants :

Critères d'inclusion :

- Nouveau diagnostic de LAL-B, LAL-T ou LAM (leucémies *de novo*).
- Échantillons de moelle osseuse ou de sang reçus au laboratoire de cytogénétique postnatale du CHU Sainte-Justine.
- Participants âges de moins de 18 ans.
- Au minimum une analyse cytogénétique doit avoir été effectuée (caryotype ou FISH) avec un rapport complété et signé.

Critères d'exclusion :

- Participants âgés de 18 ans ou plus.
- Patients atteints de LAL ou LAM, mais dont aucun échantillon de moelle osseuse ou de sang n'ait été reçu au laboratoire de cytogénétique post-natale du CHU Sainte-Justine.
- Patients dont une analyse cytogénétique a été effectuée (caryotype ou FISH) uniquement sur le prélèvement avant une greffe de moelle osseuse (pré-GMO), post-GMO ou fin de traitement.

La plupart des patients inclus dans notre étude sont inclus dans la cohorte de patients du protocole thérapeutique pour les LAL du Dana Farber Cancer Institute (131-134). Ces patients bénéficient de thérapies à la fine pointe de la technologie, adaptées en fonction de critères cliniques, génétiques et cytogénétiques (seuls les enfants dont les parents ont donné leur consentement écrit libre et éclairé peuvent participer au protocole).

2.2 Caractéristiques cliniques des patients

Au total, 253 patients atteints de leucémies aiguës pédiatriques *de novo* ont été analysés dans cette étude : 186 LAL-B, 27 LAL-T et 40 LAM. Les types de leucémies (lignée lymphoïde B, T ou myéloïde) ont été établis en fonction de différents critères respectant la classification de l'OMS et la classification FAB. Les principales caractéristiques cliniques de ces patients sont décrites dans le Tableau VII. L'âge des enfants au diagnostic varie entre quatre mois et 18 ans, l'âge médian étant de cinq ans (pour les LAL-B et les LAM) et de 11 ans (pour les LAL-T). Les leucémies de la lignée lymphoïde affectent légèrement plus de garçons que de filles (le ratio sexe masculin : sexe féminin est de 1,24 :1 et de 2 :1 pour les LAL-B et les LAL-T, respectivement), alors que la leucémie myéloïde touche surtout les filles (le ratio filles : garçons est de 1,67 :1). Le taux

de survie globale à sept ans (2005 à 2012) pour l'ensemble des cas est de 92,5% (236/253 patients sont toujours vivants en août 2012). La survie est supérieure pour les LAL-B (94,6% de survie) que pour les LAL-T et les LAM (environ 89% et 85% des cas sont vivants, respectivement).

Tableau VII. Principales caractéristiques cliniques des patients.

	Nombre total de cas	LAL-B de novo	LAL-T de novo	LAM de novo
Nombre total de cas	253 (100%)	186 (72,9%)	27 (11,4%)	40 (15,7%)
Âge :				
médiane (années)	5	5	11	5
minimum (années)	0,33	0,33	1,33	1,17
maximum (années)	18	18	17	17
Sexe :				
Masculin	136 (53,8%)	103 (55,4%)	18 (66,7%)	15 (37,5%)
Féminin	117 (46,2%)	83 (44,6%)	9 (33,3%)	25 (62,5%)
Survie :				
Vivants (août 2012)	236 (92,5%)	176 (94,6%)	24 (88,9%)	34 (85%)
Décédés	19 (7,5%)	10 (5,4%)	3 (11,1%)	6 (15%)

2.3 Résumé des techniques utilisées

Nous avons effectué une caractérisation génomique globale par l'utilisation concomitante de plusieurs outils importants en hématologie clinique: panel de FISH, cytogénétique standard (caryotype), RT-PCR et index d'ADN (ploïdie) (Figure 8). Les techniques de cytogénétique standard et moléculaire (FISH) ont été effectuées au laboratoire de cytogénétique postnatale du département de pathologie du CHU Sainte-Justine, alors que la RT-PCR et l'index d'ADN ont été réalisés au laboratoire de biologie moléculaire et d'hématologie spéciale de la même institution, respectivement. Pour ce faire, un échantillon de moelle osseuse a été prélevé à partir de la crête iliaque postérieure gauche et/ou droite de chaque patient. La moelle osseuse ainsi prélevée est séparée et envoyée dans les départements respectifs.

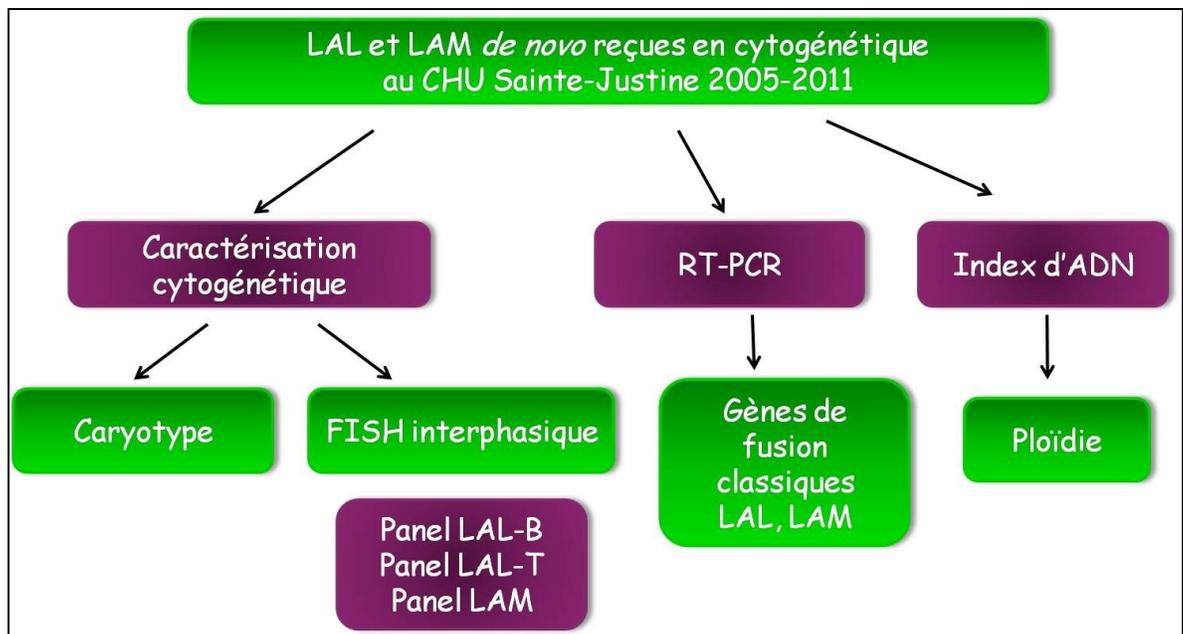


Figure 8. Stratégie utilisée au CHU Sainte-Justine pour caractériser les leucémies aiguës pédiatriques (LAL et LAM). La moelle osseuse des patients a été analysée par les quatre

techniques concomitantes (caryotype, FISH, RT-PCR et index d'ADN). Pour la FISH, un panel de sondes spécifique au type de leucémie (LAL-B, LAL-T ou LAM) est utilisé. Similairement, pour la RT-PCR, les amorces pour la détection des gènes de fusion classiques sont choisies en fonction de chaque type de leucémie (LAL ou LAM).

2.4 Les analyses cytogénétiques

2.4.1 Mise en culture et préparation des lames

Plusieurs étapes sont requises pour obtenir et analyser des chromosomes en métaphases: la mise en culture, le choc hypotonique, la récolte, l'étalement sur des lames et la coloration par un marquage GTG.

Dès sa réception, le tube contenant la moelle osseuse est centrifugé afin d'enlever le milieu de transport. Un décompte cellulaire mesure la concentration des leucocytes dans cet échantillon. Ceci permet de calculer la dilution nécessaire pour obtenir la quantité voulue de leucocytes soit de 10 millions de cellules dans chacun des tubes. La moelle est diluée dans un tube stérile contenant 3,5 mL de milieu RPMI complet et 1,5 mL de milieu *bone marrow max* (Invitrogen). Six tubes sont ensuite mis en culture et incubés à 37°C selon les conditions suivantes:

- 24 heures culture/ 3 heures colcémide/ 3 heures 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) (3 tubes)
- 48 heures culture/ 3 heures colcémide/ 3 heures BrdU (1 tube)
- 24 heures culture/ colcémide toute la nuit (*overnight*)/ 3 heures BrdU (1 tube)

➤ Technique directe : aucune culture/ 25 minutes colcémide (1 tube)

0,05 mL de colchicine (Colémide©; Gibco), un inhibiteur du fuseau mitotique, est ajouté 3 heures avant le début de la technique (ou toute la nuit) afin de bloquer les cellules en métaphase, permettant l'accumulation de cellules en division. 0,1mL de BrdU, un analogue de la thymidine, est également ajouté 3 heures avant la récolte afin d'allonger les chromosomes, facilitant ainsi l'analyse des anomalies cytogénétiques.

Après l'incubation à 37°C durant 24 ou 48 heures, un choc hypotonique dans du KCl 0,075 M (Multicell, Saint-Jean-Baptiste, Canada) durant 20 minutes à 37°C permet de faire gonfler les cellules. Afin de procéder à la récolte des chromosomes, deux fixations dans une solution froide (4°C) 3 :1 de méthanol et d'acide acétique (carnoy I) sont effectuées. Les lymphocytes sont ensuite conservés à 4°C dans le carnoy I durant une nuit avant une troisième fixation.

Pour la technique directe, le choc hypotonique et la récolte s'effectuent la journée même du prélèvement (pas de mise en culture). Pour ce faire, 0,4 mL de moelle osseuse non diluée et 0,05 mL de colcémide sont immédiatement ajoutées à une solution préchauffée de chlorure de potassium (KCl) 0,075 M. Ce tube est mis à l'incubateur durant 25 minutes à 37°C (choc hypotonique). Les étapes subséquentes sont identiques aux autres tubes mis en culture.

Les lymphocytes sont ensuite étalés sur des lames propres préalablement identifiées. Les lames servant à l'analyse chromosomique sont vieillies durant quelques jours à température ambiante, puis incubées une nuit à 37°C avant le marquage et la coloration. Les autres lames non colorées sont conservées à température ambiante pour la FISH (5

lames pour le panel LAL-B, 5 lames pour le panel LAM, 3 lames pour le panel LAL-T). Les culots excédentaires sont conservés au congélateur à -20°C dans 1 mL de carnoy I.

2.4.2 Marquage GTG et analyse chromosomique

Afin de permettre l'identification de chacun des chromosomes, nous avons utilisé un marquage morphologique en bandes GTG selon le protocole déjà publié (135-137).

En résumé, les lames sont d'abord trempées dans un bain de trypsine 2% (Gibco, Life Technologies, Montréal, Canada), diluée dans du NaCl (Baxter) durant environ 30 secondes, puis transférées dans trois bains successifs de solution saline NaCl. Ensuite, la coloration est effectuée en plaçant les lames dans un bain de Giemsa (Harleco, Voigt Global Distribution Inc., Kansas, États-Unis) 5% à pH 6.8 pendant environ deux à trois minutes. Les lames sont ensuite rincées dans deux bains successifs d'eau stérile. Le temps et la concentration des bains de trypsine et de Giemsa peuvent être ajustés afin d'obtenir un patron de bandes G et une coloration optimum.

La dénaturation enzymatique à la trypsine digère les régions moins condensées de la chromatine (clivage des ponts disulfure de l'ADN dans les bandes R), qui seront moins colorées au Giemsa (les bandes R apparaissent donc plus pâles). Cela donne un patron de bandes G (les bandes G sont foncées) qui facilite l'identification et l'analyse des chromosomes au microscope.

Pour l'analyse microscopique, les lames contenant les préparations chromosomiques sont analysées au microscope photonique. Généralement, 25 mitoses sont analysées pour chaque patient. Un minimum d'un caryotype par clone est réalisé (comprenant la lignée normale s'il y a lieu) avec le logiciel Cytovision (Leica Microsystems, Concord, Canada).

La formule chromosomique est établie en suivant les normes de nomenclature de l'ISCN 2013 (14).

Depuis l'automne 2011, l'analyse des préparations chromosomiques est faite avec un microscope automatisé : GSL; Genetix, Molecular Devices, San Jose, États-Unis qui prend des photographies des métaphases selon les critères établis. Ceci augmente significativement l'efficacité du laboratoire puisqu'il n'est plus nécessaire de chercher au microscope les mitoses, il suffit de sélectionner les 25 métaphases d'intérêt parmi celles prises par le GSL.

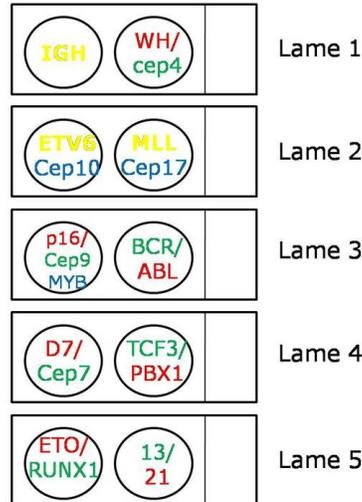
2.5 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

2.5.1 Panels de FISH (ensemble de sondes commerciales)

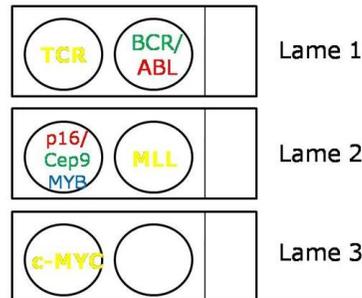
Des panels différents ont été établis afin de détecter les anomalies chromosomiques récurrentes (les plus fréquentes) et/ou ayant une valeur diagnostique ou pronostique importante dans les leucémies aiguës pédiatriques. Plusieurs panels décrits dans la littérature ont été comparés (138). Seules les sondes ayant une valeur diagnostique et pronostique importante ont été sélectionnées spécifiquement pour chacun des trois types de leucémies étudiées LAL-B, LAL-T et LAM (Figure 9 A, B et C). Le panel LAL-B comprend 13 sondes, le panel LAL-T 6 sondes et le panel LAM 9 sondes. Cinq lames sont préparées pour les cas de LAL-B et de LAM et trois pour les cas de LAL-T. Au laboratoire de cytogénétique du CHU Sainte-Justine, ces panels de FISH sont utilisés pour les leucémies *de novo*.

A. Panel LAL-B

1. ● **IGH** (14q32) (break-apart de Vysis)
2. ● **W.H.** (4p16.3) / ● **Cep 4** (Vysis)
3. ● **ETV6** (12p13) (Break-apart de Vysis) + ● **Cep 10 aqua** (vysis)
4. ● **MLL** (11q23) (Break-apart de Vysis) + ● **Cep17 aqua** (Vysis)
5. ● **p16** (9p21) / ● **Cep 9** (Vysis)+ ● **MYB** (6q23) aqua (Vysis)
6. ● **BCR** (22q11.2) Vert / ● **ABL ES** (9q34) Rouge
● t(9;22) (Dual color Extra signal de Vysis)
7. ● **D7S486** (7q31) Rouge / ● **Cep 7** (7p11.1-q11.1) Vert (Vysis)
8. ● **TCF3** (19p13.3) Vert / ● **PBX1** (1q23) rouge
● t(1;19) (Dual fusion de Vysis)
9. ● **ETO** (8q22) Rouge / ● **RUNX1** (21q22) Vert
● t(8;21) (Dual fusion de Vysis)
10. ● **13/ 21** Aneuvysion (Vysis)

**B. Panel LAL-T**

1. ● **LSI TCR** (14q11.2) (Break apart de Vysis)
2. ● **BCR** (22q11.2)/ ● **ABL ES** (9q34)
● t(9;22) (dual color extra signal de Vysis)
3. ● **p16** (9p21)/ ● **Cep 9** (Vysis) + ● **MYB** (6q23) (Vysis)
4. ● **MLL** (11q23) (Break apart de Vysis)
5. ● **c-MYC** (8q24) (Break apart de Vysis)

**C. Panel LAM**

1. ● **D7S486** (7q31) Rouge/ ● **Cep 7** (7p11.1-q11.1) Vert (Vysis)
2. ● **5q31** Rouge / ● **5p15.2** Vert **Cri du Chat** (Vysis)
3. ● **ETO** (8q22) Rouge / ● **RUNX1** (21q22) Vert
● t(8;21) (Dual fusion de Vysis)
4. ● **CBFβ** (16q22) (Break apart de Vysis)
5. ● **MLL** (11q23) (Break apart de Vysis)
6. ● **ETV6** (12p13) (Break apart de Vysis)
7. ● **PML** (15q22) rouge/ ● **RARA** (17q21) vert
● t(15;17)(q22;q21) (Dual fusion de Vysis)
8. ● **D20108** (20q12) (Vysis)
9. ● **p53** (17p13)/ ● **Cep 17** (Cytocell)

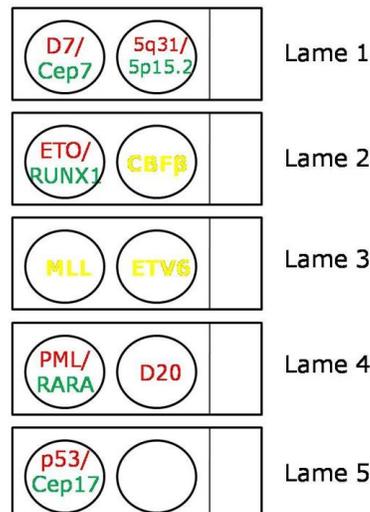


Figure 9. Description des panels de FISH utilisés pour les leucémies aiguës pédiatriques *de novo*. A) Panel LAL-B comprenant 13 sondes réparties sur 5 lames. B) Panel LAL-T comprenant 6 sondes réparties sur 3 lames. C) Panel LAM comprenant 9 sondes hybridées sur 5 lames. Légende : Sondes marquées par : ● la fluorescéine (FITC, vert), ● le *Texas-Red* (rouge), ● : le spectrum aqua (bleu) ou ● une superposition des fluorochromes FITC et *Texas-Red* (apparaît jaune).

2.4.2 Caractérisation cytogénétique moléculaire par BACs

Afin d'identifier les gènes partenaires impliqués dans certaines translocations chromosomiques rares, nous avons mis au point une stratégie pour caractériser ces anomalies par FISH avec des BACs (Figure 10). Les BACs que nous avons utilisés sont déjà marqués avec des fluorochromes de couleur rouge (*Texas-Red*) ou verte (FITC) et une grande variété sont disponibles (Center for Applied Genomics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario).

Pour identifier les BACs à utiliser, nous avons d'abord déterminé les gènes candidats impliqués dans des remaniements chromosomiques similaires décrits dans la littérature. Par la suite, nous avons choisi des BACs spécifiques aux gènes candidats près des points de cassure de ces anomalies. La localisation et le choix des BACs s'effectuent à partir de la base de données du «*Human Genome Browser Gateway*» (version GRCh37/hg19) (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Par exemple, les translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL* (11q23) forment des gènes de fusion avec une variété de partenaires différents. Avec la sonde breakapart de *MLL* (Vysis), utilisée dans les panels de FISH, on détecte le réarrangement du gène, mais l'identification de son gène partenaire nécessite des analyses

supplémentaires. Par RT-PCR, seuls les gènes de fusion classiques sont détectés (au CHU Sainte-Justine, des amorces permettent la détection des gènes *MLL-AF4* dans les LAL et *MLL-AF9* dans les LAM; Tableau X). Nous utilisons donc des BACs pour identifier les gènes partenaires plus rares de *MLL* (Figure 10).

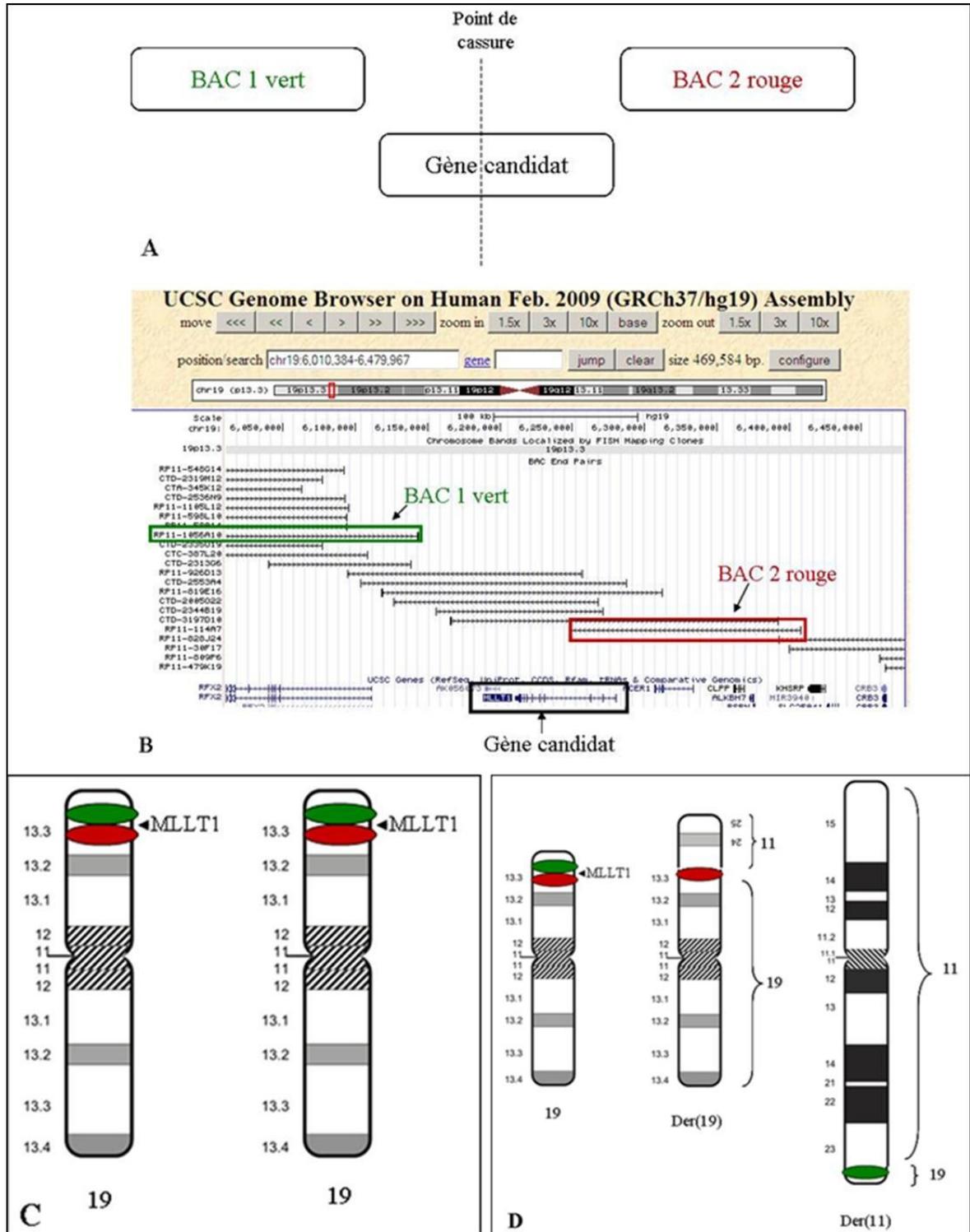


Figure 10. Méthode pour caractériser le réarrangement d'un gène rare par FISH avec des BACs. A) L'utilisation de deux BACs (un BAC vert et un BAC rouge) de part et d'autre d'un gène candidat permet de générer une sonde breakapart. B) Par exemple, pour détecter le réarrangement du gène candidat *MLLT1* (*ENL*) en 19p13.3, deux BACs (RP11-1056A10 en vert et RP11-114A7 en rouge) sont sélectionnés à partir de la base de données *UCSC Genome Browser*. C) Idéogramme illustrant deux chromosomes 19 normaux (deux signaux jaunes). D) Idéogramme illustrant un réarrangement du gène *MLLT1* par la séparation des signaux des deux BACs (BAC rouge sur le dérivé 19 et BAC vert sur le dérivé 11). Dans cet exemple, il s'agit d'une translocation $t(11;19)(q23;p13.3)$.

2.4.3 Technique de la FISH

Les sondes utilisées pour les trois panels sont des sondes commerciales (Vysis, Abbott Molecular; Dako ou Cytocell). Les techniques de FISH ont été réalisées selon les différents protocoles décrits par ces compagnies. En ce qui concerne les BACs, la technique de FISH est faite selon de légères modifications du protocole décrit par l'équipe de Keefe, 2010 (119).

La FISH consiste donc à hybrider une sonde fluorescente avec une séquence d'ADN complémentaire sur la préparation chromosomique ou interphasique (noyaux) du patient. La technique de la FISH est réalisée en deux jours : les prétraitements, la dénaturation et l'hybridation s'effectuent la première journée, les lavages et la coloration le lendemain. Les lames utilisées sont non colorées et on délimite sous les lames deux régions plus riches en noyaux (ou en chromosomes) à l'aide d'un crayon à pointe de diamants. Les lames bien identifiées sont laissées toute la nuit dans une solution de carnoy 1 (pour mieux fixer les préparations).

Plusieurs solutions doivent être préalablement préparées : 2X SSC (solution de citrate de sodium), PBS (solution de tampon phosphate), formaldéhyde, pepsine, 2X SSC +Tween 0,1% et 0,4X SSC +Tween 0,3% (Annexe 1).

2.4.3.1 Prétraitements des lames et préparation des sondes

Pour les prétraitements du lendemain, les lames sont séchées sous la hotte chimique environ 15 minutes, puis à l'incubateur à 37°C durant environ deux heures. Les prétraitements diffèrent pour la FISH interphasique et la FISH métaphasique. Généralement, la FISH interphasique est utilisée pour les panels (LAL-B, LAL-T et LAM *de novo*) ou pour les suivis, alors que la FISH métaphasique est utilisée pour les BACs (pour préciser les points de cassure d'une translocation chromosomique, section 2.4.2) ou pour des peintures chromosomiques.

Les lames doivent être déposées successivement dans chacun des bains décrits dans le Tableau VIII. Ces prétraitements contribuent à augmenter la vitesse de réaction et la stabilité des hybrides.

Tableau VIII. Prétraitements des lames pour la FISH interphasique et métaphasique.

FISH métaphasique	FISH interphasique
2XSSC 37°C 30 minutes	2XSSC 60°C 2 minutes
Éthanol 70 % 2 minutes	Pepsine 37°C 13 minutes
Éthanol 85 % 2 minutes	PBS 5 minutes
Éthanol 100 % 2 minutes	Formaldéhyde 5 minutes
	PBS 5 minutes
	Éthanol 70 % 2 minutes
	Éthanol 85 % 2 minutes
	Éthanol 100 % 2 minutes

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, les sondes utilisées sont déjà marquées [couplées avec un fluorochrome tel que la fluorescéine (FITC, vert), le *Texas-Red* (rouge) ou la Cyanine 3 (orange)], ce qui permet leur visualisation au microscope à fluorescence. Chacune des sondes sont diluées dans du tampon d'hybridation et de l'eau déionisée selon les proportions décrites dans le Tableau IX. Après avoir été mélangées au vortex et à la centrifugeuse, les sondes sont prêtes à être déposées sur les lames. 5 µL de sonde (jusqu'à 10 µL selon la taille de la goutte) est appliqué délicatement au centre du

cercle préalablement tracé. Les régions d'hybridation sont ensuite couvertes d'une petite lamelle circulaire de verre (*coverslip*) ayant un diamètre de 12 ou 18 mm.

Tableau IX. Préparation des dilutions pour les sondes de la marque Vysis ou pour les BACs de Toronto.

1 sonde Vysis ^a (20µL)	2 sondes Vysis (20 µL)	1 BAC RP11 de Toronto (10 µL)	2 BACs RP11 de Toronto (10 µL)
4 µL eau déionisée	4 µL eau déionisée	3 µL eau déionisée	1 µL eau déionisée
15 µL tampon d'hybridation de Vysis	14 µL tampon d'hybridation de Vysis	5 µL tampon d'hybridation de Vysis	5 µL tampon d'hybridation de Vysis
1 µL sonde	1 µL sonde #1	2 µL BAC	2 µL BAC #1
	1 µL sonde #2		2 µL BAC #2

Légende : a. Toutes les sondes utilisées dans les panels LAL-B, LAL-T et LAM sont distribuées par Vysis, Abbott Molecular Inc. (Markham, Canada) à l'exception de la sonde p53/cep 17 (Cytocell), dans le panel LAM. La dilution de cette sonde de Cytocell (Cambridge, Angleterre) ne requiert pas d'eau (6 µL de sonde avec 14 µL de tampon d'hybridation de Cytocell).

2.4.3.2 Hybridation et coloration

Une ouverture des doubles hélices d'ADN de la préparation chromosomique du patient et de la sonde est nécessaire pour que l'appariement des brins complémentaires (hybridation) puisse s'effectuer. Cette dénaturation (déstabilisation des ponts hydrogène) peut être réalisée sous l'action de la formamide (un produit chimique génotoxique) et/ou à la chaleur. Pour cette étape, nous utilisons le *Thermobrite* (Abbott Molecular), un appareil

programmable qui permet d'automatiser l'étape de la dénaturation. En fait, il s'agit d'une co-dénaturation puisque la sonde et les lames sont dénaturées en même temps. Les lames sont placées dans le *Thermobrite* pour une dénaturation à 75°C pendant 5 minutes. Ensuite, l'hybridation est effectuée en plaçant les lames dans une chambre humide (50% formamide/ 2X SSC) à l'incubateur à 37°C durant toute la nuit (environ 18 heures).

Le lendemain, les lames sont plongées successivement dans les solutions suivantes :

Bain 1 : 2X SSC à 37°C pendant 2 minutes.

Bain 2 : 0,4X SSC + Tween 0,3% à 73°C pendant 2 minutes.

Bain 3 : 2X SSC + Tween 0,1% à température ambiante pendant 1 minute.

Bain 4 : PBS à température ambiante (quelques minutes, la durée n'est pas importante).

Les lames sont ensuite colorées avec du 4'-6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), un agent intercalant fluorescent qui lie spécifiquement l'ADN et colore les noyaux et les chromosomes en bleu. Le DAPI est couplé au p-phénylènediamine (PPD) pH 9,0, un agent anti-blanchiment qui préserve la fluorescence. 12 µL de DAPI/PPD (DAPI II 125 mg/mL, Vysis) est déposé sur chacune des deux gouttes de la lame. Il faut couvrir d'une lamelle de verre (24mm X 60 mm). Les lames colorées sont placées à l'abri de la lumière. Elles peuvent être conservées au réfrigérateur à 4°C durant environ trois mois.

2.4.3.3 Analyse microscopique

L'analyse de la FISH requiert un microscope à fluorescence. Les fluorochromes des sondes émettent de la fluorescence en présence d'une longueur d'onde précise (émise par la lumière du microscope). Le microscope contient plusieurs filtres, permettant de modifier la longueur d'onde et d'exciter les différents fluorochromes des différentes sondes.

Dans le panel LAL-B, 100 noyaux interphasiques sont analysées pour chaque sonde, alors que 200 noyaux sont analysées dans les panels LAL-T et LAM. Par exemple, le panel utilisé pour les LAL-B *de novo* comprend 13 sondes, nécessitant l'analyse de 1300 cellules. Deux personnes effectuent l'analyse de chaque lame (100 cellules chacune pour les LAL-B; 50 cellules chacune pour les LAL-T et les LAM). En cas de discordance (plus de 10% d'écart), une troisième fait aussi la lecture des lames concernées. Par ailleurs, dans le cas d'une moelle avec un faible pourcentage de blastes (lors de l'évaluation de la maladie résiduelle), 500 cellules sont alors analysées. Les mitoses sont également analysées au besoin. Dans le cadre de notre projet de maîtrise, l'interprétation des résultats de la FISH et des caryotypes a été faite pour 253 cas de leucémies (LAL et LAM *de novo*).

2.6 RT-PCR

Puisque des amorces spécifiques sont requises pour la technique de RT-PCR, seuls les gènes de fusion classiques importants pour le diagnostic ou le pronostic des leucémies sont ciblés. Le Tableau X présente les gènes de fusion testés au laboratoire de biologie moléculaire du CHU Sainte-Justine pour les LAL et les LAM *de novo*. L'analyse de la RT-PCR est réalisée en parallèle aux analyses cytogénétiques (FISH et caryotype) lors du diagnostic (Figure 8). Lorsqu'un gène de fusion est détecté (RT-PCR positive), les amorces pour ce gène seront utilisées pour le suivi de la maladie résiduelle.

Tableau X. Gènes de fusion classiques dans les LAL et les LAM pédiatriques détectés par RT-PCR.

LAL	LAM
<i>BCR-ABL1</i>	<i>MLL-AF9</i>
<i>MLL-AF4</i>	<i>CBFβ-MYH11</i>
<i>ETV6-RUNX1</i>	<i>ETO-RUNX1</i>
<i>TCF3-PBX1</i>	<i>PML-RARA</i>

2.7 Statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées afin d'établir des corrélations entre les anomalies chromosomiques retrouvées chez les patients et différents paramètres cliniques tels que la survie globale, la survie sans événement, le pourcentage de rechutes et la résistance au traitement.

La taille de l'échantillon est de 253 patients mineurs.

Tests statistiques :

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel SPSS (*IBM SPSS Statistics*, version 19).

Pour déterminer s'il y a une corrélation entre la présence d'anomalies chromosomiques additionnelles (secondaires) et les taux de rechutes des patients, la corrélation Khi-deux de

Pearson a été utilisée. Pour les groupes présentant moins de 5 patients ($n \leq 5$), le Test exact de Fisher a été choisi car ce test statistique est valide et plus approprié pour les petits groupes.

Pour étudier la survie des patients (survie globale et survie sans événement), des courbes de survie Kaplan-Meier ont été effectuées. Le modèle de Kaplan-Meier est fondé sur l'estimation de probabilités conditionnelles à chaque date à laquelle un événement se produit (par exemple une rechute ou le décès du patient) pour estimer le taux de survie à chaque moment dans le temps. Ceci permet de comparer les taux de survie de différents groupes de patients (avec des anomalies chromosomiques distinctes).

Afin de déterminer le seuil des sondes du panel LAL-B, deux tests statistiques ont été utilisés avec le logiciel Excel, 2007 (Microsoft Office) :

- ❖ Fonction β inverse (maximum avec un intervalle de confiance de 95%)
- ❖ Distribution normale de Gauss (moyenne plus deux ou trois déviations standards)

3. Résultats

3.1 Optimisation des conditions de culture des cellules médullaires

L'analyse des mitoses des cellules de la moelle osseuse par cytogénétique standard peut s'avérer difficile en fonction de la quantité de métaphases obtenues (index mitotique) et de leur qualité (morphologie et longueur des chromosomes). Il est donc essentiel d'optimiser les conditions de culture des cellules médullaires. Un des objectifs de notre projet est de comparer quatre différentes conditions de culture afin de déterminer laquelle ou lesquelles permettent d'optimiser la détection des anomalies chromosomiques. Pour ce faire, un total de 22 cas de leucémies *de novo* ont été analysées (4 LAM et 18 LAL-B). 14 cas ont été mis en culture selon les trois premières conditions uniquement et dans huit cas supplémentaires, la technique directe a aussi été utilisée. Les conditions de culture ainsi que les anomalies sont présentées dans le Tableau XI. Il est à noter que pour certains échantillons, certaines conditions de cultures ont été effectuées, mais n'ont pas été analysées au microscope lorsqu'un nombre suffisant de métaphases analysées (25) était atteint (les mitoses de meilleure qualité sont analysées en priorité).

Tableau XI. Proportion de mitoses anormales selon les conditions de culture dans huit cas de LAL-B *de novo*.

#Cas	Anomalie	1) 24h culture /3h colcémide	2) 24h culture/ colcémide toute la nuit	3) 48h culture/3h colcémide	4) Technique directe
1	Hyperdiploïdie dans 29/51 mitoses analysées (75% par FISH)	Pas analysée	Pas analysée	5/26	24/25
2	Hyperdiploïdie dans 1 des 20 mitoses analysées (FISH : 58%), délétion <i>p16</i> (82%)	1/20	-	-	Pas analysée
3	Hyperdiploïdie dans 1 des 13 mitoses analysées	1/13	-	-	Pas analysée
4	Fusion <i>ETV6-RUNX1</i> (FISH : 70%)	0/25 ^N	Pas analysée	Pas analysée	Quantité insuffisante de mitoses
5	Aucune (FISH et caryotype normaux)	0/25 ^N	Pas analysée	Pas analysée	0/19 ^N
6	t(9;22)(q34;q11) dans 7/27 mitoses analysées et fusion <i>BCR-ABL</i> (FISH : 67%)	1/1	0/11 ^N	Pas analysé	6/15
7	Trisomie 21 dans 8/20 mitoses analysés (FISH : 27%)	5/16	3/3	0/1	Pas analysée
8	t(14;14)(q32;q11) et isochromosome 7q dans 14/17 mitoses analysées (FISH : 80%)	Pas analysée	Pas analysée	Pas analysée	14/17

Légende. N : Toutes les cellules analysées sont normales, h: heures

Parmi les huit cas de LAL-B *de novo* sur lesquels on a effectué une technique directe, un seul a échoué (quantité insuffisante de mitoses analysables) et trois n'ont pas été analysés (la quantité et/ou la qualité des mitoses était supérieure dans les autres conditions de culture) (Tableau XI). Parmi les quatre autres cas analysés avec la technique directe, un clone anormal a été détecté dans trois d'entre eux. Notamment, dans le premier cas, un clone anormal hyperdiploïde a été détecté dans 98% (24/25) des mitoses provenant de la technique directe, mais dans seulement 19% (5/26) des mitoses de la culture 48 heures avec 3 heures de colcémide. Par FISH, l'hyperdiploïdie a été observée dans 75% des cellules analysées; la technique directe semble donc plus représentative du clone anormal hyperdiploïde chez ce patient. Aussi, le sixième cas illustre l'importance d'utiliser la technique directe pour les LAL-B *de novo*. En effet, chez ce patient, une fusion *BCR-ABL* a été observée dans 67% des cellules analysées par FISH interphasique. En analysant d'abord le caryotype avec la culture de 24 heures et la colcémide toute la nuit, toutes les mitoses sont normales (11/11). En analysant les cellules de la technique directe, on a pu retrouvé la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ dans six métaphases sur 15 analysées.

Dans les 14 autres cas, nous avons comparé uniquement les cultures de 24 heures (avec la colcémide trois heures ou toute la nuit) et de 48 heures (résultats non montrés). La détection du clone anormal a été optimale (taux de mitoses anormal plus élevé) avec la technique 24 heures/3 heures chez neuf patients (quatre LAM et cinq LAL-B). La technique 24 heures/toute la nuit a été optimale dans trois cas et la technique 48 heures/3 heures dans deux cas. La culture de 24 heures semble donc plus efficace dans la majorité des patients analysés (64%).

3.2 Optimisation des panels de FISH

Depuis l'intégration de la FISH en hématologie clinique au CHU Sainte-Justine, le choix des sondes dans chacun des panels a évolué (Figure 9). Plusieurs changements ont été effectués, les principales modifications sont présentées dans ce chapitre. Initialement, le panel LAL-B comprenait notamment la sonde breakapart *c-MYC* (8q24) pour la détection des réarrangements du gène *c-MYC* associés aux LAL L3 de type Burkitt. Cette sonde permet la détection de la translocation classique t(8;14)(q24;q32) avec la fusion *c-MYC-IGH* ainsi que les translocations variantes impliquant l'oncogène *c-MYC* : la translocation t(2;8)(p11;q24) (fusion *IGK-c-MYC*) et la t(8;22)(q24;q11) générant le gène de fusion *IGL-c-MYC*. Dans le nouveau panel LAL-B, nous avons remplacé la sonde breakapart *c-MYC* pour la sonde breakapart *IGH* (14q32). Les réarrangements d'*IGH* sont plus fréquents que ceux de *c-MYC* puisqu'ils ne sont pas exclusifs aux LAL L3 : on les retrouve aussi dans les LAL-B L1 et L2 (16). Dans notre cohorte de LAL-B pédiatriques, cette sonde a d'ailleurs permis la détection de plusieurs anomalies chromosomiques impliquant le gène *IGH* ou le locus 14q32, telles qu'une translocation t(14;14)(q11;q32) et une t(2;14)(p16;q32). Les analyses de ces cas seront expliquées en profondeur dans le Tableau XVI, la Figure 18 pour la t(14;14) et dans le Tableau XVII et la Figure 22 pour la t(2;14) et discutées dans la section 4.5.3. D'autres sondes ont aussi été modifiées dans les panels afin d'optimiser la détection des anomalies chromosomiques. Le panel LAL-B initial comprenait la sonde breakapart *TCF3* (19p13) pour la détection des réarrangements de ce gène. Nous avons toutefois décidé d'utiliser la sonde de fusion *TCF3-PBX1*, qui permet d'observer la présence de ce gène de fusion issu de la translocation t(1;19)(q23;p13). Les translocations variantes impliquant *TCF3* sont assez rares dans les LAL-B pédiatriques (seule une t(17;19)(q22;p13) avec la fusion *TCF3-HLF* a déjà été décrite) (64) et la classification 2008 de l'OMS comprend les LAL-B avec la fusion *TCF3-PBX1*, mais n'inclut pas les autres réarrangements du gène *TCF3* (43).

De plus, pour détecter le gène de fusion *ETV6-RUNXI* issu de la translocation pathognomonique t(12;21)(p13;q22), nous avons choisi des sondes ciblant les gènes *ETV6* (12p13) et *RUNXI* (21q22) séparément plutôt que la sonde LSI *ETV6/RUNXI* extra signal (Vysis), afin de pouvoir détecter les anomalies variantes ou rares impliquant d'autres gènes partenaires. Les trois sondes utilisées pour observer les réarrangements impliquant les chromosomes 12p et 21q ainsi que des exemples sont donc présentées dans la Figure 11.

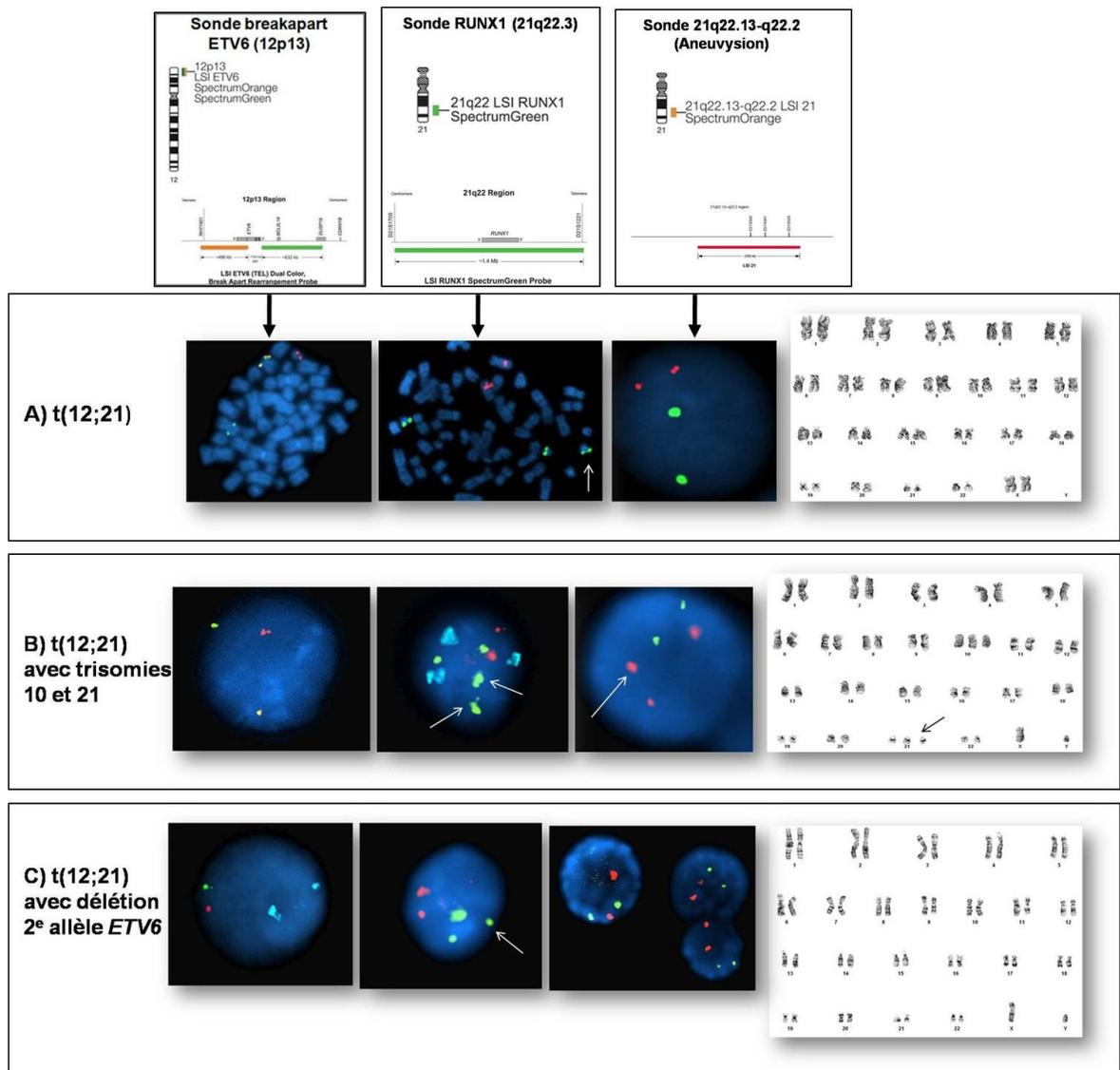


Figure 11. Détection de la translocation $t(12;21)(p13;q22)$ par FISH avec trois sondes différentes. Dans le panel LAL-B, le gène de fusion *ETV6-RUNX1* est détecté par l'utilisation concomitante de trois sondes : la sonde breakapart ETV6 (12p13) (les trois photos de FISH à gauche), la sonde RUNX1 (21q22.3) (les trois photos au centre) et une sonde contrôle en 21q22.13-q22.2 (les trois photos à droite). A) Patient atteint de LAL-B *de novo* avec une $t(12;21)(p13;q22)$ seule. On observe un réarrangement du gène *ETV6*, un réarrangement du gène *RUNX1* (flèche) et l'absence de trisomie 21. Le caryotype est

féminin normal [46,XX], puisque la translocation t(12;21) est cryptique et donc pas visible à cette résolution. B) Deuxième patient avec une LAL-B présentant une translocation t(12;21) avec des trisomies des chromosomes 10 et 21. On observe le réarrangement du gène *ETV6*, le réarrangement du gène *RUNX1* avec une trisomie 21 (quatre signaux pour la sonde *RUNX1*; flèches) et trois signaux pour la sonde contrôle sur le chromosome 21. Les trisomies 10 et 21 ont été confirmées au caryotype. C) Troisième patient atteint d'une LAL-B ayant une t(12;21) avec perte du 2^e allèle du gène *ETV6*. On observe le réarrangement d'*ETV6* avec la perte de la copie normale du gène (absence de signal jaune avec la sonde *ETV6* breakapart), le réarrangement du gène *RUNX1* (flèche) et l'absence de trisomie 21.

3.2.1 Seuil des sondes utilisées par FISH

Les critères d'interprétation des résultats de la FISH étant variables d'un laboratoire de cytogénétique à l'autre, il est primordial de déterminer le seuil de chacune des sondes utilisées. Le seuil permet de préciser le nombre de cellules anormales requises afin de désigner un résultat anormal (autrement dit, pour distinguer les résultats anormaux des résultats faux-positifs). Initialement, les seuils utilisés au CHU Sainte-Justine étaient basés sur les seuils décrits dans la littérature. Ces seuils sont basés sur plusieurs critères tels que le type, la nature et la taille de la sonde, la position génomique de la sonde par rapport au gène ciblé et/ou au point de cassure et la distance minimale entre les signaux d'hybridation de la sonde. Par exemple, les laboratoires de cytogénétiques utilisent généralement les seuils suivants pour les sondes hybridées sur des échantillons de LAL et de LAM *de novo* :

- Sonde simple fusion : 1%
- Sonde double fusion : 2%
- Sonde breakapart : 1% (*MLL*) à 10% (*IGH*)

➤ Sondes alphas ou locus spécifiques :

- gain : 5%
- perte : 10%

L'interprétation des résultats de la FISH est ensuite basée sur ces seuils théoriques en corrélation avec les autres données cliniques et génétiques de chaque patient (pourcentage de blastes, index d'ADN, résultats de la biologie moléculaire concernant la présence de transcrits de fusion, etc.). Cependant, ces seuils théoriques sont conçus pour les leucémies *de novo* et ne sont pas appropriés pour le suivi de la maladie résiduelle, dans laquelle le pourcentage de blastes et d'anomalies cytogénétiques est très faible.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons donc calculé les seuils réels pour l'ensemble des sondes du panel LAL-B. Les seuils ont été déterminés en comptant le nombre de cellules faux-positives pour chacune des sondes dans 20 cas de LAL-B *de novo* présentant une anomalie chromosomique connue pour une sonde précise. Il est donc possible de déterminer le seuil des autres sondes, qui sont normales (absence d'anomalie) chez ce patient. Un faux positif se définit comme une cellule avec un profil d'hybridation suggérant une anomalie au niveau du locus ciblé par la sonde. Les seuils ont par la suite été établis en effectuant des analyses statistiques. Deux méthodes différentes décrites dans la littérature ont été utilisées. Dans la première méthode, les seuils sont établis en identifiant l'échantillon avec le plus grand nombre de cellules faux-positives. Le seuil est ensuite calculé avec une fonction β inverse et un intervalle de confiance de 95% (117). Avec la deuxième méthode, le calcul des seuils est basé sur une distribution normale de Gauss. Le seuil correspond à la moyenne du nombre de cellules faux-positives plus deux ou trois déviations standard (139). Les seuils obtenus pour chacun des trois types de sondes (sondes breakapart, sondes de fusion et sondes locus spécifiques) sont présentés dans le Tableau XII. Pour une même sonde, les seuils calculés par la méthode 1 sont supérieurs à ceux calculés par la méthode 2. Dans l'ensemble, la méthode 1 a donné des seuils qui

varient entre 2,95% et 16,78%, alors qu'avec la méthode 2, ils varient entre 0% et 13,31%. La sonde ayant le seuil le plus élevé est Cep 17 (sonde spécifique au centromère du chromosome 17) et la sonde D7/cep 7 (7q31 et centromère du chromosome 7) a le seuil le moins élevé.

Tableau XII. Détermination du seuil des sondes utilisées par FISH dans le panel LAL-B.

Type de sondes	Sondes	Seuil par la méthode 1 : fonction β inverse			Seuil par la méthode 2 : distribution normale de Gauss			
		Nb cellules faux- positives	Nb total cellules analysées (100 cellules /cas)	Max. (interv alle confian ce 95 %) (%)	Moy. (%)	DS (%)	Moy. +2 DS (%)	Moy. +3 DS (%)
Break apart	<i>ETV6</i>	3	1400	7,36	0,21	0,58	1,37	1,95
	<i>MLL</i>	5	1800	7,36	0,28	0,75	1,78	2,53
	<i>IGH</i>	43	1900	11,94	2,26	2,18	6,36	8,54
Fusion	<i>ETO/ RUNX1 (DF)</i>	9	1600	8,58	0,56	1,09	2,75	3,84
	<i>BCR/ ABL ES</i>	30	1800	9,75	1,76	1,56	4,89	6,45
	<i>TCF3/ PBX1 DF</i>	11	1800	7,36	0,63	0,96	2,54	3,50
Locus spécifique (pour détecter les aneuploïd ies)	Cep 10 (gain)	11	1900	10,90	0,69	1,74	4,17	5,91
	(Perte)	23	1900	10,90	1,44	1,86	5,16	7,02
	Cep 17 (gain)	19	1600	15,87	1,27	2,96	7,19	10,16
	(perte)	48	1600	16,78	3,27	3,35	9,96	13,31
	13 (gain)	6	1800	6,04	0,35	0,79	1,92	2,71
	(Perte)	8	1800	6,04	0,47	0,80	2,07	2,87
21 (gain)	9	1100	6,04	0,73	0,90	2,54	3,44	

(perte)	4	1100	6,04	0,36	0,50	1,37	1,88
<i>WH/cep4</i> (gain)	9	1200	9,75	0,75	1,42	3,59	5,02
(perte)	17	1200	7,36	1,42	1,24	3,90	5,14
<i>p16/cep9</i> (gain)	12	1500	4,61	0,07	0,26	0,58	0,84
(perte)	27	1500	9,75	1,20	1,57	4,34	5,90
<i>MYB</i> (gain)	4	1100	8,59	0,29	1,07	2,42	3,49
(perte)	11	1100	9,75	0,73	1,39	3,51	4,89
<i>D7/cep 7</i> (gain)	0	1700	2,95	0	0	0	0
(perte)	10	1700	6,04	0,59	0,80	2,18	2,97

Légende. DS : déviation standard, Moy. : moyenne, Nb : nombre, Max. : maximum.

3.3 Corrélation entre les caractéristiques cliniques et les anomalies chromosomiques des LAM

Au total, 40 cas de LAM *de novo* ont été analysés. Ils ont été classés en différents sous-groupes d'anomalies cytogénétiques, en fonction des principales anomalies chromosomiques récurrentes détectées au caryotype et/ou par FISH. Les principales caractéristiques cliniques de ces patients sont présentées dans le Tableau XIII. La fréquence des anomalies chromosomiques est illustrée dans la Figure 12C. Les caractéristiques cliniques de la population de LAM *de novo* étudiée, l'âge médian au diagnostic est de 5 ans, 66% sont de sexe féminin et le pourcentage de blastes médian au

diagnostic est de 66%. L'âge médian est inférieur dans les sous-groupes avec la fusion *CBFB-MYH11* (inversion 16), un réarrangement de *MLL* (11q23) et avec d'autres anomalies chromosomiques (2,5; 3,5 et 2,8 ans respectivement). Le pourcentage de blastes est le plus élevé chez les patients avec la fusion *PML-RARA* et un réarrangement du gène *MLL* (84% et 83% respectivement).

Dans l'ensemble, 90% (36/40) des cas de LAM présentent des anomalies chromosomiques. L'anomalie la plus fréquente est le réarrangement du gène *MLL* (11q23), retrouvée dans 27,5% des cas (11/40). Les translocations impliquant *MLL* constituent 88,9% des cas de LAM avec une classification FAB M5 (8/9). La deuxième anomalie la plus fréquente est la fusion *PML-RARA* issue de la translocation pathognomonique t(15;17)(q22;q21), représentant 12,5% (5/40) de l'ensemble des cas de LAM et 100% (5/5) des LAM M3. Nous avons également retrouvé les principales anomalies génomiques connues dans la littérature pour les LAM pédiatriques, telles que la fusion *CBFB-MYH11* [inv(16)(p13;q22)] dans 7,5% des cas (3/40), la fusion *RUNX1-ETO* générée par la translocation t(8;21)(q22;q22) dans 5,0% des cas (2/40), la monosomie 7/délétion 7q (10,0%; 4/40), la délétion 5q (2,5%; 1/40), la trisomie 8 (2,5%; 1/40) et un caryotype complexe (5,0%; 2/40). Certaines anomalies rares ont également été détectées (colonne «autres anomalies»), notamment une translocation t(12;13)(p13;q1?) avec un réarrangement du gène *ETV6* (12p13) chez une jeune patiente de cinq ans atteinte d'une LAM M1 *de novo*. Ce cas a d'ailleurs été investigué davantage par FISH afin de préciser le point de cassure sur le chromosome 13. Les résultats de ces analyses supplémentaires sont présentés dans le Tableau XVI et illustrés dans la Figure 21.

Tableau XIII. Caractéristiques cliniques des patients atteints de LAM *de novo* en fonction des sous-groupes cytogénétiques.

	Nb total cas	Sans anom. cytog.	Réar. <i>MLL</i> (11q23)	t(15;17) <i>PML-RARA</i>	t(8;21) <i>RUNX1-ETO</i>	Inv(16) <i>CBFβ-MYH11</i>	Mono 7/del 7q	Caryotype complexe	Autres
Nb total cas	40	4	11	5	2	3	4	2	9
Nb cas vivants	34	3	9	5	2	3	1	2	9
Âge médian (années)	5	14	3,5	14	10	2,5	13	9,5	2,8
Sexe : H	15	1	3	1	0	2	2	2	4
F	25	3	8	4	2	1	2	0	5
Classification FAB connue	35	3	10	5	2	2	3	2	7
M0	0								
M1	4	2							2
M2	7		1		2		1		3
M3	5			5					
M4	6	1	1			2		1	1
M5	9		8						1
M6	2						1		1
M7	2						1	1	
% blastes	66	73	85	84	43	50	16	56	45

Légende. H : hommes, F : femmes, anom. cytog. : anomalies cytogénétiques, Nb : nombre, survie : août 2012, % blastes : pourcentage de blastes au diagnostic (médiane)

3.4 Fréquence des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques

3.4.1 Anomalies primaires

Les fréquences des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques *de novo* au CHU Sainte-Justine sont présentées dans la Figure 12. Les taux de détection des anomalies génomiques sont de 93,5% pour les LAL-B (174/186 cas sont anormaux), 66,7% pour les LAL-T (18/27 cas anormaux) et 90% pour les LAM (36/40 cas anormaux). Dans les LAL-B (Figure 12A), les anomalies les plus fréquentes sont l'hyperdiploïdie (37% des LAL-B) et la fusion *ETV6-RUNX1* issue de la translocation t(12;21)(p13;q22) (20% des cas). Dans les LAL-T, les anomalies les plus fréquemment observées sont la délétion du gène suppresseur de tumeur *p16* en 9p21 (22% des LAL-T) et les réarrangements du gène *TCR* en 14q11.2 (15% des cas). Dans les LAM, les réarrangements du gène *MLL* en 11q23 sont les plus fréquents (28% des cas), suivis de la fusion *PML-RARA* issue de la translocation t(15;17)(q22;q21) (13% des cas).

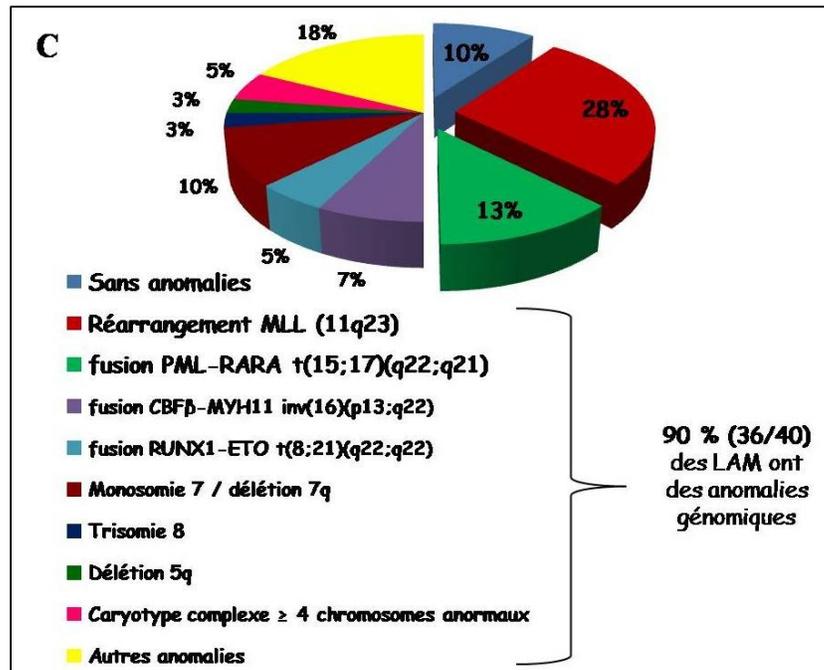
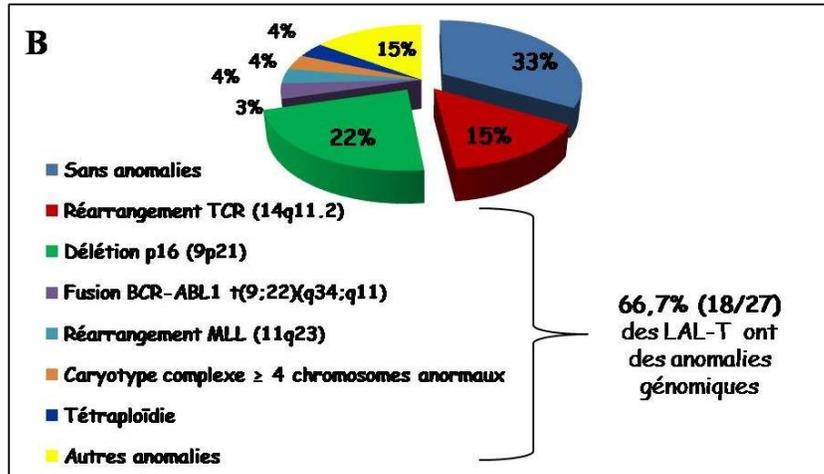
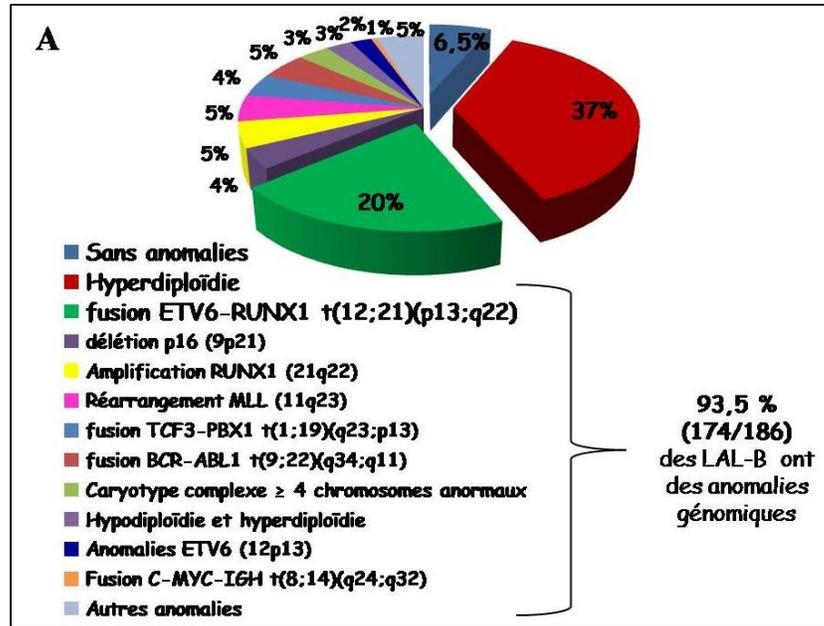


Figure 12. Fréquences d'anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques *de novo* au CHU Sainte-Justine. A. Dans les LAL-B, 93,5% des cas ont des anomalies cytogénétiques. B. Dans les LAL-T, des anomalies ont été détectées dans 66,7% des cas. C. Dans les LAM, 90% des cas présentent des anomalies chromosomiques.

3.4.1.1 Réarrangements du gène *MLL* (11q23)

Puisque le gène *MLL* a une multitude de gènes partenaires (7, 16, 32, 69), nous avons évalué la fréquence des translocations classiques et rares impliquant la bande chromosomique 11q23. La Figure 13 illustre la variété de gènes de fusion détectés dans notre cohorte de leucémies aiguës pédiatriques. Au total, 20 cas avec un réarrangement impliquant le gène *MLL* ont été détectés : 9 LAL-B et 11 LAM. Nous avons d'abord identifié la translocation $t(4;11)(q21;q23)$ générant le gène de fusion *MLL-AF4*. Cette translocation constitue le réarrangement de *MLL* le plus récurrent dans les LAL-B (quatre des neuf cas de LAL-B avec un réarrangement de *MLL*).

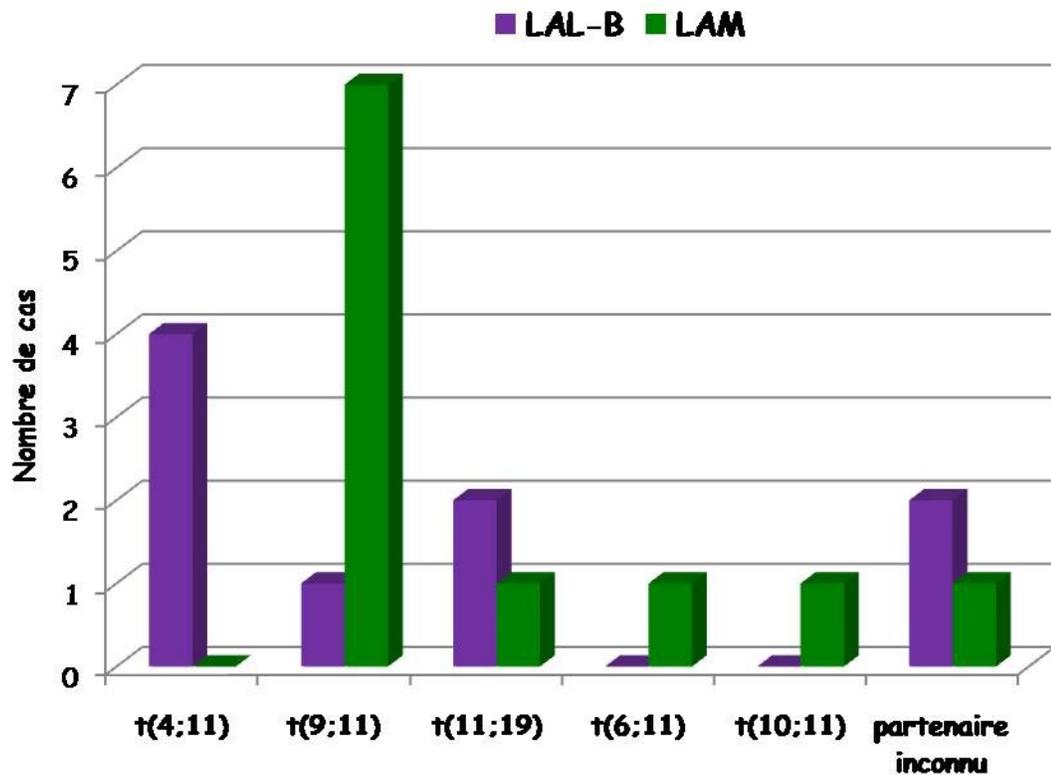


Figure 13. Variété des translocations impliquant le gène *MLL* en 11q23 dans les LAL-B et les LAM pédiatriques.

Parmi les autres cas de LAL-B avec un réarrangement du gène *MLL*, deux ont la translocation récurrente t(11;19)(q23;p13.3) [gène de fusion *MLL-ENL*] et on a également détecté une translocation t(9;11), généralement retrouvée dans les LAM. La t(9;11)(p22;q23) avec le gène de fusion chimérique *MLL-AF9* est d'ailleurs la translocation la plus fréquente dans les LAM (7 des 11 cas avec réarrangement de *MLL*) (Figure 14).

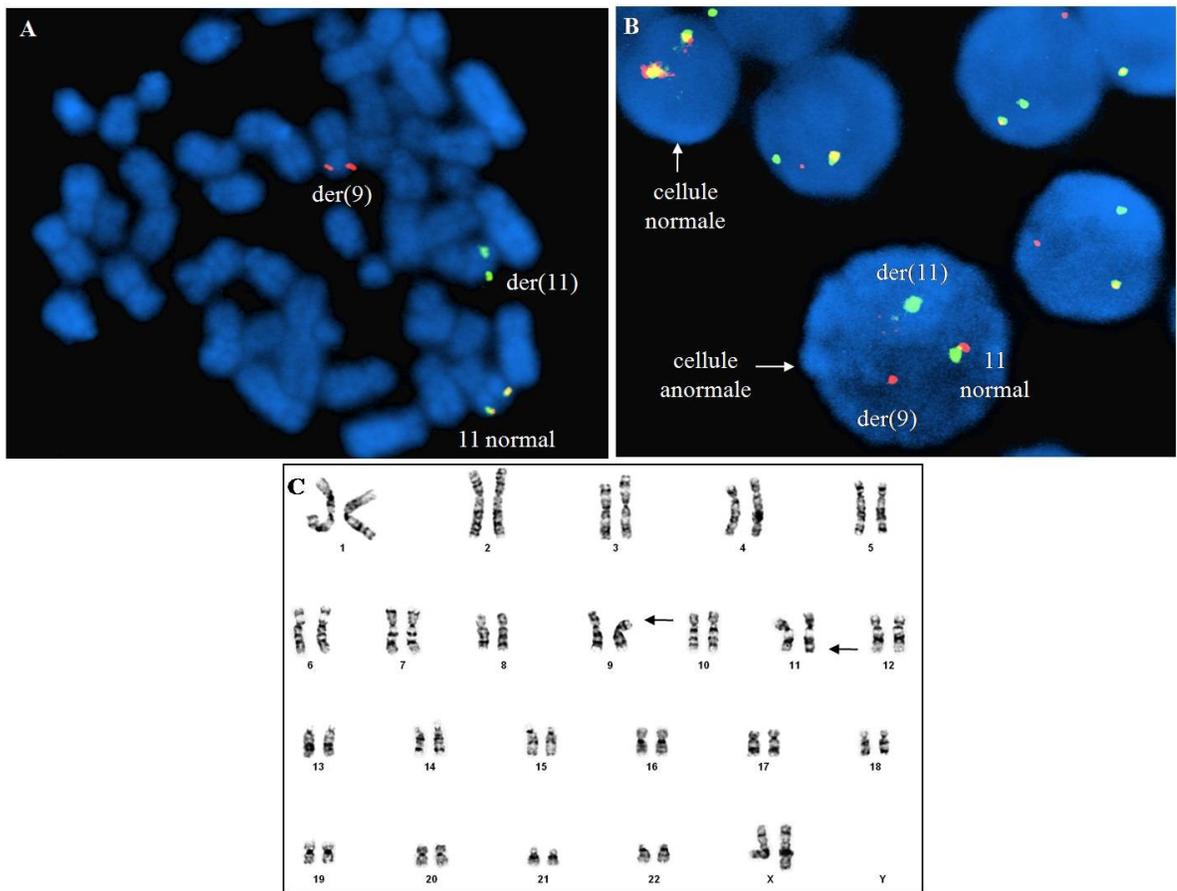


Figure 14. Translocation $t(9;11)(p22;q23)$ avec réarrangement du gène *MLL* chez une patiente avec une LAM de novo. **A et B.** FISH avec la sonde de réarrangement *MLL* (Vysis, Abbott Molecular Inc.) qui montre une translocation impliquant le gène *MLL* (11q23). Ce réarrangement a été observé dans 98% des cellules analysées par FISH. **C.** Caryotype en bandes GTG de la même patiente montrant la translocation $t(9;11)(p22;q23)$. Cette translocation a été observée dans 26 mitoses sur 28 analysées. De plus, la présence du transcrit de la fusion *MLL-AF9* a été montrée par RT-PCR (non illustré).

Dans les LAM, outre la translocation classique $t(9;11)$, on a aussi trouvé un cas de $t(11;19)$, une $t(6;11)(q27;q23)$ et une $t(10;11)(p12.31;q23)$. L'identification des gènes de

fusion *MLL-ENL* [t(11;19)], *MLL-AF6* [t(6;11)] et *MLL-AF10* [t(10;11)] a été réalisée par FISH avec des BACs, puisqu'aucune sonde commerciale spécifique à ces gènes n'est actuellement disponible. L'ensemble des résultats de la caractérisation cytogénétique moléculaire de ces cas est présentée dans la section 3.5 (Tableau XVI, Figures 19 et 20). En résumé, 56% des LAL-B et 36% des LAM avec un réarrangement du gène *MLL* ont une translocation rare [autre que les translocations classiques t(4;11) ou la t(9;11) dans les LAL-B et les LAM respectivement].

3.4.2 Anomalies secondaires

Les deux anomalies primaires les plus fréquentes dans les LAL-B sont l'hyperdiploïdie et la fusion *ETV6-RUNX1* issue de la translocation t(12;21)(p13;q22). Dans notre projet, nous avons aussi évalué la fréquence et l'impact pronostique des anomalies secondaires additionnelles à ces deux anomalies dans notre cohorte de patients pédiatriques. La liste ainsi que la fréquence de ces anomalies secondaires sont présentées dans la figure 15 :

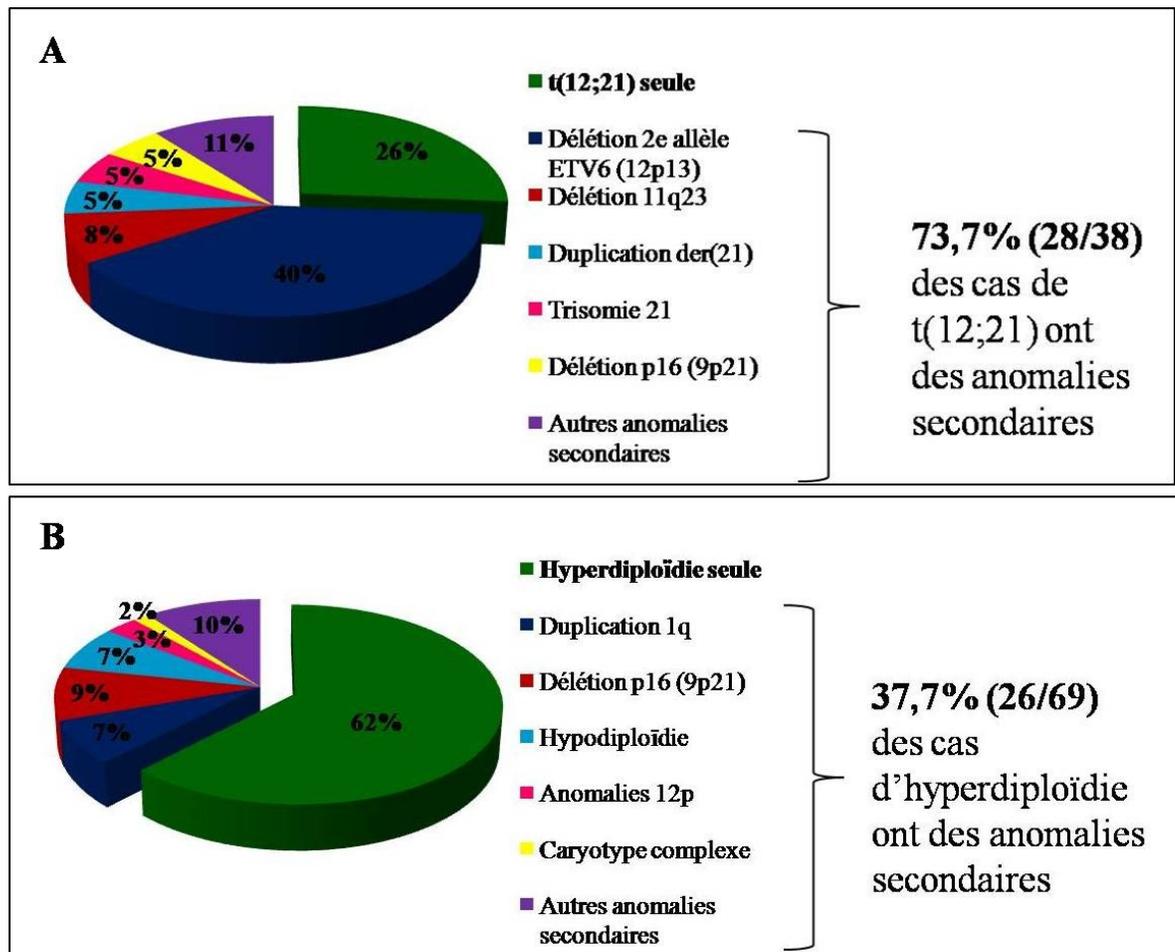


Figure 15. Fréquence des anomalies secondaires additionnelles à la translocation t(12;21)(p13;q22) et à l'hyperdiploïdie dans les LAL-B. A) 73,7% des cas avec une t(12;21) ont des anomalies secondaires, la plus fréquente étant la perte du 2^e allèle du gène *ETV6* en 12p13. B) 37,7% des cas avec une hyperdiploïdie (de 50 à 65 chromosomes) présentent des anomalies secondaires, notamment la perte du gène *p16* (9p21), un clone hypodiploïde ou la duplication du chromosome 1q.

Parmi les 69 cas de LAL-B avec une hyperdiploïdie de 50 à 65 chromosomes, environ 37,7% (26/69) ont des anomalies additionnelles (Figure 15B). Les anomalies

secondaires les plus fréquemment retrouvées sont la perte du gène suppresseur de tumeur *p16* (6 cas sur 26), un clone hypodiploïde (5/26) et la duplication du chromosome 1q (5/26). La région minimale dupliquée sur le chromosome 1 a d'ailleurs été limitée aux bandes 1q21q32. Parmi les cas de LAL-B avec la fusion *ETV6-RUNX1*, la majorité présentent des anomalies secondaires (28/38; 73,7%). La perte du 2^e allèle du gène *ETV6* est une anomalie secondaire récurrente : on la retrouve dans 53,6% (15/28) des cas de t(12;21) avec anomalies additionnelles et dans 40% de l'ensemble des cas de fusion *ETV6-RUNX1* (15/38).

3.4.2.1 Hyperdiploïdie et hypodiploïdie dans les LAL-B

Parmi les LAL-B hyperdiploïdes, certains patients présentent également un clone hypodiploïde. Les changements de ploïdie peuvent être évalués par FISH et par l'index d'ADN; la Figure 16 illustre la complémentarité de ces deux méthodes. Dans notre cohorte, nous avons retrouvé cette entité (co-existence d'un clone hyperdiploïde et hypodiploïde) chez cinq patients, représentant 7,2% (5/69) de l'ensemble des LAL-B hyperdiploïdes (50-65 chromosomes). Le Tableau XIV présente les résultats de ces cinq cas. Lors de la première analyse de la cytogénétique standard (environ 25 mitoses sont analysées), seul le clone hyperdiploïde a été détecté chez les patients numéros 1, 2 et 4. Or, par FISH, on a montré la présence d'un clone hypodiploïde, ce qui a été confirmé par l'index d'ADN. Une seconde analyse du caryotype, sur un plus grand nombre de mitoses (jusqu'à 60 mitoses ont été analysées), a permis d'observer des métaphases hypodiploïdes. Avec l'index d'ADN, un seul pic aneuploïde a toutefois été mis en évidence chez deux patients (patients 2 et 5). Le 2^e clone aneuploïde est présent dans un faible pourcentage de cellules (moins de 20%) chez ces deux patients, la faible hétérogénéité clonale étant difficile à observer par cytométrie de flux. Aussi, le pourcentage de cellules dans chacun des clones diffère légèrement entre chacune des techniques, mais globalement, le clone hyperdiploïde est supérieur. En fait, chez les patients 1, 3, 4 et 5, les cellules

hyperdiploïdes sont environ deux fois plus nombreuses que les cellules hypodiploïdes, alors que chez le patient 2, le pourcentage des deux clones est similaire.

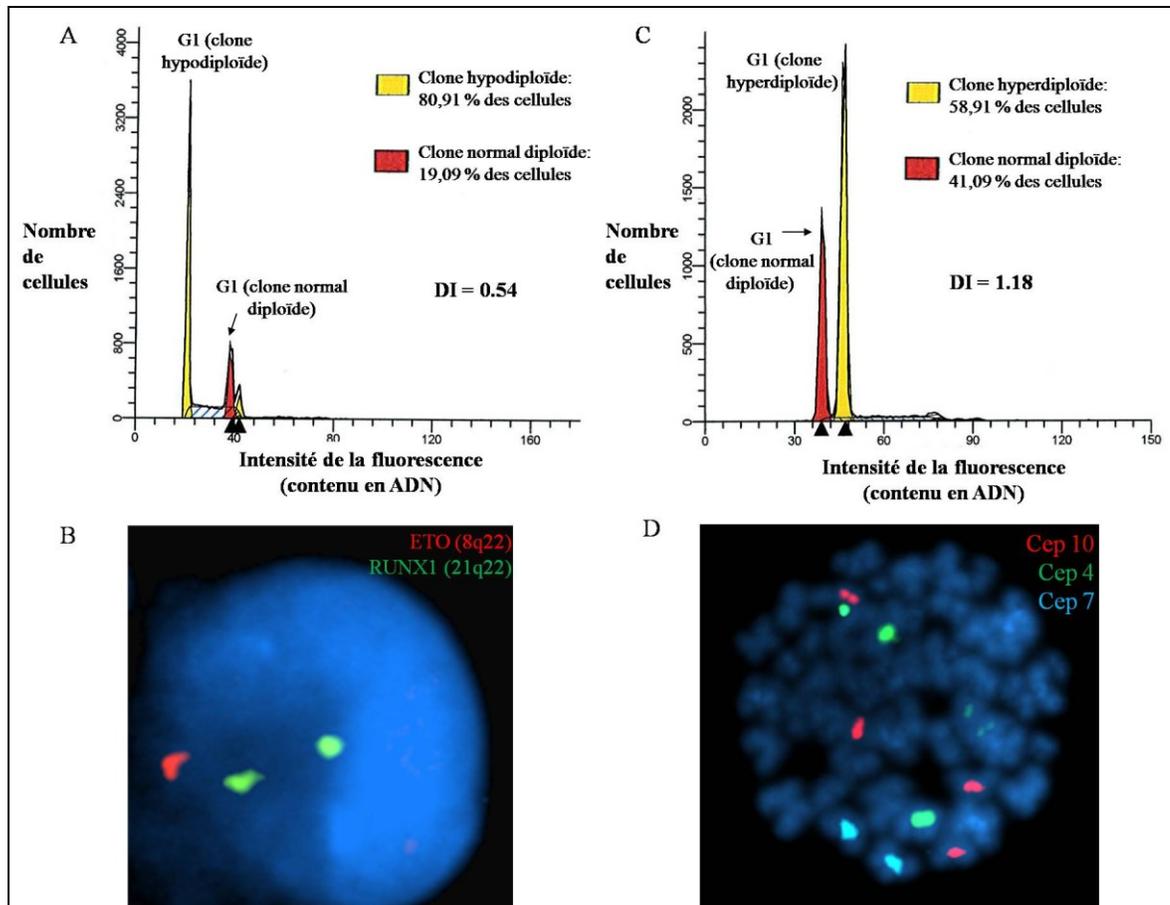


Figure 16. Détection d'hypodiploïdie et d'hyperdiploïdie par l'index d'ADN et par FISH. **A.** Hypodiploïdie à 23~26 chromosomes détectée par cytométrie de flux chez un patient avec une LAL : l'index d'ADN (DI) est de 0,54. Le clone hypodiploïde (pic jaune) représente environ 81% des cellules. **B.** Hypodiploïdie détectée par FISH chez le même patient : une monosomie 8 (signal rouge) est montrée dans le noyau. Le clone hypodiploïde a été détecté dans environ 80% des cellules par FISH. Cette hypodiploïdie a également été

observée au caryotype dans 15 mitoses sur 25 analysées (non illustré). **C.** Hyperdiploïdie à 55 chromosomes détectée par cytométrie de flux chez un deuxième patient avec une LAL : l'index d'ADN (DI) est de 1,18. Le clone hyperdiploïde (pic jaune) représente environ 59% des cellules. **D.** Hyperdiploïdie détectée par FISH chez un troisième patient avec une LAL : cette cellule montre une tétrasomie 10 (signal rouge) et une trisomie 4 (signal vert). Les chromosomes 7 (signal bleu) sont présents en deux copies. Le clone hyperdiploïde a été détecté dans environ 50% des cellules par FISH.

Tableau XIV. Cinq cas de LAL-B *de novo* avec co-existence d'un clone hyperdiploïde et d'un clone hypodiploïde détectés au caryotype, par FISH et/ou par l'index d'ADN.

Cas	Caryotype			FISH		Index d'ADN	
	Clone hyper.	Clone hypo.	Cellules normales	Clone hyper.	Clone hypo.	Clone hyper. (>1,16)	Clone hypo. (<0,85)
1	26/38 mitoses à 59 chromosomes	5/38 mitoses à 25~28 chromosomes	7/38 mitoses à 46 chromosomes	50% des noyaux	15% des noyaux	1,23	0,65
2	6/55 mitoses à 66 chromosomes	9/55 mitoses à 34~38 chromosomes	40/55 mitoses à 46 chromosomes	18% des noyaux	15% des noyaux	aucun	0,68
3	13/21 mitoses à 52 chromosomes	9/21 mitoses à 23~29 chromosomes	aucune	70% des noyaux	30% des noyaux	1,09	0,55
4	32/60 mitoses à 58 chromosomes	aucun	28/60 mitoses à 46 chromosomes	77% des noyaux	18% des noyaux	1,21	0,59
5	8/25 mitoses à 62 chromosomes	3/25 mitoses à 29 chromosomes	14/25 mitoses normales	60% des noyaux	14% des noyaux	1,3	aucun

Légende. Clone hyper. : clone hyperdiploïde (> 50 chromosomes); clone hypo. : clone hypodiploïde (<39 chromosomes).

3.4.2.2 Valeur pronostique des anomalies chromosomiques secondaires

Afin d'évaluer la valeur pronostique des anomalies chromosomiques secondaires, nous avons comparé les taux de rechutes et de décès des patients ayant uniquement des anomalies chromosomiques primaires et ceux des patients ayant des anomalies chromosomiques secondaires additionnelles (Tableau XV).

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les taux de rechutes des patients avec une hyperdiploïdie ou avec la translocation t(12;21) seule et ceux des patients avec en plus des anomalies secondaires ($p > 0,05$, test chi-deux de Pearson et test exact de Fisher). De plus, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les taux de décès des patients avec hyperdiploïdie seule et ceux des patients avec hyperdiploïdie et anomalies secondaires ($p > 0,05$). 100% des patients présentant la fusion *ETV6-RUNX1* sont vivants en août 2012 (aucun décès); il n'y a donc aucune différence entre les taux de survie des patients avec une t(12;21) seule ou avec des anomalies secondaires.

Tableau XV. Fréquence et valeur pronostique des anomalies secondaires à l'hyperdiploïdie et à la translocation t(12;21)(p13;q22).

Anomalies	Nombre de patients	Nombre de patients avec rechute	Statistiques	Nombre de patients décédés	Statistiques
Hyperdiploïdie > 46 chromosomes	74	12		4	
Hyperdiploïdie 50-65 chromosomes (bon pronostic)	69	10		3	
Hyperdiploïdie seule	43	7		2	
Hyperdiploïdie + anomalies secondaires	26	3	p>0,05	1	p>0,05
Hyperdiploïdie + caryotype complexe ¹	1	1	*p=0,032 (Pearson) p=0,182 (Fisher)	0	p>0,05
Hyperdiploïdie + Hypodiploïdie ¹	5	1	p>0,05	1	p>0,05
t(12;21)(p13;q22) Fusion <i>ETV6-RUNX1</i>	38	3		0	
t(12;21) seule	10	1		0	
t(12;21) + anomalies secondaires	28	3	p>0,05	0	p>0,05
t(12;21) + perte <i>ETV6</i> ²	15	2	p>0,05	0	p>0,05

Légende. Caryotype complexe : plus de 4 chromosomes anormaux, tests statistiques : chi-deux de Pearson (pour l'ensemble des échantillons) et test exact de Fisher (pour les échantillons avec moins de cinq patients), 1 : cette entité fait partie du groupe

«hyperdiploïdie + anomalies secondaires», 2 : cette entité fait partie du groupe « t(12;21) + anomalies secondaires».

Bien que dans l'ensemble, les anomalies secondaires ne semblent pas être corrélées à un pronostic défavorable (Tableau XV), nous avons déterminé si certains types (ou sous-groupes) d'anomalies secondaires peuvent influencer le pronostic. Nous avons donc comparé la survie sans évènement à sept ans (EFS à 7 ans) du groupe des LAL-B présentant de l'hyperdiploïdie seule avec le sous-groupe des LAL-B avec hyperdiploïdie et un caryotype complexe (Figure 17). Nos résultats montrent une réduction fortement significative de la probabilité de survie sans évènement des patients avec hyperdiploïdie et un caryotype complexe comparativement aux patients avec hyperdiploïdie seule ($p < 0,001$).

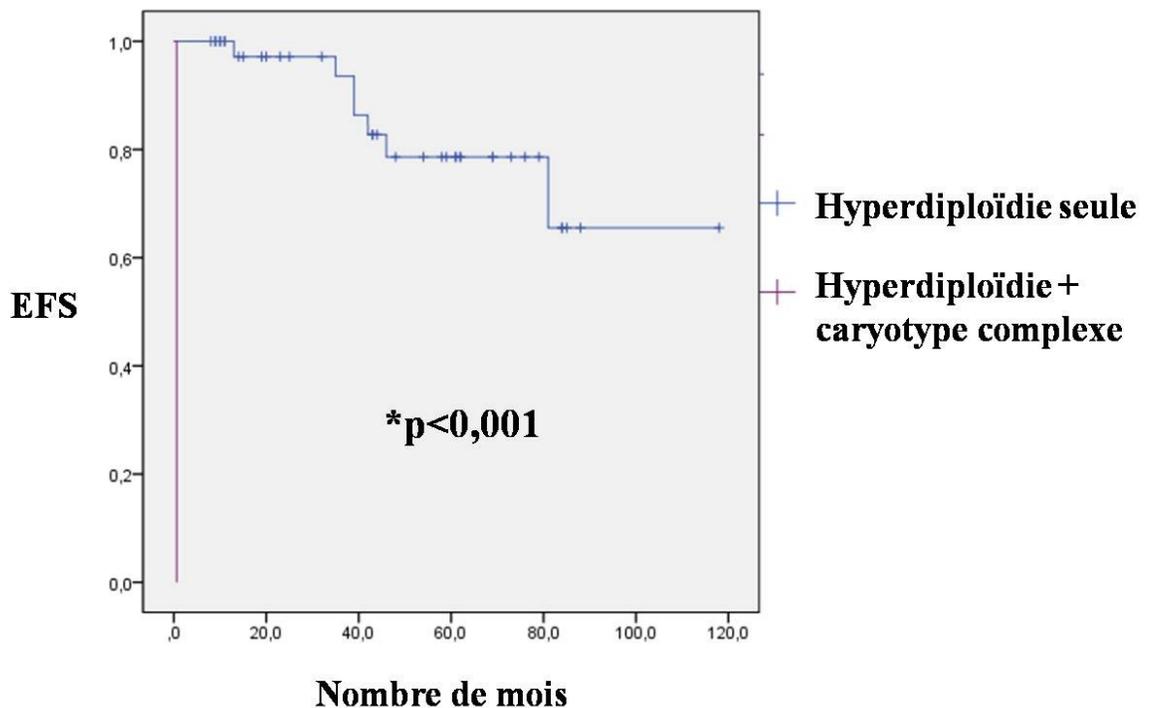


Figure 17. Courbes de Kaplan Meier pour la survie sans évènement (EFS) à sept ans des LAL-B avec hyperdiploïdie seule et des LAL-B avec hyperdiploïdie au sein d'un caryotype complexe. Le test log rank (Mantel-Cox) montre que la survie sans évènement des cas avec

hyperdiploïdie et un caryotype complexe (courbe mauve) est statistiquement réduite par rapport aux cas avec hyperdiploïdie seule (courbe bleue) (* $p < 0,001$).

3.5 Caractérisation cytogénétique moléculaire des anomalies rares

Parmi l'ensemble des leucémies aiguës analysées, plusieurs anomalies rares ont été détectées au caryotype et/ou avec les panels de FISH. Nous avons donc effectué des analyses supplémentaires de cinq cas pour lesquels il était cliniquement pertinent de préciser les points de cassure des translocations rares. En effet, l'identification des deux gènes partenaires impliqués permet de mieux établir le diagnostic et le pronostic des anomalies chromosomiques (32). Les caractéristiques de ces cinq cas et les résultats de l'ensemble des analyses sont décrits dans le Tableau XVI et illustrés dans les Figures 18, 19, 20 et 21.

Chez la première patiente étudiée (Figure 18), une jeune fille de 11 ans atteinte d'une LAL-B *de novo*, la cytogénétique standard révèle un remaniement complexe impliquant les chromosomes 9 et 14 (Figure 18A). Par FISH avec le panel LAL-B, on a d'abord détecté un réarrangement complexe du gène *IGH* en 14q32.3 (Figure 18C), une délétion des deux allèles du gène *p16* (9p21) et une délétion d'un allèle du gène *PAX5* (9p13). Afin d'éliminer la présence du gène de fusion *c-MYC-IGH* issu de la translocation t(8;14)(q24;q32) (spécifique au lymphome de Burkitt ou aux LAL L3 de type Burkitt, une entité distincte des autres LAL-B L1 ou L2) (43), nous avons utilisé la sonde de fusion *IGH-C-MYC* (Vysis), qui a confirmé l'absence du gène de fusion (résultats non montrés). Par FISH avec une peinture spécifique au chromosome 9 hybridée avec la sonde breakapart d'*IGH*, nous avons confirmé la présence de la translocation t(9;14)(p11-12;q32.3), ce qui

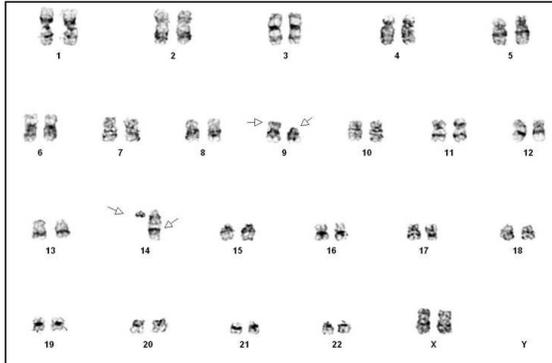
concorde avec les résultats du caryotype. Cette translocation t(9;14) implique donc le gène *IGH* sur le chromosome 14, mais le gène en 9p11-12 reste à identifier.

Tableau XVI. Caractérisation de cinq cas d'anomalies chromosomiques rares et identification des gènes impliqués par FISH avec des BACs.

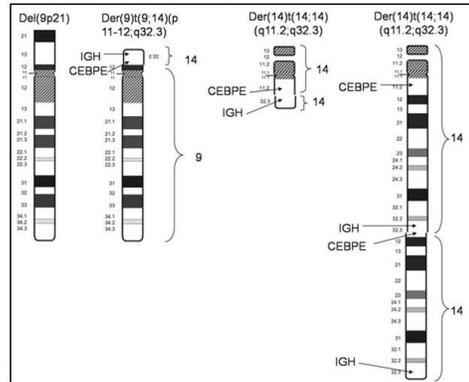
# Cas	Type de leucémie	Âge	Anomalies détectées au caryotype	Anomalies détectées par FISH (panel)	Gènes identifiés
1	LAL-B <i>de novo</i>	11 ans	46,XX,del(9)(p21),der(9)t(9;?14)(p11-12;q32),t(14;14)(q11;q32)[24]/46,XX[1]	Réarrangement <i>IGH</i> et délétion biallélique <i>p16</i> (80%), délétion monoallélique <i>PAX5</i> (71%)	<i>IGH</i> (14q32) et <i>CEBPE</i> (14q11.2)
2	LAM M5 <i>de novo</i>	6 mois	47,XX,+X,-6,der(10)t(10;11)(p12;q23)inv(11)(q13q23),der(11)t(10;11)(p1?2;q12),-14,der(21)t(10;21)(q24;q22?.3)[cp27]	Réarrangement <i>MLL</i> (90%)	<i>MLL</i> (11q23) et <i>AF10/MLLT10</i> (10p12.31)
3	LAM M5 <i>de novo</i>	16 ans	48,XX,t(6;11)(q27;q23),+der(6)(t(6;11)x2[26]	Réarrangement <i>MLL</i> (100%)	<i>MLL</i> (11q23) et <i>AF6/MLLT4</i> (6q27)
4	LAL pré-B <i>de novo</i>	1 an	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[2]/46,XX[16]	Réarrangement <i>MLL</i> (50%)	<i>MLL</i> (11q23) et <i>ENL/MLLT1</i> (19p13.3)
5	LAM M1 <i>de novo</i>	5 ans	46,XX,t(12;13)(p13;q1?)[10]/46,XX[1]	Réarrangement <i>ETV6</i> (80%)	<i>ETV6</i> (12p13) et <i>FOXO1/FKHR</i> (13q14.11)

Aussi, les deux chromosomes 14 anormaux observés au caryotype (Figure 18A) et par FISH avec la sonde *IGH* (Figure 18C) suggèrent la présence d'une translocation t(14;14), c'est-à-dire entre les deux chromosomes 14 homologues. Dans la littérature, une translocation rare t(14;14) impliquant les gènes *IGH* et *CEBPE* a déjà été décrite dans des cas de LAL-B (64, 140-142). Pour vérifier la présence d'un réarrangement du gène *CEBPE* en 14q11.2, nous avons utilisé des BACs couvrant ce gène (Figure 18D). Par FISH avec ces BACs, nous avons montré un réarrangement du gène *CEBPE*. Le profil d'hybridation est d'ailleurs similaire à celui de la sonde *IGH* (Figure 18C) : séparation des signaux entre les deux chromosomes 14 homologues [t(14;14)] et la partie 5' télomérique de la sonde est présente sur le dérivé 9 [t(9;14)]. La présence des réarrangements des gènes *IGH* en 14q32.3 et de *CEBPE* en 14q11.2 suggère une fusion *CEBPE-IGH* issue de la translocation t(14;14)(q32.2;q11.2). La Figure 18B illustre et résume de façon schématique les anomalies chromosomiques, les points de cassures et les gènes impliqués dans ces remaniements complexes. Les deux translocations t(9;14) et t(14;14) détectées chez cette patiente confirment donc le diagnostic de LAL-B *de novo*, ce qui concorde avec l'immunophénotype.

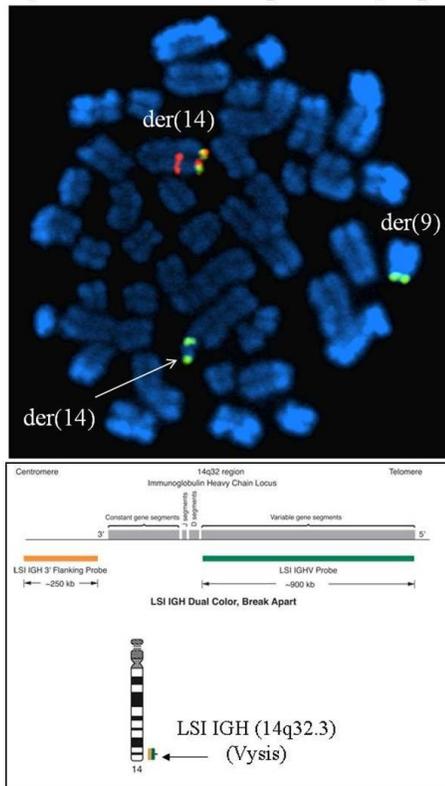
A) Caryotype



B) Idéogramme illustrant les chromosomes 9 et 14 anormaux



C) FISH Sonde breakapart *IGH* (14q32.3)



D) FISH BACs gène *CEBPE* (14q11.2)

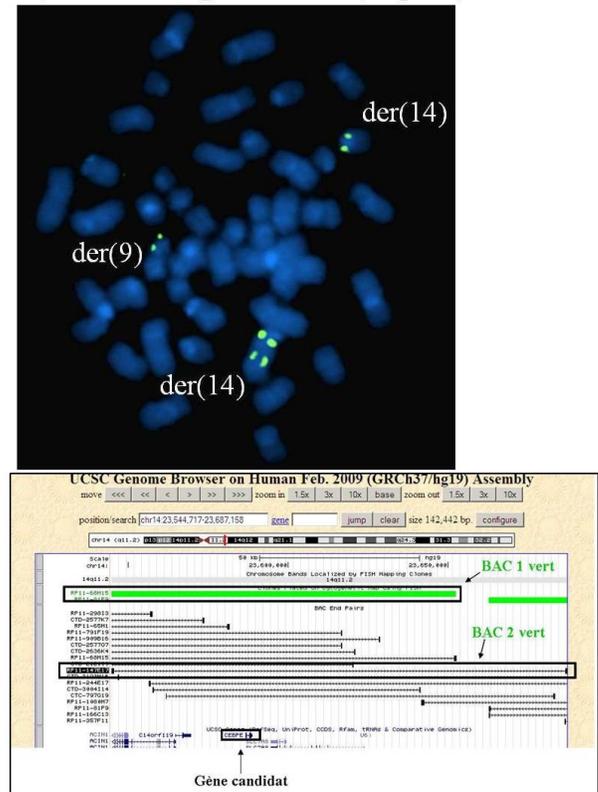


Figure 18. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une LAL-B *de novo* avec une translocation complexe impliquant les chromosomes 9 et 14 chez la patiente 1. A. Caryotype montrant une délétion du chromosome 9 [del(9)(p21)], une translocation

t(9;14)(p11-p12;q32) et une translocation entre les deux chromosomes 14 homologues [t(14;14)(q11;q32)]. Ces anomalies ont été observées dans 24 mitoses sur 25 analysées. B. Idéogramme illustrant les chromosomes 9 et 14 anormaux. C. FISH avec la sonde *IGH* (14q32.3) breakapart de Vysis (Abbott Molecular Inc.) montrant un réarrangement du gène *IGH* (observé dans 80% des cellules analysées). Cette photo montre que la partie 5' télomérique de la sonde (verte) est présente sur le dérivé 9 et le dérivé 14, alors que la partie 3' centromérique (rouge) est sur le deuxième dérivé 14. D. FISH avec les BACs RP11-147E17 et RP11-68M15 couvrant le gène *CEBPE* en 14q11.2, montrant un réarrangement du gène. La présence des réarrangements des gènes *IGH* et *CEBPE* ont permis de préciser les points de cassure de la translocation t(14;14)(q11.2;q32.3).

Les trois cas suivants que nous avons caractérisés (cas 2, 3 et 4 dans le Tableau XVI) ont en commun un réarrangement du gène *MLL* en 11q23. Les translocations impliquant *MLL* sont généralement associées à un pronostic défavorable (16, 71, 86), mais des études récentes montrent que le pronostic peut être modulé en fonction du gène partenaire de *MLL* (32, 69, 111). Par conséquent, nous avons identifié le gène partenaire de *MLL* dans trois translocations rares dans lesquelles la RT-PCR avait montré l'absence des gènes de fusion classiques *MLL-AF4* ou *MLL-AF9*. Les résultats sont présentés dans les Figures 19 et 20.

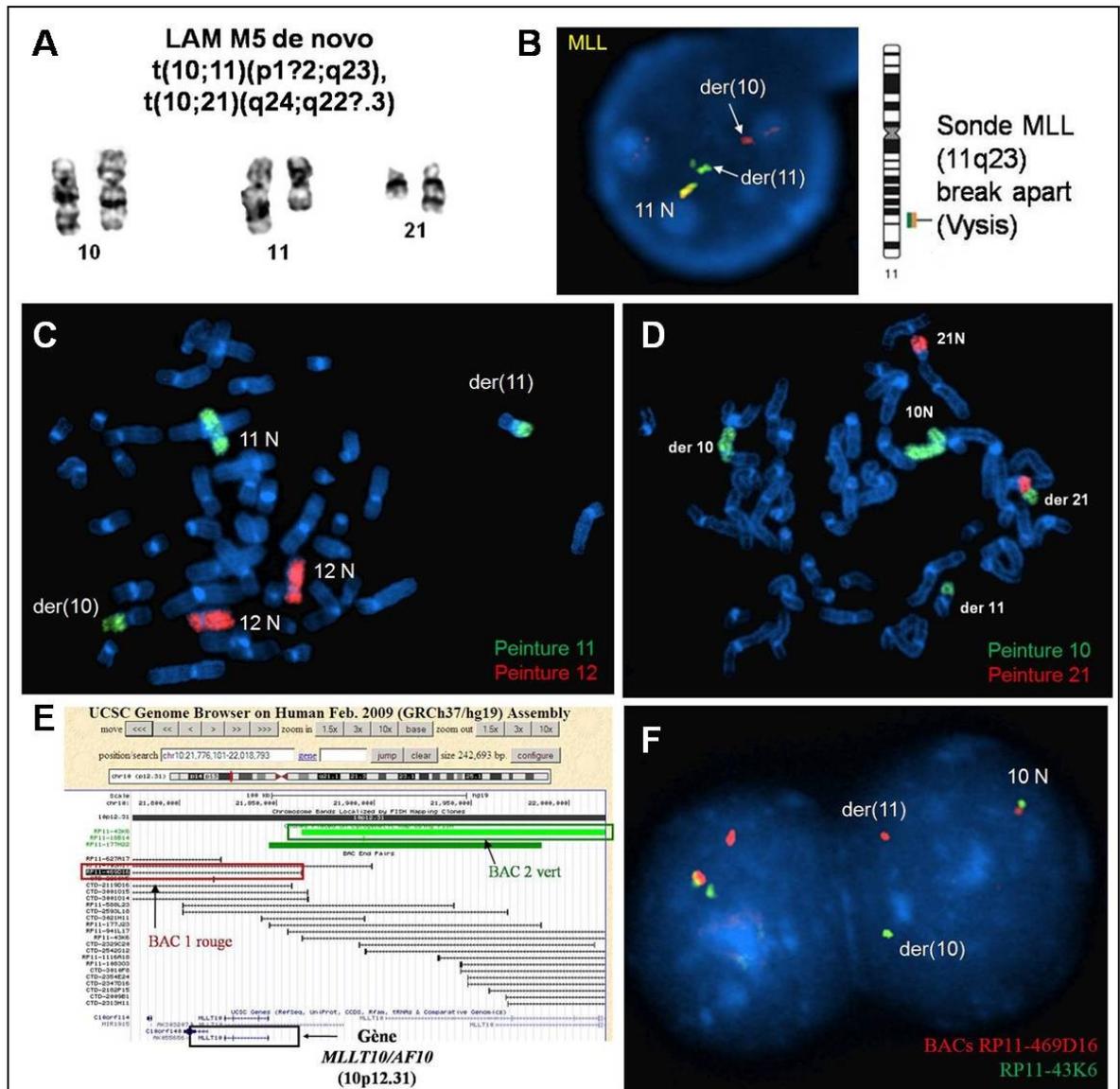


Figure 19. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une LAM M5 *de novo* avec une translocation complexe impliquant les chromosomes 10, 11 et 21 chez la patiente 2. A) Caryotype partiel montrant les chromosomes 10, 11 et 21 anormaux. B) FISH avec la sonde *MLL* breakapart (Vysis, Abbott Molecular Inc.) montrant un réarrangement du gène *MLL* en 11q23. Ce réarrangement a été observé dans 90% des cellules analysées. C) FISH sur chromosomes avec des peintures spécifiques aux chromosomes 11 (en vert) et 12 (en

rouge). Cette mitose montre les deux chromosomes 12 normaux, un chromosome 11 normal et une translocation entre les chromosome 10 et 11 (du matériel génétique du chromosome 11 est présent sur le dérivé 10). D) FISH sur chromosomes avec des peintures spécifiques aux chromosomes 10 (en vert) et 21 (en rouge). Du matériel du chromosome 10 est présent sur le chromosome 10 normal, sur le dérivé 10 (chromosome 10 anormal), sur le dérivé 11 et sur le dérivé 21. Les hybridations avec les peintures ont donc montré l'absence de translocation t(11;12), mais la présence des translocations t(10;11) et t(10;21). E) Pour préciser le point de cassure sur le chromosome 10, des BACs ont été sélectionnés de part et d'autre du gène candidat *MLLT10/AF10* (10p12.31): le BAC RP11-43K6 (en vert) et le BAC RP11-469D16 (en rouge). F) Un réarrangement du gène *AF10* a été observé dans 90% des cellules analysées.

Légende N: normal, der: chromosome dérivé anormal

Chez la patiente 2 (Figure 19), un bébé de six mois atteint d'une LAM M5 *de novo*, un réarrangement de *MLL* (11q23) a été détecté dans 90% des cellules analysées par FISH (Figure 19B). Au caryotype, on observe un remaniement complexe impliquant les chromosomes 10, 11 et 21 dans toutes les mitoses analysées (27/27) (Figure 19A). Par FISH avec des peintures spécifiques à ces chromosomes, on a montré la présence des translocations t(10;11) et t(10;21) (Figures 19C et 19D). Dans la littérature, la translocation t(10;11)(p12.31;q23) générant le gène de fusion *MLL-AF10/MLLT10* est rare, mais récurrente dans les LAM pédiatriques. Elle est retrouvée dans environ 13% des cas de LAM avec un réarrangement de *MLL* et est associée à un pronostic défavorable (32). Nous avons donc choisi des BACs spécifiques au gène *AF10* en 10p12.31 (Figure 19) et l'hybridation a montré un réarrangement de ce gène (Figure 19F). Les réarrangements de *MLL* et de *AF10* suggèrent la présence du gène de fusion *MLL-AF10* issu de la

translocation $t(10;11)(p12.31;q23)$. Toutefois, les gènes impliqués dans la translocation $t(10;21)(q24;q22?.3)$ n'ont pas encore été identifiés.

Dans la Figure 20, les patientes 3 et 4 avec réarrangement de *MLL* sont présentées. La patiente 3 est une fille de 16 ans atteinte d'une LAL M5 de novo (Figure 20A, B et C). Au caryotype, on a détecté une translocation $t(6;11)(q27;q23)$, suggérant le gène *AF6/MLLT4* en 6q27 comme gène partenaire candidat de *MLL* en 11q23. Par FISH, on a observé un réarrangement du gène *MLL* dans toutes les cellules analysées (sonde breakapart de Vysis) et un réarrangement de *AF6* dans 75% des cellules analysées (BACs localisés de part et d'autre du gène *AF6* en 6q27). Ceci concorde avec les résultats obtenus au caryotype et suggère la présence du gène de fusion *MLL-AF6* issu de la translocation $t(6;11)(q27;q23)$.

Le patiente 4 est un bébé d'un an atteint d'une LAL-B *de novo* (Figure 20D, E, F et G). Un réarrangement du gène *MLL* a été observé dans 50% des cellules analysées par FISH. Une translocation $t(11;19)(q23;p13)$ a été détectée par cytogénétique standard dans deux des 18 mitoses analysées. Des BACs pour le gène *ENL* (19p13.3) ont été choisis afin de distinguer la translocation $t(11;19)(q23;p13.3)$ (gène de fusion *MLL-ENL*) de la translocation $t(11;19)(q23;p13.1)$ (gène de fusion *MLL-ELL*). Par FISH avec ces BACs, on a montré un réarrangement du gène *ENL*, suggérant la présence du gène de fusion *MLL-ENL*. Afin de le vérifier, des amorces spécifiques à ce transcrit de fusion ont été mises au point au laboratoire de biologie moléculaire du CHU Sainte-Justine. Les analyses en RT-PCR ont bien montré la présence du transcrit de fusion *MLL-ENL* généré par la translocation $t(11;19)(q23;p13.3)$, ce qui confirme les résultats obtenus au caryotype et par FISH. Ces amorces ont par la suite été utilisées pour effectuer le suivi de la maladie résiduelle par RT-PCR chez cette patiente.

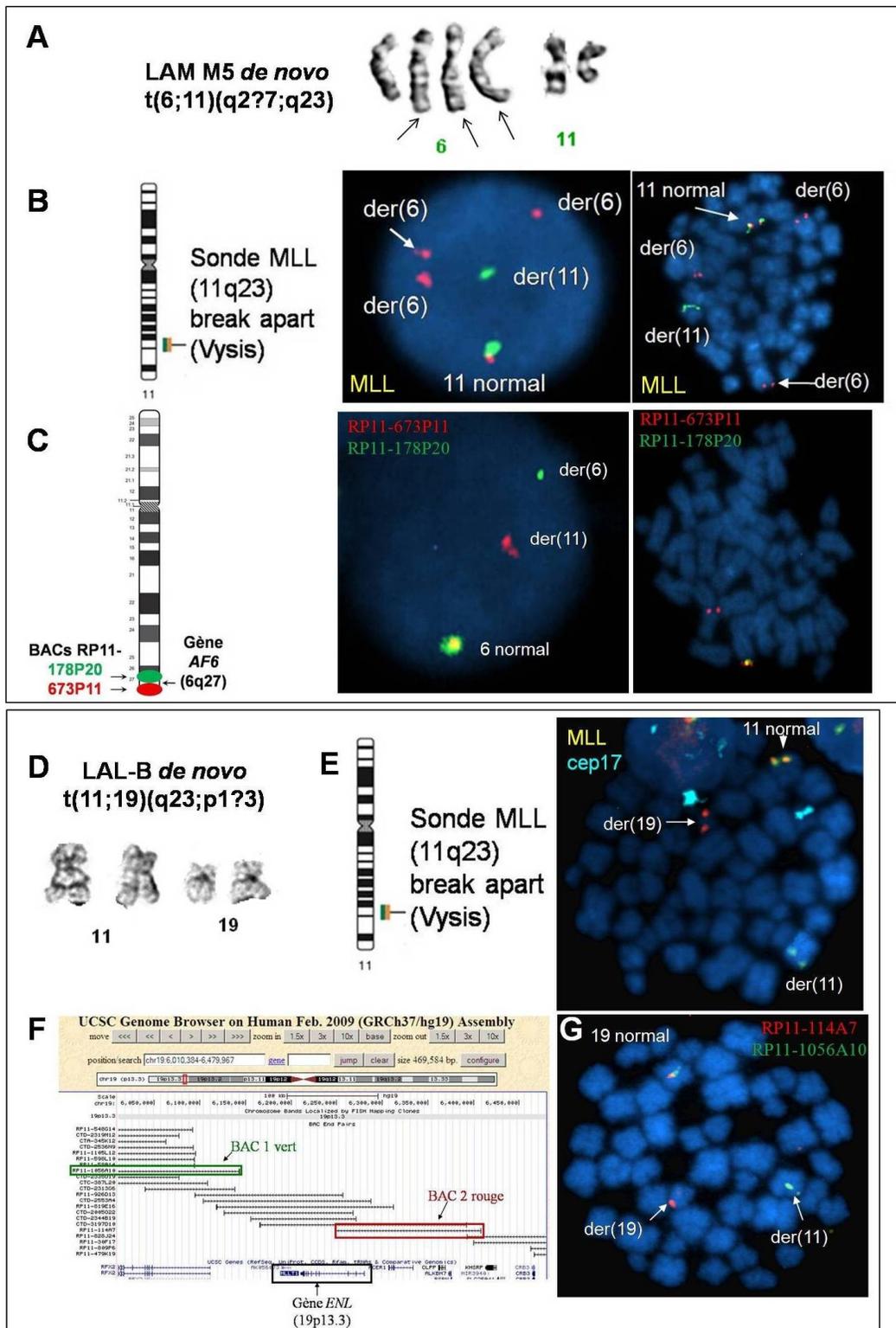


Figure 20. Caractérisation cytogénétique moléculaire de deux cas (patients 3 et 4) avec réarrangement du gène *MLL*. Chez la patiente 3 atteinte d'une LAM M5 *de novo* (A, B et C), le caryotype partiel montre une translocation t(6;11) avec deux copies supplémentaires du dérivé 6 (A). B) Par FISH, un réarrangement du gène *MLL* (11q23) a été observé dans 100% des cellules analysées. On note trois copies de la partie rouge 3' (télomérique) de la sonde *MLL*, confirmant les trois dérivés 6 observés au caryotype. C) Par FISH avec des BACs spécifiques au gène *AF6/MLLT4* (6q27), un réarrangement du gène a été observé dans 75% des cellules. Ce réarrangement est associé à une délétion de la région 3' du gène *AF6* (absence du BAC vert RP11-178P20, photo de droite). Chez la deuxième patiente atteinte d'une LAL-B *de novo* (D, E, F et G), une translocation t(11;19) a été détectée au caryotype (D). Le réarrangement du gène *MLL* a été observé par FISH dans 50% des cellules analysées (E). Le point de cassure au niveau du chromosome 19 a été précisé par FISH avec des BACs spécifiques au gène *ENL/MLLT1* en 19p13.3 (F). G) Cette mitose montre le réarrangement du gène *ENL* par la séparation des deux BACs sur le dérivé 19 (signal rouge) et sur le dérivé 11 (signal vert).

Pour le patiente 5, une translocation rare t(12;13) a été détectée au caryotype chez une fillette de cinq ans ayant reçu un diagnostic de LAM M1 *de novo* (Figure 21). L'index d'ADN est normal (1) et aucune translocation classique n'est détectée par RT-PCR. Par FISH, on observe un réarrangement du gène *ETV6* dans 80% des cellules analysées, ce qui précise le point de cassure sur le chromosome 12 en 12p13 (Figure 21B). Dans la littérature, certaines translocations t(12;13)(p13;q12.2) ont déjà été rapportées dans des cas de leucémies (64). Il s'agit des gènes de fusion *ETV6-FLT3* et *ETV6-CDX2*. Nous avons effectué une hybridation supplémentaire avec des BACs couvrant ces deux gènes candidats (*FLT3* et *CDX2* sont localisés en 13q12.2). Cependant, aucun réarrangement de *FLT3* ou de *CDX2* n'a pu être observé (Figure 21D). Afin de déterminer le gène partenaire d'*ETV6* sur le chromosome 13, nous avons fait une autre sonde dans la région 13q: *FOXO1/FKHR*.

Les réarrangements du gène *FOXO1* (13q14.11) sont récurrents dans le rhabdomyosarcome alvéolaire [translocation t(1;13) et t(2;13)] (16), une tumeur solide, mais n'ont jamais été décrits dans les LAM pédiatriques. Or, dans notre cas de LAM M1, la FISH avec la sonde *FOXO1* breakapart a bien montré un réarrangement du gène dans 59% des cellules analysées (Figure 21C).

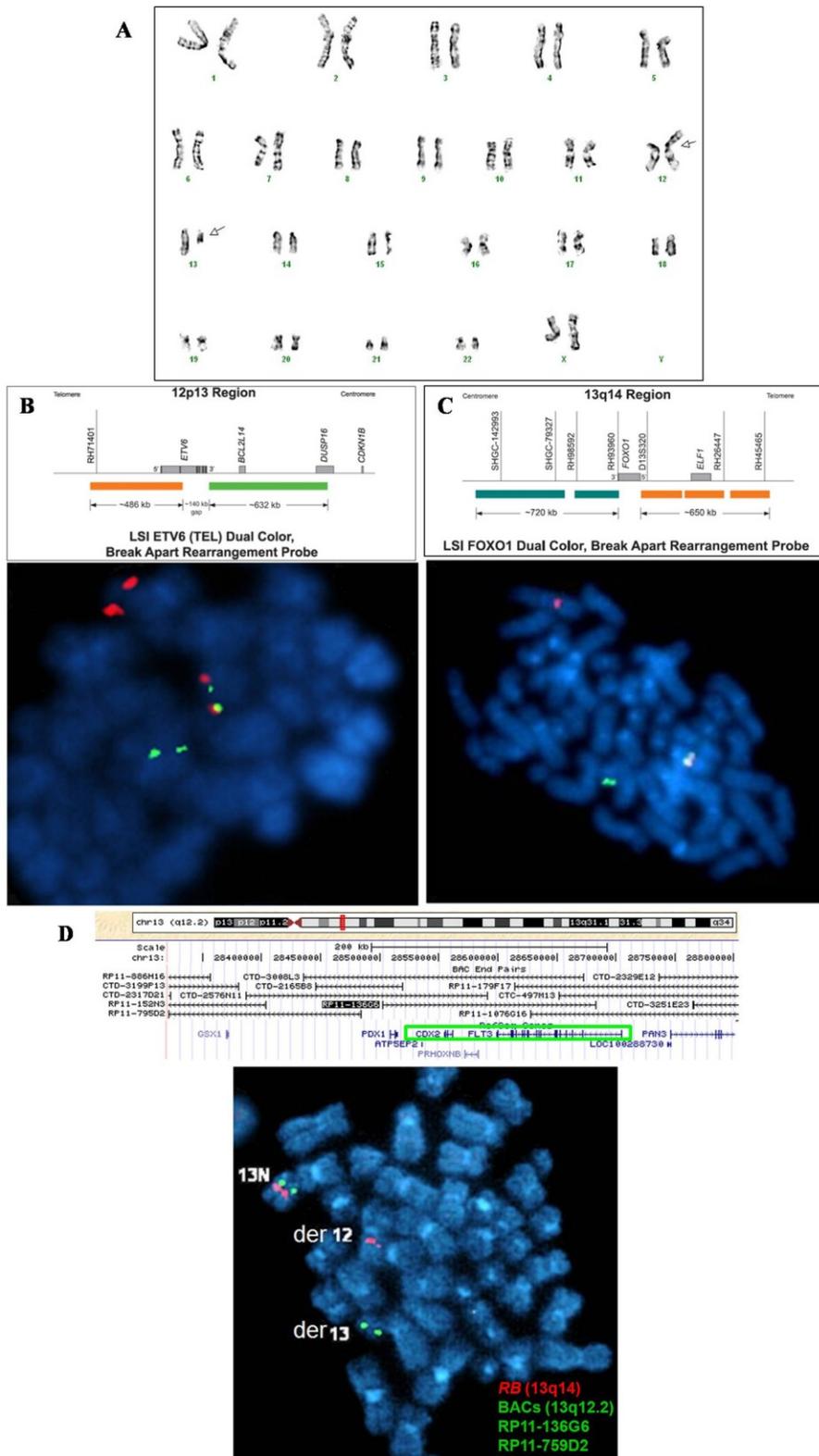


Figure 21. Caractérisation cytogénétique moléculaire d'une translocation rare t(12;13) chez une patiente atteinte d'une LAM M1 *de novo*. A) Caryotype montrant la translocation t(12;13)(p13;q1?). Cette translocation a été observée dans 10 des 11 mitoses analysées au caryotype. B) FISH avec la sonde *ETV6* breakapart (Vysis, Abbott Molecular Inc.) montrant un réarrangement du gène *ETV6* (12p13) (observé dans 80% des cellules analysées par FISH). C) FISH avec la sonde *FOXO1/FKHR* (13q14.11) breakapart (Vysis, Abbott Molecular Inc.), illustrant le réarrangement du gène. D) FISH avec des BACs (en vert) couvrant les gènes candidats *FLT3* et *CDX2* en 13q12.2 et une sonde contrôle en 13q14 (en rouge). Cette photo montre l'absence de réarrangement des gènes *FLT3* et *CDX2*.

3.5.2 Quatre nouvelles translocations identifiées dans les LAL-B

Tableau XVII. Identification de nouvelles translocations chromosomiques dans quatre cas de LAL-B.

# Cas	Type de leucémie	Âge	Anomalies détectées au caryotype	Anomalies détectées par FISH (panel)	Gènes candidats testés
1	LAL-B <i>de novo</i>	6 ans	46,XY,t(2;14)(p16;q32)[14]/46,XY[11]	Aucune (panel LAL-B normal)	<i>IGH</i> : normal <i>BCL11A</i> : normal
2	LAL-B <i>de novo</i>	18 ans	47,XY,+X,t(12;17)(p13;q12),+19[23]/46,XY[2]	Trisomie 19 (76%)	<i>ETV6</i> : normal
3	LAL-B <i>de novo</i>	6 ans	45,XY,?der(1)?t(1;7)(q?;q?),t(9;12)(p?11;p12),-9,inc[6]/46,XY[19]	Monosomie 7, délétion <i>p16</i> , délétion <i>ETV6</i> (80%)	<i>PAX5</i> : réarrangement (56%)
4	LAL-B rechute post-GMO	18 ans	46,X,t(X;1)(p22;p3?2),t(8;20)(q?21;q11)[11]/46,XX[14]	Aucune (panel LAL-B normal)	-

Légende. GMO:greffe de moelle osseuse

Dans le Tableau XVII sont présentées quatre nouvelles translocations chromosomiques que nous avons identifiées dans notre cohorte de LAL-B. Les points de cassures exacts et les gènes impliqués non pas encore été précisés, mais nos résultats suggèrent que ces anomalies n'ont jamais été décrites dans la littérature. En effet, les gènes retrouvés dans des anomalies semblables connues dans la littérature ne sont pas impliqués dans nos cas.

Par exemple, nous avons trouvé une translocation $t(2;14)(p16;q32)$ chez un garçon de six ans atteint d'une LAL-B de novo (Tableau XVII, cas 1 et Figure 22). Par FISH, toutes les sondes analysées dans le panel LAL-B sont normales. L'index d'ADN est normal (1) et aucune translocation classique n'est détectée par RT-PCR. Nous avons donc précisé les points de cassure par FISH, d'une part pour déterminer les gènes impliqués et d'autre part, afin de trouver une sonde (anormale au diagnostic) pour effectuer le suivi de la maladie résiduelle. Dans la littérature, une translocation $t(2;14)(p13-p16;q32)$ impliquant les gènes *IGH* en 14q32 et *BCL11A* en 2p16.1 est décrite dans la leucémie lymphocytaire chronique (LLC) et dans quelques rares cas de LAL-B (64). Or, dans notre cas, la sonde *IGH* breakapart (Vysis) était normale dans toutes les cellules analysées par FISH (absence de réarrangement du gène *IGH*) (Figure 22B). Avec des BACs spécifiques au gène *BCL11A*, nous avons aussi montré l'absence de réarrangement de ce gène (Figure 22C).

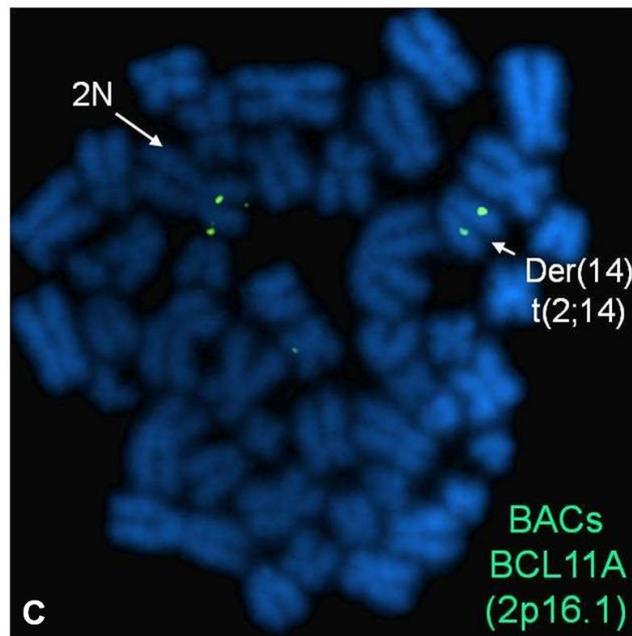
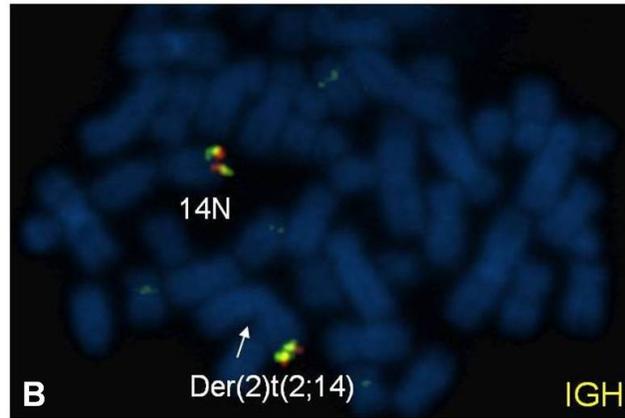
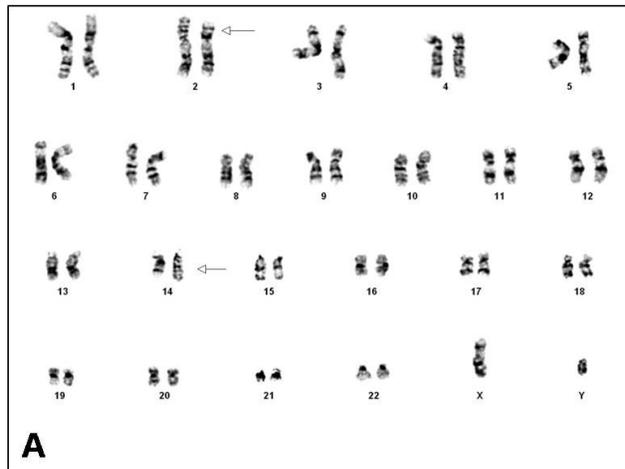


Figure 22. Nouvelle translocation t(2;14)(p16;q32) n'impliquant pas les gènes classiques *IGH* et *BCL11A* dans une LAL-B *de novo*. A) Caryotype montrant la translocation t(2;14)(p16;q32). Cette anomalie a été observée dans 14 des 25 mitoses analysées. B) FISH avec la sonde *IGH* breakapart (Vysis), montrant l'absence de réarrangement du gène *IGH* en 14q32.3. Une copie du gène est localisée sur le chromosome 14 normal et la deuxième copie est présente sur le dérivé 2 issu de la t(2;14), mais n'est pas réarrangée (deux signaux jaunes). Le point de cassure sur le chromosome 14 est donc plus centromérique que 14q32.3. C) FISH avec les BACs RP11-416L21, RP11-1023M9 et 606L8 (illustrés en vert) couvrant le gène *BCL11A* en 2p16.1. Cette photo montre l'absence de réarrangement du gène *BCL11A*. Les deux copies du gène sont présentes (deux signaux verts) : une copie sur le chromosome 2 normal et l'autre copie sur le dérivé 14 issu de la translocation t(2;14). Ceci montre que le point de cassure sur le chromosome 2 est plus centromérique que ces BACs en 2p16.1.

Dans le deuxième cas, nous avons identifié une nouvelle translocation t(12;17)(p13;q12) chez un jeune homme de 18 ans ayant reçu un diagnostic de LAL-B *de novo* (Tableau XVII, cas 2). Cette translocation, ainsi que des trisomies des chromosomes 19 et X, ont été observées dans 23 des 25 mitoses analysées au caryotype. La seule anomalie détectée par FISH avec le panel LAL-B est une trisomie 19, ce qui concorde avec le caryotype. La translocation t(12;17) n'implique pas le gène *ETV6* (12p13.2) puisque la sonde *ETV6* breakapart (une des sondes analysées dans le panel LAL-B) est normale. L'hybridation avec cette sonde a toutefois montré que le point de cassure sur le chromosome 12 est plus télomérique que le gène *ETV6* en 12p13.2, puisque *ETV6* est présent sur le dérivé 12 (et absence de signal sur le dérivé 17). Par FISH avec des BACs, nous avons précisé que le point de cassure est localisé entre les BACs RP11-101F21 (12p13.31) et RP11-367L22 (12p13.31), correspondant à une distance d'environ 379 kb (selon l'UCSC Genome Browser Hg19). Sur le chromosome 17, le point de cassure est

situé entre les BACs RP11-15P14 et RP11-229A22 en 17q12, correspondant à une distance d'environ 334 kb (selon l'UCSC Genome Browser Hg19).

Dans le cas 3, un garçon de six ans atteint d'une LAL-B *de novo*, plusieurs anomalies ont été détectées par FISH : une monosomie 7, une délétion du gène *p16* (9p21) et une délétion du gène *ETV6* (12p13). Au caryotype, on a retrouvée une translocation t(9;12)(p?11;p12). Le gène *ETV6* n'est pas impliqué dans cette translocation (on a observé une délétion d'un allèle du gène, mais aucun réarrangement). Sur le chromosome 9, le gène impliqué a été identifié : il s'agit du gène *PAX5* en 9p13. On a observé un réarrangement de *PAX5* avec une délétion de la partie 3' (télomérique) de la sonde dans 14 des 25 mitoses analysées par FISH (56%).

Chez la dernière patiente (cas 4), nous avons observé une anomalie chromosomique rare lors de sa rechute. Ayant reçu son diagnostic de LAL-B dans un hôpital extérieur, les résultats cytogénétiques sur l'échantillon *de novo* ne sont pas disponibles (inconnus). Cette patiente est venue à Sainte-Justine pour recevoir sa greffe de moelle osseuse en 2007, puis a fait une rechute en 2009 (elle était âgée de 18 ans lors de sa rechute). Au caryotype, deux translocations rares ont été détectées au sein du même clone : une translocation t(X;1)(p22;p3?2) et une t(8;20)(q?21;q11). Par FISH, le panel LAL-B est normal (aucune anomalie n'a été détectée). Aucune translocation n'a été détectée par RT-PCR. Nous avons donc caractérisé les points de cassure de ces translocations afin de trouver une sonde adéquate pour effectuer le suivi de la maladie résiduelle par FISH. Les résultats préliminaires des analyses par FISH avec des BACs montrent que la translocation t(8;20) implique la bande 20q11.2 et le point de cassure sur le chromosome 8 est plus télomérique que 8q13.1 (BAC RP11-707M3). Sur le chromosome X, le point de cassure a une localisation plus télomérique que Xp11.p23 (BAC RP11-1137J13). Des études supplémentaires permettront de déterminer les points de cassure exacts sur les chromosomes X, 1, 8 et 20. Pour l'instant, le suivi de la maladie résiduelle s'effectue par cytogénétique standard.

4. Discussion

4.1 Optimisation de la détection des anomalies cytogénétiques et valeur pronostique des anomalies primaires

Grâce à notre stratégie, qui consiste à utiliser différentes techniques génétiques concomitantes (caryotype en bande GTG, RT-PCR, index d'ADN et panels de FISH), nous avons augmenté les taux de détection des anomalies chromosomiques dans 253 leucémies aiguës pédiatriques incluant 186 LAL-B, 27 LAL-T et 40 LAM (Tableau VII, page 65). Afin d'optimiser les fréquences d'anomalies dans les différents types de leucémies pédiatriques, nous avons amélioré différents paramètres des techniques et des analyses cytogénétiques du CHU Sainte-Justine que nous discuterons dans les sections qui suivent: l'optimisation des conditions de culture des cellules médullaires (section 4.2), la mise au point et optimisation des panels de la FISH (section 4.3), le développement d'une stratégie d'analyse génomique globale pour détecter les anomalies cytogénétiques primaires (section 4.4) et secondaires (section 4.6) et la mise au point d'une méthode efficace pour caractériser les anomalies rares par FISH avec des BACs (section 4.5). Nous discuterons ensuite de la fréquence et de la valeur pronostique des anomalies secondaires (section 4.6) et de l'intégration du test des micropuces en hématologie clinique (section 4.7).

Dans le Tableau XVIII, les fréquences d'anomalies chromosomiques obtenues dans notre étude sont comparées à celles rapportées dans la littérature dans de larges cohortes de leucémies aiguës pédiatriques. Il est important de spécifier que les fréquences d'anomalies chromosomiques détectées varient en fonction des différentes techniques génétiques utilisées. Les études ayant analysé les échantillons uniquement par cytogénétique standard ont des taux de détection nettement plus faibles (environ 60% dans les LAL-B) (143), elles

ont donc été exclues de notre tableau comparatif. Les groupes présentés dans le Tableau XVIII ont utilisé des techniques similaires à notre étude (FISH et/ou caryotype et/ou RT-PCR et/ou index d'ADN) et ont étudié des cohortes de leucémies pédiatriques (moins de 18 ans); l'âge étant un autre facteur pouvant moduler la fréquence d'anomalies génomiques (144). Nos résultats montrent que nous avons réussi à optimiser les taux de détection des anomalies chromosomiques dans les trois types de leucémies (Figure 12 et Tableau XVIII). En effet, les fréquences d'anomalies détectées sont supérieures à celles connues dans la littérature, autant pour les LAL-B, les LAL-T que pour les LAM. L'objectif principal de notre projet, qui consiste à mettre au point une stratégie pour optimiser la détection des anomalies génomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques, est donc atteint.

Tableau XVIII. Comparaison des taux de détection des anomalies chromosomiques dans notre étude et dans la littérature.

Types de leucémie	Nos résultats : fréquence d'anomalies	Littérature : fréquence d'anomalies	Références
LAL-B pédiatriques	93,5% (186 cas)	75-85%	Moorman et al, 2010 (1725 cas); Harrison et al, 2005 (2367 cas); Pui et al, 2011; Kwon et al, 2010; (7, 80, 145, 146)
LAL-T pédiatriques	66,7% (27 cas)	50-60%	Karrman et al, 2009 (285 cas); Hagemeijer 2010 (66, 106)
LAM pédiatriques	90% (40 cas)	70-75%	Harrison et al, 2010 (729 cas); von Neuhoff et al, 2010 (454 cas) (63, 110)

Dans les LAM pédiatriques, 25% des cas présentent des anomalies chromosomiques à pronostic favorable telles que les fusions *PML-RARA*, *RUNX1-ETO* et *CBFB-MYH11* (Figure 12). Les leucémies myéloïdes à pronostic défavorable sont présentes dans 47,5% des cas (fusions *MLL-AF6* et *MLL-AF10*, caryotype complexe, délétion 5q et monosomie 7/délétion 7q). Les anomalies associées à un risque intermédiaire, dont la trisomie 8, la fusion *MLL-AF9*, le caryotype et la FISH normaux et les autres anomalies non classifiées favorables ou défavorables, sont retrouvées dans 27,5% des LAM. Nos résultats obtenus concordent avec les proportions décrites dans la littérature (7, 147).

Cette stratification du risque en fonction des anomalies cytogénétiques est cliniquement importante puisque la survie globale est très différente dans chacun des groupes (7, 43, 147, 148). Dans la littérature, l'OS à 5 ans des LAM pédiatriques est estimée à 90% chez les patients avec la fusion *PML-RARA*, 80% pour les autres anomalies à pronostic favorable et de 20% à 40% chez les patients présentant des anomalies à pronostic défavorable (7). Dans notre étude, parmi nos six patients atteints de LAM qui sont décédés (Tableau XIII), la majorité présentait une anomalie chromosomique à pronostic défavorable : trois cas avaient une monosomie 7, deux cas un réarrangement de *MLL* et un cas normal présentait aucune anomalie détectée au caryotype et par le panel de FISH. Ainsi, la survie globale à 7 ans est de 25% dans les LAM avec une monosomie 7 (1/4 est vivant), 81,8% dans les LAM avec un réarrangement de *MLL* (9/11 sont vivants) et de 75% dans les LAM avec un caryotype normal (3/4 sont vivants). Dans les autres sous groupes (fusions *PML-RARA*, *RUNX1-ETO*, *CBFB-MYH11* et caryotype complexe), tous les patients sont vivants en août 2012 (Tableau XIII). Nous n'avons pas pu observer de différence significative au niveau de la survie dans chacun des groupes, possiblement car le suivi n'est pas assez long (les patients ayant reçu un diagnostic en 2010 ou 2011 ont eu un suivi de seulement un ou deux ans [jusqu'en août 2012]). Il serait donc intéressant d'évaluer l'EFS et l'OS de nos patients en 2016, afin d'avoir un suivi d'au moins 5 ans pour l'ensemble des cas.

Dans notre cohorte de LAL-B pédiatriques, la fréquence des anomalies chromosomiques à pronostic favorable est élevée, particulièrement pour les LAL hyperdiploïdies. 37% (69/186) des cas de LAL-B présentent de l'hyperdiploïdie de 50 à 65 chromosomes (Figure 12 et Tableau XV), ce qui est légèrement supérieur à la fréquence décrite dans la littérature (généralement 25%, mais elle peut augmenter jusqu'à 35% ou 40% selon le groupe d'âge des patients et les techniques utilisées) (7, 37, 43, 94, 112, 118, 149). Ceci pourrait s'expliquer par certaines caractéristiques de notre cohorte étudiée. Dans la littérature, il est connu que l'hyperdiploïdie a un pic d'incidence chez les enfants entre deux et cinq ans (37, 112). Or, parmi nos 186 cas de LAL-B, l'âge médian est de cinq ans; la moitié des patients sont donc dans le groupe d'âge dans lequel la proportion d'hyperdiploïdie est la plus élevée. Aussi, plusieurs études utilisant le caryotype comme seul test génétique sous-estiment la fréquence des LAL-B hyperdiploïdes : l'hyperdiploïdie peut être détectée par FISH interphasique dans environ 33% des cas de LAL-B avec un caryotype apparemment normal et dans environ 60% des cas avec un échec du caryotype (37, 94).

Globalement, dans l'ensemble des LAL-B étudiés, 57% présentent des anomalies chromosomiques à bon pronostic (fusion *ETV6-RUNX1*, hyperdiploïdie), 21% ont des anomalies à pronostic défavorable (fusion *BCR-ABL1*, réarrangement du gène *MLL*, clone hypodiploïde, amplification du gène *RUNX1*, caryotype complexe) et 22% ont des anomalies à risque intermédiaire ou controversé (délétion du gène *p16*, fusion *TCF3-PBX1*, aucune anomalie cytogénétique détectée, autres anomalies non classifiées favorables ou défavorables) (7, 112, 144, 150).

4.2 Optimisation des conditions de culture des cellules médullaires

Dans la littérature, il est recommandé d'effectuer une technique directe, en plus des cultures de 24 et 48 heures, pour les LAL pédiatriques *de novo* (135, 136, 151). L'intégration de cette technique permet de réduire le taux d'échec (absence ou nombre insuffisant de mitoses) et d'éviter la sélection des cellules normales ou de certains clones (avantage prolifératif) en raison de la culture *in vitro* des cellules (16, 114, 115). Dans notre étude, nous avons déterminé les conditions de culture optimales à partir de 22 cas de leucémies *de novo* (18 LAL-B et 4 LAM) (section 3.1, page 83 et Tableau XI, page 84).

Parmi ces 22 cas, aucun échec de la cytogénétique standard n'a été noté (résultats non montrés). Dans l'ensemble des 186 LAL-B étudiés, on peut noter que le nombre insuffisant de mitoses analysables au caryotype est particulièrement fréquent parmi le groupe des LAL-B avec la translocation $t(12;21)(p13;q22)$ (résultats non montrés), ce qui concorde avec ce qui est décrit dans la littérature (135). Cette translocation est d'ailleurs cryptique au caryotype : parmi les cas dont l'analyse du caryotype est possible, les quelques métaphases détectées sont généralement normales (64, 98, 112).

Parmi les huit cas de LAL-B avec lesquels la technique directe a été utilisée, cette méthode a eu une importance clinique notable chez trois patients. D'abord, chez un patient (cas 6), l'analyse des métaphases de la technique directe a permis la détection d'une translocation $t(9;22)(q34;q11)$ [dans 6 des 15 mitoses analysées], alors que les mitoses provenant de la technique 24 heures/colcémide toute la nuit étaient toutes normales (11/11) (Tableau XI). Ceci pourrait suggérer que la culture *in vitro* des cellules de la moelle osseuse a favorisé la prolifération des cellules normales, au détriment de la croissance du clone avec la translocation $t(9;22)(q34;q11)$. La présence du gène de fusion *BCR-ABL1* issu de cette translocation $t(9;22)$ a été confirmé par FISH et le patient a pu bénéficier de la

thérapie ciblée au STI-571 (Gleevec®). L'utilisation de la technique directe chez ce patient a donc permis d'établir rapidement le diagnostic, ce qui est essentiel pour donner un traitement approprié, le STI-571 étant un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant spécifiquement le gène de fusion issu de cette translocation (55). Dans un deuxième patient (cas 1), un clone anormal hyperdiploïde a été détecté dans la majorité des mitoses (24/25) provenant de la technique directe, mais dans seulement quelques mitoses (5/26) de la culture 48 heures. Par FISH interphasique, l'hyperdiploïdie a été observée dans 75% des cellules analysées; la technique directe semble donc plus représentative du clone anormal hyperdiploïde chez ce patient. Pour le cas 8, une translocation $t(14;14)(q32;q11)$ et un isochromosome 7q ont été détectés dans 14/17 mitoses analysées, ce qui concorde avec les résultats obtenus par FISH (clone anormal dans 80% des cellules). Malgré le faible nombre de patients étudiés, ces résultats suggèrent que la technique directe est efficace pour détecter adéquatement le clone anormal dans les LAL-B pédiatriques et s'avère donc pertinente pour améliorer la cytogénétique standard. Afin de suivre les recommandations de la littérature (59, 135, 136), cette méthode a donc été intégrée au laboratoire de cytogénétique clinique du CHU Saint-Justine depuis janvier 2012 pour les LAL-B *de novo*. La FISH interphasique (panel LAL-B *de novo*) est aussi effectuée avec les lames provenant de cette technique lorsque cela est possible.

Concernant les trois autres conditions de culture (24 heures/ 3 heures de colcémide, 24 heures/ colcémide toute la nuit et 48 heures/ 3 heures de colcémide), nos résultats suggèrent que dans la majorité des cas, la culture des cellules médullaires durant 24 heures avec trois heures de colcémide est la plus efficace pour détecter les anomalies chromosomiques (pour 12 patients sur 22; 54,5%) (résultats non montrés). Il est recommandé d'effectuer toutes ces techniques pour les LAL *de novo*, mais de prioriser l'analyse de la culture de 24 heures (136). À la lumière de nos résultats, nous avons choisi, au CHU Sainte-Justine, d'analyser en priorité la culture de 24 heures/3 heures et la technique directe pour les LAL *de novo*. Les autres cultures (48 heures et 24

heures/colcémide toute la nuit) sont tout de même effectuées et analysées au besoin, si le nombre ou la qualité des métaphases sont insuffisants.

4.3 Mise au point et optimisation des panels de FISH

En cytogénétique hématologique, la FISH constitue un outil essentiel pour établir le diagnostic et le pronostic des leucémies (98, 108, 115, 117). Cette technique comporte plusieurs avantages, notamment la détection d'anomalies cryptiques difficilement visibles au caryotype, de l'hétérogénéité clonale et des noyaux interphasiques (cellules qui ne sont pas en division cellulaire) (Tableau VI, page 58) (16, 115, 117). Pour les LAL et les LAM pédiatriques *de novo*, l'utilisation de panels de FISH permet de cibler les principales anomalies chromosomiques récurrentes (les plus fréquentes) et ayant une valeur diagnostique et/ou pronostique importante. Au CHU Sainte-Justine, les premiers panels ont été implantés en 2005. Ils ont par la suite été améliorés et les panels actuellement utilisés pour les LAL-B, les LAL-T et les LAM *de novo* sont présentés dans la Figure 9 (page 71). Le choix des sondes repose sur plusieurs critères tels que la localisation chromosomique et le point de cassure moléculaire de la sonde, la taille de la sonde et enfin la nature de la sonde (les sondes alphasatellites ciblent les séquences α satellites des centromères des chromosomes, les sondes à séquence unique sont spécifiques à un locus chromosomique précis, les sondes breakapart permettent la détection des réarrangements chromosomiques et les sondes de fusion permettent d'observer les gènes de fusion).

4.3.1 Panel LAL-B

Dans notre cohorte de LAL-B pédiatriques, nous avons obtenu une fréquence d'anomalies chromosomiques de 93,5%, ce qui est optimal comparativement à d'autres études similaires dans la littérature dans ce type de leucémie (Tableau XVIII, page 127) (7, 80, 145, 146). Pour parvenir à ces résultats, nous avons optimisé les sondes du panel LAL-

B (Figure 9, page 71). Par exemple, pour la détection de l'hyperdiploïdie, nous avons choisi des sondes qui ciblent les chromosomes les plus fréquemment impliqués dans cette anomalie numérique récurrente chez les LAL-B pédiatriques (les chromosomes 4, 6, 10, 14 et 21) (16, 112) et qui couvrent la triple trisomie associée à un excellent pronostic (trisomies simultanées des chromosomes 4, 10 et 17) (79, 112). Le panel LAL-B permet également la détection des translocations chromosomiques récurrentes dans ce type de leucémie, telles que les gènes de fusion *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, les réarrangements des gènes *MLL*, *ETV6*, *RUNX1*, *IGH* ainsi que des anomalies chromosomiques plus rares. Ce panel nous permet notamment de détecter les réarrangements des gènes *ETV6* et *RUNX1* avec la sonde breakapart d'*ETV6* et la sonde *ETO/RUNX1*. Nous distinguons ensuite les réarrangements de *RUNX1* (21q22.3) de la trisomie 21 avec une 3^e sonde, la sonde 13/21 (21q22.13-q22.2) (Figure 11B, page 88). La FISH, contrairement à la RT-PCR, permet la détection des délétions associées aux réarrangements primaires (par exemple la délétion du gène *ETV6* comme seule anomalie, Figure 12A) ou aux réarrangements secondaires tels qu'une délétion au niveau de l'allèle non réarrangé du gène *ETV6* dans la fusion *ETV6-RUNX1* (Figure 11C). Cette stratégie permet également la détection de translocations variantes ou rares impliquant d'autres gènes partenaires. Des anomalies chromosomiques 12p et 21q n'impliquant pas les gènes *ETV6* et *RUNX1* sont décrites dans les LAL-B pédiatriques (152). Dans notre cohorte de LAL-B, notre panel de FISH, en complémentarité avec le caryotype, a permis de détecter plusieurs anomalies 12p et 21q outre la fusion *ETV6-RUNX1*, telles que l'amplification intra chromosomique du chromosome 21 (iAMP21) (dans 5% des LAL-B), la délétion du gène *ETV6* (dans 2% des LAL-B), une translocation t(12;13) sans l'implication d'*ETV6*, une délétion 21q sans l'implication de *RUNX1*, une t(15;21) au sein d'un caryotype complexe et un dérivé 21 dans un autre cas de caryotype complexe (Figure 12, page 97). La détection de l'iAMP21, dont la région commune d'amplification est d'environ 5,1 Mb et contient le gène *RUNX1*, est importante car cette anomalie est associée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de LAL-B pédiatriques (EFS à 5 ans de 26% et EFS à 10 ans de moins de 15%),

d'où l'indication d'une thérapie intensifiée (16, 90, 112, 118, 153). Concernant les autres anomalies 12p et 21q plus rares, leur valeur pronostique et les mécanismes moléculaires impliqués sont peu connus. Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi quelques cas de leucémies aiguës pédiatriques (LAL-B et LAM) présentant des anomalies chromosomiques rares et nous les avons caractérisés par FISH avec des BACs (Tableaux XVI, XVII, et Figures 18 à 22). Les résultats de ces caractérisations ont permis d'identifier les gènes impliqués dans ces translocations rares. Ces cas seront discutés dans la section 4.5.

À l'hôpital pédiatrique le *Sick Kids Hospital*, le panel LAL-B comprend aussi la sonde breakapart *c-MYC* (8q24), une sonde qui ne fait pas partie de notre panel LAL-B au CHU Sainte-Justine. Les réarrangements du gène *c-MYC* étant associés aux LAL L3 de type Burkitt [t(8;14)(q24;q32) avec la fusion *c-MYC-IGH*, t(2;8)(p11;q24) avec la fusion *IGK-c-MYC* et t(8;22)(q24;q11) générant le gène de fusion *IGL-c-MYC*] (16, 64), nous utilisons cette sonde uniquement dans les cas où l'immunophénotype suggère une LAL L3.

4.3.2 Panel LAL-T

L'utilisation d'un panel de FISH spécifique aux LAL-T nous a permis d'obtenir un taux de détection des anomalies chromosomiques de 66,7%, ce qui est supérieur aux taux décrits dans la littérature pour les LAL-T pédiatriques (Tableau XVIII) (66, 106). Ce panel permet la détection des principales anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-T ainsi que des anomalies rares. Par exemple, la sonde *BCR-ABL1* permet la détection du gène de fusion *BCR-ABL1* retrouvé dans 3% à 6% des LAL-T des enfants, mais permet également la détection de l'amplification 9q34 avec la fusion *NUP214-ABL1* (7, 16, 112). Globalement, la fréquence d'anomalies un peu plus faible dans les LAL-T comparativement aux autres leucémies (LAL-B : 93,5% et LAM : 90,0%) (Figure 12, page 97) soulève la pertinence d'optimiser et d'améliorer le panel utilisé pour les LAL-T. Une amélioration qui pourrait être apportée est l'ajout de la sonde breakapart *SIL-TAL1* (1p32).

Cette sonde permet la détection de la délétion interstielle cryptique 1p32, générant le gène de fusion *SIL-TALI*, ainsi que les réarrangements du facteur de transcription *TALI*. Ces anomalies récurrentes sont retrouvées dans 15 à 30% des LAL-T pédiatriques (7, 43, 104, 154). De plus, l'oncogène *TALI* faisant partie d'un complexe protéique liant l'histone déacétylase 1, il a été suggéré que les patients avec des anomalies de ce gène pourraient bénéficier de thérapies ciblées inhibant l'histone déacétylase (7, 104). Récemment, il a d'ailleurs été montré que des inhibiteurs de l'histone déacétylase diminuent l'expression de *TALI* et induisent l'apoptose des cellules T chez des souris transgéniques et sur des lignées cellulaires, d'où l'intérêt de développer des thérapies similaires chez l'humain (155). Le panel LAL-T pourrait aussi être amélioré par l'ajout de la sonde breakapart *TCR β* (7q34), permettant la détection des réarrangements de ce gène de la famille des récepteurs des cellules T. En effet, par FISH, on peut détecter des translocations impliquant ce locus dans 20% des cas de LAL-T pédiatriques, dont la majorité (environ 58%) sont cryptiques (invisibles au caryotype) (64, 156). Aussi, les fusions *TLX3-BCL11B* (*HOX11L2-BCL11B*) issue de la translocation t(5;14)(q35.1;q32.2)] et *MLLT10-PICALM* (*AF10-CALM*) générée par la translocation t(10;11)(p13;q14)] sont récurrentes dans les LAL-T. Les fusions *TLX3-BCL11B* et *MLLT10-PICALM* sont retrouvées dans respectivement 20% à 24% et 5% à 10% des LAL-T pédiatriques et sont associées à un pronostic défavorable (7, 43, 64, 104, 156). La translocation t(10;11)(p13;q14) générant la fusion *MLLT10-PICALM* peut être confondue avec la translocation t(10;11)(p12;q23) (fusion *MLL-AF10*) lors de l'analyse du caryotype (les points de cassure étant assez similaires) et la translocation t(5;14)(q35.1;q32.2) est cryptique (64, 157). Il s'avère donc nécessaire d'utiliser des techniques moléculaires telles la RT-PCR ou la FISH pour les détecter (16). Les laboratoires médicaux Mayo, *Mayo Medical Laboratories*, de prestigieux laboratoires américains, utilisent d'ailleurs une sonde double fusion *MLLT10-PICALM* dans leur panel de FISH pour les LAL-T. Généralement, les LAL-T sont associées à un pronostic plus défavorable que les leucémies de la lignée B (risque supérieur de rechute), il est donc essentiel d'élaborer de nouvelles stratégies afin d'améliorer le diagnostic précoce, la

stratification du risque et les traitements à offrir aux patients atteints de cette pathologie (19, 43, 64). Nous suggérons donc d'ajouter les sondes suivantes pour le panel de la FISH dans les LAL-T : 1) la sonde breakapart *SIL-TAL1* (1p32), 2) la sonde breakapart *TCR β* (7q34), 3) la sonde double fusion *TLX3-BCL11B* [t(5;14)(q35.1;q32.2)] et 4) la sonde double fusion *MLLT10-PICALM* [t(10;11)(p13;q14)].

L'optimisation du taux de détection des anomalies génomiques dans les LAL-T pourrait également bénéficier d'une amélioration du panel utilisé par RT-PCR. Au laboratoire de biologie moléculaire du CHU Sainte-Justine, aucun panel d'amorces n'a été développé spécifiquement pour les LAL de la lignée T : le même panel que celui pour les LAL-B (détection des gènes de fusion *BCR-ABL1*, *MLL-AF4*, *ETV6-RUNX1* et *TCF3-PBX1*; Tableau X) est utilisé. Or, la fusion *ETV6-RUNX1* est pathognomonique (exclusive) aux LAL-B (3, 16, 64), il n'est donc pas nécessaire de rechercher la présence de ce transcrit de fusion chez les patients dont l'immunophénotype confirme un diagnostic de LAL-T. La fusion *TCF3-PBX1* [translocation t(1;19)(q23;p13)] est également très rare dans les LAL-T (16, 118, 153). Il serait davantage pertinent de rechercher par RT-PCR les fusions récurrentes *TLX3-BCL11B* issue de la translocation t(5;14)(q35.1;q32.2)] et *MLLT10-PICALM* générée par la translocation t(10;11)(p13;q14)]. Aussi, les réarrangements du gène *MLL* (11q23) sont présents dans environ 4% des LAL-T pédiatriques (64). La translocation la plus fréquente est la t(11;19)(q23;p13.3) (fusion *MLL-ENL*) et est associée à un pronostic favorable (64, 112, 153, 158). Nous suggérons donc le panel LAL-T suivant pour la RT-PCR : 1) *BCR-ABL1*, t(9;22)(q34;q11.2), 2) *MLL-ENL*, t(11;19)(q23;p13.3), 3) *TLX3-BCL11B*, t(5;14)(q35.1;q32.2), 4) *MLLT10-PICALM*, t(10;11)(p13;q14). Ainsi, parmi les amorces actuellement détectées par RT-PCR pour les LAL-T (Tableau X), seules celles ciblant le transcrit de fusion *BCR-ABL1* devraient être conservées.

4.3.3 Panel LAM

Le panel LAM que nous avons mis au point semble efficace puisque nous avons détecté 90,0% d'anomalies chromosomiques dans ce groupe (Figure 12, page 97), ce qui est supérieur à ce qui est décrit dans la littérature dans de larges cohortes de LAM pédiatriques (70% à 75% d'anomalies) (Tableau XVIII, page 127) (63, 110). Il est constitué de neuf sondes, permettent la détection des principales anomalies chromosomiques décrites dans les LAM pédiatriques (fusions *RUNX1-ETO*, *PML-RARA*, réarrangements des gènes *CBFβ*, *MLL*, monosomie 7/délétion 7q, monosomie 5/délétion 5q et trisomie 8) (Tableau V, page 54 et Figure 9C, page 71). Contrairement, à d'autres panels LAM décrits dans la littérature tels que celui de l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (138) et des laboratoires de Mayo, qui comprennent une sonde de fusion *BCR-ABL1* pour la détection de la translocation t(9;22)(q34;q11.2), nous avons décidé de ne pas l'inclure dans notre panel LAM car cette anomalie se retrouve dans moins de 1% des cas de LAM pédiatriques (16, 65). Par contre, il serait peut-être pertinent d'ajouter dans notre panel LAM une sonde pour observer les réarrangements du gène *EVII* (3q26), qui sont associés à un pronostic très défavorable, (64, 148). La plus récente stratification du risque cytogénétique des LAM du *Medical Research Council* (MRC) inclut les anomalies 3q [inv(3)(q21q26) et t(3;3)(q21;q26)] dans la catégorie de risque élevé (60, 147). Dans les essais cliniques AML10, AML12 et AML15 du MRC sur 5876 jeunes adultes atteints de LAM, la survie globale à 10 ans des patients avec des anomalies 3q est de seulement 4%; le MRC considère donc cette entité comme un facteur de risque indépendant (pronostic défavorable) (60). Les LAM avec un réarrangement du gène *EVII* font d'ailleurs partie de la classification 2008 de l'OMS, cette anomalie est donc importante à la fois pour le diagnostic et le pronostic (43). Le panel de Mayo comprend une sonde de fusion *RPNI-EVII* [permettant la détection de l'inversion inv(3)(q21q26)], mais une sonde *EVII* breakapart tricolore est aussi disponible (pour détecter tous les réarrangements du gène *EVII*). Par ailleurs, une anomalie récurrente dans les LAM M7 pédiatriques, retrouvée

dans 50% des cas, est la translocation $t(1;22)(p13;q13)$ générant la fusion *RBM15-MKLI* (3, 64). On la retrouve surtout chez les bébés de moins de 24 mois et elle est associée à un pronostic défavorable avec une survie médiane de huit mois (64, 65). La fusion *RBM15-MKLI* pourrait être recherchée dans notre laboratoire pour les cas de LAM M7. Une autre anomalie serait pertinente à rechercher dans les LAM M2 qui ne présentent pas la fusion *RUNX1-ETO* [$t(8;21)$] : la fusion *DEK-NUP214* issue de la translocation $t(6;9)(p23;q34)$, associée à un pronostic défavorable (43).

4.3.4 Seuil des sondes

Une validation pré-clinique de la FISH et des sondes utilisées dans un cadre clinique est recommandée par plusieurs institutions telles que le Collège Américain des Pathologistes (*College of American Pathologists-CAP*), la FDA, le Collège Américain des Médecins Généticiens (ACMG), le Collège Canadien des Médecins Généticiens (CCMG) et le *Children Oncology Group* (COG) (116, 117, 159, 160). La validation comporte plusieurs étapes: la localisation des sondes afin de s'assurer que la sonde hybride au locus chromosomique voulu sur des lames contrôles (spécificité), la sensibilité (pourcentage de métaphases avec le profil d'hybridation attendu; la sensibilité minimale de 95% est recommandée pour des analyses cliniques) et finalement l'établissement du seuil normal de chacune des sondes utilisées dans un laboratoire de cytogénétique clinique (160). Un des objectifs de notre projet est de calculer statistiquement le seuil des sondes utilisées dans le panel LAL-B.

Nous avons évalué le nombre de cellules faux-positives (cellules avec un profil d'hybridation suggérant une anomalie au niveau du locus ciblé par la sonde) pour chacune des 13 sondes du panel dans 20 cas de LAL-B *de novo* présentant une anomalie chromosomique connue (Tableau XII, page 92 et Figure 23, page 139). Nous avons ensuite calculé le seuil de chaque sonde en comparant deux méthodes statistiques décrites dans la littérature (117, 139, 159-161). Tel qu'illustré dans la Figure 23 (page 139), la première

méthode (fonction β inverse) donne des seuils plus élevés que la deuxième méthode (distribution normale de Gauss). Avec la fonction β inverse, le calcul des seuils est basé sur le maximum (le cas ayant le plus grand nombre de cellules faux-positives), alors que la méthode de Gauss utilise la moyenne (moyenne des toutes les cellules faux-positives de l'ensemble des cas). Statistiquement, dans un échantillon donné, le maximum est toujours supérieur à la moyenne. Ceci explique donc pourquoi la méthode 1, basée sur la valeur maximale, donne des seuils supérieurs à la méthode 2, basée sur la valeur moyenne.

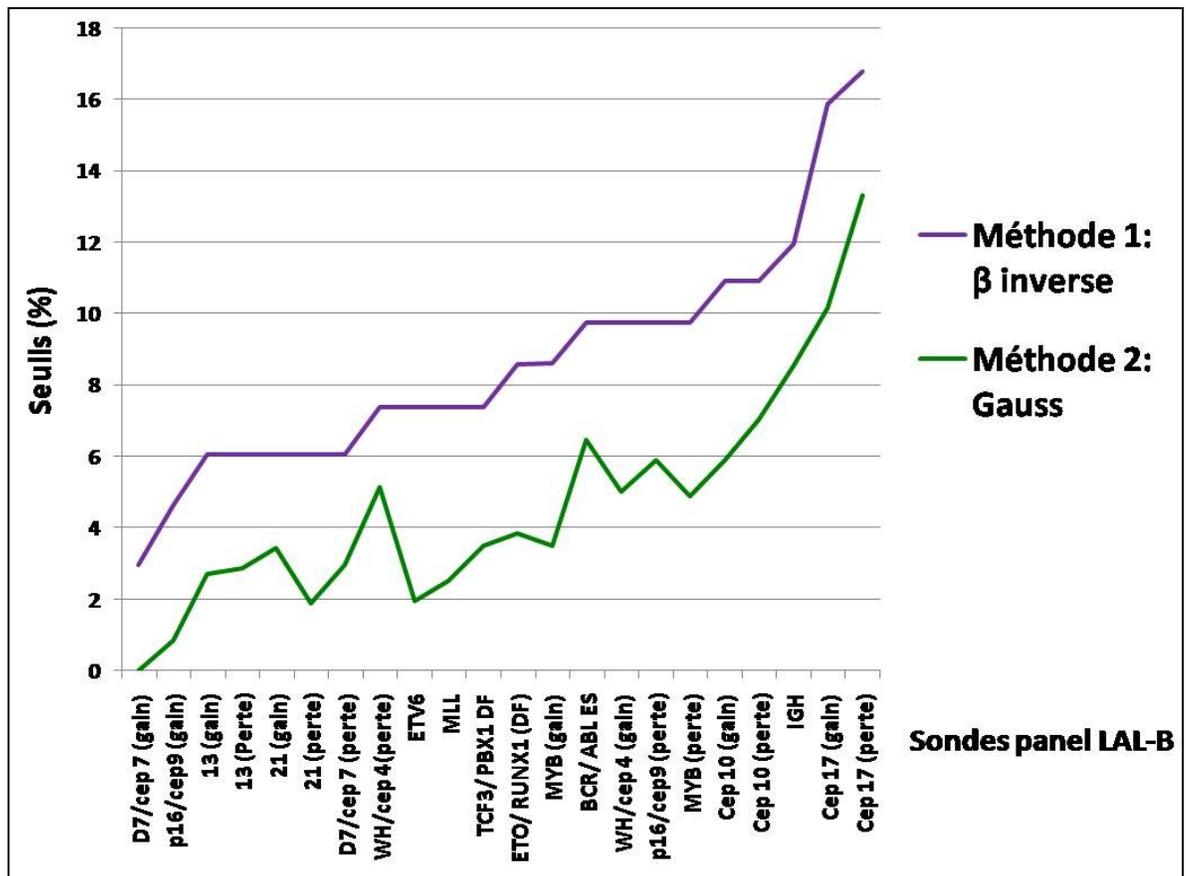


Figure 23. Comparaison de deux méthodes statistiques pour le calcul des seuils des sondes du panel LAL-B. Pour la méthode 1 (courbe mauve), les seuils ont été calculés selon une fonction β inverse (maximum avec un intervalle de confiance de 95%). Pour la méthode 2 (courbe verte), les seuils ont été calculés selon une distribution normale de Gauss (moyenne plus 3 déviations standards).

Le choix de la méthode statistique pour calculer les seuils est important car l'interprétation des résultats cytogénétiques cliniques (FISH) est basée notamment sur ces seuils. Chaque méthode comporte des avantages et des limites. Avec des seuils élevés (méthode 1, fonction β inverse), nous minimisons le risque d'avoir des résultats faux-positifs, (160), ce qui est essentiel pour donner le bon diagnostic. Par contre, des seuils

élevés (calculés par la première méthode) sont moins précis. Ceci pourrait influencer le suivi de la maladie résiduelle en augmentant la probabilité d'avoir des résultats faux-négatifs (160). En choisissant la deuxième méthode statistique (Gauss), qui donne des seuils plus bas, on minimise les résultats cytogénétiques faux-négatifs, mais on augmente le risque d'avoir des cas faux-positifs (160, 162). Toutefois, les données obtenues concernant le nombre de cellules faux-positives pour chacun des 20 cas analysés ne suivent pas une distribution normale (courbe standard de Gauss symétrique); les tests statistiques basés sur la moyenne (plus deux ou trois déviations standards) ne sont donc pas appropriés (117, 139). Ceci suggère que la méthode 1, calculant les seuils des sondes par la fonction β inverse, serait plus appropriée et plus valide au plan statistique. Cette méthode serait à privilégier puisqu'elle établit des seuils de normalité élevés basés sur la valeur maximale observée chez un patient sain. D'ailleurs, une étude du consortium de recherche sur les leucémies lymphocytiques chroniques (CRC) a comparé les seuils et l'interprétation des résultats de la FISH de cinq différents laboratoires (162). Les discordances entre les laboratoires étaient principalement attribuables à des seuils de normalité inadéquats. Le CRC recommande par conséquent d'appliquer des normes et des critères d'analyses de la FISH rigoureux et d'utiliser des tests statistiques non paramétriques fiables (tels que la fonction β inverse, basée sur une distribution binominale et non normale comme le test de Gauss) pour établir le seuil des sondes (162). Le même raisonnement pourrait être applicable aux leucémies aiguës pédiatriques.

Les seuils présentés dans le Tableau XII (page 92) et dans la Figure 23 (page 139) ont été établis par l'analyse de 100 cellules par cas pour chacune des sondes et ce pour 20 patients atteints de LAL-B *de novo* (donc au total, environ 2000 cellules ont été comptées pour chacune des sondes). Il est recommandé de déterminer les seuils en analysant le même nombre de cellules que lors de l'analyse des cas de cytogénétique clinique (160). L'utilisation de ces seuils est donc appropriée pour l'interprétation des résultats des LAL-B *de novo*. Toutefois, il faudrait refaire le calcul des seuils afin de pouvoir les utiliser lors des

suivis de la maladie résiduelle, dans lesquels nous analysons jusqu'à 500 cellules par sonde. En fait, le nombre exact de cellules à analyser pour établir les seuils varie d'une étude à l'autre: certains auteurs ont mentionné que 500 cellules sur 20 patients normaux sont requises (total de 10 000 cellules par sonde) (139, 159), bien que 200 cellules pour 20 cas (total de 4000 cellules par sonde) semble suffisant pour générer des seuils fiables (117, 160). Parmi les résultats que nous avons obtenus pour les seuils des sondes du panel LAL-B, il est par ailleurs étonnant qu'aucune cellule faux-positive n'ait été notée pour la sonde centromérique du chromosome 7(cep 7)/D7S486 (gains) parmi les 1700 cellules analysées (Tableau XII, avant dernière ligne). Il faudrait donc analyser un plus grand nombre de cellules (au minimum 4000) afin d'avoir un seuil représentatif pour cette sonde. Enfin, il serait aussi pertinent de déterminer les seuils pour les sondes des panels LAM et LAL-T.

4.4 Complémentarité et discordances des techniques génétiques

Les quatre techniques cytogénétiques (caryotype, FISH, RT-PCR et index d'ADN) comportent chacune des avantages et des inconvénients pour l'analyse génomique (Tableau VI, page 58); l'idéal est de les utiliser de façon concomitante pour les leucémies *de novo*. L'utilisation de plusieurs tests génétiques nous a permis d'optimiser la détection des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques (Figure 12, page 97) et d'évaluer avec une meilleure précision la présence d'anomalies secondaires ou rares importantes pour le diagnostic et/ou le pronostic des patients (Figures 15, 16, 17 et Tableau XV). Chez certains patients atteints de LAL-B *de novo*, par exemple, il y a co-existence d'un clone hyperdiploïde et d'un clone hypodiploïde (37, 43, 122, 163). Il est important de souligner la difficulté de détection du clone hypodiploïde au caryotype, d'où l'utilité d'utiliser plusieurs techniques concomitantes (caryotype, FISH interphasique et index

d'ADN) (Tableau XIV, page 105 et Figure 16, page 104). De plus, le caryotype est restreint à un nombre limité de mitoses, alors que la FISH et l'index d'ADN évaluent un grand nombre de cellules (Tableau VI). Des études récentes ont également montré l'efficacité des aSNP pour détecter l'hypodiploïdie chez les patients qui présentent les deux clones (hyperdiploïde et hypodiploïde) (122, 125). La valeur pronostique de cette entité (co-existence d'hyperdiploïde et d'hypodiploïde) sera discutée dans la section 4.6.1.

Suite à notre étude, nous proposons une stratégie pour la détection efficace de l'ensemble des anomalies génomiques à chacune des étapes de la maladie (diagnostic, suivi de la maladie résiduelle, rechute, avant et après la greffe de moelle osseuse, s'il y a lieu, et fin du traitement) (Tableau XIX, page 143). Il est important d'utiliser les techniques appropriées pour chaque patient, en fonction des anomalies détectées lors du diagnostic. Cela permettra d'offrir aux patients une meilleure prise en charge et de cibler les analyses appropriées.

Aussi, dans le Tableau XIX, nous voulions souligner qu'après une greffe de moelle osseuse, il importe de vérifier le pourcentage de cellules du donneur (greffon) et du receveur (le chimérisme est évalué par des marqueurs de surface). Le caryotype et la FISH devraient être effectués uniquement s'il y a présence de cellules du receveur. En effet, lorsqu'un échantillon est constitué à 100% des cellules du donneur, les résultats cytogénétiques sont pratiquement toujours normaux (résultats non montrés).

Tableau XIX. Stratégie de détection des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques à chacune des étapes de la maladie, du diagnostic jusqu'à la fin du traitement.

	Caryotype	FISH	RT-PCR	Index ADN ³	Micropuces
<i>De novo</i>	√	√	√	√	√
Suivi de la maladie résiduelle		√	√ ²		
Rechute	√	√	√	√	√
Pré-GMO	√	√			
Post-GMO		√ ¹	√ ¹		
Fin de traitement		√ ¹	√ ¹		

Légende. GMO : greffe de moelle osseuse; 1. Les analyses cytogénétiques devraient être effectuées uniquement s'il y a présence de cellules du receveur; 2. La RT-PCR peut être utilisée pour le suivi de la maladie résiduelle des cas avec des gènes de fusion classiques dont les deux gènes partenaires sont connus; 3. L'index d'ADN peut aussi être utilisé pour le suivi de la maladie résiduelle et pour la fin du traitement des cas présentant de l'hyperdiploïdie ou de l'hypodiploïdie lors du diagnostic (*de novo*).

Seulement quatre cas de leucémies sur 253 étudiés montrent une discordance dans les résultats des techniques utilisées (Tableau XX, page 145). Le premier cas est un bébé de 20 mois atteint d'une LAL-B *de novo*. Par FISH, on a observé une hyperdiploïdie dans 69% des cellules analysées. La présence du clone hyperdiploïde a été confirmée par l'index d'ADN (1,26 dans la même proportion de cellules). Par RT-PCR, le transcrite de fusion *MLL-AF4* issu de la translocation t(4;11)(q21;q23) a été détecté, bien qu'aucun réarrangement du gène *MLL* (11q23) n'avait été observé par FISH. Après vérification (reprise de la RT-PCR), on a montré l'absence de ce transcrite de fusion, ce pourquoi nous considérons qu'il s'agit d'un faux-positif en RT-PCR. Le deuxième cas est une LAL-B

chez un patient de 14 ans. La FISH interphasique a d'abord montré une délétion du gène *p16* en 9p21 dans 45 % des noyaux analysés et l'absence de la fusion *BCR/ABL1*. Cependant, le transcrit de fusion *BCR-ABL1* a été détecté par RT-PCR. La PCR quantitative (Q-PCR) a confirmé la présence de ce transcrit de fusion. Une deuxième analyse de la FISH a permis d'observer la fusion *BCR-ABL1* dans 48% des noyaux et dans 15 des 25 mitoses analysées, avec une délétion d'une grande partie de la sonde d'*ABL1* (9q34). Cette grande délétion rend l'interprétation plus difficile, ce qui pourrait expliquer le résultat négatif (absence de la fusion *BCR-ABL1*) lors de la première analyse de la FISH. Il s'agit donc d'un faux-négatif par FISH.

Les deux derniers cas sont des translocations qui semblent classiques au caryotype (points de cassures similaires à ceux décrits dans la littérature), mais qui n'impliquent pas les gènes classiques généralement réarrangés (Tableau XX). La première translocation est la $t(9;22)(q34;q22.1)$ retrouvée au sein d'un clone hyperdiploïde à 52~53 chromosomes chez un garçon de sept ans atteint d'une LAL-B *de novo*. L'index d'ADN a confirmé la présence du clone hyperdiploïde, par contre la RT-PCR a montré l'absence du transcrit de fusion *BCR-ABL1*. Par FISH, deux sondes différentes *BCR/ABL1* montrent l'absence du gène de fusion. Ceci a une implication clinique importante pour orienter le choix de la thérapie (chez cette patiente, le Gleevec ne serait pas approprié puisqu'il ne s'agit pas de la $t(9;22)$ classique avec le gène de fusion *BCR-ABL1*). Chez le dernier patient, un bébé de 23 mois atteint d'une LAL-T *de novo*, on a retrouvé une translocation $t(8;14)(q24;q22)$ dans 10 des 25 mitoses analysées par cytogénétique standard. Dans la littérature, une translocation avec des points de cassures similaires est décrite dans les LAL-T pédiatriques : la $t(8;14)(q24;q11)$ (16, 66, 156). Cette translocation est caractérisée par une juxtaposition du proto-oncogène *C-MYC* à proximité du gène *TCR* (64). Toutefois, chez notre patient, aucun réarrangement des gènes *C-MYC* (8q24.1) ou *TCR* (14q11.2) n'a été observé par FISH. Les gènes impliqués dans la translocation $t(8;14)$ de ce patient n'ont pas encore été investigués. Il serait pertinent d'évaluer la présence d'un réarrangement du gène

NKX2 (14q13.3), un gène de la famille des *homeobox* dont les anomalies sont décrites dans environ 5% des LAL-T pédiatriques (157, 164).

Tableau XX. Quatre cas de LAL *de novo* présentant une discordance entre les résultats de la cytogénétique standard, de la cytogénétique moléculaire, de la RT-PCR et/ou de l'index d'ADN.

Type de discordance	Résultat du caryotype	Résultat de la FISH	Résultat de la RT-PCR	Résultat de l'index d'ADN
Faux-positif RT-PCR	Échec (technique non réussie)	Hyperdiploïdie (69%), absence de réarrangement de <i>MLL</i> (11q23)	Présence du transcrit de fusion <i>MLL-AF4</i> [t(4;11)(q21;q23) positive]	1,26 (69%)
Faux-négatif FISH	Échec (technique non réussie)	Délétion gène <i>p16</i> (9p21) (45%), absence de la fusion <i>BCR-ABL1</i>	Présence du transcrit de fusion <i>BCR-ABL1</i> (point de cassure mineur) [t(9;22)(q34;q22.1) positive]	1
Faux-positif caryotype	52~53,XY,+6,t(9;22)(q34;q22.1),+10,+14,+18,+21,+21[28]/46,XY[65]	Hyperdiploïdie (63%), absence de la fusion <i>BCR-ABL1</i>	Absence du transcrit de fusion <i>BCR-ABL1</i> [t(9;22)(q34;q22.1) négative]	1,14
Faux-positif caryotype	t(8;14)(q24;q22)[10]/46,XY[15]	Normal, absence réarrangement de <i>C-MYC</i> (8q24.1) ou de <i>TCR</i> (14q11.2)	normal	1

4.5 Stratégie pour caractériser les cas rares par FISH avec des BACs

4.5.1 Réarrangements rares du gène *MLL*

Les remaniements du gène *MLL* (11q23) constituent des anomalies récurrentes dans notre cohorte de leucémies aiguës pédiatriques, représentant 4% des LAL-T, 5% des LAL-B et 28% des LAM (Figures 12, 13, 14 et Tableau XIII). Ces translocations forment des gènes de fusions oncogéniques qui jouent un rôle crucial dans la leucémogénèse par leur capacité de transformer les cellules hématopoïétiques en cellules-souches leucémiques (71). Ces anomalies surviennent surtout chez les bébés de moins de un an, sont souvent associées à un taux de leucocytes sanguins (WBC) élevé, une organomégalie, un envahissement du système nerveux central et confèrent généralement un pronostic défavorable (16, 86, 153). Chez les bébés atteints de LAL avec la fusion *MLL-AF4* issue de la translocation t(4;11)(q21;q23), l'oncogène *FLT3* est souvent surexprimé; une thérapie ciblée avec le lestaurtinib (un inhibiteur de *FLT3*) est d'ailleurs en essai clinique par le COG (AALL0631) (19, 153). Toutefois, des études récentes ont montré que les leucémies avec réarrangement de *MLL* constituent un groupe hétérogène et ce particulièrement parmi les LAM pédiatriques (32, 67, 69). Plusieurs facteurs peuvent moduler la valeur pronostique de ces leucémies tels que l'âge des patients au diagnostic, la présence d'anomalies chromosomiques secondaires et le gène partenaire de *MLL* (86, 112, 119). Par exemple, le pronostic des LAM pédiatriques est excellent avec le gène de fusion *MLL-MLLT11* [t(1;11)(q21;q23)], intermédiaire chez les patients avec le gène de fusion *MLL-AF9* [t(9;11)(p22;q23)] et défavorable pour les gènes de fusion *MLL-AF6* [t(6;11)(q27;q23)] et *MLL-AF10* [t(10;11)(p12;q23)] (32, 69, 147). Par ailleurs, la classification 2008 de l'OMS considère les LAM avec la t(9;11)(p22;q23) comme une entité distincte avec un pronostic supérieur aux autres réarrangements de *MLL* dans les LAM (43, 119). Ces évidences

illustrent l'importance clinique de caractériser les cas présentant une translocation en 11q23 afin d'identifier le gène partenaire de *MLL* (119).

La FISH constitue un outil essentiel, particulièrement dans les LAM, car environ le tiers des translocations impliquant *MLL* sont cryptiques (43). Les principaux transcrits de fusion sont ensuite détectés par RT-PCR (*MLL-AF4* dans les LAL-B et *MLL-AF9* dans les LAM). Cependant, nos résultats montrent qu'environ la moitié des translocations impliquant *MLL* forment un gène de fusion autre que ces deux gènes de fusion classiques (Figure 13). En effet, dans notre cohorte, cinq des neuf cas de LAL-B et quatre des onze cas de LAM présentent une translocation rare non détectée par RT-PCR, telle qu'une $t(6;11)(q27;q23)$ [gène de fusion *MLL-AF6*], une translocation complexe $t(10;11)(p12;q23),t(10;21)(q24;q22?.3)$ [*MLL-AF10*], une $t(11;19)(q23;p13.3)$ [*MLL-ENL*] ou autre. Dans le cadre de cette étude, nous avons développé une stratégie efficace pour identifier le gène partenaire de *MLL* par FISH avec des BACs (Figure 10) et c'est grâce à cette stratégie que ces translocations rares ont pu être caractérisées (Tableau XVI, Figures 19 et 20). Une autre équipe a mis au point une stratégie similaire (FISH avec des BACs spécifiques à *MLL* et aux gènes partenaires candidats) (119). Leur technique consiste à générer des sondes de fusion maison, chacune de ces sondes étant constituée de cinq BACs verts spécifiques à *MLL* et quatre BACs rouges spécifiques au gène partenaire candidat. La stratégie de l'équipe de Keefe et al, 2010 semble efficace pour détecter la présence des principaux gènes de fusion décrits dans les leucémies aiguës pédiatriques (*MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL*, *MLL-ELL* et *MLL-AF6*) (119). Notre stratégie inclut la sonde breakapart *MLL* (Vysis, Abbott Molecular). Pour identifier le gène partenaire, nous utilisons des BACs de part et d'autre du gène candidat (générant une sonde breakapart) et le réarrangement de ce gène peut facilement être détecté par la séparation des signaux des deux BACs (Figures 19 et 20). Ensuite, il est possible de confirmer la présence du gène de fusion par RT-PCR. Par exemple, chez le patient atteint de LAL-B *de novo* dans lequel nous avons observé un réarrangement des gènes *MLL* et *ENL* (Figure 20DEFG), des

amorces spécifiques au gène de fusion *MLL-ENL* ont pu confirmer les résultats obtenus par FISH. Récemment, des sondes de fusion commerciales *MLL-AF6* et *MLL-ENL* ont été développées par la compagnie Poseidon (Kreatech Diagnostics). Ces sondes constituent donc de nouvelles alternatives pour la détection de ces gènes de fusion. Aussi, une nouvelle technologie moléculaire, la CGH translocation, permet la détection simultanée de plusieurs translocations équilibrées. La CGH translocation pourrait s'avérer utile et rapide pour identifier le gène partenaire de *MLL*. Nous pourrions donc améliorer notre stratégie séquentielle pour caractériser les cas avec une translocation impliquant le gène *MLL* :

- 1) Détection du réarrangement de *MLL* par FISH avec une sonde commerciale *MLL* breakapart
- 2) Déterminer des gènes partenaires candidats de *MLL* au caryotype et par RT-PCR (la RT-PCR confirme ou élimine la présence des gènes de fusion classiques)
- 3) Vérifier le réarrangement du gène candidat par FISH avec des BACs ou détecter le gène de fusion par FISH avec une sonde de fusion commerciale ou par CGH translocation

Outre l'identification du gène partenaire de *MLL*, la caractérisation des anomalies cytogénétiques rares peut s'avérer utile pour mieux établir le diagnostic, le pronostic ou pour effectuer le suivi de la maladie résiduelle des patients. Notre caractérisation par FISH a permis d'identifier de nouvelles translocations chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques (sections 4.5.2, 4.5.3 et 4.5.4).

4.5.2 Nouveau réarrangement impliquant le gène *PAX5*

Nous avons caractérisé un cas de LAL-B *de novo* avec une $t(9;12)(p?11;p12)$ et un $der(1)?t(1;7)(q?;q?)$ au sein du même clone (Tableau XVII, cas numéro 3). Par FISH, nous avons montré un réarrangement du gène *PAX5* en 9p13, mais l'absence de réarrangement du gène *ETV6* en 12p13. Dans la littérature, une translocation avec des points de cassure similaires est décrite dans environ 1% des LAL-B pédiatriques [$dic(9;12)(p13;p13)$] et est caractérisée par le gène de fusion *PAX5-ETV6* (16, 64, 165). *PAX5* est un facteur de transcription essentiel à la différenciation des cellules de la lignée B (16, 28, 55, 64). La protéine chimérique produite par le gène de fusion *PAX5-ETV6* agit comme un facteur de transcription aberrant (répresseur), bloque la différenciation des cellules B et confère un avantage prolifératif (16, 165, 166). Comme seule anomalie, cette entité confère un excellent pronostic: la majorité des patients obtiennent une rémission complète et la survie globale à 5 ans dépasse 95% (64, 152). Notre cas semble donc être une entité distincte, puisque d'une part, il s'agit d'une translocation variante (le gène partenaire de *PAX5* n'est pas *ETV6*) et d'autre part, le pronostic d'une $t(9;12)$ en association avec une monosomie 7 est peu connu. D'après les résultats obtenus par FISH avec la sonde *ETV6*, la région où est localisé le point de cassure est plus centromérique que ce gène en 12p13.2. D'ailleurs, cette région contient un autre gène candidat : *SLCO1B3* (12p12.2). Un chromosome dicentrique [$dic(9;12)(p13;p12.2)$] avec le gène de fusion *PAX5-SLCO1B3* a déjà été décrit dans les LAL-B pédiatriques (64, 166). Nous pourrions donc poursuivre la caractérisation moléculaire en utilisant des BACs de part et d'autre de *SLCO1B3* pour évaluer s'il y a un réarrangement de ce gène dans la moelle de notre patient.

4.5.3 Nouveaux réarrangements impliquant la bande chromosomique 14q32 dans les LAL pédiatriques

Une t(2;14)(p16;q32) a été détectée au caryotype dans une LAL-B *de novo* (Tableau XVII, cas numéro 1). Par FISH, nous avons observé une absence de réarrangement des gènes *IGH* (14q32) et *BCL11A* (2p16.1) (Figure 22, page 123). Il ne s'agit donc pas de la t(2;14)(p13-p16;q32) récurrente impliquant le gène de fusion *IGH-BCL11A* décrite dans la leucémie lymphocytaire chronique (LLC) et dans quelques rares cas de LAL-B (64, 167-170). Nous avons poursuivi la caractérisation cytogénétique moléculaire avec des BACs couvrant d'autres gènes candidats tels que *DICER1* (14q32.13), *TRIP11* (14q32.12) et *LOXL3* (2p13.3), mais aucun réarrangement de l'un de ces gènes n'a été observé. D'après les résultats obtenus avec les BACs, le point de cassure sur le chromosome 2 est localisé entre le BAC RP11-842N8 en 2p13.3 et le BAC RP11-416L21 en 2p16.1 (plus centromérique que le gène *BCL11A*). Quelques gènes candidats sont localisés dans cette région tels que *MEIS1* (2p14), un facteur de transcription de la famille des *homeobox* impliqué dans la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques et *XPO1* (2p15), un proto-oncogène déjà rapporté dans de rares translocations dans les leucémies (64, 171). Sur le chromosome 14, le point de cassure est plus centromérique que le BAC RP11-809D14 en 14q32.13. Cette région contient plusieurs gènes dont le gène candidat *CALMI* (14q32.11), impliqué dans le cycle cellulaire. Actuellement, puisqu'aucune sonde anormale n'a été trouvée pour effectuer le suivi par FISH, les analyses du caryotype seront donc utilisées pour détecter la translocation t(2;14) lors du suivi de la maladie résiduelle de ce patient.

Aussi, la caractérisation d'une translocation complexe impliquant *IGH* a permis de préciser le diagnostic d'une fillette (Tableau XVI, cas numéro 1 à la page 110 et Figure 18, page 112). Initialement, par l'analyse de la cytogénétique standard, nous avons observé un remaniement complexe impliquant les chromosomes 9 et 14 (Figure 18A). Plusieurs hybridations avec des sondes spécifiques à ces chromosomes ont montré l'implication des

gènes *CEBPE* en 14q11.2 et *IGH* en 14q32.3. *CEBPE* est un facteur de transcription de la famille CEBP. Il est impliqué dans la différenciation des cellules de la lignée myéloïde, mais n'est pas exprimé dans les cellules précurseurs B normales (64, 140-142). *IGH* code pour la chaîne lourde des immunoglobulines, un gène constitutivement actif (8, 16, 108). La fusion *CEBPE-IGH* issue de la t(14;14)(q11.2;q32.3) est une anomalie rare, mais récurrente dans les LAL-B pédiatriques et associée à un risque intermédiaire (80, 141, 142, 144). La juxtaposition de l'oncogène *CEBPE* près du fort promoteur d'*IGH* entraîne une sur-expression de *CEBPE*, contribuant à la leucémogénèse (le mécanisme moléculaire est similaire à celui illustré dans la Figure 7CD, page 50) (108, 140, 141). Par FISH, nous avons aussi confirmé la présence de la t(9;14)(p11-12;q32.3) et l'absence du gène de fusion *c-MYC-IGH* (Figure 18, page 112). Cette translocation t(9;14) clonale implique le gène *IGH* sur le chromosome 14, mais le gène en 9p11-12 reste à identifier. Le point de cassure est plus centromérique que le gène *PAX5* en 9p13.2. Plusieurs gènes candidats sont localisés dans cette région, tels que *FANCG* (9p13), *MELK* (9p13.1) et *STOML2* (9p13.1). Globalement, nos résultats ont permis d'établir un diagnostic de LAL-B (fusion *CEBPE-IGH*), qui aurait pu être confondu avec un diagnostic de lymphome de Burkitt (fusion *c-MYC-IGH*) puisque les remaniements du gène *IGH* sont beaucoup plus fréquents dans cette entité (16, 43).

4.5.4 Nouveau gène de fusion *ETV6-FOXO1*

Nous avons identifié un nouveau gène de fusion *ETV6-FOXO1* issu d'une translocation t(12;13)(p13;q14) dans une LAM M1 *de novo* (Figure 21, page 120 et Tableau XVI, page 110). On retrouve des translocations récurrentes impliquant le gène *FOXO1* (13q14.11) dans le rhabdomyosarcome alvéolaire [la t(1;13)(p36;q14) générant la fusion *PAX7-FOXO1* et la t(2;13)(q36;q14) avec le gène de fusion chimérique *PAX3-FOXO1*] (16, 171, 172). *FOXO1* (*FKHR*) est facteur de transcription impliqué dans la

régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (171). Des études récentes suggèrent aussi qu'il agit comme un gène suppresseur de tumeur dans le lymphome de Hodgkin (64, 173). Dans les tumeurs solides, les fusions *PAX7-FOXO1* et *PAX3-FOXO1* génèrent des protéines chimériques aberrantes qui acquièrent des activités oncogéniques (forts activateurs transcriptionnels) (16, 172). Ces gènes de fusion ont une valeur pronostique importante chez les patients atteints de rhabdomyosarcome alvéolaire avec des métastases (la fusion *PAX3-FOXO1* constitue un sous-groupe à haut-risque; la fusion *PAX7-FOXO1* est toutefois associée à un bon pronostic) (16, 172). À notre connaissance, il s'agit du premier cas de réarrangement de *FOXO1* dans les LAM pédiatriques. Une translocation t(12;13)(p13;q12) a déjà été décrite chez un adulte atteint d'une LAM M1 *de novo* (174). Par FISH et par PCR, les auteurs ont montré la présence d'une fusion rare *ETV6-CDX2* (174). Outre *FOXO1*, il existe d'autres gènes généralement impliqués dans les tumeurs solides et exceptionnellement rapportés dans des cas isolés d'hémopathies malignes. Par exemple, *CLCA2* (1p22), un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein, a déjà été décrit comme un nouveau partenaire de *RUNX1* chez un patient adulte atteint d'une LAM-t (175).

L'identification des deux gènes impliqués dans la translocation t(12;13)(p13;q14) de notre patiente facilite le suivi de la maladie résiduelle, qui pourra être effectué par FISH ou par RT-PCR (en développant des amorces spécifiques au transcrite de fusion *ETV6-FOXO1*). La valeur pronostique de ce nouveau gène de fusion n'est pas connue. Chez notre patiente, une persistance de 19% de blastes et un réarrangement du gène *ETV6* dans 20% des cellules ont été observés au jour 28 post-induction 1. Elle a par la suite reçu une greffe de moelle osseuse et est toujours vivante trois ans après avoir reçu son diagnostic de LAM. Un suivi à plus long terme permettra de préciser l'impact clinique de la fusion *ETV6-FOXO1*.

4.6 Fréquence et valeur pronostique des anomalies secondaires

Les deux anomalies primaires les plus fréquentes chez les LAL-B sont l'hyperdiploïdie et la fusion *ETV6-RUNX1* issue de la translocation t(12;21)(p13;q22) (Figure 12). Ces deux anomalies seules sont associées à un pronostic favorable (7, 16, 37, 80), mais la valeur pronostique des anomalies secondaires additionnelles à ces anomalies est controversée (22, 24, 27, 29, 94, 100). Dans notre projet, nous voulions donc évaluer la fréquence et l'impact pronostique de ces anomalies secondaires dans notre cohorte de patients pédiatriques.

4.6.1 Anomalies secondaires à l'hyperdiploïdie

L'hyperdiploïdie de 50 à 65 chromosomes, *high hyperdiploidy*, lorsqu'elle est la seule anomalie primaire est associée à un bon pronostic chez les LAL-B pédiatriques (survie globale à cinq ans de 90%) (176). Toutefois, environ 20% des patients répondent mal au traitement et rechutent (EFS à 10 ans de 80%) (112). Il est donc cliniquement pertinent de rechercher de nouveaux marqueurs génétiques afin de mieux stratifier le risque de cette entité (112, 176). Il a déjà été suggéré que certaines anomalies structurales additionnelles telle la t(9;22)(q34;q11.2) et les réarrangements de *MLL* peuvent conférer un pronostic défavorable aux LAL-B hyperdiploïdes (37, 64, 94). Dans notre étude des 69 LAL-B *de novo* avec hyperdiploïdie (50 à 65 chromosomes), 37,7% des cas présentent des anomalies secondaires (Figure 15B, page 102). Afin d'évaluer la valeur pronostique de ces anomalies additionnelles, nous avons comparé les taux de rechute et de décès des sous-groupes avec et sans anomalies secondaires (Tableau XV, page 107). Nos résultats suggèrent que la présence d'anomalies additionnelles n'influence pas ni les taux de rechutes, ni les taux de décès des enfants atteints de LAL-B avec hyperdiploïdie ($p > 0,05$, test chi-deux de Pearson). Ceci pourrait s'expliquer par le type d'anomalies secondaires

détectées dans notre cohorte. En effet, parmi les anomalies additionnelles, nous avons notamment détecté des délétions des gènes *p16* (9p21), *ETV6* (12p13) et des duplications 1q21q32. Ces anomalies récurrentes n'affectent pas le pronostic des LAL pédiatriques hyperdiploïdes (105, 176). Chez certains patients, nous avons détecté un clone hypodiploïde (<39 chromosomes) en plus du clone hyperdiploïde (Tableau XIV). La co-existence d'hyperdiploïdie et d'hypodiploïdie est associée à un pronostic défavorable (96, 97, 112, 177). Dans notre cohorte, les taux de rechute sont légèrement supérieurs dans le groupe avec ces deux clones comparativement au groupe avec hyperdiploïdie seule (1/5 vs 7/43), mais nous n'avons pas pu observer d'effet statistiquement significatif (Tableau XV, page 107). De plus, 16,3% (7/43) des patients avec hyperdiploïdie seule ont subi une rechute.

Malgré la présence d'une anomalie cytogénétique à bon pronostic (hyperdiploïdie seule de 50 à 65 chromosomes) d'autres facteurs de risque associés à un pronostic défavorable (immunophénotype, morphologie, pourcentage de blastes, etc.) ont peut-être contribué aux rechutes de certains patients (78). Toutefois, nous avons identifié un nouveau marqueur génétique associé à un pronostic défavorable : les LAL hyperdiploïdes au sein d'un caryotype complexe (au moins quatre chromosomes avec des anomalies structurales clonales). Nous avons montré, par les courbes de survie de Kaplan Meier (Figure 17, page 108), que l'EFS à sept ans est significativement réduite chez les patients avec hyperdiploïdie et un caryotype complexe par rapport aux patients avec hyperdiploïdie seule ($p < 0,001$, test log rank de Mantel-Cox). Comme anomalie primaire seule, un caryotype complexe est associé à un pronostic défavorable dans les LAL-B (112). La valeur pronostique de l'hyperdiploïdie au sein d'un caryotype complexe est peu connue dans la littérature. Certains auteurs ont néanmoins souligné une importante instabilité chromosomique générant une hétérogénéité clonale parmi les cas d'hyperdiploïdie de 50 à 65 chromosomes (149). Ceci pourrait expliquer la présence de multiples anomalies structurales (caryotype complexe) chez certains patients avec de l'hyperdiploïdie. Il serait

donc pertinent de vérifier la valeur pronostique de cette entité sur une plus large cohorte de patients.

4.6.2 Anomalies secondaires à la fusion *ETV6-RUNXI*

Parmi nos 38 cas de LAL-B avec la fusion *ETV6-RUNXI*, 73,7% présentent des anomalies secondaires (Figure 15A, page 102). Par FISH et au caryotype, nous avons détecté les principales anomalies additionnelles connues telles que la délétion du 2^e allèle d'*ETV6* (12p13), la duplication du dérivé 21 contenant le gène de fusion, la trisomie 21 et la délétion du gène suppresseur de tumeur *p16* (9p21) (27, 29, 103, 112, 178). Dans notre cohorte, nous avons montré qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative ($p > 0,05$, test chi-deux de Pearson) entre les taux de rechute des patients qui présentent la fusion *ETV6-RUNXI* seule (aucune anomalie secondaire) et les patients qui ont la t(12;21) avec des anomalies secondaires (1/10 comparativement à 3/28; Tableau XV, page 107). En isolant le sous-groupe de patients qui présentent la perte du 2^e allèle d'*ETV6* comme anomalie secondaire, il n'y a pas de corrélation avec les taux de rechute des patients (1/10 comparativement à 2/15 chez les patients avec perte d'*ETV6*; Tableau XV, dernière ligne). Puisque tous les enfants de notre étude avec la t(12;21) sont toujours vivants (aucun décès dans les groupes avec et sans anomalie secondaire), nous n'avons pas pu évaluer adéquatement l'impact des anomalies additionnelles sur la survie globale. Dans la littérature, la valeur pronostique des anomalies secondaires à la fusion *ETV6-RUNXI* est controversée car plusieurs études sont contradictoires (99-101, 103, 112, 178, 179). Une récente étude sur une large cohorte de LAL-B pédiatriques a évalué l'OS et l'EFS à 9 ans de 229 cas de fusion *ETV6-RUNXI* détectée par FISH (179). L'équipe de Barbany, 2012 a montré que les anomalies secondaires n'avaient pas d'impact pronostique ni sur l'OS, ni sur l'EFS, et ce même en séparant les sous-groupes d'anomalies additionnelles (délétion d'*ETV6*, trisomie 21, duplication du dérivé 21) (179). Ceci confirme donc les résultats que nous avons obtenus dans notre étude. Toutefois, par micropuces, il a été montré que les

LAL-B avec la fusion *ETV6-RUNX1* ont en moyenne de deux à six CNV additionnels, par exemple des microdélétions récurrentes de gènes impliqués dans le métabolisme des glucocorticoïdes (26-29). Par séquençage de l'ensemble de l'exome, *whole-exome sequencing*, on a aussi retrouvé sept mutations somatiques par cas de t(12;21) (180). Puisque ces altérations sont cryptiques, nous n'avons pas pu les détecter dans notre étude par FISH (il n'y a d'ailleurs pas de sonde commerciale ciblant ces petites régions génomiques). Il serait toutefois intéressant d'évaluer leur valeur pronostique (particulièrement pour les microdélétions focales récurrentes du gène *TBL1XR1*), d'où l'intérêt d'utiliser les micropuces comme test génétique en hématologie clinique. De plus, l'architecture clonale des LAL pédiatriques avec la t(12;21) semble complexe et dynamique entre le diagnostic et la rechute (102, 181, 182). Les micropuces pourraient donc être utiles afin d'évaluer adéquatement l'évolution clonale chez les patients en rechute avec la fusion *ETV6-RUNX1*.

4.7 Intégration des micropuces en hématologie clinique

4.7.1 Pertinence de l'intégration des micropuces en clinique cytogénétique oncologique

Les micropuces sont actuellement utilisées comme test génétique de première ligne chez les individus atteints de retard mental, de retard de développement ou des maladies du spectre de l'autisme [recommandations du Collège Canadien des Médecins Généticiens (CCMG), du Collège Américain des Médecins Généticiens (ACMG) et du consortium international de l'*International Standard Cytogenomic Array consortium (ISCA)*] (183-189). Toutefois, aucune norme ne fait consensus sur leur intégration en hématologie (125, 128). Puisque les micropuces permettent d'analyser l'ensemble du génome à très haute résolution, il semble pertinent de les intégrer en hématologie clinique afin d'augmenter les

taux de détection des anomalies génomiques. Par exemple, en utilisant uniquement le caryotype, on retrouve environ 60% de cas anormaux dans les LAL-B pédiatriques (113, 123, 190), alors qu'environ 55 à 65% des cas sont anormaux dans les LAM (59, 62, 63, 191). En combinant le caryotype et la FISH, on détecte des anomalies dans environ 80% des cas (7, 113, 145). Enfin, en appliquant les micropuces, environ 90 à 95% des LAL présentent des aberrations génomiques (en combinant l'aCGH et la FISH) (190, 192) et on retrouve des anomalies dans environ 80% des LAM (en combinant les aSNP et le caryotype) (129, 130). L'augmentation des taux de détection des anomalies génomiques par micropuces peut s'expliquer par deux facteurs. D'une part, certaines anomalies sont cryptiques et ne peuvent donc pas être détectées au caryotype ou par FISH (127). Par exemple, dans une étude de 180 cas de leucémies pédiatriques analysées à la fois par aSNP, au caryotype et par FISH, la technique d'aSNP a permis de détecter des délétions submicroscopiques du gène *p16* (9p21.3) dans 26 échantillons (14%) dans lesquels le caryotype et la FISH (avec une sonde commerciale ciblant *p16*) étaient normaux (125). Dans cette même cohorte, des délétions cryptiques du gène *PAX5* (9p13) ont été détectées par aSNP dans 10 cas (5,6%) et des CN-LOH dans 12 cas (6,7%). Globalement, cette étude a montré que les micropuces ont permis la détection d'aberrations additionnelles (non observées au caryotype) dans 72% des leucémies. Dans 8% de ces cas, les résultats obtenus par micropuces ont changé drastiquement le traitement des patients, illustrant le bénéfice d'utiliser des technologies à haute résolution telles que les micropuces. D'autre part, certaines anomalies ne se retrouvent pas dans les cellules en division cellulaire (124, 193). Cependant, cette technologie ne permet pas encore la détection des anomalies chromosomiques équilibrées (à l'exception de la CGH-translocation) et de l'hétérogénéité clonale, ce qui est essentiel pour préciser le diagnostic et évaluer adéquatement le pronostic des LAL et des LAM (114).

De plus, certaines microdélétions et microduplications (ne pouvant pas être détectées à la résolution du caryotype) ont une valeur pronostique importante dans les

hémopathies malignes pédiatriques. Par exemple, des délétions submicroscopiques récurrentes du gène *IKZF1/IKAROS* (7p12.2) sont associées aux LAL ayant un pronostic défavorable, avec une prévalence estimée à 80-95% dans les LAL-B présentant la fusion *BCR-ABL1* (Ph+) (22). Les délétions du gène suppresseur de tumeur *IKZF1/IKAROS* sont également fréquentes dans les LAL à haut risque Ph- (retrouvées dans environ 28% des cas) et triplent le risque de résistance au traitement ou de rechute (19, 194). Les altérations du gène *IKZF1/IKAROS* semblent un marqueur de pronostic (et de rechute) indépendant de l'âge ou des autres anomalies cytogénétiques (118), d'où l'importance de développer des méthodes pour les détecter efficacement (195). Or, par FISH, aucune sonde commerciale ciblant ce gène n'est actuellement disponible (certaines équipes ont toutefois utilisé des BACs, par exemple le BAC RP11-663L2) (194). De plus, des délétions du gène *BTGI* (12q21.33) sont retrouvées dans environ 10% des LAL précurseur B et contribuent à la résistance aux traitements aux glucocorticoïdes (195, 196). Des microdélétions du gène *ARID5* (10q21.2) sont également retrouvées chez les LAL à haut risque (22). Certaines altérations submicroscopiques impliquant des gènes clés du métabolisme des glucocorticoïdes (*TBLIXR1* en 3q26.32 et *NR3C1* en 5q31.3), de l'apoptose (gène *BMF* en 15q15.1) et de la réparation de l'ADN (gène *MSH2* en 2p21 et gène *MLH1* en 3p21.3) sont retrouvées à la rechute des LAL avec la fusion *ETV6-RUNX1* (102). La détection de ces microdélétions pourrait donc s'avérer utile pour évaluer l'évolution clonale et expliquer la résistance aux traitements de ces patients. Dans les LAL-T *de novo*, les micropuces permettraient la détection d'anomalies supplémentaires dans 38% des cas pédiatriques (125). Par exemple, les aSNP peuvent détecter des anomalies récurrentes telles que la délétion cryptique 1p32 générant le gène de fusion *STIL-TALI* (retrouvée dans 15 à 30% des LAL-T) et les CN-LOH 9p (retrouvées dans environ 51% des cas), qui incluent notamment les gènes *PAX5* (9p13) et *p16* (9p21) (105, 125, 197).

De plus, une nouvelle technologie de micropuces, la *translocation comparative genomic hybridization* ou CGH-translocation, permet de détecter les translocations

chromosomiques équilibrées (198, 199). Cette technique combine la PCR et l'aCGH afin de cibler les gènes de fusions cliniquement significatifs dans les hémopathies malignes. La première étape de la CGH-translocation est une amplification linéaire de l'ADN du patient avec des amorces spécifiques aux points de cassures du gène de fusion ciblé (128, 198, 199). L'ADN du patient et l'ADN d'un échantillon contrôle sont ensuite marqués et co-hybridés sur une micropuce contenant des milliers d'oligonucléotides. Lorsque le gène de fusion est présent, les multiples cycles d'amplification linéaires (PCR) génèrent un excès de matériel génétique sur le chromosome dérivé qui sera détecté par la micropuce (198). La CGH-translocation permet également l'identification de plusieurs translocations équilibrées en un seul test génétique par l'utilisation de plusieurs amorces à la fois (PCR multiplexe). Cette nouvelle technologie constitue donc une méthode rapide et efficace qui pourrait éventuellement être intégrée en hématologie clinique, lorsqu'un plus grand nombre de patients auront été testés (199). Certains panels commerciaux utilisant la CGH-translocation (OncoChipTM de Signature Genomics) peuvent détecter simultanément plusieurs translocations variantes impliquant *MLL*, ce qui serait particulièrement utile dans les cas de LAM pédiatriques, dans lesquels l'identification du gène partenaire de *MLL* est importante pour établir adéquatement le pronostic (section 4.5.1) (128).

4.7.2 Stratégies pour intégrer les micropuces en hématologie

Globalement, les micropuces constituent un outil génétique pertinent permettant de détecter l'ensemble des délétions génomiques submicroscopiques essentielles pour établir le diagnostic, le pronostic et expliquer la résistance à certaines thérapies des LAL (125, 128). Les micropuces ont donc leur place en clinique au sein d'une investigation génomique globale, à condition de les utiliser en complémentarité avec les autres outils génétiques (114, 125, 129, 200). La Figure 24 illustre une stratégie proposée. Pour les LAL, l'intégration de l'aCGH permet de réduire le nombre de sondes utilisées par FISH : seules les sondes pour la détection des anomalies équilibrées sont nécessaires (128).

Cependant, pour les LAM, puisque les gains et les pertes sont beaucoup moins fréquents que dans les LAL, les micropuces ne semblent pas aussi pertinentes comme outil génétique de première ligne. Par conséquent, l'aCGH ou les aSNP peuvent être utilisés dans les cas de LAM normaux, c'est-à-dire lorsqu'aucune anomalie n'est détectée par FISH, au caryotype et par RT-PCR. De plus, dans le cas des LAM, l'utilisation des aSNP pourrait être utile puisque cette technologie permet la détection d'anomalies alléliques récurrentes telles que les CN-LOH (retrouvées dans 10% à 20% des cas) (125, 201). Par contre, puisque la valeur pronostique des CN-LOH est actuellement controversée (130), il serait préférable de cibler par aSNP uniquement les régions de CN-LOH récurrentes dont le rôle pronostique est reconnu. Récemment, grâce aux études de aSNP, il a été démontré que les CN-LOH en 9p interagissent avec les mutations de *JAK2* (9p24) et semblent associées à un pronostic défavorable (130). Similairement, des CN-LOH fréquents en 13q (associées à des mutations de *FLT3*) sont corrélées à une diminution de la survie globale des LAM chez les adultes (202).

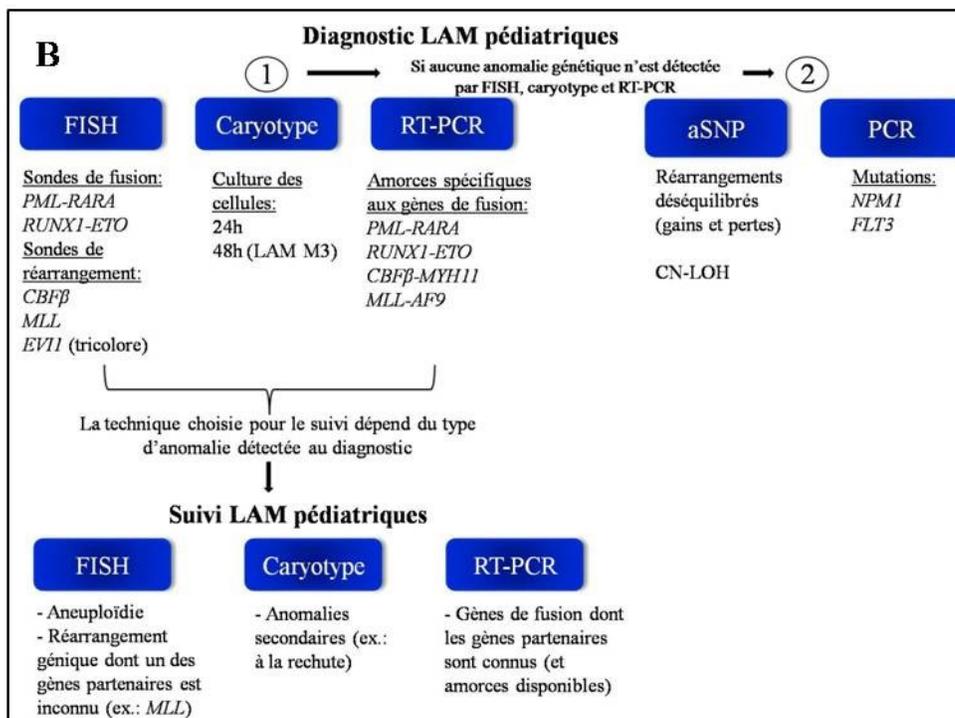
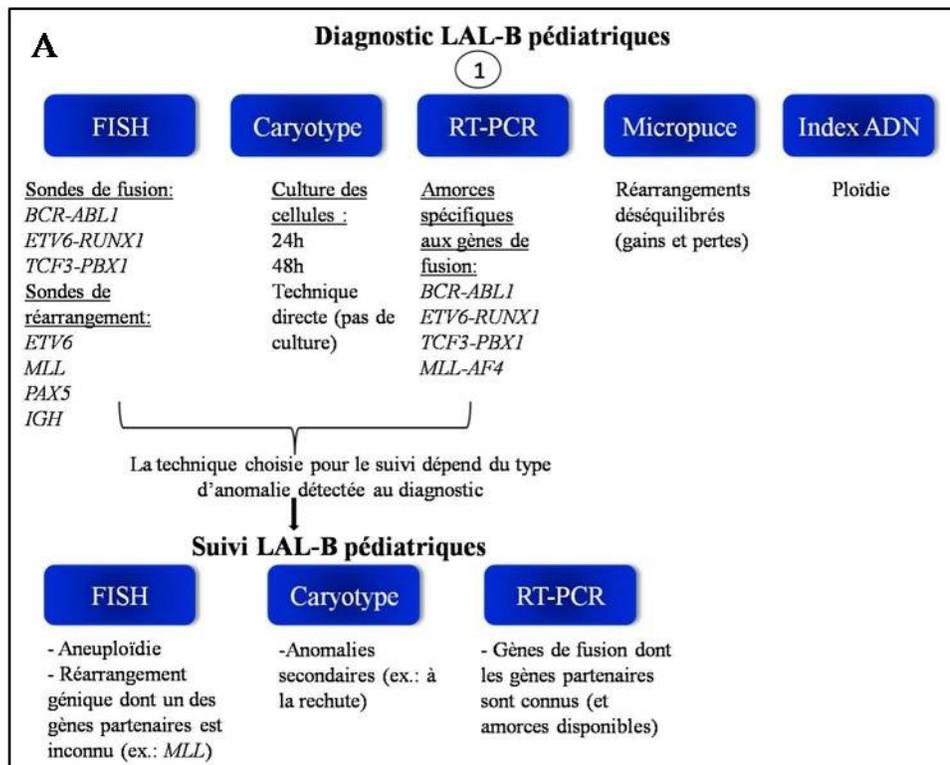


Figure 24. Proposition d'une stratégie d'investigation génomique globale pour le diagnostic et le suivi des LAL-B et des LAM pédiatriques. A. LAL-B. Pour le diagnostic des LAL-B, l'algorithme suggère d'utiliser en parallèle les outils génétiques et cytogénétiques standards (FISH, caryotype, RT-PCR et index d'ADN) et l'aCGH. Cette stratégie permet de réduire le nombre de sondes requises en FISH puisque les gains et les pertes tels que les aneuploïdies (hyperdiploïdie et hypodiploïdie), les délétions (*p16/CDNK2A* et *MYB*) et les amplifications (*RUNX1*) peuvent être détectées par aCGH. Pour le suivi de la maladie résiduelle des LAL-B, la technique choisie dépend des anomalies retrouvées au diagnostic. B. LAM. Pour le diagnostic des LAM, seuls la FISH, le caryotype et la RT-PCR devraient être utilisés en première ligne. Si aucune anomalie n'est détectée, une analyse par micropuce à ADN et par PCR (pour détecter les mutations récurrentes) devrait être entreprise. Pour le suivi de la maladie résiduelle des LAM, la stratégie est la même que pour le suivi des LAL-B.

Outre la stratégie proposée dans la Figure 24, certaines équipes ont suggéré un algorithme séquentiel (en plusieurs étapes distinctes) pour le diagnostic moléculaire des LAL et des LAM (98, 121). En effet, une telle stratégie priorise la détection des anomalies à pronostic défavorable (l'hypodiploïdie, la fusion *BCR-ABL1* et les réarrangements de *MLL* dans les LAL). Cependant, dans l'éventualité où aucune de ces aberrations n'est détectée, des analyses supplémentaires sont requises, retardant le diagnostic génomique final. Une stratégie séquentielle s'avère donc moins appropriée lorsque les traitements doivent être entrepris rapidement ou lorsque les autres critères pronostiques sont peu informatifs.

Aussi, l'intégration des micropuces en clinique serait pertinente pour mieux évaluer l'évolution clonale de l'ensemble des LAL et des LAM pédiatriques lors des rechutes. En effet, le clone à la rechute semble génétiquement distinct du clone au diagnostic (Figure 6) (72, 74, 181). Autant les LAL que les LAM sont caractérisées par une hétérogénéité

clonale au diagnostic et subissent une évolution clonale dynamique lors de la rechute (19, 72, 74). Les nouvelles anomalies génétiques qui apparaissent à la rechute peuvent être influencées et sélectionnées par la chimiothérapie (elle-même mutagénique) et/ou après une greffe de moelle osseuse (74). Actuellement au CHU Sainte-Justine, lors d'une rechute d'une LAL ou d'une LAM pédiatrique, à la fois la FISH (avec une ou des sondes ciblant uniquement l'anomalie détectée au diagnostic) et le caryotype (analysant l'ensemble du génome, mais à faible résolution) sont utilisés. Toutefois, selon les nouveaux modèles de l'évolution clonale (Figure 6B et C), il semble cliniquement pertinent d'ajouter des puces à ADN comme outil génétique à la rechute. Leur utilisation concomitante aux techniques cytogénétiques classiques (caryotype, FISH et RT-PCR) permettrait de détecter adéquatement les anomalies génomiques spécifiques à la rechute et d'évaluer l'architecture clonale complexe qui en découle.

4.7.3 Défis entourant l'analyse des micropuces

Il est important de distinguer les anomalies spécifiques de la tumeur (acquises au niveau des cellules tumorales) des anomalies constitutionnelles (hérités des cellules germinales) (201, 203). Aussi, il est essentiel de ne pas confondre les anomalies pathogéniques des variants retrouvés chez les individus sains (201). Différentes bases de données de variants sont actuellement disponibles, telles que la *Database of Genomic Variants* (DGV) de Toronto (Ontario) et le consortium de l'*International Standard Cytogenomic Array consortium* (ISCA) (183). Cependant, une validation des résultats par d'autres techniques est aussi nécessaire afin de préciser le type d'anomalies détectées par micropuces (126).

La haute résolution des différentes plateformes de puces à ADN permet la détection de CNV de petite taille, mais la valeur pronostique de ces anomalies submicroscopiques est

controversée. L'analyse et l'interprétation des micropuces en oncologie peuvent s'avérer difficiles : une délétion du chromosome 20q de 500kb détectée par aCGH a-t-elle la même valeur pronostique qu'une délétion 20q de plusieurs mégabases (Mb) visible au caryotype ? (204). Similairement à l'interprétation des micropuces en cytogénétique constitutionnelle, plusieurs critères devront être pris en considération afin de distinguer les CNV bénins, les CNV avec une signification clinique incertaine et les CNV pathogéniques, notamment: la région critique minimale (région minimale délétée ou dupliquée), les gènes impliqués (particulièrement les gènes critiques), la taille du CNV et surtout la présence de polymorphismes bénins (DGV) (204). Certaines équipes ont suggéré d'utiliser un échantillon contrôle (peau, cellules épithéliales buccales) pour faciliter cette interprétation (128). Ceci engendre toutefois des coûts et des délais supplémentaires. Il faudrait également établir des seuils minimums (taille des anomalies, nombre minimal de marqueurs requis) pour considérer un CNV pathogénique (par exemple : 200kb pour les pertes, 400kb pour les gains et 5-10 Mb pour les CN-LOH). L'interprétation des résultats peut également s'avérer difficile en raison de l'hétérogénéité clonale, de la ploïdie, de la complexité et de la quantité d'aberrations génomiques détectées par micropuces (125, 128); d'où l'intérêt d'établir des recommandations internationales pour faciliter et uniformiser l'implantation, l'analyse et l'interprétation des nouvelles plateformes de puces à ADN pour le diagnostic des hémopathies malignes.

Par ailleurs, un consortium spécifiquement dédié à l'application des micropuces pour le diagnostic du cancer a été formé en 2009 : le *Cancer Cytogenomics Microarray Consortium* (CCMC) (128). Ce consortium international permet le partage de résultats des micropuces en oncologie via une base de données publique. En partenariat avec l'ACMG, le CCMC établit actuellement des normes sur l'analyse des anomalies génomiques en oncologie avec les puces à ADN.

Conclusions et perspective

En conclusion, notre stratégie, qui consiste à combiner les analyses du caryotype, des panels de la FISH, de la RT-PCR et de l'index d'ADN, a permis d'optimiser la détection des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës pédiatriques au CHU Sainte-Justine. Au total, 253 leucémies *de novo* ont été caractérisées : 186 LAL-B, 27 LAL-T et 40 LAM. Les fréquences d'anomalies chromosomiques obtenues sont optimales dans les trois types de leucémies *de novo* analysés, soit 93,5% dans les LAL-B (174/186), 66,7% dans les LAL-T (18/27) et 90% dans les LAM (36/40). Ceci a contribué à améliorer la prise en charge des patients (diagnostic, stratification du risque et thérapies génétiques ciblées).

Notre étude illustre aussi la pertinence de la FISH pour préciser les points de cassures et les gènes impliqués dans les translocations chromosomiques. Cette caractérisation cytogénétique moléculaire a permis d'identifier trois nouvelles translocations. Un nouveau réarrangement du gène *PAX5* issu d'une t(9;12)(p13;p12) a été observé dans une LAL-B *de novo* (absence de réarrangement du gène *ETV6* en 12p13). Dans un deuxième patient atteint d'une LAL-B *de novo*, nous avons détecté une nouvelle t(2;14)(p16;q32). Par FISH, nous avons montré l'absence de réarrangement des gènes habituellement impliqués dans cette translocation, soit *IGH* en 14q32 et *BCL11A* en 2p16.1. Nous avons délimité la région des points de cassures pour chacun des chromosomes (entre le BAC RP11-842N8 en 2p13.3 et le BAC RP11-416L21 en 2p16.1 et point de cassure plus centromérique que le BAC RP11-809D14 en 14q32.13). Nous avons identifié des gènes candidats pertinents (*MEIS1* en 2p14, *XPO1* en 2p15 et *CALM1* en 14q32.11).

Nous avons aussi identifié un nouveau gène de fusion *ETV6-FOXO1* issu d'une translocation t(12;13)(p13;q14) dans une LAM M1 *de novo*. Bien que les translocations impliquant le gène *FOXO1* (13q14.11) soient récurrentes dans le rhabdomyosarcome alvéolaire, une tumeur solide, il s'agit du premier cas de réarrangement de ce gène dans les

LAM pédiatriques. Les caractérisations des anomalies rares ont permis de préciser le diagnostic ou le pronostic des patients et faciliteront le suivi de la maladie résiduelle grâce à l'identification d'un ou des gènes impliqués.

En comparant les taux de rechutes et de survie globale des patients atteints de LAL-B présentant la fusion *ETV6-RUNX1* ou de l'hyperdiploïdie, nous avons montré que la présence d'anomalies chromosomiques secondaires additionnelles à ces deux anomalies primaires n'influence pas le pronostic ($p > 0,05$, test chi-deux de Pearson). Nos résultats suggèrent la présence d'une nouvelle entité à pronostic défavorable : les LAL-B pédiatriques avec hyperdiploïdie au sein d'un caryotype complexe (EFS significativement réduite par rapport aux patients avec hyperdiploïdie seule, $p < 0,001$, test log rank de Mantel-Cox). Il faudrait toutefois vérifier la valeur pronostique de ces anomalies concomitantes (hyperdiploïdie au sein d'un caryotype complexe) sur un plus grand nombre de patients atteints de LAL-B.

En perspective, nous proposons d'intégrer les micropuces en hématologie clinique afin de détecter les anomalies cryptiques essentielles au diagnostic, au pronostic et pour orienter les thérapies dans les LAL et les LAM pédiatriques.

Bibliographie

1. Comité directeur de la Société canadienne du cancer: Statistiques canadiennes sur le cancer 2011. Toronto: Société canadienne du cancer. ISSN 0835-2976; Mai 2011.
2. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010 Jun;36(4):277-85.
3. Jaffe ES, Vardiman J, Campo E, Arber DMD, Harris NL. *Hematopathology*. 1st ed. Philadelphie: Saunders, Elsevier; 2011.
4. Hsi ED. *Hematopathology*. Goldblum JR, editor. Philadelphie: Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
5. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 12.
6. Marcoux S. Childhood acute lymphoblastic leukemia and related neuropsychological problems: current knowledge overview. *Médecine Sciences Amérique.* 2012;1(1):84-97.
7. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 10;29(5):551-65.
8. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2003 Sep;3(9):639-49.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
11. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr;10(4):232-3.
12. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009 Jul;30(7):1073-81.

13. Shaffer L, Slovak M, Campbell L. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.
14. Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature: Karger; 2013.
15. Weinberg RA. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2007.
16. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics. Third ed. New Jersey: Wiley-Blackwell 2009.
17. Klassen CD. Toxicology, The Basic Science of Poisons. 7th ed. Kansas city: Casarett and Doull's; 2008.
18. Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman Lecture. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:3-12.
19. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jun;56(6):984-93.
20. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012 Feb 2.
21. Sherborne AL, Hemminki K, Kumar R, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, et al. Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1049-54.
22. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009 Sep;41(9):1006-10.
23. Bernard O. [Mechanisms of leucemogenesis]. *Bull Cancer*. 2010 Nov;97(11):1381-8.
24. Forestier E, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgstrom G, Golovleva I, et al. Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 May;46(5):440-50.
25. Bungaro S, Irving J, Tussiwand R, Mura R, Minto L, Molteni C, et al. Genomic analysis of different clonal evolution in a twin pair with t(12;21) positive acute lymphoblastic leukemia sharing the same prenatal clone. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):208-11.

26. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, et al. Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3553-8.
27. Borst L, Wesolowska A, Joshi T, Borup R, Nielsen FC, Andersen MK, et al. Genome-wide analysis of cytogenetic aberrations in ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012 May;157(4):476-82.
28. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758-64.
29. Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, et al. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug 15;19(16):3150-8.
30. Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, et al. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):368-9; author reply 70-1.
31. Bueno C, Montes R, Catalina P, Rodriguez R, Menendez P. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):400-10.
32. Balgobind BV, Zwaan CM, Pieters R, Van den Heuvel-Eibrink MM. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1239-48.
33. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Knight D, Kearney L, Slany R, Greaves M. MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Aug;45(8):754-60.
34. Gruhn B, Taub JW, Ge Y, Beck JF, Zell R, Hafer R, et al. Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. *Leukemia*. 2008 Sep;22(9):1692-7.
35. Maia AT, Tussiwand R, Cazzaniga G, Rebullia P, Colman S, Biondi A, et al. Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 May;40(1):38-43.
36. Davidsson J, Lilljebjorn H, Andersson A, Veerla S, Heldrup J, Behrendtz M, et al. The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hum Mol Genet*. 2009 Nov 1;18(21):4054-65.

37. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Aug;48(8):637-60.
38. Richardson RB. Promotional etiology for common childhood acute lymphoblastic leukemia: the infective lymphoid recovery hypothesis. *Leuk Res*. 2011 Nov;35(11):1425-31.
39. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev*. 2010 Jun;36(4):286-97.
40. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997 Feb 1;349(9048):344-9.
41. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet*. 2011 May;204(5):227-44.
42. Fonatsch C. The role of chromosome 21 in hematology and oncology. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 Jun;49(6):497-508.
43. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues . 2008. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
44. Ross JA. Environmental and genetic susceptibility to MLL-defined infant leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008(39):83-6.
45. O'Neill KA, Bunch KJ, Vincent TJ, Spector LG, Moorman AV, Murphy MF. Immunophenotype and cytogenetic characteristics in the relationship between birth weight and childhood leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Jan;58(1):7-11.
46. Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 1;30(7):751-7.
47. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*. 2010 Jun;42(6):492-4.
48. Sermage-Faure C, Demoury C, Rudant J, Goujon-Bellec S, Guyot-Goubin A, Deschamps F, et al. Childhood leukaemia close to high-voltage power lines--the Geocap study, 2002-2007. *Br J Cancer*. 2013 May 14;108(9):1899-906.
49. Teepen JC, van Dijk JA. Impact of high electromagnetic field levels on childhood leukemia incidence. *Int J Cancer*. 2012 Aug 15;131(4):769-78.

50. Hegger C, Reedijk AM. [Childhood leukaemia in a residential area with a high-voltage power line: approach according to the Dutch Community Health Services' guideline 'Cancer Clusters']. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2013;157(1):A5485.
51. Scelo G, Metayer C, Zhang L, Wiemels JL, Aldrich MC, Selvin S, et al. Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. *Environ Health Perspect*. 2009 Jan;117(1):133-9.
52. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar;13(3):189-203.
53. Fukasawa K. P53, cyclin-dependent kinase and abnormal amplification of centrosomes. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1786(1):15-23.
54. Gisselsson D, Jin Y, Lindgren D, Persson J, Gisselsson L, Hanks S, et al. Generation of trisomies in cancer cells by multipolar mitosis and incomplete cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20489-93.
55. Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:175-98.
56. Testa U. Leukemia stem cells. *Ann Hematol*. 2011 Mar;90(3):245-71.
57. Payne KJ, Dovat S. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):3-12.
58. Swiers G, de Bruijn M, Speck NA. Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1151-63.
59. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol*. 2007 May;86(5):311-27.
60. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.
61. Clarke S, O'Reilly J, Romeo G, Cooney J. NUP214-ABL1 positive T-cell acute lymphoblastic leukemia patient shows an initial favorable response to imatinib therapy post relapse. *Leuk Res*. 2011 Jul;35(7):e131-3.
62. Braham-Jmili N, Sendi-Senana H, Labiadh S, Ben Abdelali R, Ben Abdelaziz A, Khelif A, et al. [Haematological characteristics, FAB and WHO classification of 153 cases of myeloid acute leukaemia in Tunisia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006 Sep-Oct;64(5):457-65.

63. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2682-9.
64. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. [database on the Internet]. Available from: <http://AtlasGeneticsOncology.org>.
65. Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical Cytogenetics in Pediatric Acute Leukemia: An Update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012 May 18.
66. Karrman K, Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, et al. Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Sep;48(9):795-805.
67. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009 Aug;23(8):1490-9.
68. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J*. 2010 Apr;277(8):1822-31.
69. Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7102-11.
70. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):591-9.
71. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):823-33.
72. Notta F, Mullighan CG, Wang JC, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):362-7.
73. Graubert TA, Mardis ER. Genomics of acute myeloid leukemia. *Cancer J*. 2011 Nov-Dec;17(6):487-91.
74. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012 Jan 26;481(7382):506-10.

75. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008 Nov 28;322(5906):1377-80.
76. Gudgin EJ, Huntly BJ. Acute myeloid leukemia: leukemia stem cells write a prognostic signature. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(2):21.
77. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*. 2011 Sep;17(9):1086-93.
78. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):532-43.
79. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia*. 2005 May;19(5):734-40.
80. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010 May;11(5):429-38.
81. Cooper TM, Razzouk BI, Gerbing R, Alonzo TA, Adlard K, Raetz E, et al. Phase I/II trial of clofarabine and cytarabine in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (AAML0523): A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jan 17.
82. Hagedorn N, Acquaviva C, Fronkova E, von Stackelberg A, Barth A, zur Stadt U, et al. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of "isolated" and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4022-9.
83. Dreyer ZE, Dinndorf PA, Camitta B, Sather H, La MK, Devidas M, et al. Analysis of the role of hematopoietic stem-cell transplantation in infants with acute lymphoblastic leukemia in first remission and MLL gene rearrangements: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(2):214-22.
84. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Peters C, Hann I, et al. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2644-50.

85. Fuka G, Kauer M, Kofler R, Haas OA, Panzer-Grumayer R. The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26348.
86. Sam TN, Kersey JH, Linabery AM, Johnson KJ, Heerema NA, Hilden JM, et al. MLL gene rearrangements in infant leukemia vary with age at diagnosis and selected demographic factors: A Children's Oncology Group (COG) study. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Jun;58(6):836-9.
87. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr*. 2009 Feb;21(1):1-8.
88. Sulong S, Moorman AV, Irving JA, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):100-7.
89. Bertin R, Acquaviva C, Mirebeau D, Guidal-Giroux C, Vilmer E, Cave H. CDKN2A, CDKN2B, and MTAP gene dosage permits precise characterization of mono- and bi-allelic 9p21 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May;37(1):44-57.
90. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6848-55.
91. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, et al. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia*. 2003 Nov;17(11):2249-50.
92. Brown A, Niggli F, Hengartner H, Caflisch U, Nobile L, Kuhne T, et al. Characterization of high-hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia with gain of a single chromosome 21. *Leuk Lymphoma*. 2007 Dec;48(12):2457-60.
93. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):1049-57.
94. Zemanova Z, Michalova K, Sindelarova L, Smisek P, Brezinova J, Ransdorfova S, et al. Prognostic value of structural chromosomal rearrangements and small cell clones with high hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2005 Mar;29(3):273-81.
95. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, Robert A, Genevieve F, Kuhlein E, et al. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *Int J Lab Hematol*. 2010 Jun;32(3):288-98.

96. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1112-5.
97. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(5):552-9.
98. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Br J Haematol*. 2010 Oct;151(2):132-42.
99. Martinez-Ramirez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA, et al. Fluorescence in situ hybridization study of TEL/AML1 fusion and other abnormalities involving TEL and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children with acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2001 Dec;86(12):1245-53.
100. Alvarez Y, Coll MD, Ortega JJ, Bastida P, Dastugue N, Robert A, et al. Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 Oct 1;162(1):21-9.
101. Attarbaschi A, Mann G, Konig M, Dworzak MN, Trebo MM, Muhlegger N, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia*. 2004 Oct;18(10):1611-6.
102. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, Kaindl U, Krapf G, Inthal A, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2658-67.
103. Peter A, Heiden T, Taube T, Korner G, Seeger K. Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses--analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. *Eur J Haematol*. 2009 Nov;83(5):420-32.
104. Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009 Jan;46(1):16-23.
105. Kuchinskaya E, Heyman M, Nordgren A, Soderhall S, Forestier E, Wehner P, et al. Interphase fluorescent in situ hybridization deletion analysis of the 9p21 region and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from a prospective

analysis of 519 Nordic patients treated according to the NOPHO-ALL 2000 protocol. *Br J Haematol.* 2011 Mar;152(5):615-22.

106. Hagemeijer A, Graux C. ABL1 rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Apr;49(4):299-308.

107. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012 Jan 12;481(7380):157-63.

108. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):233-45.

109. Frohling S, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med.* 2008 Aug 14;359(7):722-34.

110. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1;28(16):2674-81.

111. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood.* 2009 Sep 17;114(12):2489-96.

112. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2012 May;26(3):123-35.

113. Usvasalo A, Raty R, Harila-Saari A, Koistinen P, Savolainen ER, Vettenranta K, et al. Acute lymphoblastic leukemias with normal karyotypes are not without genomic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Jul;192(1):10-7.

114. Dawson AJ, Yanofsky R, Vallente R, Bal S, Schroedter I, Liang L, et al. Array comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis in pediatric acute leukemias. *Curr Oncol.* 2011 Oct;18(5):e210-7.

115. Olde Nordkamp L, Mellink C, van der Schoot E, van den Berg H. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009 Dec;31(12):930-5.

116. Canadian college of medical geneticists (CCMG), cytogenetics committee: CCMG Practice guidelines for cytogenetics analysis. C. Recommendations for the indications, analysis and reporting of cancer specimens. Ottawa, Canada: 2010.

117. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007 Apr;9(2):134-43.
118. Zhou Y, You MJ, Young KH, Lin P, Lu G, Medeiros LJ, et al. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol.* 2012 May 8.
119. Keefe JG, Sukov WR, Knudson RA, Nguyen LP, Williamson C, Sinnwell JP, et al. Development of five dual-color, double-fusion fluorescence in situ hybridization assays for the detection of common MLL translocation partners. *J Mol Diagn.* 2010 Jul;12(4):441-52.
120. Bruggemann M, Gokbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol.* 2012 Feb;39(1):47-57.
121. Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1333-41.
122. Safavi S, Forestier E, Golovleva I, Barbany G, Nord KH, Moorman AV, et al. Loss of chromosomes is the primary event in near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2012 Aug 14.
123. Kowalczyk JR, Babicz M, Gaworczyk A, Lejman M, Winnicka D, Styka B, et al. Structural and numerical abnormalities resolved in one-step analysis: the most common chromosomal rearrangements detected by comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Jul 15;200(2):161-6.
124. Ballabio E, Regan R, Garimberti E, Harbott J, Bradtke J, Teigler-Schlegel A, et al. Genomic imbalances are confined to non-proliferating cells in paediatric patients with acute myeloid leukaemia and a normal or incomplete karyotype. *PLoS One.* 2011;6(6):e20607.
125. Dougherty MJ, Wilmoth DM, Tooke LS, Shaikh TH, Gai X, Hakonarson H, et al. Implementation of high resolution single nucleotide polymorphism array analysis as a clinical test for patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet.* 2011 Jan;204(1):26-38.
126. Mullighan CG. Single nucleotide polymorphism microarray analysis of genetic alterations in cancer. *Methods Mol Biol.* 2011;730:235-58.
127. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, et al. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010 Sep;95(9):1481-8.
128. Simons A, Sikkema-Raddatz B, de Leeuw N, Konrad NC, Hastings RJ, Schoumans J. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum Mutat.* 2012 Jun;33(6):941-8.

129. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4552-60.
130. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2731-9.
131. Waber DP, McCabe M, Sebree M, Forbes PW, Adams H, Alyman C, et al. Neuropsychological outcomes of a randomized trial of prednisone versus dexamethasone in acute lymphoblastic leukemia: findings from Dana-Farber Cancer Institute All Consortium Protocol 00-01. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Nov;60(11):1785-91.
132. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):320-34.
133. Vrooman LM, Neuberg DS, Stevenson KE, Asselin BL, Athale UH, Clavell L, et al. The low incidence of secondary acute myelogenous leukaemia in children and adolescents treated with dexrazoxane for acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. *Eur J Cancer*. 2011 Jun;47(9):1373-9.
134. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):896-904.
135. Swansbury J. *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press inc.
136. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Third ed. Barch MJ KT, Spurbeck JL, editor. Philadelphie (États-Unis): Lippincott-Raven; 1997.
137. Lemieux N, Drouin R, Richer CL. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum Genet*. 1990 Aug;85(3):261-6.
138. Vance GH, Kim H, Hicks GA, Cherry AM, Higgins R, Hulshizer RL, et al. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900). *Leuk Res*. 2007 May;31(5):605-9.
139. Castagne C, Muhlematter D, Beyer V, Parlier V, van Melle G, Jotterand M. Determination of cutoff values to detect small aneuploid clones by interphase fluorescence in situ hybridization: the Poisson model is a more appropriate approach. Should single-cell trisomy 8 be considered a clonal defect? *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Dec;147(2):99-109.

140. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto KJ, Majid A, Walewska R, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3451-61.
141. Han Y, Xue Y, Zhang J, Wu Y, Pan J, Wang Y, et al. Translocation (14;14)(q11;q32) with simultaneous involvement of the IGH and CEBPE genes in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 Dec;187(2):125-9.
142. Dyer MJ, Akasaka T, Capasso M, Dusanj P, Lee YF, Karran EL, et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood*. 2010 Feb 25;115(8):1490-9.
143. Soszynska K, Mucha B, Debski R, Skonieczka K, Duszenko E, Koltan A, et al. The application of conventional cytogenetics, FISH, and RT-PCR to detect genetic changes in 70 children with ALL. *Ann Hematol*. 2008 Dec;87(12):991-1002.
144. Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lab Med*. 2011 Dec;31(4):631-47, ix.
145. Kwon WK, Lee JY, Mun YC, Seong CM, Chung WS, Huh J. Clinical utility of FISH analysis in addition to G-banded karyotype in hematologic malignancies and proposal of a practical approach. *Korean J Hematol*. 2010 Sep;45(3):171-6.
146. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Br J Haematol*. 2005 May;129(4):520-30.
147. Kuhn A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol*. 2012 Aug;96(2):153-63.
148. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2011 Jan;25(1):39-51.
149. Talamo A, Chalandon Y, Marazzi A, Jotterand M. Clonal heterogeneity and chromosomal instability at disease presentation in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):209-14.
150. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):926-35.

151. Haferlach C, Rieder H, Lillington DM, Dastugue N, Hagemeijer A, Harbott J, et al. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 May;46(5):494-9.
152. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, et al. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4559-66.
153. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1165-74.
154. Chiaretti S, Foa R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2009 Feb;94(2):160-2.
155. Cardoso BA, de Almeida SF, Laranjeira AB, Carmo-Fonseca M, Yunes JA, Coffey PJ, et al. TAL1/SCL is downregulated upon histone deacetylase inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2011 Oct;25(10):1578-86.
156. Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Poppe B, Herens C, De Paepe A, et al. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia*. 2006 Jul;20(7):1238-44.
157. Homminga I, Pieters R, Meijerink JP. NKL homeobox genes in leukemia. *Leukemia*. 2012 Apr;26(4):572-81.
158. Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, Richards SM, Buck G, DeWald G, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5136-45.
159. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006 Jan;8(1):16-23.
160. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, Ketterling RP, Olson SB, Quigley DI, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):667-75.
161. Tanaka K, Arif M, Eguchi M, Shintani T, Kumaravel TS, Asaoku H, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization overcomes pitfalls of G-banding analysis with special reference to underestimation of chromosomal aberration rates. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 Nov;115(1):32-8.

162. Smoley SA, Van Dyke DL, Kay NE, Heerema NA, Dell' Aquila ML, Dal Cin P, et al. Standardization of fluorescence in situ hybridization studies on chronic lymphocytic leukemia (CLL) blood and marrow cells by the CLL Research Consortium. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Dec;203(2):141-8.
163. Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Disease-associated patterns of disomic chromosomes in hyperhaploid neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Jun;51(6):536-44.
164. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012 Oct 1;122(10):3398-406.
165. Fazio G, Palmi C, Rolink A, Biondi A, Cazzaniga G. PAX5/TEL acts as a transcriptional repressor causing down-modulation of CD19, enhances migration to CXCL12, and confers survival advantage in pre-BI cells. *Cancer Res.* 2008 Jan 1;68(1):181-9.
166. Strefford JC, An Q, Harrison CJ. Modeling the molecular consequences of unbalanced translocations in cancer: lessons from acute lymphoblastic leukemia. *Cell Cycle.* 2009 Jul 15;8(14):2175-84.
167. Vundinti BR, Korgaonkar S, Kerketta L, Ghosh K. A rare case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with t(2;14)(p13;q32), +X, +11, +12, +13,+der(1p) karyotype. *Indian J Cancer.* 2011 Jul-Sep;48(3):387-8.
168. Wehrli LA, Braun J, Buetti LN, Hagleitner N, Hengartner H, Kuhne T, et al. Non-classical karyotypic features in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Feb;189(1):29-36.
169. Yin CC, Lin KI, Ketterling RP, Knudson RA, Medeiros LJ, Barron LL, et al. Chronic lymphocytic leukemia With t(2;14)(p16;q32) involves the BCL11A and IgH genes and is associated with atypical morphologic features and unmutated IgVH genes. *Am J Clin Pathol.* 2009 May;131(5):663-70.
170. Kerketta L, Vundinti BR, Ghosh K. Translocation t(2;14)(p13;q32) in a case of Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Hum Genet.* 2007 Sep;13(3):125-6.
171. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [database on the Internet] 2013. Available from: <http://omim.org/entry/136533>.
172. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2002 Jun 1;20(11):2672-9.

173. Xie L, Ushmorov A, Leithauser F, Guan H, Steidl C, Farbinger J, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3503-11.
174. Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, et al. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood*. 1999 Feb 1;93(3):1025-31.
175. Giguere A, Hebert J. CLCA2, a novel RUNX1 partner gene in a therapy-related leukemia with t(1;21)(p22;q22). *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Oct 15;202(2):94-100.
176. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjorn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21719-24.
177. Charrin C, Thomas X, Ffrench M, Le QH, Andrieux J, Mozziconacci MJ, et al. A report from the LALA-94 and LALA-SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2444-51.
178. Al-Shehhi H, Konn ZJ, Schwab CJ, Erhorn A, Barber KE, Wright SL, et al. Abnormalities of the der(12)t(12;21) in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Feb;52(2):202-13.
179. Barbany G, Andersen MK, Autio K, Borgstrom G, Franco LC, Golovleva I, et al. Additional aberrations of the ETV6 and RUNX1 genes have no prognostic impact in 229 t(12;21)(p13;q22)-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias treated according to the NOPHO-ALL-2000 protocol. *Leuk Res*. 2012 Jul;36(7):936-8.
180. Lilljebjorn H, Rissler M, Lassen C, Heldrup J, Behrendtz M, Mitelman F, et al. Whole-exome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011 Nov 18.
181. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):356-61.
182. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempinski H, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6247-54.
183. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010 Nov;12(11):742-5.

184. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):680-5.
185. CCMG Position Statement: Use of array genomic hybridization technology in constitutional genetic diagnosis in Canada. September 22, 2009.
186. CCMG Guidelines for genomics microarray testing. Ottawa, Canada: July 13, 2010.
187. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):749-64.
188. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*. 2011 Sep;43(9):838-46.
189. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med*. 2011 Sep;13(9):777-84.
190. Kuchinskaya E, Heyman M, Nordgren A, Schoumans J, Staaf J, Borg A, et al. Array-CGH reveals hidden gene dose changes in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal or failed karyotype by G-banding. *Br J Haematol*. 2008 Mar;140(5):572-7.
191. King RL, Naghashpour M, Watt CD, Morrissette JJ, Bagg A. A comparative analysis of molecular genetic and conventional cytogenetic detection of diagnostically important translocations in more than 400 cases of acute leukemia, highlighting the frequency of false-negative conventional cytogenetics. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jun;135(6):921-8.
192. Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, Akkaya B, Luleci G, Salim O, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of adult acute leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Mar;197(2):122-9.
193. Watanabe N, Kobayashi H, Ichiji O, Yoshida MA, Kikuta A, Komada Y, et al. Cryptic insertion and translocation or nondividing leukemic cells disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia*. 2003 May;17(5):876-82.
194. Cazzaniga G, van Delft FW, Lo Nigro L, Ford AM, Score J, Iacobucci I, et al. Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in

- monozygotic twins with Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Nov 17;118(20):5559-64.
195. Simons A, Stevens-Kroef M, El Idrissi-Zaynoun N, van Gessel S, Weghuis DO, van den Berg E, et al. Microarray-based genomic profiling as a diagnostic tool in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Dec;50(12):969-81.
196. van Galen JC, Kuiper RP, van Emst L, Levers M, Tijchon E, Scheijen B, et al. BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4810-9.
197. Fielding AK, Banerjee L, Marks DI. Recent developments in the management of T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Jun;7(2):160-9.
198. Shaffer LG, Schultz RA, Ballif BC. The use of new technologies in the detection of balanced translocations in hematologic disorders. *Curr Opin Genet Dev*. 2012 Jun;22(3):264-71.
199. Greisman HA, Hoffman NG, Yi HS. Rapid high-resolution mapping of balanced chromosomal rearrangements on tiling CGH arrays. *J Mol Diagn*. 2011 Nov;13(6):621-33.
200. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):776-84.
201. Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood*. 2010 May 27;115(21):4157-61.
202. Bullinger L, Kronke J, Schon C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):438-49.
203. Walter MJ, Graubert TA, Dipersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ. Next-generation sequencing of cancer genomes: back to the future. *Per Med*. 2009 Nov 1;6(6):653.
204. Itzhar N, Dessen P, Toujani S, Auger N, Preudhomme C, Richon C, et al. Chromosomal minimal critical regions in therapy-related leukemia appear different from those of de novo leukemia by high-resolution aCGH. *PLoS One*. 2011;6(2):e16623.

Annexe 1: Préparation des solutions pour la FISH

2X SSC (100 mL)

Mesurer 10 mL de solution 20X SSC (solution mère au réfrigérateur contenant du NaCl et du citrate de sodium dihydrate).

Ajouter 90 mL d'eau déionisée.

Ajuster le pH à 7,0 en ajoutant du HCl 1N.

Filtrer avec un filtre de 0,22 μ et conserver la solution dans une bouteille identifiée au réfrigérateur à 4°C.

PBS (150 mL)

A) Na₂HPO₄

Mesurer 75 mL d'eau déionisée.

Peser 2,13g de Na₂HPO₄ et l'ajouter dans l'eau. Agiter jusqu'à dissolution complète.

B) NaCl

Mesurer 75 mL d'eau déionisée.

Peser 1,298g de NaCl et l'ajouter dans l'eau. Agiter jusqu'à dissolution complète. Transférer dans un bécher de 250 mL.

C) Na₂HPO₄ + NaCl

Mesurer 12 mL de NaH₂PO₄ 0,2M (solution stock au réfrigérateur).

Ajouter 61 mL du Na₂HPO₄ dissout préparé à l'étape A.

Transférer dans le bécher de 250 mL contenant le NaCl dissout.

Ajuster le pH à 7.3:

Si le pH < 7.3, ajouter quelques gouttes de Na₂HPO₄ dissout

Si le pH > 7.3, ajouter quelques gouttes de NaH₂PO₄ 0.2M (solution stock au réfrigérateur)

Filtrer avec un filtre de 0,22µ et conserver la solution de PBS dans une bouteille identifiée au réfrigérateur à 4°C.

Formaldéhyde (40 mL)

Sous la hotte, mesurer 1 mL de formaldéhyde (Sigma).

Ajouter 39 mL de PBS filtré à pH 7.3.

Couvrir de parafilm et mélanger par inversion. Transférer dans un bain de plastique et conserver à température ambiante.

Pepsine (40 mL; à préparer à la dernière minute, ne se conserve pas)

Mesurer 40 mL de HCl 0,01 N.

Ajouter 20 µL de pepsine (Sigma) et bien mélanger.

0,4X SSC +Tween 0,3% (500 mL)

Mesurer 490 mL d'eau déionisée et ajouter 10 mL de 20X SSC (solution stock au réfrigérateur).

Ajouter doucement 500 µL de Tween 20.

Mélanger et ajuster le pH à 7,0 en ajoutant du HCl 0,1N.

Filtrer avec un filtre de 0,22 μ et conserver la solution dans une bouteille identifiée au réfrigérateur à 4°C.

2X SSC +Tween 0,1% (500 mL)

Mesurer 450 mL d'eau déionisée et ajouter 50 mL de 20X SSC.

Ajouter 500 μ L de Tween 20.

Mélanger et ajuster le pH à 7,0 en ajoutant du HCl 1N.

Filtrer avec un filtre de 0,22 μ et conserver la solution dans une bouteille identifiée au réfrigérateur à 4°C

Annexe 2 : Article publié dans Médecine Sciences Amérique, 2012

Médecine Sciences Amérique, 2012, Volume 1, Numéro 1, Numéro spécial 79^e congrès de l'Association francophone pour le savoir (ACFAS), pages 122-136. www.msamerique.ca

Mise en évidence des facteurs cytogénétiques influençant le pronostic et le choix thérapeutique dans les leucémies aiguës pédiatriques

Strategy to detect genomic abnormalities essential for the prognosis and therapeutic choices in childhood acute leukemia

Mélanie Roy-Tourangeau^{1,2}, Nicole Lemieux^{1,2}, Raouf Fetni^{1,2}.

¹Département de pathologie et Centre de recherche, CHU Sainte-Justine
3175, Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec) Canada H3T 1C5

²Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine
Université de Montréal
2900, boul. Édouard-Montpetit
Montréal (Québec) Canada H3T 1J4

Auteur de correspondance :
Dr Raouf Fetni, PhD
Tél.: (514) 345-4931 poste 2481
Fax : (514) 345-4819

Contributions des auteurs :
Le premier auteur de cet article de revue (Roy-Tourangeau, M) a effectué la revue de littérature et a écrit le manuscrit. Fetni, R et Lemieux N ont donné des commentaires constructifs et ont corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont approuvé la version finale de l'article. Cet article a été rédigé à la demande de la rédactrice en chef de Médecine Sciences Amérique, la docteure Danielle Jacques.

Article reçu le : 16/08/2011
Article accepté le : 21/12/2011

Résumé

Les anomalies chromosomiques récurrentes dans les leucémies aiguës pédiatriques sont détectées par caryotype, hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), RT-PCR et index d'ADN. Ces analyses sont essentielles pour établir le diagnostic, le pronostic et pour orienter la thérapie des hémopathies malignes. Les micropuces sont actuellement utilisées en cytogénétique chez les individus atteints de retard mental, mais aucune norme ne fait consensus sur leur intégration en hématologie. Récemment, les études d'associations pangénomiques (GWAS) ont identifié des microdélétions, des microduplications et des pertes d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies (CN-LOH) pertinentes pour le diagnostic et/ou le pronostic des leucémies. Dans cette revue, nous discuterons de l'apport et de l'intégration des micropuces, avec les autres outils cytogénétiques, pour la détection des anomalies génomiques ayant une valeur pronostique importante.

Mots clés : cytogénétique clinique, leucémie, micropuces, anomalies chromosomiques, FISH.

Summary

Recurrent chromosomal abnormalities in childhood acute leukemia are detected by karyotyping, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), RT-PCR and DNA index. Those cytogenetic tests are essential for the diagnosis, prognosis and therapeutic choices in hematopoietic malignancies. DNA microarray analysis is currently used in cytogenetic for the evaluation of mental retardation and developmental delay. Nevertheless, there is no consensus about the use of microarrays in the clinical diagnosis of hematopoietic malignancies. Recently, Genome-wide Association Studies (GWAS) have identified some recurrent microdeletions, microduplications and copy neutral loss of heterozygosity (CN-LOH) relevant for the diagnosis and/or the outcome of paediatric acute leukemia. In this review, we will discuss the contribution and the integration of microarrays, in addition to standard cytogenetic tools, for the detection of genomic abnormalities having an important prognostic value.

Key words: cytogenetic, acute leukemia, microarrays, chromosomal abnormalities, FISH.

Intérêt de la détection des anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes

La leucémie aiguë est le cancer pédiatrique le plus fréquent. Elle représente 31,5% des tumeurs chez les enfants de moins de 14 ans (1). Plusieurs anomalies chromosomiques récurrentes sont impliquées dans l'initiation ou la progression tumorale. Plus spécifiquement, la majorité des leucémies aiguës pédiatriques sont caractérisées par des translocations entre deux chromosomes qui génèrent des gènes de fusion ou dérèglent l'expression normale de gènes impliqués dans des processus clés de l'hématopoïèse tels que le cycle cellulaire, la différenciation, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose. Au plan clinique, la cytogénétique est essentielle pour établir le diagnostic et/ou le pronostic et par conséquent pour orienter la thérapie des hémopathies malignes.

Diagnostic des leucémies aiguës pédiatriques

Tout d'abord, outre les critères cliniques tels que l'âge, la morphologie, le pourcentage de blastes et l'immunophénotype, la classification 2008 des hémopathies malignes de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) inclut également les caractéristiques génétiques de la leucémie (2). Cette classification fait l'objet d'un consensus mondial utilisé par les cliniciens pour le diagnostic et le pronostic des leucémies. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B, l'anomalie numérique la plus fréquente est l'hyperdiploïdie (25% des cas) et l'anomalie structurale la plus fréquente est la translocation pathognomonique $t(12;21)(p13;q22)$. Cette dernière génère le gène de fusion *ETV6-RUNX1* (25% des cas) (3). Les LAL-T sont caractérisées par des réarrangements de gènes récepteurs des cellules T, principalement le gène *TCRA/D* (14q11) ou le *TCRB* (7q34), retrouvés dans environ 20 à 30% des cas (4). Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les réarrangements du gène *MLL* (11q23) constituent les anomalies les plus prévalentes, présentes dans environ 18% des LAM pédiatriques (3, 5). Actuellement, plus de 60 différents gènes partenaires de *MLL* ont été identifiés et l'on retrouve ces translocations dans divers types d'hémopathies malignes, autant dans les LAM et LAL *de novo* (nouveau diagnostic) que dans les leucémies induites par la thérapie (inhibiteurs de la topoisomérase II) (6). Les translocations $t(4;11)(q21;q23)$ (fusion *MLL-AF4*) et la

t(9;11)(p22;q23) (fusion *MLL-AF9*) sont les plus fréquentes dans les LAL et les LAM respectivement (*Figure 1*).

Pronostic et thérapies des leucémies aiguës pédiatriques

Des études portant sur de grandes cohortes de patients de LAL et de LAM pédiatriques ont permis d'établir la valeur pronostique des anomalies chromosomiques récurrentes. En outre, un rôle important de la cytogénétique est d'orienter le choix du traitement afin qu'il soit le plus adapté possible au profil génétique des cellules leucémiques de chaque patient.

Tout d'abord, la détection des anomalies chromosomiques ayant une valeur pronostique connue permet d'améliorer la stratification du risque des patients (risque faible, intermédiaire ou élevé). Ceci influence les décisions thérapeutiques telles que l'intensification et la durée des cycles de chimiothérapie (7). Par exemple, une hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes (sans anomalie secondaire additionnelle), particulièrement en présence des trisomies 4, 10 et 17, est associée à un très bon pronostic dans les LAL (8) (*Figure 2D*). Par conséquent, si les autres facteurs cliniques sont également de pronostic favorable, une chimiothérapie moins agressive est indiquée. Par contre, les LAL qui présentent un réarrangement du gène *MLL* constituent une catégorie à haut risque avec des tumeurs très agressives, spécialement chez les enfants de moins de quatre ans (9). En effet, le taux de survie sans événement (EFS – *event free survival*) à 5 ans des bébés présentant un réarrangement de *MLL* est estimé de 30 à 40%, et ce, malgré une chimiothérapie intensive (3). Par conséquent, une greffe de moelle osseuse (ou une greffe de cellules-souches hématopoïétiques) est alors recommandée.

La cytogénétique a aussi contribué à la mise au point de thérapies ciblées qui révolutionnent le traitement de certaines hémopathies malignes. La première thérapie ciblée découle de la découverte de la translocation pathognomonique t(15;17)(q22;q21) spécifique aux LAM M3 (leucémie aiguë promyélocytaire). La caractérisation des points de cassures de cette translocation a mis en évidence le gène de fusion *PML-RARA*, impliquant le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (*RARA*), d'où la mise au point de la thérapie à l'acide rétinoïque (*all-trans retinoic acid and anthracycline*) (10). Les patients ayant la t(15;17) peuvent donc bénéficier de cette thérapie ciblée, qui, en combinaison avec le

trioxyde d'arsenic, entraîne des taux de survie globale de l'ordre de 75 à 85%, ce qui constitue l'entité avec le meilleur pronostic dans les LAM (3, 11).

Initialement, l'imatinib mésylate (STI-571 ou Gleevec®) a été développé pour inhiber spécifiquement le récepteur *PDGFR*. Il est cependant aussi efficace sur d'autres tyrosines kinases, telles qu'*ABL* et *c-KIT*. Le STI-571 a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis en 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, caractérisées par le gène de fusion *BCR-ABL1* (12). En effet, cet inhibiteur de tyrosine kinase cible ce gène de fusion issu de la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11) (chromosome de Philadelphie : Ph). Au niveau moléculaire, l'imatinib se lie à la poche catalytique du domaine tyrosine kinase d'*ABL* et bloque l'accès à l'ATP, conférant à la protéine chimérique *BCR-ABL1* une conformation inactive, induisant un arrêt de prolifération (13). Le STI-571 est également utilisé comme thérapie dans les LAL Ph+, la fusion *BCR-ABL1* étant présente dans environ 5% des LAL-B pédiatriques ainsi que dans les LAL-T avec le gène de fusion *NUP214-ABL* (3).

Un des facteurs ayant contribué au progrès des taux de guérison est l'optimisation des doses de chimiothérapie à la suite d'une meilleure caractérisation des valeurs pronostiques des anomalies génétiques. Cependant, bien que les EFS à 5 ans actuels soient estimées à 80% dans les LAL et à 60% dans les LAM (3), plusieurs patients répondent mal à la thérapie (résistance primaire) ou ont des rechutes (résistance secondaire). Une meilleure caractérisation génomique de ces patients, notamment par la détection des aberrations submicroscopiques récurrentes, permettrait d'améliorer la prise en charge de ces patients afin de leur donner un traitement plus approprié.

Techniques cytogénétiques actuellement utilisées en clinique

Puisque les anomalies chromosomiques récurrentes contribuent à établir le diagnostic, à évaluer le pronostic ainsi qu'à orienter la démarche thérapeutique à offrir aux patients atteints de leucémie, il est essentiel de mettre au point une stratégie optimale de détection des aberrations génomiques dans les LAL et LAM pédiatriques. Différents outils génétiques sont actuellement utilisés en hématologie clinique : le caryotype, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN

après transcription inverse (RT-PCR) ainsi que la cytométrie en flux (index d'ADN). Les différentes caractéristiques de ces techniques sont présentées au *Tableau I*.

Caryotype

Dans les hémopathies malignes, le caryotype permet l'analyse des anomalies chromosomiques spécifiques aux cellules leucémiques. La résolution obtenue varie entre 10 et 20 Mb. Ceci donne une vue d'ensemble du génome (analyse non ciblée) et permet la détection des anomalies récurrentes, rares et secondaires. Cependant, le caryotype vise seulement les cellules en phase mitotique et présente plusieurs difficultés techniques telles qu'un faible index mitotique des cellules leucémiques *in vitro* (quantité insuffisante de mitoses) et une faible résolution des chromosomes (*Tableau I*) (14).

Hybridation *in situ* en fluorescence

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est une analyse ciblée qui permet d'hybrider une sonde fluorescente avec une séquence d'ADN complémentaire sur les noyaux interphasiques ou les cellules mitotiques du patient (*Figure 1*). Il existe une grande variété de sondes commerciales, principalement les sondes de fusion (pour la détection d'un gène de fusion) et les sondes de réarrangement (*breakapart*), pour la détection d'un réarrangement génique). Ces dernières sont surtout utilisées pour les gènes ayant un grand nombre de partenaires tel que *MLL* (*Figure 1*).

Pour le diagnostic des leucémies *de novo*, les laboratoires de cytogénétique clinique utilisent généralement une série de sondes (*panel*) spécifiques aux anomalies chromosomiques les plus fréquentes et/ou ayant une valeur pronostique importante selon le type de leucémie étudié. Par exemple, au laboratoire de cytogénétique du CHU Sainte-Justine (Montréal, Québec, Canada), nous utilisons un ensemble de 13 sondes pour les LAL-B, 5 sondes pour les LAL-T et 9 sondes pour les LAM.

Réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse (RT-PCR)

La RT-PCR est une analyse ciblée qui utilise des amorces spécifiques à une séquence d'ARN du patient, puis plusieurs cycles d'amplification sont effectués. La RT-PCR est une technique spécifique et très sensible (10^{-6}), d'où l'augmentation du risque d'un résultat faux positif (contamination avec des produits PCR) (15). Puisqu'en clinique, la RT-PCR est utilisée pour détecter les transcrits des gènes de fusion les plus fréquents, elle présente l'inconvénient du risque de résultats faux négatifs (du à des translocations variantes avec des points de cassures moléculaires rares) (10). Enfin, cette méthode ne permet pas la détection d'aneuploïdies telles que les trisomies et les monosomies ainsi que les anomalies de ploïdie telle que l'haploïdie et l'hypodiploïdie.

Index d'ADN

L'index d'ADN (cytométrie de flux) permet d'évaluer la ploïdie d'un échantillon en mesurant la quantité d'ADN par cellule. L'ADN est coloré avec un fluorochrome (par exemple l'iodure de propidium) qui émet de la fluorescence en présence d'une lumière laser (émise par le cytomètre de flux). Un algorithme permet ensuite de distinguer les différentes phases du cycle cellulaire (G_0 , G_1/S et G_2/M) et de les comparer à un contrôle normal diploïde (index d'ADN = 1). L'hyperdiploïdie (plus de 50 chromosomes) entraîne un bon pronostic et est caractérisée par un index d'ADN $> 1,16$, alors que l'hypodiploïdie sévère (moins de 39 chromosomes) amène un pronostic défavorable et est représentée par un index d'ADN $< 0,85$ (16) (*Figure 2*).

Intégration de nouvelles technologies en clinique cytogénétique oncologique

Micropuces

Les micropuces permettent la détection des anomalies déséquilibrées, c'est-à-dire les gains (amplifications, duplications, translocations déséquilibrées) et les pertes (délétions, translocations déséquilibrées) de matériel génétique. Les études d'associations pangénomiques (GWAS) ont montré la présence d'aberrations chromosomiques cryptiques ayant une valeur pronostique cliniquement importante dans les cancers hématologiques

(17). Par exemple, des délétions submicroscopiques récurrentes du gène *IKZF1/IKAROS* (7p12.2) sont associées aux LAL ayant un pronostic défavorable, avec une prévalence estimée à 80-95% dans les LAL-B présentant la fusion *BCR-ABL1* (Ph+) (17). De plus, les délétions du gène *IKZF1/IKAROS* sont également fréquentes dans les LAL Ph- et triplent le risque de résistance au traitement ou de rechute (12). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont soulevé la pertinence d'utiliser les micropuces comme test génétique de routine en hématologie clinique, particulièrement pour les cas où l'analyse du caryotype n'a pas permis de détecter d'anomalies (18, 19).

Il existe actuellement deux types de micropuces : l'hybridation génomique comparative sur micropuces (aCGH) et les polymorphismes d'un seul nucléotide sur micropuces (aSNP). Différentes plateformes sont offertes pour chacune de ces deux techniques et quelques exemples, avec leurs caractéristiques respectives, sont présentés dans le *Tableau I*. La nouvelle génération de micropuces intègre simultanément des sondes polymorphiques et des sondes non polymorphiques sur la même micropuce. L'avantage majeur des micropuces, comparativement aux autres outils cytogénétiques, est leur très grande résolution (< 1000 paires de bases pour certaines plateformes). Cependant, seules les anomalies entraînant une perte d'hétérozygotie (LOH) et/ou un changement du nombre de copies (gain ou perte) peuvent être observées : les translocations réciproques, les insertions et les inversions équilibrées ne sont donc pas détectables.

La principale différence entre les plateformes d'aCGH et d'aSNP est la discrimination de chacun des allèles des chromosomes homologues par les puces des aSNP (20). Ainsi, les deux plateformes permettent la détection de la perte d'hétérozygotie causée par une délétion hémizygotique d'un allèle. Cependant, seules les sondes polymorphiques des aSNP peuvent détecter la perte d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies (CN-LOH). Les CN-LOH observées dans les cellules tumorales correspondent à une disomie uniparentale acquise, car les deux chromosomes ou locus homologues proviennent d'un seul parent à la suite d'une perte de l'allèle paternel ou maternel et duplication de l'allèle subsistant (21).

Intégration des micropuces en clinique

Puisque les micropuces permettent d'analyser l'ensemble du génome à très haute résolution, il semble pertinent de les intégrer en hématologie clinique afin d'augmenter le taux de détection des anomalies génomiques. Par exemple, en utilisant uniquement le caryotype, on retrouve environ 60% de cas anormaux dans les LAL-B pédiatriques (18, 19, 22), alors qu'environ 55 à 65% des cas sont anormaux dans les LAM (5, 10, 23, 24). En combinant le caryotype et la FISH, on détecte des anomalies dans environ 80% des cas (3, 18, 25). Enfin, en appliquant les micropuces, environ 90 à 95% des LAL présentent des aberrations génomiques (en combinant l'aCGH et la FISH) (22, 26) et on retrouve des anomalies dans environ 80% des LAM (en combinant les aSNP et le caryotype) (21). Cependant, cette technologie ne permet pas encore la détection des anomalies chromosomiques équilibrées et de l'hétérogénéité clonale, ce qui est essentiel pour préciser le diagnostic et évaluer adéquatement le pronostic des LAL et des LAM.

Ainsi, les micropuces ont leur place en clinique au sein d'une investigation génomique globale, à condition de les utiliser en complémentarité avec les autres outils génétiques, la *Figure 3* illustre une stratégie proposée. Par exemple, pour les LAL, l'intégration de l'aCGH permet de réduire le nombre de sondes utilisées en FISH : seules les sondes pour la détection des anomalies équilibrées sont nécessaires. Cependant, pour les LAM, puisque les gains et les pertes sont beaucoup moins fréquents que dans les LAL, les micropuces ne semblent pas aussi pertinentes comme outil génétique de première ligne. Par conséquent, l'aCGH ou les aSNP peuvent être utilisés dans les cas de LAM normaux, c'est-à-dire lorsqu'aucune anomalie n'est détectée par FISH, au caryotype et par RT-PCR. De plus, dans le cas des LAM, l'utilisation des aSNP pourrait être utile puisque cette technologie permet la détection d'anomalies alléliques récurrentes telles que les CN-LOH (retrouvées dans environ 10% des cas) (27). Par contre, puisque la valeur pronostique des CN-LOH est actuellement controversée (21), il serait préférable de cibler par aSNP uniquement les régions de CN-LOH récurrentes dont le rôle pronostique est reconnu. Récemment, grâce aux études de aSNP, il a été démontré que les CN-LOH en 9p interagissent avec les mutations de *JAK2* (9p24) et semblent associées à un pronostic défavorable (21).

Similairement, des CN-LOH fréquents en 13q (associées à des mutations de *FLT3*) sont corrélées à une diminution de la survie globale des LAM chez les adultes (28).

Outre la stratégie proposée dans la *Figure 3*, certaines équipes ont suggéré un algorithme séquentiel (en plusieurs étapes distinctes) pour le diagnostic moléculaire des LAL et des LAM (15, 29). En effet, une telle stratégie priorise la détection des anomalies à pronostic défavorable (l'hypodiploïdie, la fusion *BCR-ABL1* et les réarrangements de *MLL* dans les LAL). Cependant, dans l'éventualité où aucune de ces aberrations n'est détectée, des analyses supplémentaires sont requises, retardant le diagnostic génomique final. Une stratégie séquentielle s'avère donc moins appropriée lorsque les traitements doivent être entrepris rapidement ou lorsque les autres critères pronostiques sont peu informatifs.

Défis entourant l'analyse des micropuces

Il est important de distinguer les anomalies spécifiques de la tumeur (acquises au niveau des cellules tumorales) des anomalies constitutionnelles (hérités des cellules germinales) (27). Aussi, il est essentiel de ne pas confondre les anomalies pathogéniques des variants retrouvés chez les individus sains (27). Différentes bases de données de variants sont actuellement disponibles, telles que la *Database of Genomic Variants* (DGV) de Toronto (Ontario) et le consortium de l'*International Standard Cytogenomic Array consortium* (ISCA) (30). Cependant, une validation des résultats par d'autres techniques est aussi nécessaire afin de préciser le type d'anomalies détectées par micropuces (20).

Conclusion

Les micropuces, autant l'aCGH que les aSNP, ne doivent pas être utilisées comme outil diagnostique unique, mais plutôt en complémentarité avec le caryotype, la technique FISH interphasique, la RT-PCR et l'index d'ADN. Chacune de ces méthodes comporte ses avantages et ses limites, d'où l'importance de les utiliser ensemble. Ainsi, une stratégie optimale permettrait l'intégration graduelle des micropuces au sein d'une investigation génomique globale des LAL et des LAM, en utilisant les tests dont la signification clinique est déjà reconnue. Ces outils performants permettraient d'augmenter significativement le

taux de détection des aberrations génomiques des leucémies aiguës pédiatriques, ce qui pourrait améliorer la prise en charge des patients et réduire les taux de rechute.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le département de pathologie, le laboratoire de cytogénétique (particulièrement Diane Lachance et Lysanne Le Brock) et le département d'hématologie (particulièrement le D^{re} Caroline Laverdière et Isabelle Delorme) du CHU Sainte-Justine ainsi que le département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 277-85.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues . 2008. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
3. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011; 29: 551-65.
4. Karrman K, Forestier E, Heyman M, et al. Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 795-805.
5. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2682-9.

6. Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood* 2011; 117: 7102-11.
7. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29: 532-43.
8. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 2005; 19: 734-40.
9. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 429-38.
10. Haferlach T, Bacher U, Kern W, et al. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol* 2007; 86: 311-27.
11. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-65.
12. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56: 984-93.
13. Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 175-98.
14. Olde Nordkamp L, Mellink C, van der Schoot E, van den Berg H. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31: 930-5.

15. Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1333-41.
16. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, et al. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *Int J Lab Hematol* 2010; 32: 288-98.
17. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009; 41: 1006-10.
18. Usvasalo A, Raty R, Harila-Saari A, et al. Acute lymphoblastic leukemias with normal karyotypes are not without genomic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 192: 10-7.
19. Kowalczyk JR, Babicz M, Gaworczyk A, et al. Structural and numerical abnormalities resolved in one-step analysis: the most common chromosomal rearrangements detected by comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 200: 161-6.
20. Mullighan CG. Single nucleotide polymorphism microarray analysis of genetic alterations in cancer. *Methods Mol Biol* 2011; 730: 235-58.
21. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* 2010; 115: 2731-9.
22. Kuchinskaya E, Heyman M, Nordgren A, et al. Array-CGH reveals hidden gene dose changes in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal or failed karyotype by G-banding. *Br J Haematol* 2008; 140: 572-7.
23. Braham-Jmili N, Sendi-Senana H, Labiadh S, et al. Haematological characteristics, FAB and WHO classification of 153 cases of myeloid acute leukaemia in Tunisia. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006; 64: 457-65.
24. King RL, Naghashpour M, Watt CD, et al. A comparative analysis of molecular genetic and conventional cytogenetic detection of diagnostically important translocations in more than 400 cases of acute leukemia, highlighting the frequency of false-negative conventional cytogenetics. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 921-8.

25. Kwon WK, Lee JY, Mun YC, et al. Clinical utility of FISH analysis in addition to G-banded karyotype in hematologic malignancies and proposal of a practical approach. *Korean J Hematol* 2010; 45: 171-6.
26. Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of adult acute leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 197: 122-9.
27. Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood* 2010; 115: 4157-61.
28. Bullinger L, Kronke J, Schon C, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* 2010; 24: 438-49.
29. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Br J Haematol* 2010; 151: 132-42.
30. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010; 12: 742-5.

Tableau I. Comparaison des avantages et des limites de chacune des techniques cytogénétiques actuellement utilisées pour le diagnostic des leucémies.

Technique	Avantages	Limites
Caryotype	Analyse génomique globale	Faible résolution (environ 10 Mb)
	Détection des anomalies chromosomiques numériques (aneuploïdie et polyploïdie) et structurales (anomalies fréquentes et rares)	Cible uniquement les cellules en division et nécessite une quantité et une qualité adéquate des métaphases
FISH	Détection des anomalies chromosomiques numériques et structurales (permet la détection des anomalies cryptiques)	Analyse ciblée
	Cible à la fois les mitoses et les noyaux interphasiques	Résolution environ 100 kb
	Détection de l'hétérogénéité clonale	Nécessite l'utilisation de plusieurs sondes
RT-PCR	Sensibilité permettant la détection de la maladie résiduelle	Analyse ciblée (détection des transcrits des gènes de fusion fréquents)
		Ne détecte pas les anomalies chromosomiques numériques et structurales rares Taux élevés de faux positifs et de faux négatifs
Index ADN	Détection des changements de ploïdie, de l'hyperdiploïdie et de l'hypodiploïdie	Seuil de détection élevé
		Ne détecte pas les anomalies de structure et les aneuploïdies impliquant 1 ou 2 chromosomes
aCGH	Détection des réarrangements cryptiques déséquilibrés (gains et pertes)	Ne détecte pas les anomalies équilibrées
	Détection des LOH à la suite d'une perte d'un allèle sans duplication compensatoire	Ne détecte pas les CN-LOH, la ploïdie et les petits clones
aSNP	Détection des réarrangements cryptiques déséquilibrés (gains et pertes)	Ne détecte pas les anomalies équilibrées
	Détection des LOH, des CN-LOH, de la ploïdie et de l'hétérogénéité clonale	

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence; RT-PCR: la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse; Mb : Méga bases; kb : kilo bases; aSNP : polymorphisme d'un seul nucléotide sur micropuces; aCGH : hybridation génomique comparative sur micropuces; LOH : perte d'hétérozygotie; CN-LOH : perte d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies.

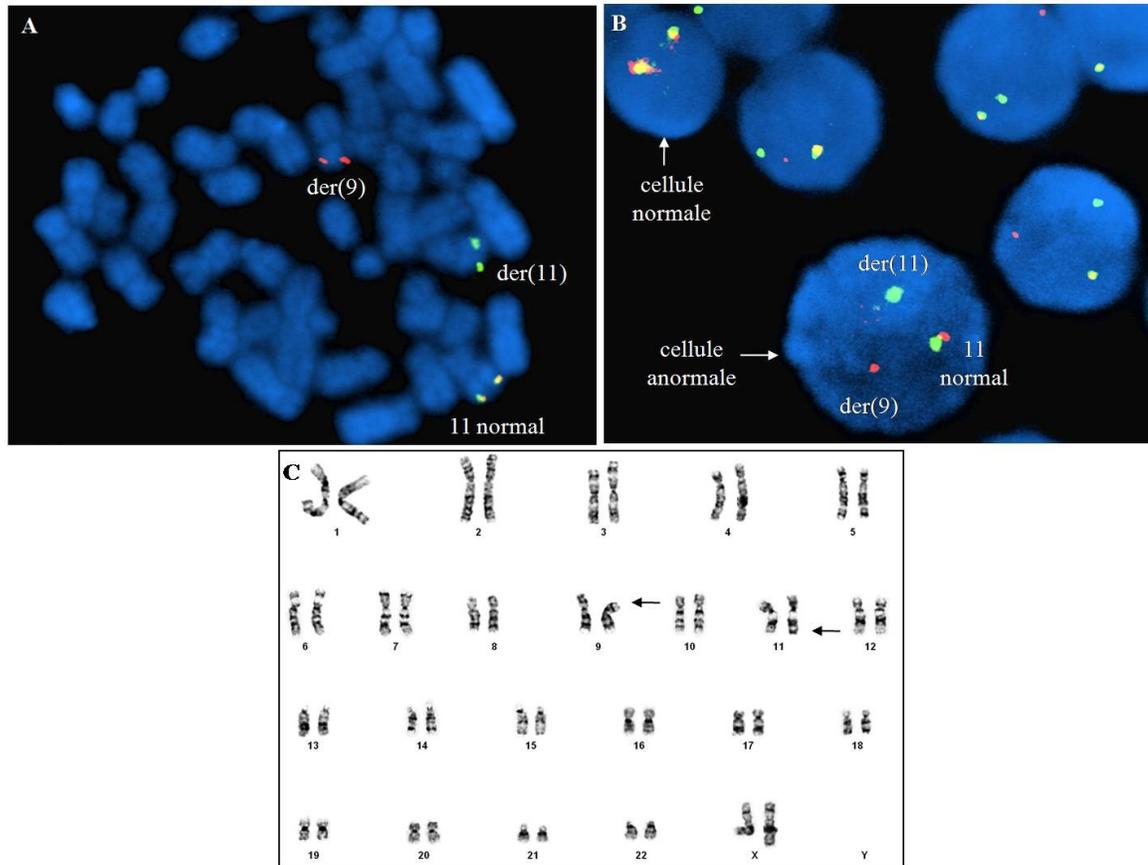


Figure 1. Translocation $t(9;11)(p22;q23)$ avec réarrangement du gène *MLL* chez une patiente avec une LAM *de novo*.

A et B. FISH avec la sonde de réarrangement *MLL* (Vysis, Abbott Molecular Inc.) qui montre une translocation impliquant le gène *MLL* (11q23). Ce réarrangement a été observé dans 98% des cellules analysées par FISH.

C. Caryotype en bandes GTG de la même patiente montrant la translocation $t(9;11)(p22;q23)$. Cette translocation a été observée dans 26 mitoses sur 28 analysées. De plus, la présence du transcrite de la fusion *MLL-AF9* a été montrée par RT-PCR (non illustré).

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence; RT-PCR: la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse; LAM : leucémie aiguë myéloïde; der : chromosome anormal dérivé

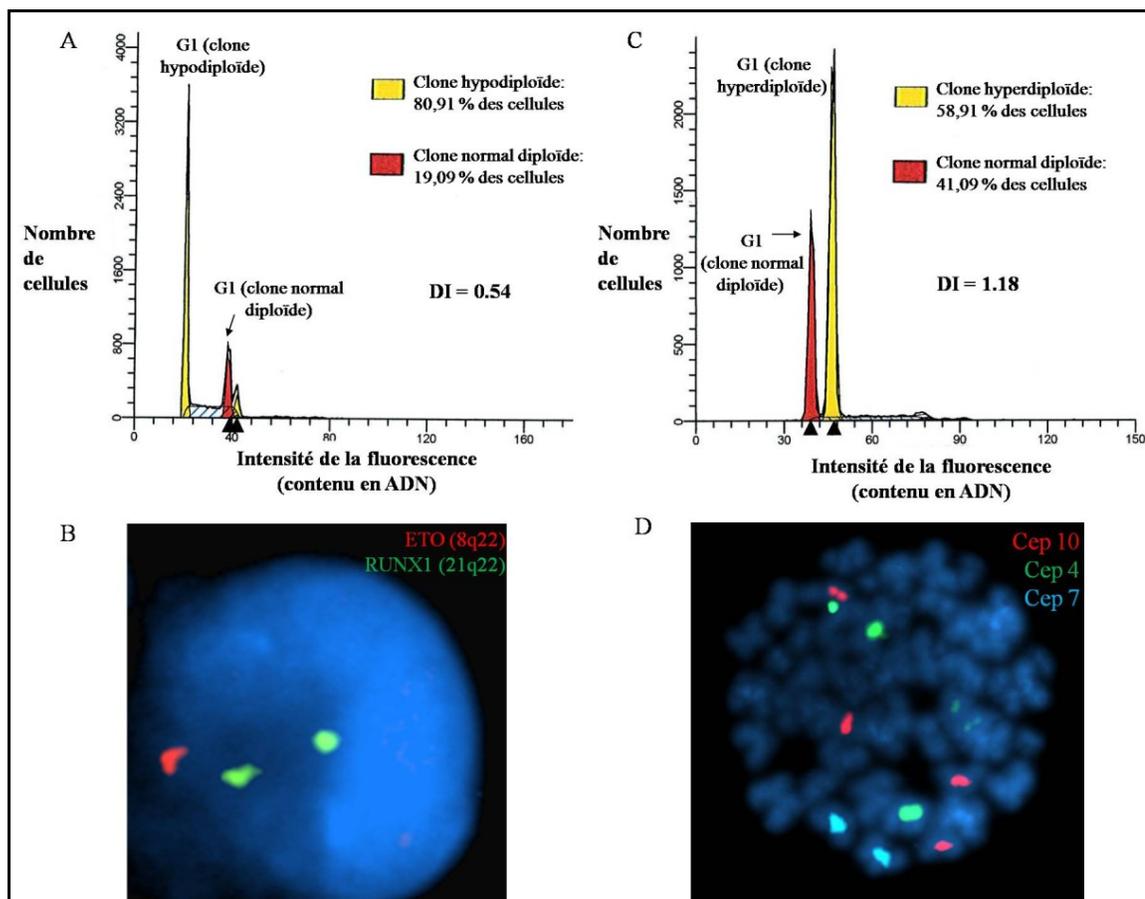


Figure 2. Détection d'hypodiploïdie et d'hyperdiploïdie par l'index d'ADN et par FISH. **A.** Hypodiploïdie à 23~26 chromosomes détectée par cytométrie de flux chez un patient avec une LAL : l'index d'ADN est de 0,54. Le clone hypodiploïde (pic jaune) représente environ 81% des cellules. **B.** Hypodiploïdie détectée par FISH chez le même patient : une monosomie 8 (signal rouge) est montrée dans le noyau. Le clone hypodiploïde a été détecté dans environ 80% des cellules par FISH. Cette hypodiploïdie a également été observée au caryotype dans 15 mitoses sur 25 analysées (non illustré). **C.** Hyperdiploïdie à 55 chromosomes détectée par cytométrie de flux chez un deuxième patient avec une LAL : l'index d'ADN est de 1,18. Le clone hyperdiploïde (pic jaune) représente environ 59% des cellules. **D.** Hyperdiploïdie détectée par FISH chez un troisième patient avec une LAL : cette cellule montre une tétrasomie 10 (signal rouge) et une trisomie 4 (signal vert). Les chromosomes 7 (signal bleu) sont présents en deux copies. Le clone hyperdiploïde a été détecté dans environ 50% des cellules par FISH.

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique; DI : index d'ADN; Cep : centromère d'un chromosome

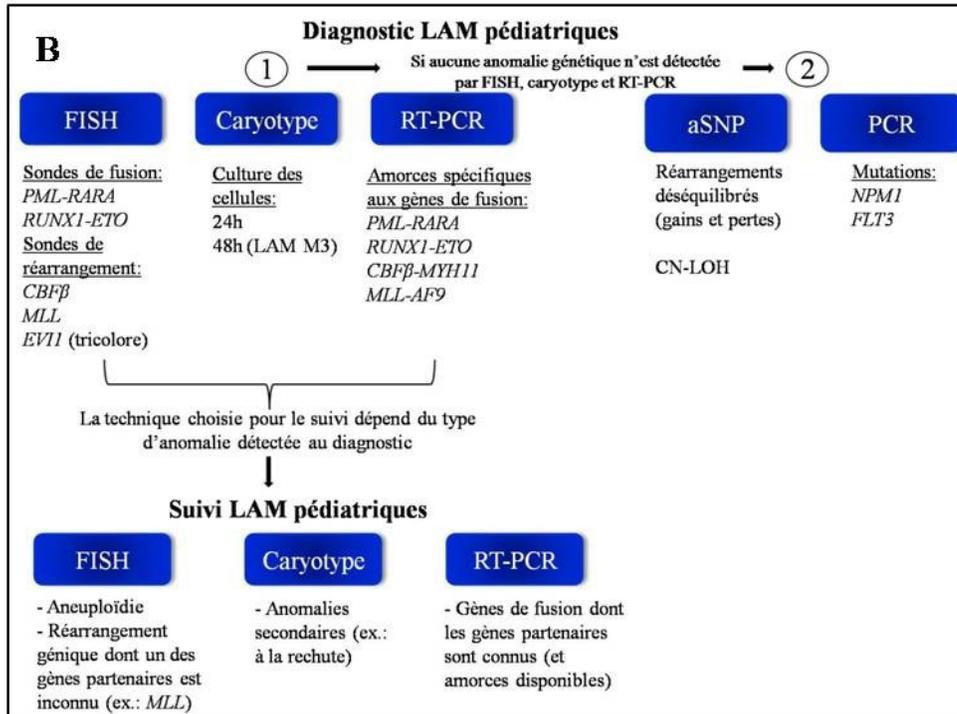
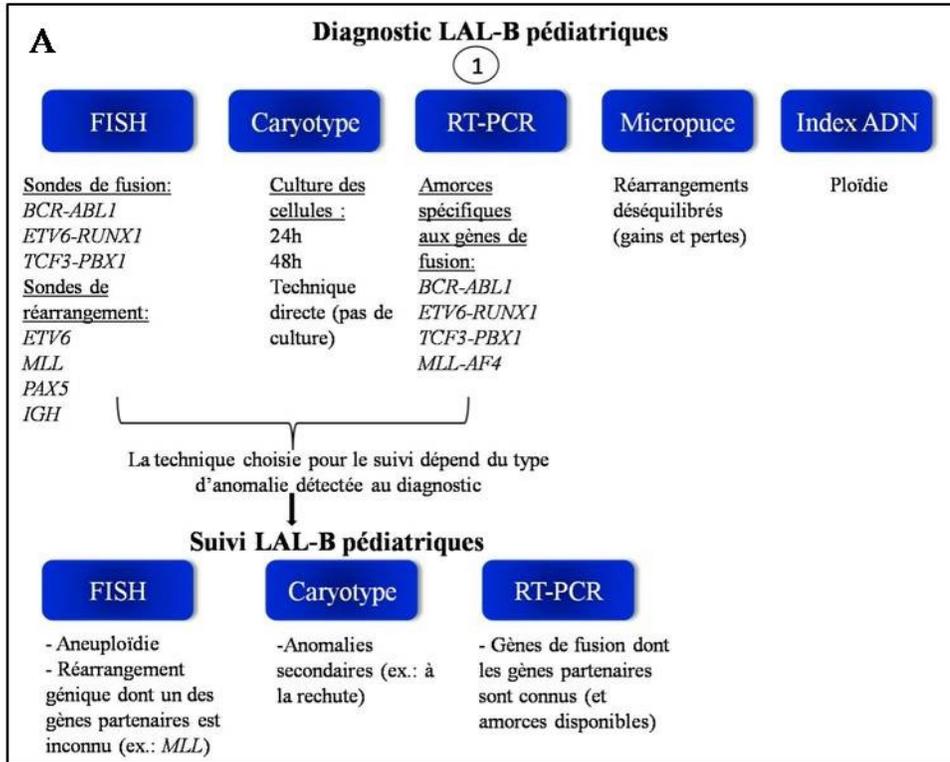


Figure 3. Proposition d'une stratégie d'investigation génomique globale pour le diagnostic et le suivi des LAL-B et des LAM pédiatriques. A. LAL-B Pour le diagnostic des LAL-B, l'algorithme suggère d'utiliser en parallèle les outils génétiques et cytogénétiques standards (FISH, caryotype, RT-PCR et index d'ADN) et l'aCGH. Cette stratégie permet de réduire le nombre de sondes requises en FISH puisque les gains et les pertes tels que les aneuploïdies (hyperdiploïdie et hypodiploïdie), les délétions (*p16/CDNK2A* et *MYB*) et les amplifications (*RUNX1*) peuvent être détectées par aCGH. Pour le suivi de la maladie résiduelle des LAL-B, la technique choisie dépend des anomalies retrouvées au diagnostic. **B. LAM** Pour le diagnostic des LAM, seuls la FISH, le caryotype et la RT-PCR devraient être utilisés en première ligne. Si aucune anomalie n'est détectée, une analyse par micropuce à ADN et par PCR (pour détecter les mutations récurrentes) devrait être entreprise. Pour le suivi de la maladie résiduelle des LAM, la stratégie est la même que pour le suivi des LAL-B.

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence; RT-PCR: la réaction en chaîne entraînée par une polymérase à ADN après transcription inverse; aSNP : polymorphisme d'un seul nucléotide; aCGH : hybridation génomique comparative sur micropuces; LOH : perte d'hétérozygotie; CN-LOH : perte d'hétérozygotie sans changement du nombre de copies; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique; LAM : leucémie aiguë myéloïde

Curriculum vitae

Formation académique :

Maîtrise en sciences biomédicales (M.Sc.)

(Diplôme en voie d'obtention)

Département de pathologie et de biologie cellulaire, Université de Montréal

Département de pathologie et Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine

Baccalauréat en sciences biomédicales (B.Sc.)

Université de Montréal, Montréal

Novembre 2008

Formations scientifiques complémentaires:

1. *Stage en recherche clinique (milieu hospitalier)*

Laboratoire de cytogénétique postnatale, département de pathologie,

CHU Sainte-Justine

Directeur : Dr. Raouf Fetni, février 2010 à décembre 2011

2. *Stage en laboratoire de recherche (milieu universitaire)*

Laboratoire de cytogénétique moléculaire, département de pathologie et biologie cellulaire,

Université de Montréal

Directrice: Dre. Nicole Lemieux, été 2008

3. Formations *Introduction à l'analyse statistique* et *Analyse statistique avancée, SPSS*

Unité de recherche clinique appliquée, CHU Ste-Justine

Automne 2010

Publication scientifique:

1. *Mise en évidence des facteurs cytogénétiques influençant le pronostic et le choix thérapeutique dans les leucémies aiguës pédiatriques*

Mélanie Roy-Tourangeau, Nicole Lemieux, Raouf Fetni

Médecine Sciences Amérique, 2012, Volume 1, Numéro 1, Numéro spécial 79^e congrès de l'Association francophone pour le savoir (ACFAS), pages 122-136. www.msamerique.ca

Expérience d'enseignement :

Stage de laboratoire (PBC3100 : Travaux de recherche)

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

5 étudiants de niveau universitaire

Juillet 2010

- Ce stage fût un vif succès: la satisfaction et l'enthousiasme des étudiants ont mené à la signature d'une entente entre les doyens de l'Université Jazan (Arabie Saoudite) et de l'Université de Montréal (Canada) afin de favoriser les échanges étudiants entre les Facultés de Médecine des deux universités.

Prix et bourses obtenus :**1) Prix d'excellence pour la présentation par affiche, catégorie maîtrise (1^{er} prix)**

XXVI^e congrès annuel des étudiants gradués et post-gradués du Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, CHU Sainte-Justine, Montréal, 8 juin 2011, *Caractérisation cytogénétique des anomalies 12p et 21q dans les leucémies aiguës pédiatriques*

Roy-Tourangeau M, Laverdière C, Lemieux N, Fetni R

2) Présentation sélectionnée pour publication dans la revue Médecine Sciences Amérique (à la demande de la rédactrice en chef, la docteure Danielle Jacques)

79^e congrès de l'Association francophone pour le savoir (ACFAS), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 9 au 13 mai 2011, *Facteurs cytogénétiques influençant le pronostic des leucémies aiguës lymphoblastiques hyperdiploïdes*

Roy-Tourangeau, Mélanie, Giguère A, Laverdière C, Lemieux N, Fetni R

3) Bourse du département de pathologie et de biologie cellulaire

Université de Montréal (2011-2013)

4) Bourse du département de pathologie

CHU Sainte-Justine (2010-2012)

5) Bourse de rédaction (maîtrise)

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Université de Montréal (2011)

Présentations scientifiques à des congrès (présentations orales ou par affiche) :

1) 29^e réunion scientifique annuelle de l'Association de cytogénétique du Québec (ACQ), CHU Sainte-Justine, Montréal, 27 avril 2012, *Optimisation du taux de détection des anomalies chromosomiques dans 258 LAL et LAM pédiatriques*,

Roy-Tourangeau Mélanie, Laverdière C, Lemieux N, Fetni R

2) 12th International Congress of Human Genetics (ICHG)/61st Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Palais des congrès, Montréal, 11 au 15 octobre 2011, *Strategy using SNP array and interphase FISH for the detection of genetic prognosis factors in neuroblastoma*

Roy-Tourangeau M, Arsenault M-P, Nyalendo C, Cournoyer S, Teira P, Duval M, Sartelet H, Fetni R

3) 49th annual Great Lakes Chromosomes Conference (GLCC), Université de Toronto, Toronto, Canada, 19-20 mai 2011, *Characterization of recurrent and rare 12p and 21q chromosomal abnormalities in childhood ALL and AML*

Roy-Tourangeau Mélanie, Laverdière C, Lemieux N, Fetni R

4) 60th Annual Meeting of American Society of Human Genetics (ASHG), Washington DC, États-Unis, 2 au 6 novembre 2010

Correlation between interstitial telomeres, chromosomal instability and mosaicism

M. Roy-Tourangeau, W. Dridi, N. Lemieux, R. Fetni

