

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	3
INTRODUCTION.....	4
I. LEUCEMIES AIGÜES : GENERALITES	4
A. <i>DIAGNOSTIC et CLASSIFICATIONS.....</i>	5
1. Clinique : une pathologie aigüe.....	5
2. Cytologie, l'élément central.....	6
3. Immunophénotypage.....	7
4. Génétique.....	7
a) Cytogénétique.....	8
b) Biologie Moléculaire	10
B. <i>PRONOSTIC et EVOLUTION.....</i>	12
1. Facteurs pronostics pré-thérapeutiques.....	12
2. Prise en charge.....	12
II. LA PLOÏDIE.....	13
A. <i>DEFINITIONS.....</i>	13
B. <i>UN OUTIL PRONOSTIC MAJEUR.....</i>	13
1. Hyperdiploïdie : anomalie de bon pronostic	14
2. Hypodiploïdie : un pronostic plus sombre.....	15
C. <i>LES TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA PLOÏDIE.....</i>	16
1. Caryotype Standard	17
2. Cytogénétique moléculaire.....	21
a) FISH.....	21
b) CGH/SNP-Array.....	27
→ La CGH conventionnelle.....	27
→ La CGH-array	29
→ La SNP-array	30
3. Cytométrie en flux	32
OBJECTIF DE LA THESE	35
MATERIEL ET METHODE	36
I. LES PATIENTS	36
II. LES TECHNIQUES REALISEES.....	36
A. <i>L'index d'ADN.....</i>	36
B. <i>Caryotype et FISH.....</i>	37
1. Mise en Culture	37
2. Sortie de Culture.....	37
3. Dénaturation et Caryotypage.....	38
4. Hybridation in situ.....	38
C. <i>CGH/SNP-array.....</i>	40
RESULTATS	41
I. ANOMALIES CYTOGENETIQUES OBSERVEES DANS NOTRE COHORTE	41
II. CONCORDANCE DES TECHNIQUES.....	42
III. DESCRIPTION DE CAS PRESENTANT UNE PARFAITE CONCORDANCE DES TECHNIQUES.....	43
A. <i>CAS n°1 avec hyperdiploïdie classique</i>	43
B. <i>CAS n°2 avec hypodiploïdie sévère</i>	44
IV. DESCRIPTION DE CAS AYANT PRÉSENTE DES DIFFICULTES DIAGNOSTIQUES.....	46
A. <i>Echec de caryotype : CAS n°3.....</i>	46
B. <i>Un caryotype apparemment normal : CAS n°4.....</i>	48
C. <i>Hypodiploïdies masquées : CAS n° 5 et 6</i>	49
DISCUSSION.....	53

CONCLUSION.....	63
BIBLIOGRAPHIE.....	64
ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	71
ANNEXE.....	74

Table des figures et tableaux

Tableau 1. Classification EGIL des LALB (8)	7
Tableau 2. Classification OMS 2016 des LAL (11)	8
Figure 1. Répartition des anomalies génétiques dans les LAL B pédiatriques. D'après Bhojwani et al. (6)	9
Figure 2. Répartition des sous-types de LAL Ph-like chez les enfants, adolescents et adultes jeunes D'après Hunger et al. (23).....	11
Figure 3. Les niveaux de résolution des techniques d'études génétiques. D'après B. Delobel. (59).....	16
Figure 4. Les phases de la mitose. D'après Jackson et al. (62).....	18
Figure 5. Les phases du cycle cellulaire D'après Alberts et al. (63).....	19
Figure 6. Exemple de caryotype normal (46,XX) en bandes R	21
Figure 7. Image FISH métaphasique.....	23
Figure 8. Schémas représentatifs de sondes de fusion et de sondes break-apart (BA).	25
Figure 9. Représentation schématiques des étapes de la technique de FISH (74).....	26
Figure 10. Représentation schématique de la technique de CGH conventionnelle (76).....	28
Figure 11. Les étapes de la CGH-array (78).....	30
Figure 12. Représentation schématique des résultats de log R ratio et de BAF (79).....	31
Figure 13. Variation de la BAF et du Log R ratio en fonction du pourcentage de cellules anormales. D'après Song et al. 2012 (80).....	32
Figure 14. Corrélation entre le nombre modal de chromosomes et l'index en CMF D'après Rachieru-Sourisseau et al. (83)	33
Figure 15. Exemples de cytogrammes	34
Figure 16. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°1.....	44
Figure 17. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°2.....	46
Figure 18. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°3.....	47
Figure 19. Résultat de l'analyse de CGH/SNP-array du cas n°4.....	49
Figure 20. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°5.....	50
Figure 21. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°6.....	52

INTRODUCTION

I. Leucémies Aigües : généralités

Les leucémies aigües constituent un groupe de pathologies malignes caractérisées par une prolifération médullaire de progéniteurs de cellules hématopoïétiques, non différenciés appelés blastes. Cette multiplication anormale va générer, en premier lieu, une insuffisance médullaire du fait de l'envahissement par les cellules malignes. La moelle osseuse est alors très rapidement incapable de produire des cellules sanguines normales ce qui se traduit par des cytopénies périphériques. En parallèle, l'invasion du sang et des organes hématopoïétiques secondaires engendre un syndrome tumoral de gravité variable.

En ce qui concerne la physiopathologie, une combinaison d'anomalies génétiques acquises confère un avantage sélectif en affectant la différenciation, stimulant la prolifération et la survie ce qui provoquera la sélection et l'expansion d'un clone cellulaire malin. Plusieurs altérations sont identifiées progressivement comme étant plus largement impliquées dans l'initiation de la transformation leucémique.

Un certain nombre de facteurs de risques et de prédispositions ont été mis en évidence mais ils ne sont retrouvés que dans 5% des situations (1). Parmi les anomalies génétiques constitutionnelles les plus fréquemment citées, nous retrouvons la trisomie 21 (2)(3)(4), le syndrome de Li-Fraumeni (5) ou encore la maladie de Fanconi. Par ailleurs, la plupart des pathologies hématologiques acquises sont susceptibles d'évoluer vers la leucémie aigüe. Enfin, l'exposition au benzène, aux hydrocarbures, les chimiothérapies (agents alkylants et inhibiteurs des topoisomérases) et radiothérapies sont reconnus comme des facteurs favorisants.

On distingue deux grandes catégories de leucémies aigües :

- Les formes myéloblastiques plus fréquentes chez l'adulte et le sujet âgé
- Les formes lymphoblastiques B et T que l'on retrouvera plus fréquemment chez l'enfant

Les LA constituent le cancer le plus fréquent de l'enfant (25 à 30%) et sa forme lymphoblastique représente 80% des LA pédiatriques dont 85% sont de lignée B et 15% de lignée T (6)(1). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux leucémies aigues lymphoblastiques B pédiatriques (LALB).

A. DIAGNOSTIC et CLASSIFICATIONS

1. Clinique : une pathologie aigüe

Le tableau clinique découle directement de la physiopathologie. Les symptômes, d'apparition généralement brutale et d'aggravation rapide, vont varier en terme de sévérité et de présentation d'un patient à l'autre.

Nous pouvons retrouver tout d'abord les conséquences de l'insuffisance médullaire :

- Un syndrome hémorragique se traduisant par des hémorragies cutanéo-muqueuses liées à une fréquente thrombopénie au diagnostic. Il peut potentiellement être aggravé par l'existence d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) associée.
- Un syndrome infectieux lié à une éventuelle neutropénie. Nous pouvons décrire des infections classiques mais persistantes malgré le traitement ou anormalement sévères (l'angine étant le tableau de présentation le plus fréquent). Des infections à germes opportunistes peuvent aussi constituer un signe d'appel.
- Un syndrome anémique sur la chute rapide et importante du taux d'hémoglobine qui est en général mal toléré avec pâleur, tachycardie, asthénie...

Le syndrome tumoral quant à lui est souvent bien présent dans les LAL B de l'enfant avec l'apparition d'adénopathies, d'une splénomégalie plus ou moins associée à une hépatomégalie et des douleurs osseuses. Plus rarement, un envahissement d'autres organes peut avoir lieu avec des manifestations telles qu'une atteinte testiculaire ou encore des signes d'envahissement neuro-méningé.

Certains tableaux peuvent constituer des urgences thérapeutiques et doivent absolument être recherchés. Dans un contexte d'hyperleucocytose majeure on pourra retrouver une leucostase pulmonaire et/ou neurologique devant déclencher une prise en charge en urgence parfois en réanimation (détresse respiratoire sévère et résistante à l'oxygénotherapie, manifestations à type de convulsions ou troubles de la conscience...). Plus fréquemment, une CIVD peut se produire notamment à l'initiation du traitement ou en cas de forte hyperleucocytose entraînant, dans le pire des cas, un syndrome hémorragique et une défaillance multiviscérale. Un bilan d'hémostase standard mais complet doit ainsi toujours être réalisé en cas de suspicion de LA.

2. Cytologie, l'élément central

La numération formule sanguine montre classiquement un tableau de tricytopénie (anémie, thrombopénie et neutropénie) associée à une hyperleucocytose avec la présence de cellules blastiques circulantes. Cependant, toutes les associations d'anomalies sont possibles et une numération normale de même que l'absence de blaste dans le sang n'exclut pas le diagnostic. Celui-ci nécessite dans tous cas la réalisation d'un prélèvement de moelle osseuse et la mise en évidence d'au moins 20% de cellules blastiques.

L'ancienne classification FAB permettait de classer les LA en fonction de leur aspect morphologique, lignée cellulaire et degré de différenciation. Malheureusement, ceci reste en partie subjectif et ne permet pas d'être sûr à 100% du type de LA. En effet, il est possible de retrouver des granulations dans une LAL et inversement certains blastes myéloïdes très immatures n'en présentent aucune. Seule l'existence de corps d'Auer signe le caractère myéloïde et ils doivent être recherchés attentivement. Actuellement, la cytométrie en flux est devenue indispensable pour la détermination de lignée et, à fortiori, dans la classification des LALB.

3. Immunophénotypage

La classification EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia) des LALB (cf tableau 1) est entièrement basée sur l'identification des clusters de différenciation (CD) intra-cellulaires et de surface retrouvés au niveau des cellules blastiques (7). La cytométrie en flux permet ainsi de déterminer avec une plus grande spécificité s'il s'agit d'une LAM ou d'une LAL, de préciser si celle-ci est de lignée B ou T et de définir le degré de différenciation. Dans un deuxième temps, on identifie le phénotype spécifique des blastes, ce que l'on appelle les LAIP (leukemia associated immunophenotype). Ceux-ci permettront à terme de distinguer spécifiquement les blastes des autres cellules et constitueront les marqueurs de suivi de maladie résiduelle spécifiques de la maladie du patient. Il peut s'agir de :

- marqueurs aberrants dit d'infidélité de lignée (ex : CD13 ou CD33 dans une LALB)
- marqueurs anormalement sur ou sous exprimés
- coexpressions anormales de CD, témoignant d'une anomalie dans la différenciation (ex : coexpression de marqueurs d'immaturité et de marqueurs présents dans les cellules très différencierées)

	Marqueurs de lignée B (cCD79a, CD19, CD22)	CD10	Chaîne μ intra-cytoplasmique	sIg
B-I (pro-B)	+	-	-	-
B-II (commune)	+	+	-	-
B-III (pré-B)	+	±	+	-
B-IV (B mature)	+	±	±	+

Tableau 1. Classification EGIL des LALB (8)

4. Génétique

L'analyse génétique des cellules anormales constitue le dernier élément indispensable au diagnostic, à la classification et surtout au pronostic de la leucémie aigüe. Plus récemment, l'apport théranostique est de plus en plus validé et mis en avant dans la littérature. Le profil

génétique tumoral peut permettre d'orienter vers une thérapeutique ciblée comme c'est le cas par exemple dans les LAL avec chromosome Philadelphie ou Ph-like. De manière générale, nous aurons une modification de la présentation clinique et biologique, de l'évolution, de la réponse thérapeutique et du risque de rechute en fonction des caractéristiques génétiques des cellules leucémiques. Cependant, la cytogénétique conventionnelle et la biologie moléculaire n'identifient aucune anomalie clonale primaire dans 25% des LAL pédiatriques (9).

a) Cytogénétique

La cytogénétique permet de rechercher les anomalies de nombre de chromosomes (aneuploïdies) ainsi que les anomalies de structure récurrentes (translocations, délétions ...) ayant un rôle central dans la classification OMS 2016 (cf tableau 2) et une valeur pronostique de premier plan (10).

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia

Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with $t(9;22)(q34.1;q11.2)$; *BCR-ABL1*

MPAL with $t(v;11q23.3)$; *KMT2A* rearranged

MPAL, B/myeloid, NOS

MPAL, T/myeloid, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with $t(9;22)(q34.1;q11.2)$; *BCR-ABL1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with $t(v;11q23.3)$; *KMT2A* rearranged

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with $t(12;21)(p13.2;q22.1)$; *ETV6-RUNX1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with $t(5;14)(q31.1;q32.3)$ *IL3-IGH*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with $t(1;19)(q23;p13.3)$; *TCF3-PBX1*

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia

Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Tableau 2. Classification OMS 2016 des LAL (11)

En ce qui concerne les LALB de l'enfant, l'hyperdiploïdie constitue l'anomalie la plus fréquente (25% des cas de LAL pédiatriques) (1)(12) avec un pronostic favorable (13). Inversement, l'hypodiploïdie est plus rare, 1% des cas de LAL pédiatriques, mais associée à un pronostic plutôt défavorable (6).

Dans les translocations récurrentes de bon pronostic, on retrouve la t(12;21) dans 25% des cas de LAL pédiatriques (6). Inversement, les réarrangements impliquant le gène KMT2A quant à eux ne sont retrouvés que dans 5% des cas en général mais concernent jusqu'à 80% des enfants de moins de un an avec un pronostic restant défavorable (6). L'amplification intra-chromosomique du chromosome 21 identifiée dans moins de 2% des cas classera le patient immédiatement en haut risque mais avec un pronostic largement amélioré par les thérapies intensives (14)(15). La translocation (9;22) ou chromosome Philadelphie (Ph) classique de la LAL de l'adulte, n'est mise en évidence que dans 3% des LAL de l'enfant mais doit être systématiquement recherchée car elle confère la possibilité d'une réponse aux anti-tyrosine kinase de type Imatinib. Le pronostic de ces LAL B Ph positive a été considérablement amélioré par l'avènement de ces thérapeutiques.

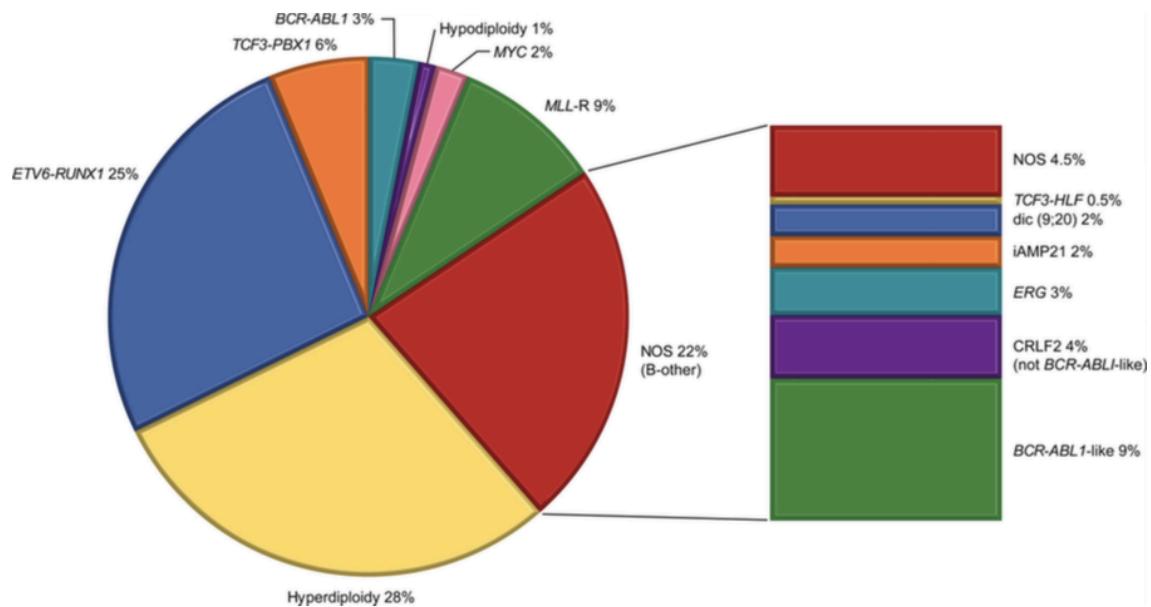


Figure 1. Répartition des anomalies génétiques dans les LAL B pédiatriques. D'après Bhojwani et al. (6)

b) Biologie Moléculaire

La biologie moléculaire arrive dans un second temps mais reste indispensable surtout pour les LAL avec un caryotype normal afin de rechercher les anomalies ayant un intérêt pronostique. Ces patients seront classés dans la catégorie dite « B-other ». De plus en plus de marqueurs moléculaires à forte valeur pronostique sont mis en évidence tels que des mutations au sein de gènes impliqués dans le développement, la différenciation et la prolifération de la lignée B qui apparaissent chez 40% des patients (6). La plupart du temps on réalise le séquençage de panels de gènes impliqués ou de la RT-PCR à la recherche de mutations ou de réarrangements. La MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) est une forme de PCR multiplex semi-quantitative avec ligation qui permet d'évaluer le nombre de copies de gènes de manière simultané pour des dizaines de loci (16). Elle est utile pour identifier les délétions, duplications et amplifications d'intérêt notable. A noter que les délétions peuvent tout à fait être identifiées par CGH-array.

Les principales anomalies recherchées sont :

- Des transcrits de fusion correspondant à des translocations cryptiques au caryotype ou en cas d'échec de ce dernier (BCR-ABL1, ETV6-RUNX1 ...)
- Délétion ou mutation du gène IKZF1 (Ikaros, 7p12) : Il s'agit d'un gène qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation lymphoïde B normale. Les délétions sont plus fréquentes dans les LALB Ph + ou Ph-like et associées à un mauvais pronostic (17).
- Anomalies du gène PAX 5 (9p13) : Des délétions ou mutations sont retrouvées dans plus d'un tiers des LALB tandis que les amplifications sont plus rares. Ces anomalies joueraient un rôle important dans la leucémogénèse mais n'ont à priori pas d'impact pronostic (18).
- Mutations TP53 : Elles sont retrouvées dans la moitié des LAL avec hypodiploïdie sévère et associées à un mauvais pronostic et un fort taux de rechute (19).
- Les LAL dites Ph-like : Celles-ci correspondent à 10-15% des LAL de l'enfant et globalement associées à un pronostic défavorable (20)(21). Néanmoins, il sera possible d'utiliser des inhibiteurs de tyrosine kinase en compléments thérapeutique afin d'améliorer ce

pronostic. Ainsi, la connaissance de l'existence de ces anomalies est indispensable. Par définition, il s'agit de LAL présentant un profil d'expression génique comparable à celui des LAL avec BCR-ABL1 (22). Quelle que soit l'anomalie, on retrouvera une dérégulation d'un récepteur de cytokine à activité tyrosine-kinase (23). Plusieurs altérations et réarrangements ont été décrits (20) :

- Réarrangement type ABL1 impliquant les gènes ABL1, 2, PDGFRA ou CSF1R
- Réarrangement EPOR (volontiers dérégulé par IGH ou IGK)
- Réarrangement JAK2
- Réarrangement CRLF2
- Mutations des gènes NRAS, KRAS, PTPN11 ou NF1 plus souvent associées aux LAL hyperdiploïdes ou avec anomalie MLL.

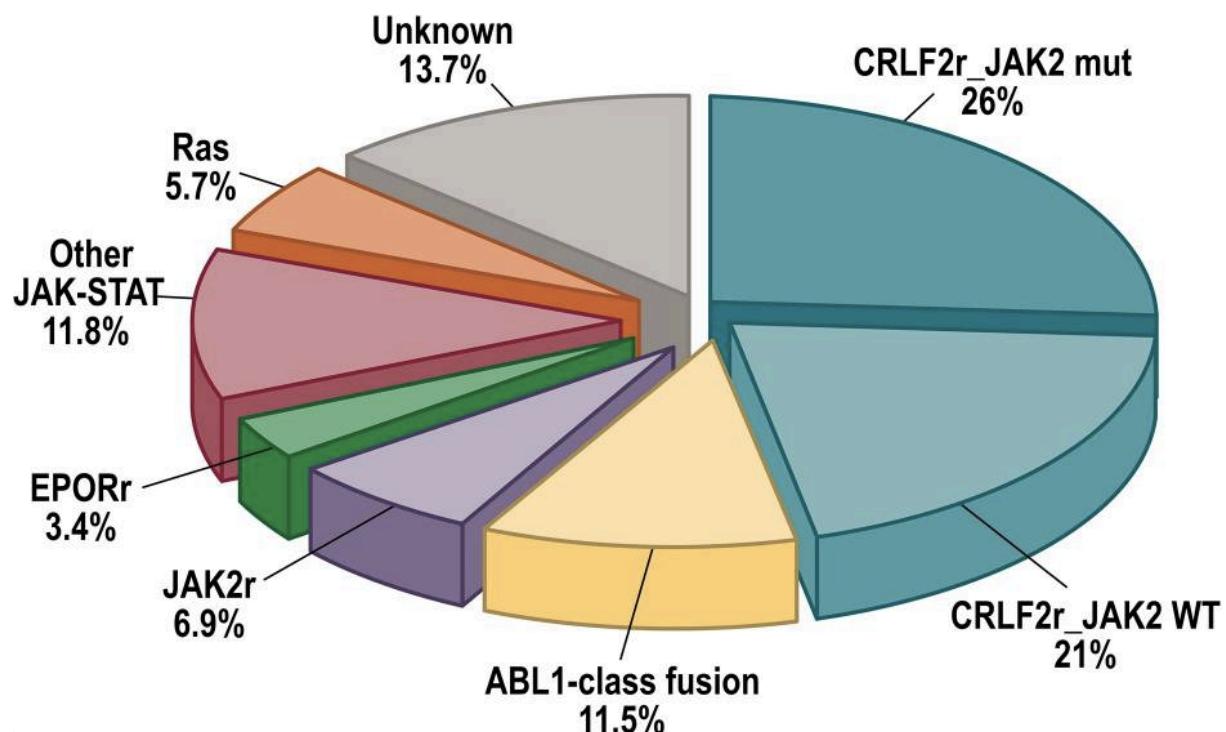


Figure 2. Répartition des sous-types de LAL Ph-like chez les enfants, adolescents et adultes jeunes D'après Hunger et al. (23)

Plus récemment, de nouvelles entités de LAL B ont été identifiées avec notamment des réarrangements impliquant : MEF2D (4% des LAL B pédiatriques, de pronostic mauvais à intermédiaire), ZNF384 (5% des LAL pédiatriques, pronostic intermédiaire et plutôt LAL preB ou biphenotypiques), ETV6-RUNX1 like (3% des LAL pédiatriques et pronostic

favorable), NUTM1 (1% des LAL B de l'enfant) ou encore DUX4 (pronostic favorable, on y retrouve la délétion ERG) (9).

B. PRONOSTIC et EVOLUTION

1. Facteurs pronostics pré-thérapeutiques

Pour les LALB de l'enfant, de nombreux facteurs pronostiques ont pu être identifiés au cours du temps. Actuellement, l'âge au diagnostic (< 1 an et > 10 ans), l'atteinte du système nerveux central, l'hyperleucocytose supérieure à 50G/L, la corticorésistance à J8 et certaines anomalies génétiques restent les principaux facteurs de mauvais pronostic (24). Le pronostic est ensuite réévalué en fonction de la réponse thérapeutique et de la maladie résiduelle. Ces données sont de plus en plus au premier plan et sont des éléments essentiels guidant la thérapeutique (25)(26). L'objectif est d'évaluer le risque de rechute et de décès du patient afin d'adapter l'intensité thérapeutique rapidement.

2. Prise en charge

La prise en compte de l'ensemble des facteurs précités va permettre d'adapter l'intensité du traitement de manière objective. Les patients seront ainsi classés en risque standard, intermédiaire ou élevé (24). Il est à noter que l'utilisation de thérapies intensives permet parfois de diminuer le caractère péjoratif de certains facteurs. La pathologie reste létale dans quasiment 100% des cas en l'absence de traitement. Celui-ci passe essentiellement par de la chimiothérapie avec plusieurs phases d'intensité variable s'étalant sur 2 ans en moyenne : induction, consolidation et entretien. Les enfants avec les formes les plus sévères ont la possibilité de bénéficier d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir de sang de cordons ou d'un donneur volontaire de moelle osseuse (intrafamiliale préférentiellement). Actuellement, avec l'amélioration de la prise en charge des patients, on retrouve une survie à 5ans à plus de 85%.

II. LA PLOÏDIE

A. DEFINITIONS

Environ la moitié des enfants leucémiques présentent une aneuploïdie c'est à dire une anomalie du nombre de chromosomes (27). La notion de nombre modal est indispensable. Celui-ci correspond au nombre de chromosomes retrouvé dans la majorité des mitoses analysées. Pour rappel, le nombre normal de chromosomes dans une cellule humaine s'élève à 46 comprenant 22 paires d'autosomes et une paire de gondosomes : c'est la diploïdie par définition.

On parle d'hyperdiploïdie au-delà de 46 chromosomes. La notion d'hyperdiploïdie élevée reste moins bien définie avec des seuils variables d'une publication à l'autre. On évoque le plus fréquemment un nombre de chromosomes supérieur 50 et un index d'ADN supérieur ou égal à 1,16 (28). Selon la classification OMS 2016, la notion d'hyperdiploïdie élevée est associée à un nombre de chromosome compris entre 51 et 65 même si de nombreuses publications vont jusqu'à 67 chromosomes (29)(30). Les hyperdiploïdies plus faibles entre 47 et 50 ne sont pas considérées car sans valeur pronostique. L'hypodiploïdie est quant à elle utilisée pour parler de caryotypes avec un nombre de chromosomes inférieur ou égal à 45. Là encore, l'OMS considère l'hypodiploïdie de valeur pronostique à moins de 44 chromosomes avec deux entités : hypodiploïdie sévère ou faible et near-haploïdy.

B. UN OUTIL PRONOSTIC MAJEUR

Le pronostic et les traitements des LAL de l'enfant, et en particulier des LALB, se sont considérablement améliorés ces dernières années. La ploïdie des cellules leucémiques fait partie, comme nous l'avons dit précédemment, des principaux éléments à définir au diagnostic de la maladie. Mise en évidence en 1978 (31), son implication prépondérante dans le pronostic a ensuite été largement prouvée au cours de multiples études (32)(33)(34)(35). Actuellement, les patients sont classés dès le début de leur maladie en risque faible, intermédiaire ou élevé en fonction des différents critères et notamment cytogénétiques. Les étiologies de l'aneuploïdie et les mécanismes sont encore mal connus. Une instabilité

chromosomique sous-jacente avec l'apparition d'anomalies de séparation des chromosomes voire d'échanges entre les cellules et la création de multiples sous-clones paraît être une piste intéressante notamment dans les hyperdiploïdies élevées (36). Par ailleurs, une origine issue d'une seule mitose anormale semble être privilégiée mais le gains de différents chromosomes au cours de mitoses successives n'est pas exclu (37).

Attention cependant, plus que le nombre modal lui-même, le mécanisme de l'aneuploïdie est l'élément le plus déterminant du pronostic. Ainsi, il sera nécessaire de se méfier d'un nombre apparemment élevé de chromosomes qui pourrait correspondre en réalité à la duplication d'un clone hypodiploïde voir near-haploïde. Comme nous le verrons dans la partie discussion, cette situation constitue l'un des principaux enjeux techniques dans la détermination des aneuploïdies.

1. Hyperdiploïdie : anomalie de bon pronostic

L'hyperdiploïdie élevée (51 à 67 chromosomes) est reconnue comme un facteur de bon pronostic depuis le début des années 80 (38). Elle constitue une des anomalies génétiques récurrentes les plus fréquemment observées dans les LAL B de l'enfant, présente dans 25 à 30% des cas (39)(27). De manière générale, nous retrouvons essentiellement des trisomies. On met en évidence également des tétrasomies mais elles ne sont pas prédominantes et concernent essentiellement le chromosome 21 (39). La physiopathologie de ce processus reste encore mal définie mais de nombreuses études montrent que le gain de chromosomes n'est pas aléatoire. En effet, tous peuvent être gagnés mais huit le sont de manière récurrente dans 70% des cas : X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21. Parmi ces hyperdiploïdies, plusieurs études ont pu mettre en évidence des sous-groupes présentant des pronostics variables. Il semblerait ainsi que la survenue de certaines trisomies ait un pronostic plus favorable encore que l'hyperdiploïdie seule (28)(40). De cette manière, l'existence de la triple trisomie +4, +10 et +17 au diagnostic ou simplement des doubles trisomies +10 et +17 ou +4 et +10, en cas d'hyperdiploïdie élevée, améliore encore le pronostic avec moins de rechute (28)(41)(42)(43). D'autres analyses évoquent l'association des trisomies 4 et 18 comme facteur de meilleur pronostic (44). De la même façon, les enfants présentant un nombre modal de chromosomes au-delà de 54 voire de 58 (13) présenteraient aussi un avantage, alors qu'en inversement, la trisomie 5 semble plutôt être un élément grevant le pronostic (28).

Le substrat du rôle oncogénique de l'aneuploïdie est peu connu. Aucune translocation cryptique commune n'a pu être identifiée dans la littérature. Par ailleurs, l'analyse NGS a montré qu'en moyenne, seulement 7 mutations potentiellement impactantes étaient retrouvées au sein de cette catégorie de patient (45). On y retrouve notamment les mutations de gènes impliqués dans la voie RAS (46) et celles de gènes impliqués dans la régulation des histones (47). Même si cela pourrait constituer des facteurs pronostic secondaires supplémentaires, aucune mutation ou groupe de mutations n'est commun à l'ensemble des LALB avec hyperdiploïdie (48). Le gain de chromosome et, par ce biais, la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les différents systèmes de régulation du cycle cellulaire, semble constituer la piste principale dans la leucémogénèse de ces hémopathies.

2. Hypodiploïdie : un pronostic plus sombre

Un nombre de chromosomes inférieur ou égal à 45 est identifié dans 1 à 3% des cas (27). A l'inverse de l'hyperdiploïdie, cela a été associé à un pronostic défavorable chez les enfants avec une LAL (49), particulièrement les hypodiploïdies inférieures à 45 avec un pronostic qui s'aggrave avec la diminution du nombre de chromosomes (50)(51). Plusieurs études ont ainsi montré que les patients présentant un caryotype dit « near-haploïde » représentent la classe avec le pronostic le plus défavorable (52)(53). En 2004, Harrisson et al. confirment ces données et hiérarchisent les hypodiploïdies en 3 sous-groupes : near-haploïde (23 à 29 chromosomes), hypodiploïdie faible ou sévère (33 à 39 chromosomes) et hypodiploïdie élevée (42 à 45 chromosomes). Les deux premières présentent ainsi les pronostics les plus défavorables mais les patients avec plus de 40 chromosomes ont, quant à eux, une évolution plus hétérogène (54). Des études plus récentes semblent suggérer cependant que la MRD reste un élément majeur dans la détermination du pronostic au sein même de cette catégorie. Ainsi, des patients avec une hypodiploïdie mais une MRD négative après 6 semaines d'induction voient leur pronostic amélioré en cas de chimiothérapie intensive (55). Par ailleurs, les caryotypes autour de 44-45 chromosomes ne semblent pas partager un pronostic aussi sombre que le reste des hypodiploïdies. Ceux-ci sont liés en général à la présence de monosomies uniques, de translocation déséquilibrées ou encore de chromosomes dicentriques (56).

Dans ce contexte, il est particulièrement important de se méfier des hypodiploïdies masquées. En effet, certains patients peuvent présenter un caryotype entre 50 et 78

chromosomes correspondant à la duplication d'un clone inférieur ou égal à 39. Parfois, les deux clones sont visibles et facilement identifiables par le caryotype. Mais il arrive que seul le clone dupliqué se manifeste. Cela constitue un authentique piège cytogénétique avec des conséquences importantes sur la prise en charge. Dans ces cas, l'utilisation appropriée de la FISH, de la CMF et de la SNP-array peut permettre de résoudre le problème (57). Actuellement, aucune différence de pronostic n'a été mise en évidence entre les patients hypodiploïdes avec ou sans duplication (58).

C. LES TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA PLOÏDIE

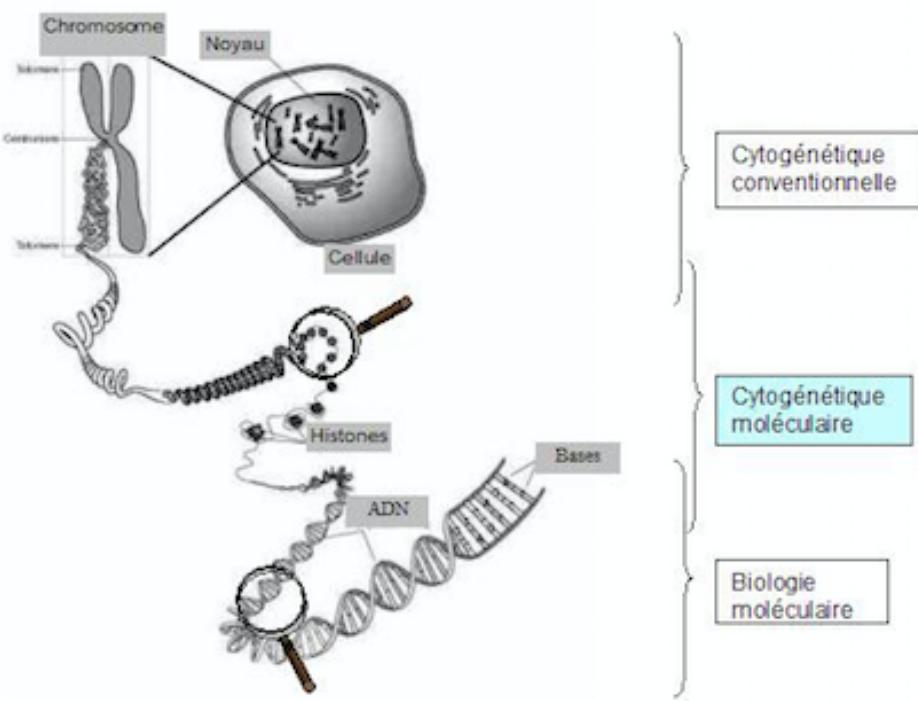


Figure 3. Les niveaux de résolution des techniques d'études génétiques. D'après B. Delobel. (59)

De haut en bas : La cytogénétique conventionnelle permet l'étude de l'ensemble du génome sous forme de chromosomes avec une résolution faible (plusieurs Mégabases). La cytogénétique moléculaire, comprenant FISH et CGH/SNP-array, autorise une étude plus fine avec une résolution oscillant entre quelques dizaines et quelques centaines de Kilobases. Enfin, la biologie moléculaire permet une analyse à l'échelle de la base. A noter, l'existence de zones de chevauchement entre les résolutions des techniques.

1. Caryotype Standard

Le nombre normal de chromosomes dans une cellule humaine a été établi en 1956 (60). Dès lors, la cytogénétique humaine s'est considérablement et rapidement développée. En 1960, la première anomalie chromosomique spécifique d'une pathologie maligne est identifiée dans une cellule de leucémie myéloïde chronique et ouvre le champ de la cytogénétique onco-hématologique (61). Depuis, le caryotype des cellules malignes reste le choix de première intention et l'examen à réaliser de façon systématique lors de tout diagnostic de leucémie aigüe. Il offre notamment la possibilité d'avoir une vision de l'ensemble du génome ce qui représente son principal avantage avec une résolution limitée à maximum 5Mb. Il permet d'avoir un aperçu de l'ensemble des chromosomes et de visualiser tous les types d'anomalies qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, équilibrées ou non : aneuploïdies, translocations équilibrées ou pas, grandes délétions et amplifications... Le caryotype conventionnel correspond à l'étude des chromosomes après fixation de cellules vivantes bloquées en métaphase.

Pré-Analytique et mise en Culture :

Après réception du prélèvement hépariné (moelle, sang, ganglion ou tissus) et transporté rapidement en milieu stérile, celui-ci est mis en culture pendant 24 à 96h en fonction de la suspicion diagnostique au sein d'une étuve à CO₂ à 37°C. En ce qui concerne les diagnostics de LALB, une culture de 24h sans agent mitogène et sans synchronisation est privilégiée.

Sortie de culture, choc et fixation :

Par la suite, on procède à un blocage des cycles cellulaires en métaphase grâce à l'utilisation de la colchicine qui est un poison du fuseau mitotique. Elle interrompt la fusion des fibres du fuseau et libère les chromosomes de la plaque équatoriale. Pour rappel, la métaphase correspond à l'étape au cours de laquelle la chromatine atteint son degré de condensation maximale permettant ainsi de visualiser le génome sous la forme de chromosomes (62).

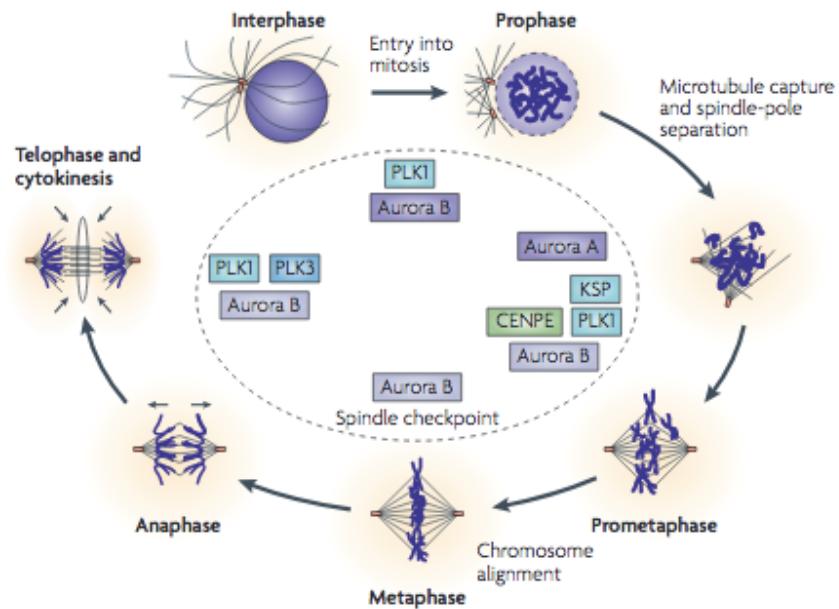


Figure 4. Les phases de la mitose. D'après Jackson et al. (62)

La mitose représente 10% du temps du cycle cellulaire. La cellule mère entre d'abord en prophase (46 chromosomes à deux chromatides) avec condensation progressive de la chromatine et mise en place des centrosomes de part et d'autre du noyau. Les chromosomes se déplacent via les kinetocores au grès des polymérisations et dépolymérisations des microtubules. Au moment de la métaphase ils sont condensés au maximum et présents le long de la plaque équatoriale. Les chromatides sœurs sont séparées et attirées vers les pôles opposés de la cellule lors de l'anaphase. Après la télophase on obtient deux cellules filles contenant deux fois moins d'ADN, 46 chromosomes à une chromatide, mais le même patrimoine génétique.

Cette étape peut être précédée par une synchronisation des cultures : les cellules sont successivement bloquées en phase S (phase de réPLICATION de l'interphase, cf figure 5 (63)) à l'aide de FRDU (5-fluorodésoxyuridine = analogue de la thymidine) puis débloquées en utilisant de la thymidine. Ceci permet d'améliorer la qualité voire la quantité des métaphases. Après lavages et centrifugations, on réalise ensuite un choc hypotonique en mettant les cellules quelques minutes au sein d'une solution hypotonique. Ceci leur permet de gonfler et d'obtenir un étalement optimal des métaphases pour que le classement des chromosomes soit plus facile. S'ensuivent une fixation et un étalement des préparations chromosomiques sur lame dans des conditions hygrométriques et de température optimisées. Il faut alors vérifier la quantité et l'aspect des métaphases au microscope à contraste de phase afin d'adapter les étapes suivantes.

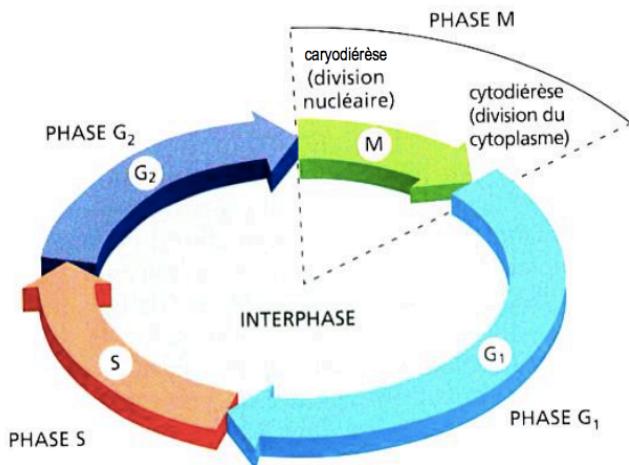


Figure 5. Les phases du cycle cellulaire D'après Alberts et al. (63)

Le cycle cellulaire se décompose en 4 phases : la mitose, la phase G₁, la phase S et la phase G₂. Les cellules entrent en phase G₁ avec 46 chromosomes à une seule chromatide. La phase S est une phase de réPLICATION de l'ADN qui permet d'obtenir 46 chromosomes à deux chromatides et de préparer la mitose. Les phases G₁ et G₂ sont des périodes de synthèse de protéines, de contrôle de l'environnement et de réparation de l'ADN.

Dénaturation et marquage en bandes :

La dernière étape de traitement, et l'une des plus délicate, correspond à la dénaturation et coloration des chromosomes. L'objectif est de générer des bandes colorées sur les chromosomes avec une résolution moyenne de l'ordre de 400 à 650 bandes. Il est possible d'obtenir des bandes G ou R en fonction de la technique utilisée. En France, de manière générale et au sein de notre laboratoire à Marseille, ce sont les bandes R qui sont privilégiées. Celles-ci sont obtenues après dénaturation chimique (acide) et thermique. A l'inverse, les bandes G sont générées par dénaturation enzymatique (trypsine) seule. Dans tous les cas, une étape de coloration au Giemsa est ensuite réalisée pour obtenir sur chaque chromosome une alternance de bandes claires et de bandes sombres qui lui est propre. La taille, l'intensité et la succession de chaque bande est spécifique à chaque chromosome et permet de les classer précisément. Le banding, inventé dans les années 70 par Caspersson et al (il s'agissait initialement de bandes fluorescentes à la quinacrine (64)(65)) a permis non seulement de classer plus précisément les chromosomes mais aussi de déterminer avec une plus grande exactitude les points de cassures en cas d'anomalies. Le substrat moléculaire de l'apparition de ces bandes n'est pas clairement défini, néanmoins il semble que ce soit en partie lié à la composition en bases, au temps de réPLICATION, à l'association aux protéines chromosomiques et au niveau de condensation de la chromatine. Ainsi, les bandes R (foncées) sont plus riches

en régions codantes répliquées précocement, en bases GC et contiennent la plupart des points des cassures impliqués dans les principaux remaniements connus.

A noter qu'il existe aussi des bandes C et NOR qui marquent respectivement les centromères et les régions d'organisation nucléolaire (bras courts des acrocentriques) mais qui sont largement moins utilisées.

Sélection et classement des métaphases :

Finalement, les métaphases sont capturées manuellement ou automatiquement et ensuite sélectionnées puis classées à l'aide de logiciels de reconnaissances de formes. Il est nécessaire de varier la qualité des mitoses analysées pour limiter le risque de faux négatif. En effet, classiquement les cellules leucémiques des LAL possèdent des chromosomes de qualité médiocre. Ainsi, si on ne classe que les « jolies » métaphases, on s'expose à la possibilité de ne classer que des caryotypes de cellules normales et donc d'avoir un examen non informatif voire faussement interprété comme normal.

Chaque chromosome est donc classé selon sa taille, son banding, la position de son centromère et son rapport bras court/bras long (p/q). Les potentielles anomalies sont identifiées et le caryotype définitif du diagnostic de LAL est établi. En l'absence d'anomalie, il est nécessaire d'analyser au moins 20 mitoses afin de l'affirmer. A l'inverse, toute anomalie détectée doit être clonale c'est à dire identifiée sur au moins 2 mitoses en cas de gain d'un chromosome ou 3 mitoses en cas de perte. Si nécessaire, une anomalie non clonale peut être confirmée/infirmée par FISH.

La réalisation d'un caryotype standard reste donc la règle et permet en général d'orienter les autres analyses. Même si celui-ci est indispensable, il est non suffisant voire même parfois non informatif et nécessite d'être complété. C'est à ce moment là qu'interviennent les techniques de cytogénétique moléculaire.

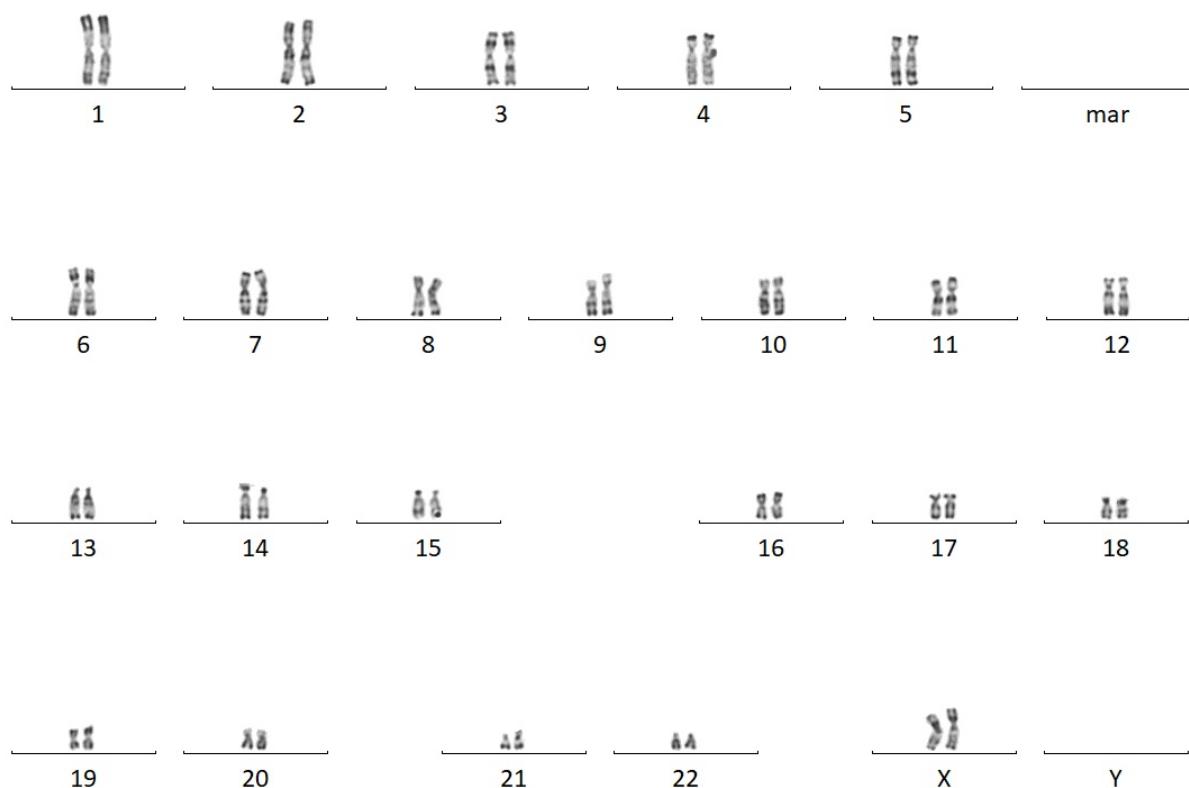


Figure 6. Exemple de caryotype normal (46,XX) en bandes R

2. Cytogénétique moléculaire

a) **FISH**

La FISH, ou hybridation *in situ* par fluorescence, est basée sur le principe de réassociation spécifique des acides nucléiques. Il s'agit d'une méthode de cytogénétique moléculaire permettant l'étude des anomalies chromosomiques en utilisant des sondes moléculaires marquées par des fluorochromes. Développée dans les années 80 (66), elle arrive en complément du caryotype et son utilité dans la prise en charge des LAL a été largement démontrée (67)(68). Cette technique est une analyse ciblée avec une sensibilité de l'ordre de 100Kb comprise entre la cytogénétique conventionnelle (10 Mégabases) et la biologie moléculaire (une base). Elle permet donc de mettre en évidence des anomalies cryptiques en cytogénétique conventionnelle ou de confirmer des anomalies suspectées (69).

Pour rappel, la molécule d'ADN est constituée de deux brins antiparallèles reliés entre eux par complémentarité des bases via des liaisons hydrogènes. Ces brins étant susceptibles d'être dissociés puis réassociés à l'infini. Ainsi, au cours de la FISH, plusieurs étapes vont permettre de séparer puis réunir les séquences d'ADN génomique avec des sondes spécifiques.

L'hybridation in situ peut être réalisée sur métaphases ou sur noyaux interphasiques.

- FISH métaphasique : Elle reste le « gold standard » car elle permet de visualiser les chromosomes, la position des sondes et parfois de mieux préciser le mécanisme de l'anomalie. L'obtention de métaphases nécessite une étape de culture cellulaire identique à celle réalisée pour le caryotype.
- FISH interphasique : L'étude des noyaux interphasiques permet de compter plus de cellules et de réaliser l'analyse sur différents types de prélèvements (67). Il est possible de réaliser l'hybridation sur noyaux directement à partir du culot cytogénétique (on peut alors combiner sur la même lame les FISH métaphasiques et interphasiques) ou encore sur cytospins, lames d'étalement de moelle ou coupes de tissus paraffinés. Tout l'intérêt de cette technique dans les LALB de l'enfant intervient dans la détection des aneuploïdies (70)(71). En effet, l'utilisation de sondes centromériques ou locus spécifique peut aider à compter les chromosomes, identifier et confirmer l'aneuploïdie suspectée au caryotype (72). Plusieurs études mettent en avant l'utilisation de sondes des chromosomes 4, 6, 10 et 17 afin de mettre en évidence ou confirmer ces trisomies qui sont celles les plus fréquemment retrouvées et avec un intérêt pronostic (40)(71).

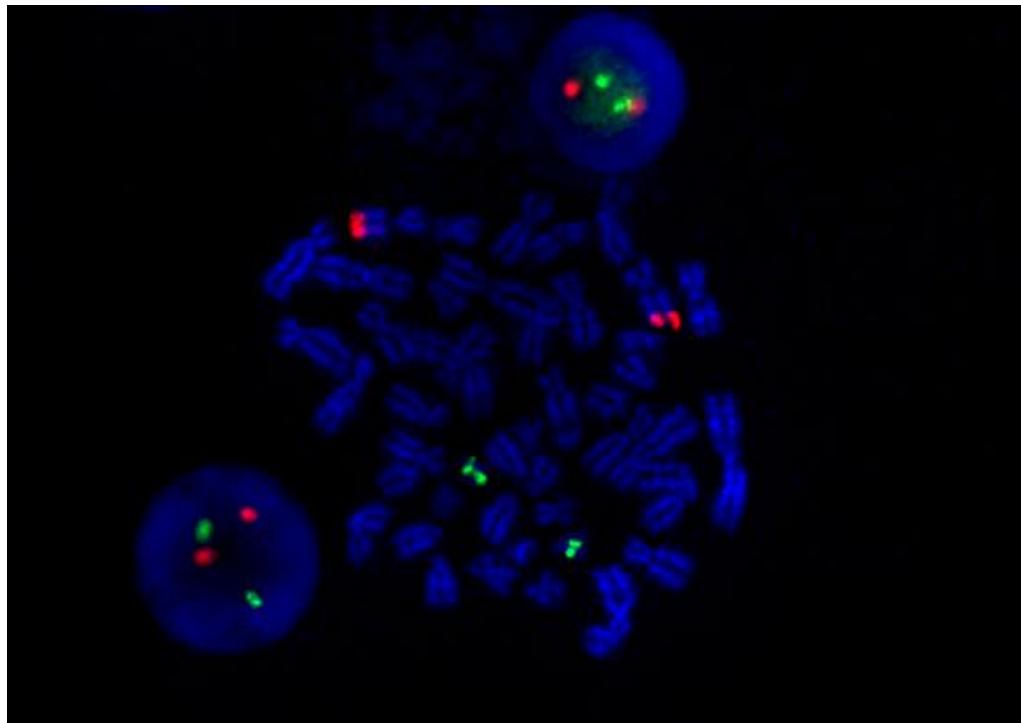


Figure 7. Image FISH métaphasique

Sonde BCR-ABL1 (22q11/9q34), double fusion, extra-signal de VYSIS, métaphase et 2 noyaux normaux (BCR en vert et ABL1 en rouge).

Préparation des lames :

Dans le cas des LALB, nous étalons en général du culot cytogénétique sur des lames après culture. Il est aussi possible d'utiliser des lames d'étalement de moelle. Les sondes que l'on souhaite utiliser sont déposées sur les lames. Les sondes de FISH sont des séquences complémentaires de la séquence d'intérêt marquées par incorporation de bases nucléotidiques associées à des fluorochromes. Il en existe plusieurs types :

- Locus spécifique : les plus utilisées notamment pour chercher des réarrangements mais aussi parfois pour identifier des aneuploïdies. On distingue les sondes :
 - Bicolore, simple fusion : elles ciblent des séquences situées à côté de chacun des deux points de cassures (mais sans les couvrir). Elles présentent des risques de faux positifs en raison du taux possiblement élevé de colocalisations aléatoires. L'aspect normal sera 2R2V et l'anormal classique, 1F1R1V (F=fusion, R=rouge, V=vert)
 - Bicolore, simple fusion, extrasignal : une des deux sondes couvre un point de cassure. L'aspect normal sera 2R2V et l'anormal classique, 1F1R1V1r.

→ Bicolore, double fusion : largement plus utilisées car elles diminuent le risque de faux positifs. Les deux sondes couvrent entièrement les points de cassure donc l'aspect anormal classique sera 2F1R1V.

→ Bicolore, séparation (break apart) : les deux sondes marquent des séquences situées de part et d'autre d'un point de cassure d'un gène. Elles sont utiles lorsqu'il existe de nombreux partenaires (ex : MLL). L'aspect anormal classique est 1F1R1V alors que cette fois-ci, l'aspect 2F est considéré comme normal.

- Centromérique : elles marquent les centromères ; elles sont utiles pour compter les chromosomes mais peuvent parfois marquer les autres centromères de manière non spécifique.
- Sub-télomériques
- Peintures : elles peuvent marquer un bras chromosomique ou un chromosome entier

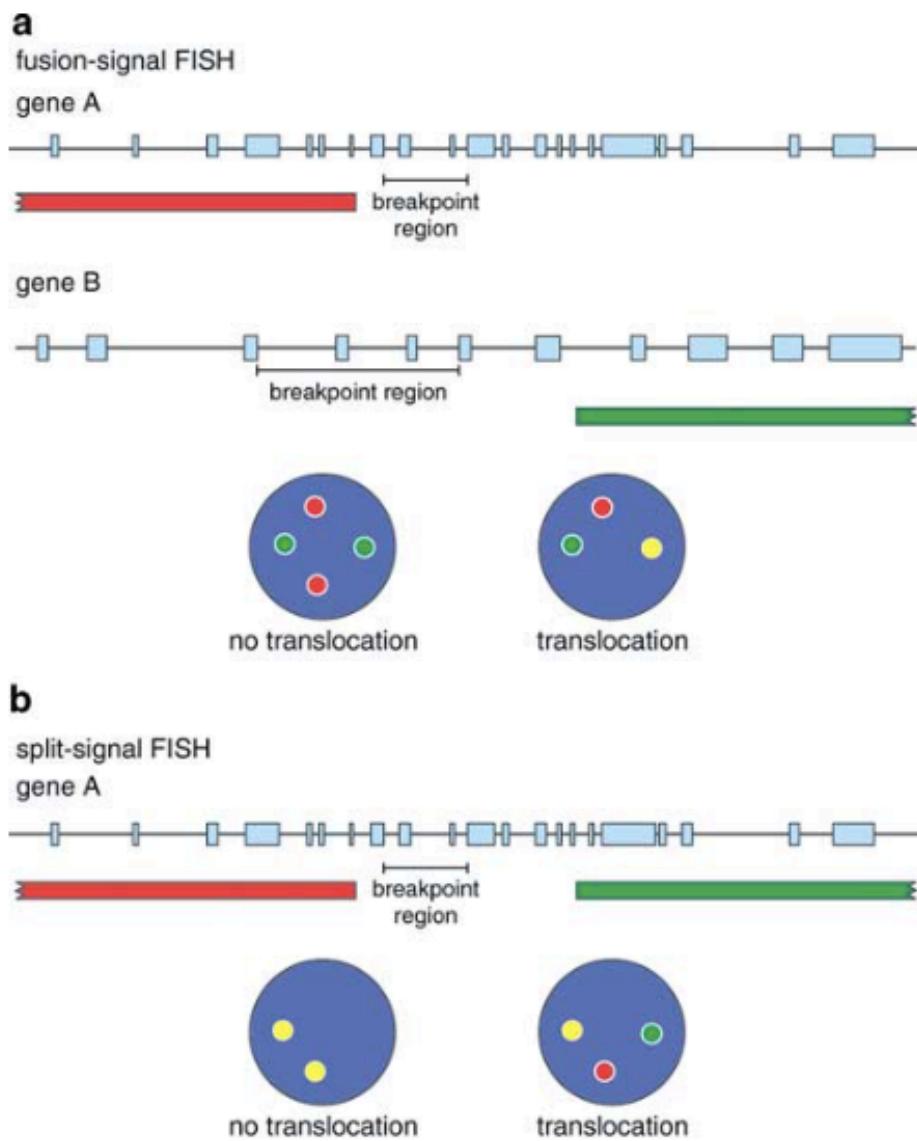


Figure 8. Schémas représentatifs de sondes de fusion et de sondes break-apart (BA).

(a) représente une sonde simple fusion pour laquelle le signal anormal correspond au signal de fusion. (b) représente une sonde de séparation (BA) pour laquelle le signal normal correspond au signal de fusion. D'après Van der burg et al. (73).

Dénaturation :

On procède à une co-dénaturation des brins d'ADN du patient et des sondes marquées en mettant les lames entre 70 et 85°C pendant 1 à 5min.

Hybridation :

En diminuant la température à 37°C pendant quelques heures, les sondes ciblent et se réapparient spécifiquement avec la région d'intérêt par complémentarité.

Lavage et révélation :

Après des étapes de lavages pour éliminer le bruit de fond potentiel on procède à une contre-coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), molécule fluorescente qui se lie aux bases A et T de l'ADN et qui permet de marquer les noyaux en interphase et les chromosomes en métaphase (bandes DAPI). Finalement, les lames sont analysées au microscope à fluorescence qui permettra de révéler les fluorochromes.

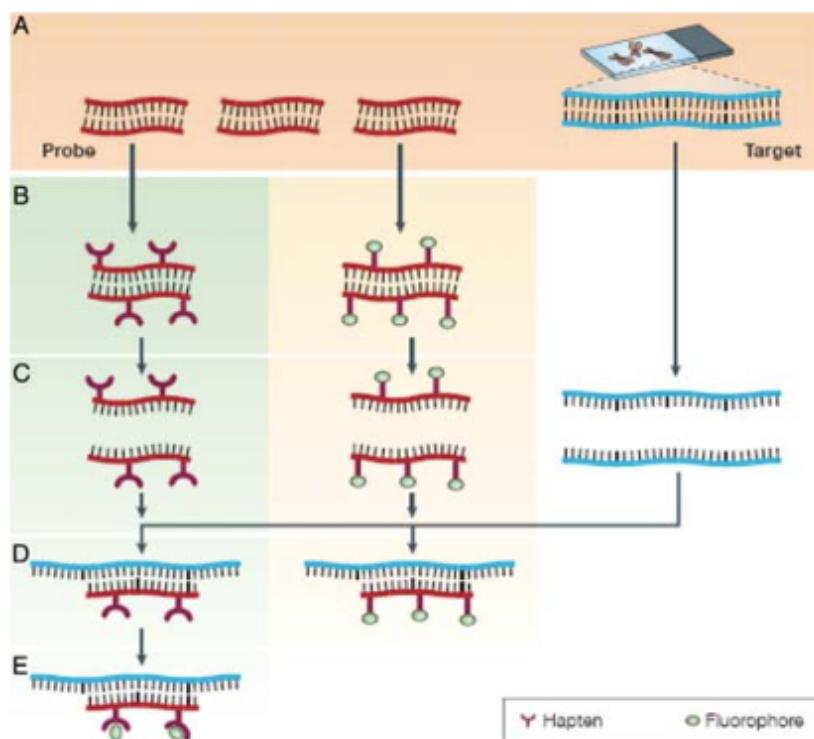


Figure 9. Représentation schématiques des étapes de la technique de FISH (74)

(A) Les sondes et les séquences d'ADN cibles sont étalées sur lame. (B) Auparavant les sondes sont marquées directement par incorporation de nucléotides marqués avec des fluorochromes (droite) ou indirectement via des haptènes (gauche). Ces derniers seront liés par des Ac eux-même associés à des fluorochromes. (C) Codénaturation des sondes et des séquences d'intérêt. (D) Hybridation. (E) Etape supplémentaire uniquement pour le marquage indirect pour ajouter les Ac reliés aux molécules fluorescentes. Cette technique est largement moins utilisée. D'après Bishop R.

b) CGH/SNP-Array

→ La CGH conventionnelle

La CGH, ou hybridation génomique comparative, a été mise en place au début des années 90 (75). Le principe est de marquer l'ADN du patient et de l'ADN témoin, présents en même quantité, avec deux fluorochromes différents. S'ensuit une étape d'hybridation compétitive de notre mélange d'ADN sur des lames où sont étalées des métaphases. Les signaux générés par les fluorochromes sont numérisés et un rapport d'intensité des fluorescences est établi. Celui correspond au reflet du rapport de la quantité d'ADN du patient vis à vis de celle du témoin. Après traitement informatique, il est représenté sous la forme d'une ligne le long d'un idéogramme chromosomique. In fine, on exprime les valeurs en logarithme (log R ratio):

- Un log R ratio proche de 0 (ligne de base sur le graphique) correspond à un équilibre parfait entre les deux ADN donc pas de gain ou de perte. Une déviation significative de plusieurs signaux sur une même région suggère un problème (16).
- En dessous on sera dans une situation de perte de matériel : délétion, monosomie
- Au-delà on sera dans une situation de gain : duplication, amplification, plurisomies...

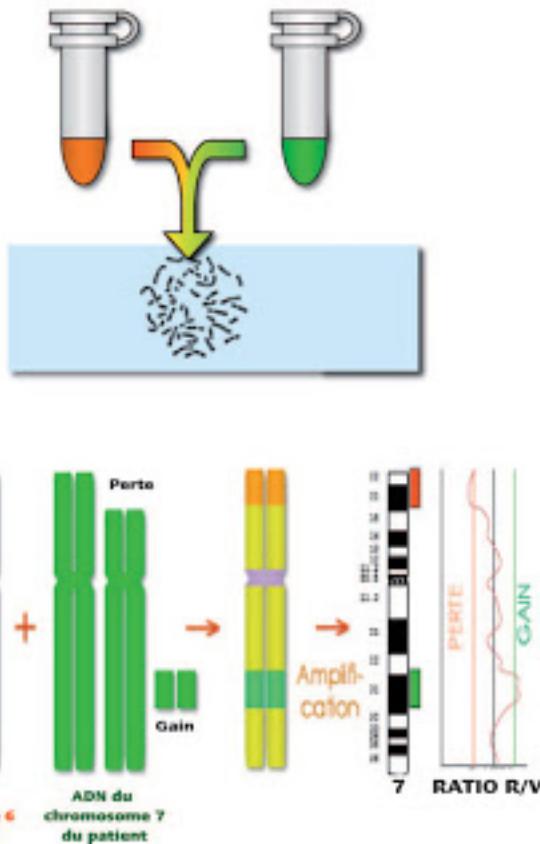


Figure 10. Représentation schématique de la technique de CGH conventionnelle (76)

L'ADN du patient et l'ADN témoin marqués différemment sont mélangés en quantité équivalente. S'ensuit une étape d'hybridation compétitive sur métaphase de témoin avec recueil des signaux émis et génération d'un rapport de fluorescence pour chaque bande chromosomique. Celui-ci est ensuite exprimé sous la forme d'un idéogramme suivant l'axe longitudinal de chaque chromosome. La ligne de base (à 0) correspond à l'équilibre tandis que les déviations significatives d'un côté ou de l'autre correspondent aux pertes et gains de matériel. D'après Campus Cerimes.

L'idée est de comparer l'intensité des signaux pour chaque bande chromosomique afin d'en déduire si il y a un gain ou une perte de matériel chez le patient par rapport au témoin : délétion, duplication, amplification (76)... Cette technique permet une analyse bien plus objective que l'étude morphologique mais le problème reste cependant la résolution. En effet, celle-ci demeure à l'échelle de la bande chromosomique tout comme le caryotype. Il faudra attendre 1997 (77), pour développer une technique améliorée où l'hybridation se fait sur des séquences nucléotidiques cibles fixées sur des supports solides : c'est le début de la CGH-array. Ceci permettra d'augmenter considérablement la résolution de l'analyse.

→ **La CGH-array :**

De la même façon que pour la CGH classique, on mélange les deux ADN marqués différemment mais cette fois ci, l'hybridation compétitive se fait sur des puces sur lesquels on retrouve des puits contenant des séquences génomiques (ou sondes) plus ou moins grandes. Les signaux de fluorescences seront recueillis pour chaque puits qui contient un seul type de sonde. Un ratio d'intensité est ainsi généré pour chaque fragment d'ADN et ce, pour l'ensemble du génome. Des logiciels permettent ensuite de représenter les résultats sous la forme d'un graphique pour chaque chromosome de la même manière que pour la technique précédente. Les déséquilibres identifiés ne concerneront plus une bande entière mais une séquence nucléotidique plus petite. La résolution dépendra donc de la taille des sondes utilisées avec une amélioration constante ces dernières années. De nos jours, l'utilisation de sondes oligonucléotidiques permet une analyse de l'ordre de quelques Kb. On parle de caryotype moléculaire.

In fine, cette technique permet donc d'identifier les déséquilibres chromosomiques en comparant le nombre de molécules d'ADN d'une personne par rapport à un témoin. On parle de variations de nombre de copies ou « CNV » (76).

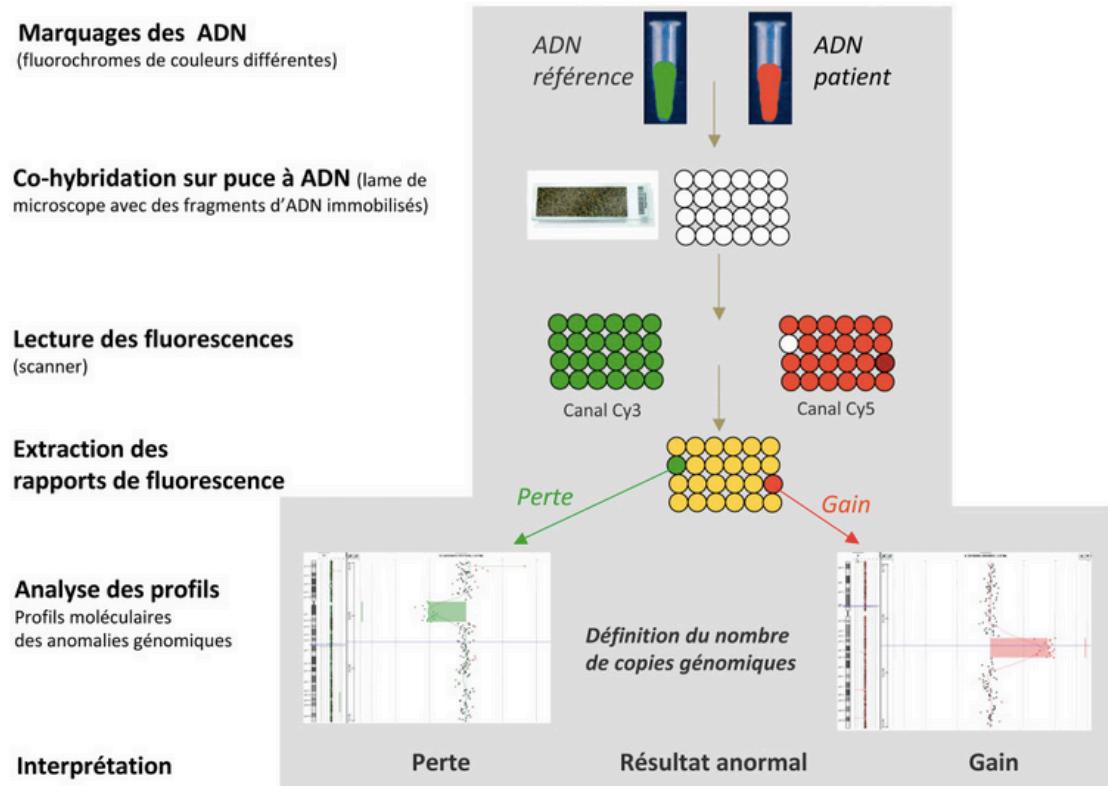


Figure 11. Les étapes de la CGH-array (78)

Le mélange d'ADN est cette fois-ci déposé sur des plaques contenant des puits dans lesquels on retrouve des séquences d'ADN immobilisées. Pour chaque puit/sonde, le rapport de fluorescence est généré puis, après traitement informatique, exprimé sous la forme d'idéogrammes pour chaque chromosome. A gauche de chaque graphique on retrouve ici la représentation du chromosome avec les bandes chromosomiques et a droite le report des ratios de fluorescence pour chaque zone le long du chromosome. Les décalages par rapport à la ligne de base vers la droite (ici surligné en rouge) correspondent à des gains tandis que les décalages vers la gauche (en vert) matérialisent des pertes de matériel. D'après l'institut de pathologie et de génétique a.s.b.l.

→ **La SNP-array :**

Dans le cadre de la SNP-array, on utilise des sondes dans lesquelles sont intégrées des SNP ou single nucléotide polymorphisms. Il s'agit de variations d'une seule paire de base (pb) qui sont distribuées le long du génome de manière uniforme, toutes les 100 à 1000 pb (16). Par définition, elles sont présentes chez au moins 1% de la population et ne sont pas pathogènes. Les oligonucléotides synthétisés auront ainsi les deux allèles du SNP pour chaque locus. Cette variante de la technique permet d'identifier les pertes d'hétérozygotie (LOH) et disomies uniparentales (UPD). Dans ce cas, un seul des deux allèles sera identifiable. Cette notion a un intérêt majeur dans l'étude des anomalies de la ploïdie. En pratique, on évalue

grâce à cette technologie un paramètre supplémentaire au log R ratio que l'on appelle la fréquence de l'allèle B ou BAF (B allele frequency = B/A+B). Les deux allèles d'un même gène, l'un d'origine paternel et l'autre d'origine maternel, sont nommés arbitrairement A et B. Pour chaque gène, un patient peut être AA, BB (homozygote) ou enfin AB (hétérozygote) ce qui correspond respectivement à des BAF à 0%, 100% et 50% (ligne de base sur le graphique). En temps normal, nous détenons de l'ADN d'origine paternel et maternel et nous aurons une répartition des SNP selon les trois fréquences. En cas de LOH, le patient est pour chaque région soit AA, soit BB mais il n'existe plus de AB par définition donc plus de BAF à 50%. C'est ce qui arrive dans les UPD, un des deux allèles disparaît tandis que l'autre se duplique. Cette anomalie pourra se voir à l'échelle de chromosomes entiers dans les cas d'hypodiploïdie dupliquée, un chromosome est perdu et son homologue se duplique. On se retrouve donc avec une paire comprenant deux chromosomes issus du même parent. A noter, il est rare d'avoir un prélèvement avec 100% de cellules malignes, de ce fait les pourcentages précédents sont susceptibles d'être modifiés en fonction du degré de dilution par les cellules normales mais le principe restera le même (cf figure 13).

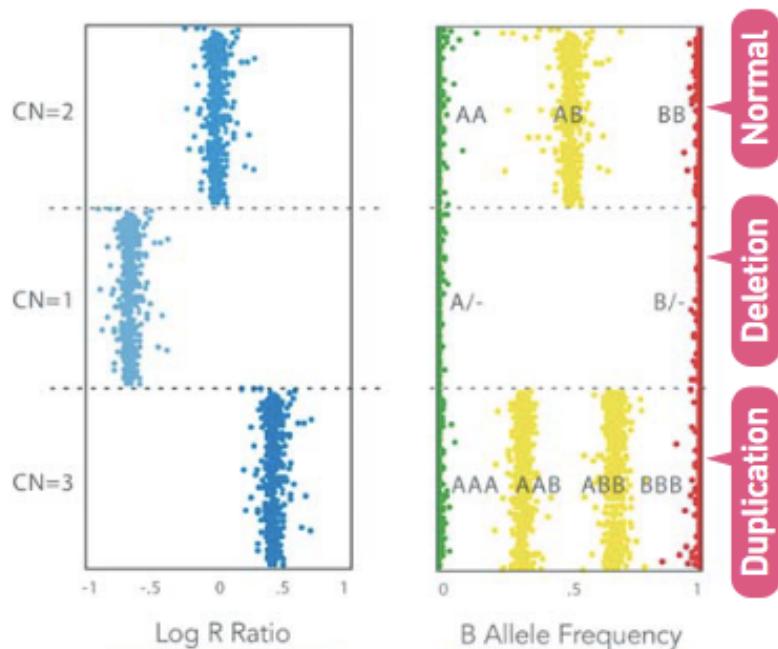


Figure 12. Représentation schématique des résultats de log R ratio et de BAF (79)

A gauche les représentations de Log R ratio et à droite celles de la BAF pour les situations les plus classiques. De haut en bas : Situation normale avec diploïdie, CN=2 (Copie Number) et les 3 BAF sont représentées. Contexte de délétion hétérozygote/perte ou de LOH, CN=1 et disparition du génotype AB. Contexte de duplication hétérozygote/gain, CN=3 et apparition de BAF à 33% et 66%. D'après Haematological Malignancy Diagnostic Service.

Un dernier paramètre peut être étudié, il s'agit de l'allèle différence. Il est calculé en faisant la différence entre l'allèle A et l'allèle B pour chaque SNP. Ainsi, cette fois ci, un profil homozygote AA correspond à la valeur 1, un profil homozygote BB à la valeur -1 et une hétérozygotie AB à 0 (ligne de base).

Toutes ces techniques sont basées sur une extraction initiale de l'ADN du patient. Elles sont donc réalisables sur tous types de prélèvements mais aussi et surtout sur échantillons de petites tailles et congelés. Les détails techniques de réalisation vont ensuite varier en fonction de la technologie utilisée (Agilent, Affimetrix...).

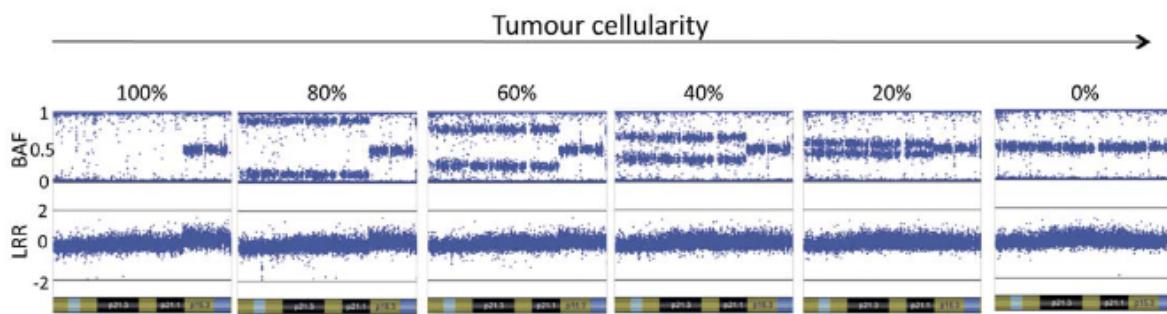


Figure 13. Variation de la BAF et du Log R ratio en fonction du pourcentage de cellules anormales. D'après Song et al. 2012 (80)

3. Cytométrie en flux

Au-delà de la détermination des marqueurs antigéniques de surfaces et cytoplasmiques des cellules leucémiques nécessaire à la classification et au diagnostic, la cytométrie en flux peut aussi permettre de déterminer le contenu en ADN et donc la ploïdie (81). Cette technique rapide, pouvant se faire sur sang ou moelle sur tube EDTA, permet d'analyser un grand nombre de cellules et donc éventuellement de mettre en évidence de petits clones. Pour se faire, on utilise un marquage à l'iodure de propidium. Il s'agit d'un agent fluorescent et intercalant des acides nucléiques, qui permet de marquer l'ADN et l'ARN des cellules. Après excitation par une longueur d'onde spécifique (488nm) la quantité de fluorescence émise sera directement proportionnelle à la quantité d'ADN (82).

Enfin, on obtient un ou plusieurs pics correspondant à la fluorescence moyenne des cellules normales et des cellules leucémiques. L'index d'ADN est généré en déterminant le rapport de fluorescence entre les pics. Il est donc nécessaire d'avoir des cellules diploïdes de référence afin de comparer (contingent de cellules normales dans le prélèvement ou témoin). Un rapport de 1 (un seul pic visible) correspond en théorie à des cellules avec un nombre normal de chromosomes, c'est à dire diploïdes. Attention, ceci ne préjuge en aucun cas du caractère normal du caryotype pouvant présenter des anomalies de structure équilibrées voire des anomalies de nombres qui se compensent. Lorsque d'autres pics apparaissent, ils peuvent donc correspondre à des clones de cellules leucémiques présentant des anomalies de la ploïdie : hypodiploïde ou hyperdiploïde. Plusieurs études ont pu établir des correspondances entre le nombre modal de chromosomes et l'index d'ADN (83). Ce dernier permet ainsi de déterminer la ploïdie de façon fiable en particulier pour les hyperdiploïdies au-delà de 50 chromosomes avec une sensibilité moindre pour les ploïdies proches de 46 (84). Le nombre modal le plus fréquent se situe entre 53 et 54 et correspond à un index d'ADN de 1,2 (83).

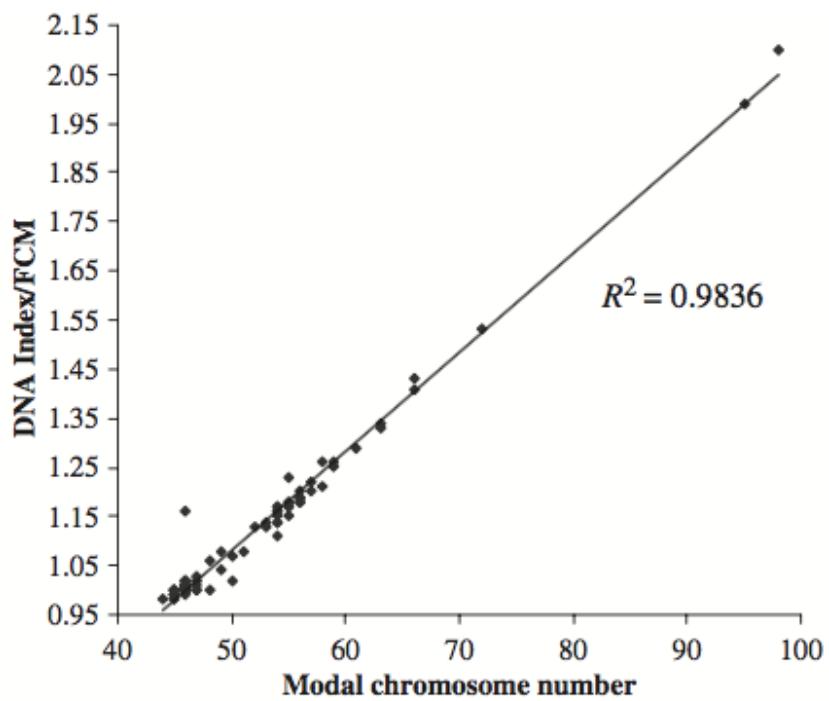


Figure 14. Corrélation entre le nombre modal de chromosomes et l'index en CMF D'après Rachieru-Sourisseau et al. (83)

Par ailleurs, l'apport pronostique a lui aussi été largement démontré. Dès 1985, Look montre qu'un index d'ADN supérieur ou égal à 1,16 est associé à un meilleur pronostic chez les enfants « standard risk » (85). Par la suite, cette idée est confirmée au sein des groupes de patients de risques intermédiaires et élevés (86).

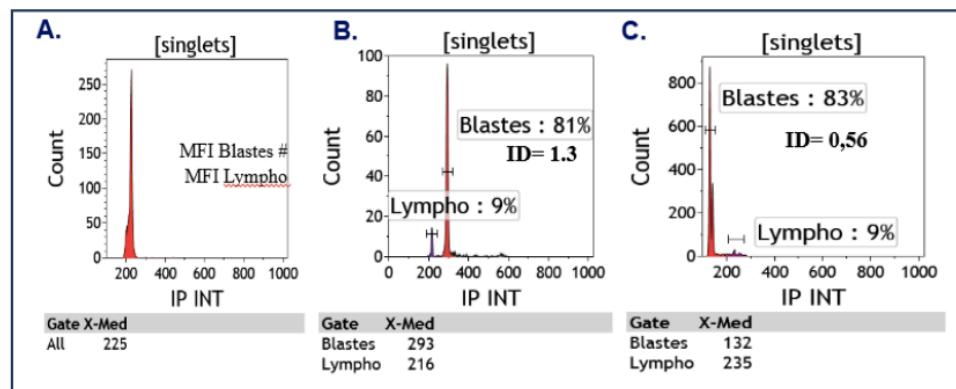


Figure 15. Exemples de cytogrammes

A = diploïdie, B = hyperdiploïdie et C = hypodiploïdie

OBJECTIF DE LA THESE

La recherche des anomalies génétiques des cellules leucémiques fait donc partie intégrante du diagnostic et du pronostic initial de la maladie avec parfois même une implication thérapeutique. Dans le contexte des LALB de l'enfant les anomalies de la ploïdie sont largement majoritaires et doivent être identifiées correctement et rapidement. Actuellement, de plus en plus de procédés se développent en routine afin de compléter le caryotype standard et d'orienter les analyses moléculaires ciblées. Néanmoins, chacune d'entre elles présentent ses avantages, ses inconvénients, ses pièges et ses enjeux avec des techniques classiques bien ancrées et solides qui n'ont pas encore dit leur dernier mot face aux nouvelles technologies.

L'objectif de ma thèse a donc été de faire le point concernant l'apport des différentes techniques dans la détermination de la ploïdie pour les LALB pédiatriques. Après une description rétrospective de l'ensemble des données épidémiologiques et génétiques retrouvées au sein de notre cohorte de patients nous discuterons plusieurs cas ayant engendré des difficultés diagnostiques et avec des enjeux particuliers au Centre Hospitalier Universitaire de la Timone à Marseille.

MATERIEL ET METHODE

I. Les Patients

Quatre mille quatre cent cinq myélogrammes effectués dans le service d’Onco-Hématologie Pédiatrique du Pr G. MICHEL ont été analysés au laboratoire d’hématologie du Pr P.E. MORANGE entre le 1er Janvier 2015 et le 31 Décembre 2019. Parmi ces 4405 myélogrammes, nous retrouvons 168 diagnostics initiaux de leucémies aigues dont 29 leucémies aigues myéloïdes (17,3%), 137 leucémies aigues lymphoblastiques (81,5%) et deux LA biphenotypiques. Au sein des LAL, nous avons identifié 118 (86,1%) LAL B et 19 (13,9%) LAL T. Ces résultats rejoignent ainsi l’épidémiologie classiquement décrite dans la littérature pour les leucémies aigues de l’enfant.

Je me suis plus spécifiquement intéressée à la cytogénétique de ces LAL B. Ainsi, j’ai analysé et comparé les résultats obtenus pour le caryotype, la FISH, l’index d’ADN et la CGH/SNP-array pour chaque diagnostic.

II. Les techniques réalisées

A. L’index d’ADN

L’index d’ADN est réalisé au laboratoire d’hématologie au sein du département de cytométrie en flux sur échantillons de sang la plupart du temps et plus rarement de moelle. Le prélèvement subit une étape préalable de lyse des globules rouges via une solution de chlorure d’ammonium. Après avoir été centrifugé 5min à 300G, le culot cellulaire est récupéré puis mis en suspension dans une solution tampon de PBS (phosphate salin) afin d’être numéroté sur un automate SYSMEX XN 10 du laboratoire. En fonction de la numération, le prélèvement est plus ou moins dilué avec du PBS afin d’obtenir une concentration de 10 millions de cellules par mL. Cent microL de cette suspension cellulaire sont additionnés à 2,5 microL de

réactif Buffer 1 du kit PerFix-nc® de Beckman-Coulter. Il s'agit d'un agent fixateur des cellules contenant du formaldéhyde. Le mélange est vortexé puis incubé 15 minutes à température ambiante. Après incubation, le culot est lavé 2 fois par 3mL de PBS et centrifugé à 300 G pendant 5 minutes. Le culot lavé est finalement suspendu dans 400 µL de réactif tampon « cell cycle kit » permettant la perméabilisation et le marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP). Finalement, l'acquisition se fait sur le cytomètre Navios de Beckman Coulter à une vitesse de 60 à 100 évènements par seconde. Le ou les pics de fluorescence sont analysés ; le rapport des intensités de fluorescence (MFI) du pic des blastes comparé à celui des lymphocytes normaux permet d'obtenir l'index ADN.

B. Caryotype et FISH

1. Mise en Culture

Le caryotype et la FISH sont réalisés tous deux au sein de l'unité de cytogénétique onco-hématologique du laboratoire du Pr MORANGE. Pour chaque diagnostic, une seringue héparinée est prélevée pour la cytogénétique. Après centrifugation du prélèvement à 1200 tours/min pendant 10min, nous récupérons le surnageant concentré en globules blancs (buffy coat) que l'on suspend dans du milieu de culture contenant : RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), sérum de veau foetal, glutamine et pénicilline. Cinquante microL de ce mélange sont pipetés et mis en présence d'acide acétique afin de lyser les globules rouges pour ensuite être numéroté manuellement au microscope en cellule de Malassez. En fonction de la numération, nous récupérons le volume nécessaire permettant de mettre dans chaque flasque de culture (contenant du milieu mais sans agent mitogène) 15 millions de cellules. La culture pour les LALB dure 24h en étuve à CO2 à 37°C.

2. Sortie de Culture

Après une première centrifugation à 1200tours/min pendant 10min, nous récupérons le surnageant afin de procéder au choc hypotonique. La solution utilisée (5,59g de KCl dans 1L d'eau), mise préalablement à l'étuve à 37°C, est ajoutée au prélèvement d'abord goutte à goutte, tout en vortexant, puis plus rapidement. Nous complétons le culot pour obtenir un total

d'environ 10mL et le mélange est placé 15min à l'étuve. S'ensuivent plusieurs étapes de fixation. Pour se faire, nous préparons trois volumes de méthanol pour un volume d'acide acétique. Nous rajoutons ensuite 0,5 à 1mL de ce fixateur dans le prélèvement avant homogénéisation. Après une centrifugation de 1200tours/min pendant 10min, le surnageant est aspiré et nous rajoutons de nouveau du fixateur cette fois ci goutte à goutte tout en vortexant puis plus rapidement jusqu'à atteindre 10mL. Le tube est une nouvelle fois centrifugé et cette étape est réitérée deux fois. Après la dernière centrifugation (3 lavages au total), nous récupérons le surnageant et homogénéisons une dernière fois. Le culot cellulaire contenant les potentielles mitoses est alors prêt à être utilisé et il est étalé sur plusieurs lames (en laissant simplement tomber une ou deux gouttes sur les lames). Certaines lames sont utilisées pour le caryotypage standard tandis que les autres sont utilisées pour la FISH.

3. Dénaturation et Caryotypage

Pour ce qui est du caryotype, quelques gouttes de culot sont déposées sur une ou plusieurs lames qui sont ensuite placées sur coussin humide sous une lampe pendant 10min. Ces lames sont regardées au microscope afin d'en évaluer la richesse (nombre de lames étalées en fonction de ce paramètre) et le temps de dénaturation nécessaire. Au laboratoire, au moins deux temps de dénaturation sont systématiquement réalisés (par exemple, 13 et 14min). Après avoir été trempées 5 à 10min dans du méthanol afin de les fixer, les lames sont lavées dans des bacs d'eau stérile puis placées dans le bac de dénaturation situé dans un bain marie à 87,1°C. Il contient une solution de sodium dihydrogénophosphate dihydraté. Les lames sont ensuite rapidement rincées à l'eau froide afin d'arrêter la réaction de dénaturation puis colorées 3min dans une solution de Giemsa à 3%.

Ces lames sont finalement passées sur un chercheur automatique de métaphase Métasystem puis sélectionnées manuellement en vue du caryotypage (découpage et classement des mitoses avec l'aide du logiciel Ikaros).

4. Hybridation in situ

En ce qui concerne la FISH, les lames sont initialement trempées successivement dans plusieurs bacs (10min par bac). Le premier contenant 100mL de HCl 0,01N et 500microL de pepsine dans un bain-marie à 37°C et le deuxième qui contient une solution avec 97,3mL de chlorure de magnésium et 2,7mL de formaldéhyde à 38% à température ambiante. Après

chaque bac, les lames sont trempées 5min dans une solution tampon de PBS. Par la suite, elles sont plongées dans 3 bacs de déshydratation (contenant de l'éthanol à 70%, 90% et 100%), 2 à 3min par bac puis séchées à l'air libre. En fonction de leur marque, les sondes sont plus ou moins diluées dans un tampon puis centrifugées 1min à 10 000 tours/min et laissées à 37°C. Pendant ce temps, les lames sont elles aussi préchauffées quelques minutes à 37°C. Ensuite, 10 à 20 microL de sonde sont déposées sur les lames et recouverts ensuite par une lamelle. Celles-ci sont ensuite déposées dans le Thermobrite qui réalise 4min de dénaturation à 75°C puis une phase d'hybridation durant toute la nuit à 37°C. Le lendemain, les lamelles sont retirées et les lames sont plongées successivement dans deux nouveaux bacs : le premier, pendant 2 min, situé dans un bain marin à 72°C et contenant 100mL de 0,4 SSC et le deuxième, pendant 1 min, à température ambiante contenant 100mL de 2 SSC (le SSC étant une solution tampon de citrate de sodium). Elles sèchent ensuite à l'air libre à l'abri de la lumière, puis sont placées à 37°C pendant 10 à 15min. Quinze microlitres de contre-colorant DAPI sont déposés sur chaque lame puis recouverts d'une nouvelle lamelle. Le tout est finalement laissé au congélateur à -20°C pendant 15 à 30min.

Pour la FISH aussi les lames sont passées dans le chercheur Metasystem associé à un microscope à fluorescence, qui procède à la capture des noyaux et métaphases pour tous les fluorochromes et sondes utilisés. Les images sont ensuite analysées par la biologiste. Dans le cadre des LALB de l'enfant, 3 sondes sont réalisées systématiquement au laboratoire :

- ETV6-RUNX1 (12p13/21q22), extra signal de VYSIS
- BCR-ABL1 (22q11/9q34), extra signal de VYSIS
- MLL (11q23), break appart de VYSIS

En cas de caryotype non informatif ou difficile, nous rajoutons deux autres sondes :

- E2A-PBX1-HLF (1q23/19p13/17q22), double fusion de CYTOCELL (systématique en cas de t(1;19) retrouvée ou suspectée)
- 7q22/7q35/D7Z1, triple couleur de LEICA

Le reste des sondes est choisi en fonction de ce qui est vu au caryotype. Par exemple, en cas d'hyper ou d'hypodiploïdie, des sondes centromériques des chromosomes 4, 6, 10, 18 et X sont souvent utilisées ainsi que la sonde IGH-MYC, CEP8 (14q32/8q24, centromère 8), triple couleur, double fusion. En ce qui concerne le choix de ces sondes, outre leur intérêt certain en terme pronostic, il faut préciser qu'un certain nombre d'anomalies sont à rechercher ou éliminer systématiquement en fonction du protocole en cours. Actuellement, il s'agit du protocole CAALL F01, pour lequel il est obligatoire d'éliminer ou identifier avant J8 :

Ph/BCR-ABL1, réarrangement MLL, iAMP21, hypodiploïdie < 44 chromosomes, monosomie 7, t(1;19)/TCF3-PBX1 et t(17;19)/TCF3-HLF.

C. CGH/SNP-array

L'hybridation génomique comparative est réalisée au sein du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, dans le laboratoire de génétique médicale et cytogénétique oncologique du Pr ROCHE-LESTIENNE par le Dr Nicolas DUPLOYER. Des prélèvements congelés de moelle leur sont systématiquement envoyés devant tout nouveau diagnostic de LA. Ils utilisent la technologie Affymetrix avec support d'hybridation Cytoscan HD ayant une résolution de 20Kb et le logiciel d'analyse Chromosome Analysis suite 3.0 d'Affymetrix. Ce système autorise une réalisation concomitante de l'analyse CGH et de la SNP-array, il permet donc de rechercher à la fois les CNV et les LOH. Elle permet aussi de ne pas utiliser d'ADN témoin. En effet, l'ADN génomique du patient est comparé avec des bases de données contenant des fichiers de références adaptés.

RESULTATS

I. Anomalies cytogénétiques observées dans notre cohorte

Au sein de notre cohorte de patients, nous avons identifié le résultat cytogénétique final combinant l'ensemble des conclusions du caryotype, de la FISH, de l'index d'ADN et de la CGH/SNP-array. Parmi nos 118 LAL B, 55 patients soit 46,6% présentent une hyperdiploïdie élevée classique de bon pronostic et 8 patients, soit 6,8%, présentent une hypodiploïdie. Enfin, 6 enfants soit 5,1% ont présenté un caryotype normal et 37, soit 31,4%, sont pseudodiploïdes, c'est à dire avec un nombre de chromosomes normal à 46 mais présentant uniquement des anomalies de structures. Sur l'ensemble des enfants avec une LALB, nous identifions au moins une anomalie de structure quelle qu'elle soit, isolée ou associée à une aneuploïdie, chez 61 d'entre eux, c'est à dire 51,7%.

En ce qui concerne les hyperdiploïdies, nous observons un nombre variable de chromosomes entre 52 et 65, les caryotypes à 54 et 55 étant les plus représentés avec chacun 12 et 11 patients. Il en est de même pour les caryotypes à 47 chromosomes identifiés chez 12 enfants. Chez ces derniers, nous retrouvons 7 trisomies 21 dont 2 constitutionnelles devant donc être considérés comme des caryotypes « normaux » en terme de pronostic. Pour rappel, la trisomie 21 fait partie des anomalies constitutionnelles les plus à risque de leucémie aigüe. A noter, un patient hypotétraploïde à 88 chromosomes.

Parmi les hypodiploïdies, nous observons 1 patient avec un nombre modal de chromosome à 35 et 5 patients à 45 chromosomes, ces derniers présentant quasiment tous un chromosome dicentrique expliquant leur nombre modal à 45. Il est à noter que 2 patients hypodiploïdes sont apparus sous une forme d'hypodiploïdie dupliquée dite masquée : le premier « near-haploïd » et le second « paratriploïde ». Nous reparlerons de ces cas plus en

détail dans le paragraphe IV.C car ils constituent des pièges importants mettant en difficulté la plupart des techniques de détermination de la ploïdie.

Concernant les anomalies de structure, nous mettons en évidence 18 enfants soit 15% de nos patients avec une translocation (12;21). Seulement 2 d'entre elles étaient clairement identifiables au caryotype, les 16 autres, cryptiques, ont été révélées uniquement par la FISH systématique ETV6-RUNX1. Parmi ces dernières, 10 furent associées à un caryotype pseudodiploïde (add 12p, dicentrique impliquant le 12, del 12p...), 2 à des trisomies 21, 3 à un contexte de caryotype normal et 1 à un échec de caryotype. A noter que les anomalies du 12 telles que les délétions 12p et les trisomies 21 sont des anomalies fréquemment associées et qui faisaient suspecter la t(12;21).

La translocation (9;22) quant à elle n'était retrouvée que chez 5 patients, 4,2%, dont 2 associées à des hyperdiploïdies. La translocation (4;11) est identifiée chez 3 patients (dont 2 nourrissons) et la t(1;19) chez 2 d'entre eux (uniquement des LALB2). Pour finir, l'amplification intrachromosomique du chromosome 21 est observée chez 5 patients. Dans tous les cas, celle-ci a été identifiée sur la FISH sous la forme de plusieurs signaux AML1 (plus de trois) regroupés en clusters. Sur les caryotypes, elle se manifestait par des anomalies d'un 21 de type add21 ou anneaux du 21.

II. Concordance des techniques

Sans compter les patients entre 45 et 47 chromosomes, 28 patients sur 58 avec une aneuploïdie vraie ont pu bénéficier de toutes les analyses : caryotype, FISH, index d'ADN et CGH/SNP array. En effet, il n'a pas été possible de réaliser la CGH pour deux d'entre eux en raison d'un manque de matériel. Par ailleurs, 25 patients n'ont pas pu bénéficier de l'index d'ADN. Enfin, 3 patients se sont retrouvés en échec de caryotype.

Parmi les enfants avec hyperdiploïdie élevée ou hypodiploïdie inférieure à 45, les techniques réalisées ont donné des résultats comparables dans la grande majorité des cas (94,8%). Si on ne considère que les patients ayant bénéficié des 4 techniques, on atteint 92,9% de parfaite concordance (26 sur 28). Le caryotype, la FISH, l'index et la CGH sont alors concordants en ce qui concerne la ploïdie, donc le nombre de chromosomes et le pronostic. On note cependant quelques variations de chromosomes gagnés ou perdus entre le

caryotype et la CGH. Par exemple un caryotype qui indique une trisomie 14 et une CGH montrant une trisomie 15 à la place mais cela n'impacte en rien le diagnostic. Finalement, seulement trois cas ont généré de réelles discordances entre les techniques. Dans la partie qui suit, nous allons ainsi présenter six cas dont quatre ont pu susciter des difficultés diagnostiques de détermination de la ploïdie (cf tableau en annexe 1 p.73)

III. Description de cas présentant une parfaite concordance des techniques

A. CAS n°1 avec hyperdiploïdie classique

Un patient de 12 ans, consulte son médecin traitant pour asthénie, douleurs de hanches et purpura pétéchial avec un hémogramme montrant : une hémoglobine normale à 12,6g/dL, une thrombopénie profonde à 35G/L avec une leucocytose normale à 6,4G/L mais neutropénie à 0,7G/L. Traité initialement comme un PTI avec des corticoïdes, il est finalement hospitalisé devant la non amélioration du bilan associée à une augmentation de la leucocytose à 20G/L dont 10% de cellules blastiques.

Le myélogramme réalisé dans les suites, identifie un envahissement à 100% par des blastes exprimant à l'immunophénotypage du CD79a, CD19, CD22, CD10 mais sans chaîne mu intra-cytoplasmique. Ceci pose donc le diagnostic de LAL B2 et un caryotype médullaire est réalisé. Ce dernier met en évidence une hyperdiploïdie élevée classique : 55,XY,+X,+Y,+4,+6,+14,+17,+18,+21,21. Ce résultat est concordant avec celui de l'index d'ADN à 1,19.

La FISH ne montre aucun réarrangement (en accord avec la RT MLPA) mais confirme les trisomies 6, 14, 17 et 18 ainsi que la térasomie 21. La CGH/SNP array retrouve les mêmes gains identifiés au caryotype. Le patient est à ce jour en début de traitement d'entretien.

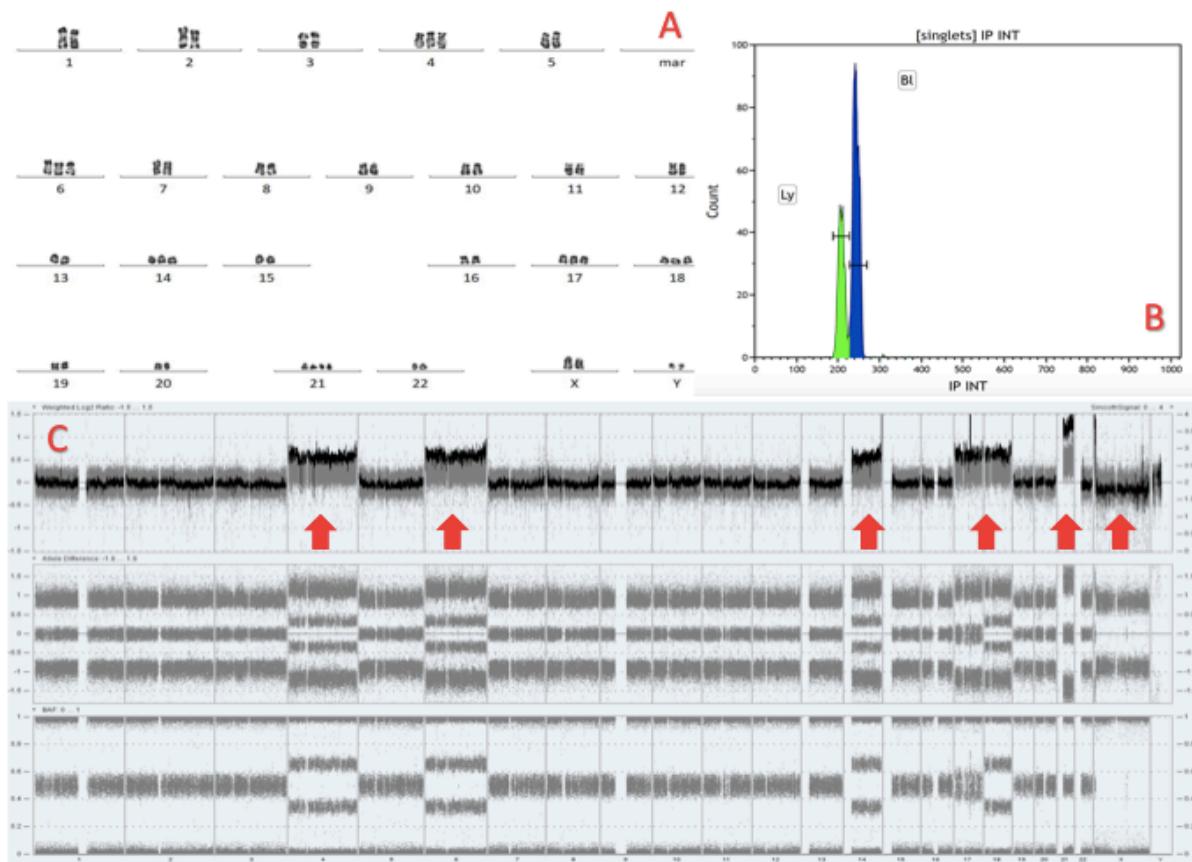


Figure 16. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°1

(A) Caryotype médullaire standard : 55,XY,+X,+Y,+4,+6,+14,+17,+18,+21,21. (B) Index d'ADN sur sang : en vert le pic de fluorescence des lymphocytes (MFI = 205) et en bleu les blastes (MFI = 244) avec un index d'ADN à 1,19. (C) Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio, allèle différence et BAF. On retrouve, pour chaque paramètre les gains identifiés au caryotype (flèches rouges)

B. CAS n°2 avec hypodiploïdie sévère

Un patient de 16 ans, consulte pour douleur à la cuisse droite avec altération de l'état général. Le bilan sanguin met en évidence une thrombopénie à 80G/L avec légère hyperleucocytose à 11G/L associée à la présence de 39% de blastes circulants malgré une hémoglobine et des polynucléaires neutrophiles normaux. Le myélogramme réalisé dans les suites montre un envahissement à 78% de cellules blastiques non granuleuses qui expriment les marqueurs B à l'immunophénotypage avec du CD10 mais sans chaîne intracytoplasmique. Le diagnostic de LAL BII est donc posé.

L'index d'ADN réalisé se révèle à 0,79 avec cependant un troisième pic pouvant correspondre à une duplication du premier clone (5% des cellules). Le caryotype identifie uniquement une hypodiploïdie sévère, 35,XY,-2,-3,-4,-7,-9,-12,-13,-15,-16,-17,-20. La FISH en revanche révèle plusieurs clones :

- FISH BCR-ABL1 : un premier clone, majoritaire (50%) avec un seul signal ABL1 et deux signaux BCR. Le deuxième (8%) avec deux signaux ABL1 et trois BCR. Le dernier avec deux signaux ABL1 pour quatre signaux BCR
- FISH MLL : On retrouve 4 signaux MLL dans 16% des noyaux
- FISH TEL-AML1 : Deux clones dont un à 60% avec un signal ETV6 et deux signaux RUNX1 et un autre avec deux signaux ETV6 pour quatre signaux RUNX1 (15%).

Ceci évoque donc qu'environ 15% des cellules anormales présentent une version dupliquée du clone hypodiploïde. Cela correspond à une entité de pronostic défavorable dite hypodiploïdie sévère 30-39 chromosomes / hypotétraploïdie 60-78.

Par la suite, l'hypodiploïdie sévère a été confirmée en CGH/SNP array et une mutation TP53 non constitutionnelle (VAF à 49%) a été mise en évidence chez ce patient. Il a présenté une bonne réponse au traitement (CAALL B VHR), et est actuellement en cours de traitement d'entretien.

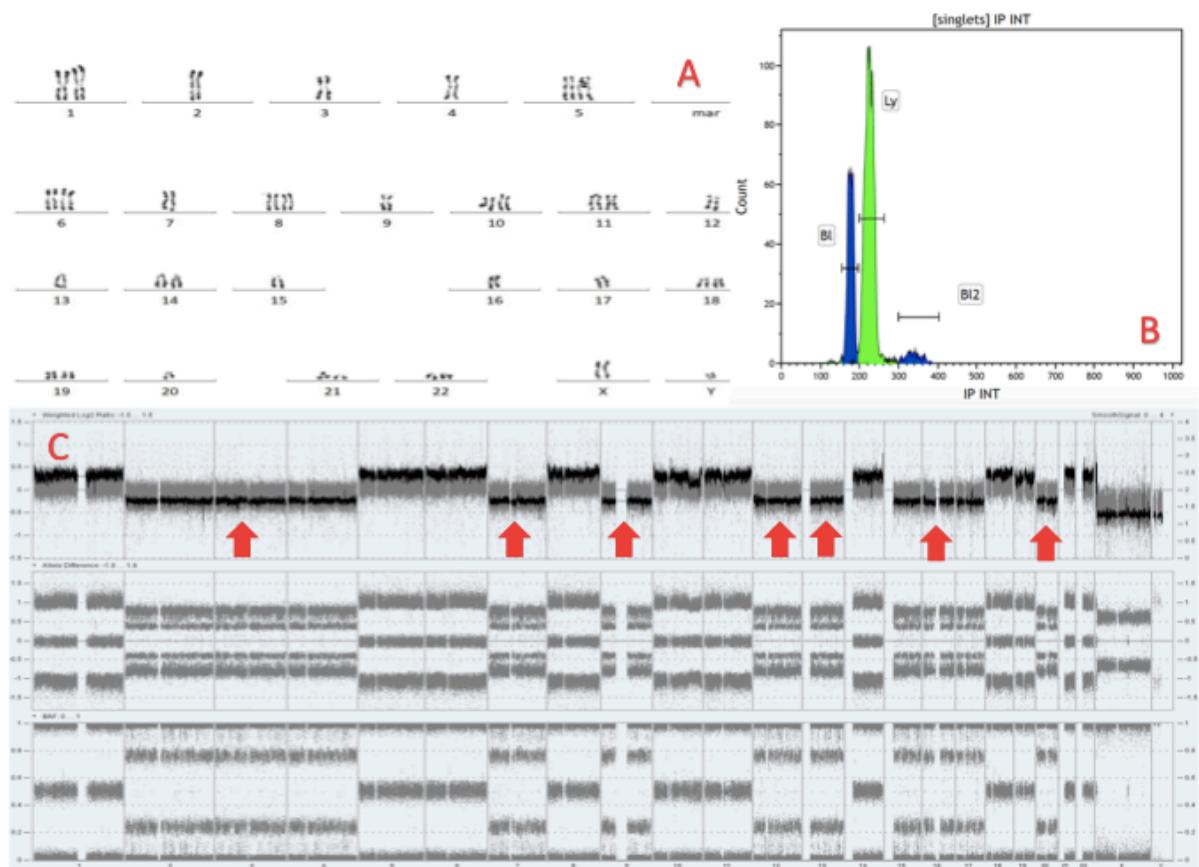


Figure 17. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°2

(A) Caryotype médullaire standard : 35,XY,-2,-3,-4,-7,-9,-12,-13,-15,-16,-17,-20. (B) Index d'ADN sur sang : en vert le pic de fluorescence des lymphocytes (MFI = 225) et en bleu les pic de blastes : Bl, clone hypodiploïde, MFI = 178 ; Bl2 clone dupliqué, MFI = 338. Ils correspondent respectivement à des index d'ADN à 0,79 et 1,5. (C) Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio, allèle différence et BAF. On retrouve, pour chaque paramètre les pertes identifiées au caryotype (flèches rouges). A noter, une petite variation avec perte du chromosome 14 au lieu du 15.

IV. Description de cas ayant présenté des difficultés diagnostiques

A. Echec de caryotype : CAS n°3

Un adolescent de 16 ans consulte aux urgences pour lombalgie fébrile après une chute mécanique. Une fracture vertébrale de L1 est mise en évidence associée à une pancytopenie sur le bilan sanguin : anémie à 7,2g/dL, thrombopénie à 31G/L et neutropénie à

0,02G/L pour 0,6G/L de globules blancs. Aucune cellule anormale circulante n'est identifiée. Le patient est donc hospitalisé et un myélogramme est réalisé. Celui-ci montre un frottis désertique mais blastique et l'immunophénotypage est celui d'une LAL B2 (B commune).

Malheureusement, la culture cellulaire réalisée en vue du caryotype est en échec et seule la FISH interphasique a pu être faite. Celle-ci identifie trois copies pour les gènes RUNX1T1 (8q22), ABL1 (9q34), HLF (17q22) et quatre copies de RUNX1 (21q22) mais pas de réarrangement. Ce profil pouvant correspondre à des trisomies 8, 9, 17 et une térasomie 21. A noter par ailleurs, un index d'ADN sortant à 1,2. Les données de la CGH/SNP array venant confirmer et compléter ces résultats permettent de générer un caryotype hyperdiploïde sévère : 57,XY,+X,+4,+6,i(7)(q10),+8,+9,+10,+14,+17,+18,+21,+21.

Le patient est ensuite traité selon le protocole CAALL B MR puis CAALL HR du fait d'une MRD positive en fin d'induction. Après une rechute médullaire précoce (à 2 ans du diagnostic), il est allogreffé avec deux unités de sang placentaire et présente une bonne évolution à un an post-greffe.

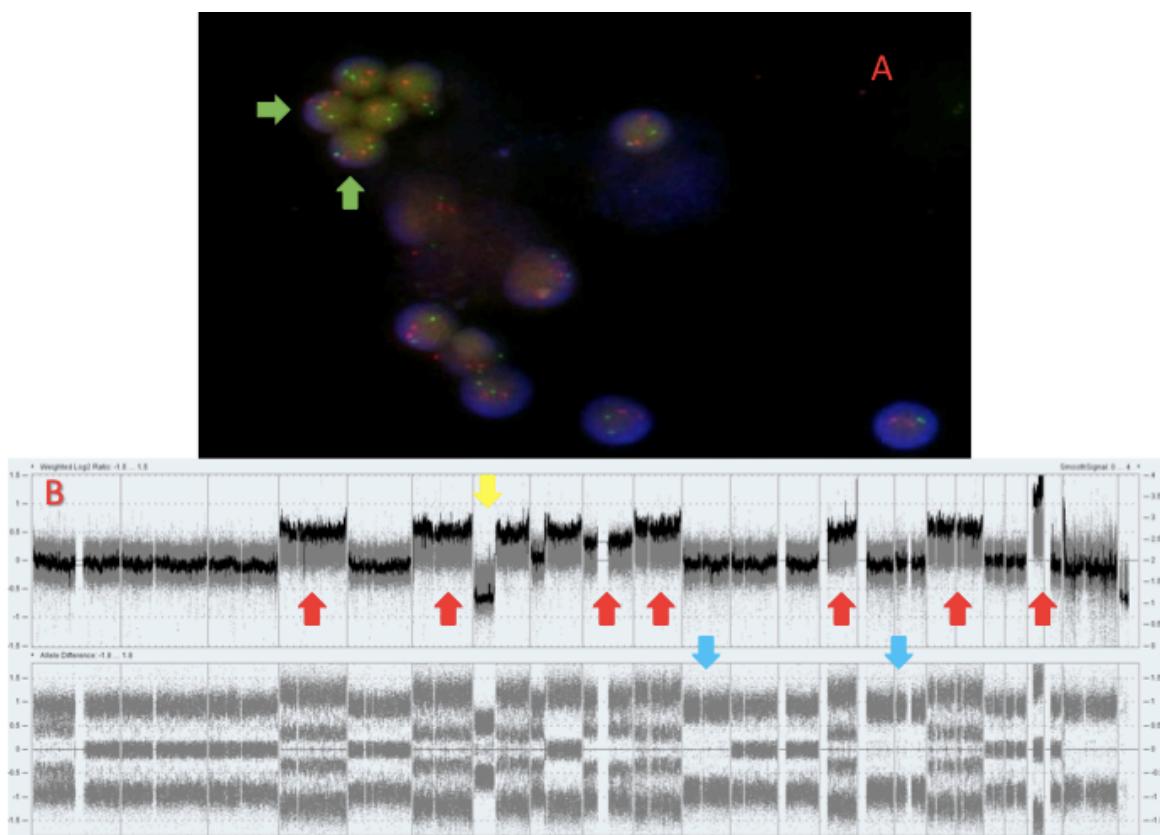


Figure 18. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°3

(A) FISH interphasique BCR-ABL1 (22q11/9q34), extra signal de VYSIS. ABL1 est marqué en rouge et BCR en vert, nous retrouvons 3 signaux rouges mais 2 signaux verts sur certains noyaux (flèches vertes), témoins de

la trisomie 9 avec disomie 22. (B) Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio et allèle différence. On retrouve, pour chaque paramètre les gains identifiés au caryotype (flèches rouges) et quelques UPD pour les chromosomes 11, 15 et 16 (flèches bleues). On voit nettement la perte d'hétérozygotie (disparition de la ligne de base : allèle différence = 0). A noter aussi, une délétion 7p (flèche jaune) emportant le gène IKZF1 associée à un gain de la région 7q se traduisant cytogénétiquement par un isochromosome 7q.

B. Un caryotype apparemment normal : CAS n°4

Un patient de 3 ans est hospitalisé pour impotence fonctionnelle du membre supérieur gauche avec douleur et fièvre. La numération formule sanguine révèle une bocytopénie avec anémie modérée à 10g/dL arégénérative et neutropénie à 230 PNN/mm3. La numération plaquettaire est normale et aucune cellule anormale n'est mise en évidence sur le frottis sanguin. Compte tenu du tableau clinique, un myélogramme est réalisé montrant 78% de cellules blastiques exprimant les marqueurs lymphoïdes B avec du CD10 mais pas de chaîne intra-cytoplasmique. Le diagnostic de LAL-BII est donc posé et le caryotype sur moelle est réalisé.

Celui-ci se révèle normal sur les 20 mitoses analysées. En revanche, les analyses FISH réalisées de façon systématique dans une LALB : BCR-ABL, ETV6-RUNX1 et MLL ne montrent aucun réarrangement mais la présence de 4 signaux RUNX1 disjoints dans 26% des noyaux et 2 métaphases sur 5 ce qui est évocateur d'une térasomie 21. De nouvelles analyses FISH, notamment centromériques, sont réalisées : IGH-MYC-CEP8, CEP 4, 6, 10, 17, 18 et X. Celles-ci montrent des trisomies 4, 6, 10, 14, 17 et 18 ainsi qu'un chromosome X surnuméraire. Ces gains sont caractéristiques d'une hyperdiploïdie élevée supérieure ou égale à 55 chromosomes. La CGH/SNP-array confirme une partie de ces gains dans un second temps (pas les trisomies 10 et 14) mais prélèvement dilué et de mauvaise qualité. L'index quant à lui n'avait pas été réalisé.

Le patient a pu suivre son traitement normalement et est en rémission de sa maladie à 30 mois de la fin du traitement d'entretien.

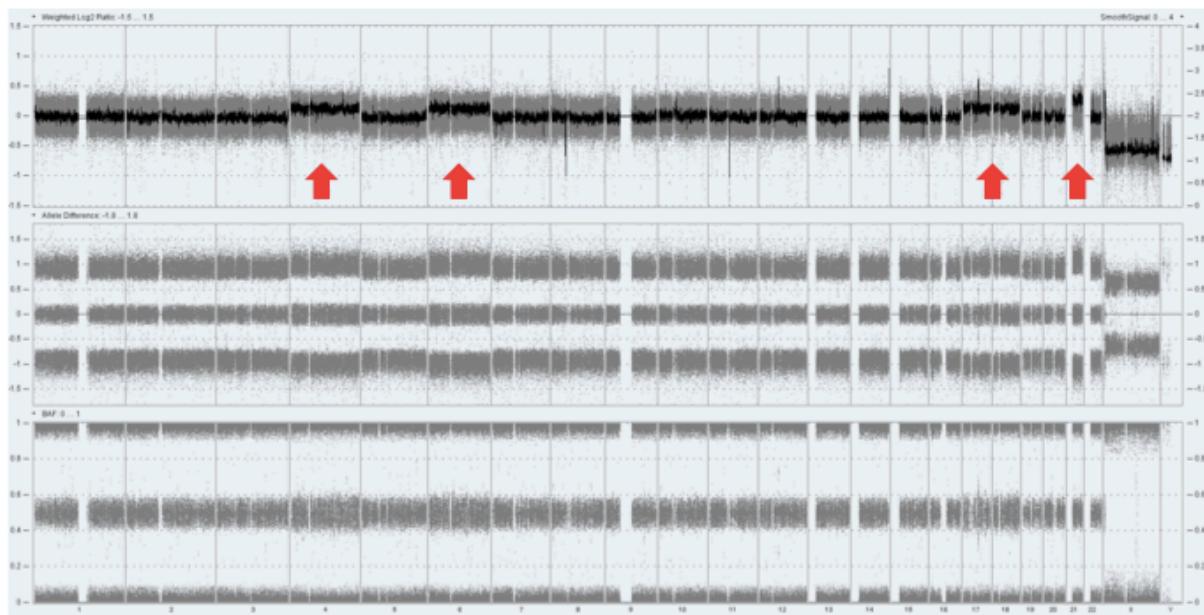


Figure 19. Résultat de l'analyse de CGH/SNP-array du cas n°4

Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio, allèle différence et BAF. Nous retrouvons, pour chaque paramètre les gains identifiés au caryotype (flèches rouges). A noter, une légère discordance avec la FISH ainsi que des anomalies très faiblement représentées en rapport avec une probable dilution du prélèvement.

C. Hypodiploïdies masquées : CAS n° 5 et 6

→ CAS n°5

Une patiente de 10 ans est hospitalisée pour fièvre isolée à 38,8°C avec un bon état général et une augmentation de la CRP. La numération formule sanguine montre une légère anémie à 9,7g/dL isolée avec des plaquettes à 251G/L et des globules blancs à 4,8G/L dont 2,3G/L de PNN. Une arthrite juvénile est suspectée devant une douleur au genou gauche et la patiente est hospitalisée pendant 10j. Le jour de sa sortie, le laboratoire d'hématologie met en évidence 8% de blastes dans le sang. Par la suite, le myélogramme avec immunophénotypage est réalisé montrant 92% de cellules blastiques exprimant les marqueurs forts de lignée lymphoïde B avec CD10 et sans marqueur myéloïde ou lymphoïde T.

Un caryotype est donc réalisé sur la moelle. Celui-ci met en évidence une hyperdiploïdie atypique à 55 chromosomes : 55,XX,+X,+X,+4,+4,+10,+10,+18,+21,+21. De plus, un second clone plus petit à 54 chromosomes est observé, identique excepté une perte du chromosome 10. Ces anomalies sont confirmées par la FISH qui ne montre aucun

réarrangement mais une tétraploïdie 21 avec disomies 9, 11, 12, et 22. L'index d'ADN quant à lui est à 1,18.

Plus tard, la CGH/SNP array révèle que toutes des disomies sont des disomies uniparentales confirmant la suspicion de caryotype near haploïde dupliqué. La biologie moléculaire identifie quant à elle, une mutation du gène NRAS.

Dans les suites, la patiente est prise en charge selon le protocole CAALL VHR et greffée à 6 mois du diagnostic avec un don de moelle de sa sœur. L'évolution post-greffe est simple et aucune rechute n'est signalée à ce jour (28 mois post greffe).

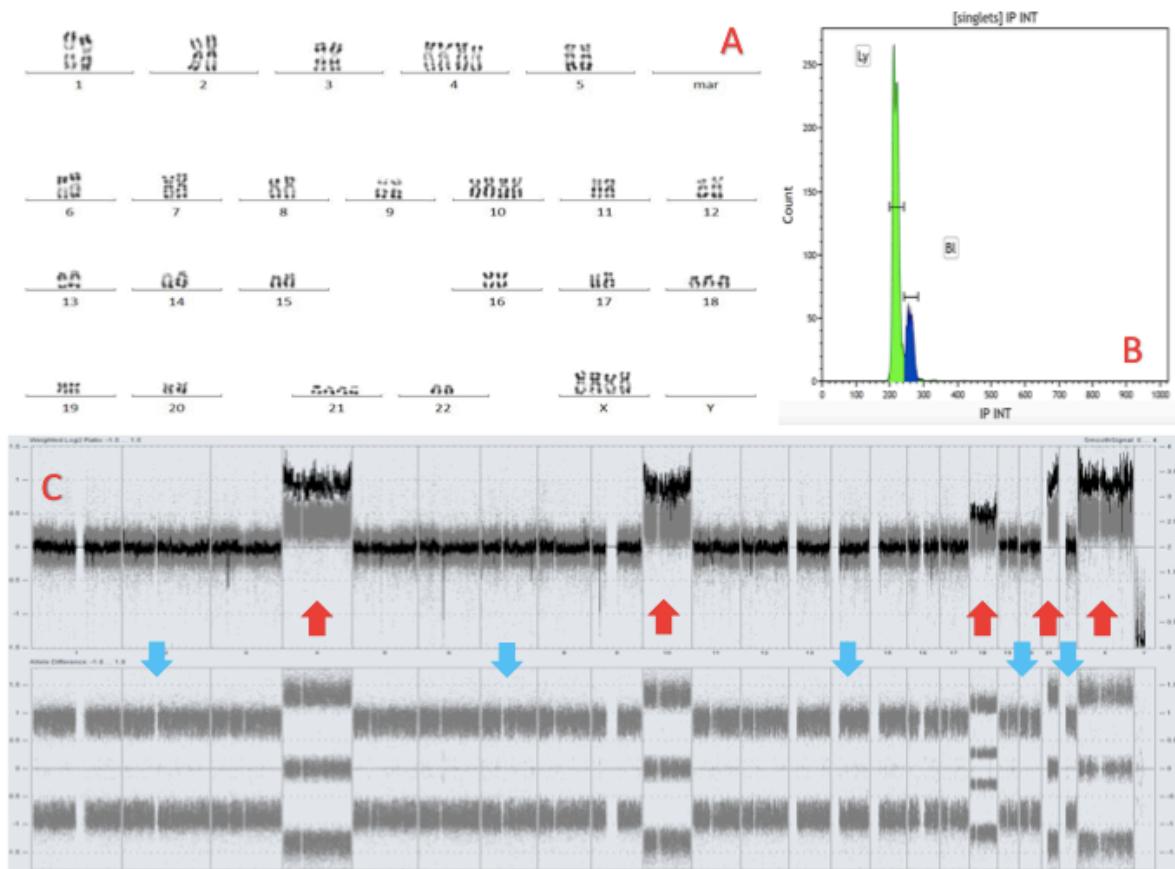


Figure 20. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°5

(A) Caryotype médullaire standard : 55,XX,+X,+X,+4,+4,+10,+10,+18,+21,+21. (B) Index d'ADN sur sang : en vert le pic de fluorescence des lymphocytes (MFI = 215) et en bleu le pic des blastes (MFI = 253), correspondant à un index d'ADN à 1,18. (C) Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio et allèle différence. On retrouve, pour chaque paramètre les gains identifiés au caryotype (flèches rouges) et les UPD pour les chromosomes disomiques (flèches bleues). On voit nettement la perte d'hétérozygotie (disparition de la ligne de base, allele difference = 0).

→ CAS n°6

Un patient de 14 ans est hospitalisé initialement pour altération de l'état général avec asthénie et amaigrissement ainsi que des douleurs abdominales. Un scanner abdominal révèle une importante splénomégalie avec hépatomégalie. Le bilan sanguin met en évidence une bocytopénie : hémoglobine à 9,7g/dL, plaquettes à 33G/L avec à 6,1G/L de globules blancs dont 1,8 PNN et 39% de cellules blastiques non granuleux. Le myélogramme confirme le diagnostic de leucémie aigüe et l'immunophénotypage montre qu'il s'agit d'une LAL-B2.

Le caryotype est réalisé en urgence sur le sang. Celui-ci donnera un caryotype pseudotriploïde à 69 chromosomes constitué essentiellement de disomies et de térasomies : 69<4n>XXYY,-2,-2,-3,-3,-4,-4,-5,add(6)(p22),-7,-7,-9,-9,-12,-12,-13,-13,-15,-15,-16,-17,-17,-20,-20. Les FISH réalisées confirment les anomalies du caryotype (térasomies 1, 6, 11, 21 et 22 ; disomies 3, 7 et 17). L'index d'ADN à 1,5 correspond approximativement à un nombre modal de chromosomes à 69 soit une triploïdie. On pouvait cependant identifier un troisième pic pouvant correspondre à un petit clone hyopdiploïde avec un index à 0,78 pouvant correspondre à un nombre modal à environ 35 chromosomes (3% des cellules).

Par la suite, la CGH/SNP array montre que tous les chromosomes disomiques correspondent en réalité à des disomies uniparentales. Cela vient donc confirmer l'hypothèse d'un cas de duplication de caryotype hypodiploïde avec un clone ancestral à 35 chromosomes s'étant dupliqué et une perte secondaire du chromosome 5.

Finalement, l'analyse de biologie moléculaire met en évidence une mutation constitutionnelle du gène P53 : R306X avec un VAF à 85%, anomalie fréquemment associée à ce type de pathologie.

L'adolescent est donc traité selon le protocole CAALL VHR et allogreffé à 6 mois du diagnostic grâce à un donneur volontaire de moelle osseuse. Onze mois après, il présente des douleurs articulaires inflammatoires de la hanche droite traitées initialement comme une arthrite septique sur ostéonécrose. Devant la persistance du tableau clinique un myélogramme est réalisé montrant un envahissement blastique majeur et donc une rechute avec un index d'ADN sortant cette fois-ci à 0,79. Le nouveau caryotype sort quant à lui parfaitement normal mais les FISH identifient cette fois-ci les deux clones (hypodiploïde et hypotétraploïde) : environ 30% de monosomies 7 et 9 et 15% de térasomies 1 et 22.

Après un échec de traitement par CARTCell, le patient décèdera malheureusement 2 ans après le diagnostic initial.

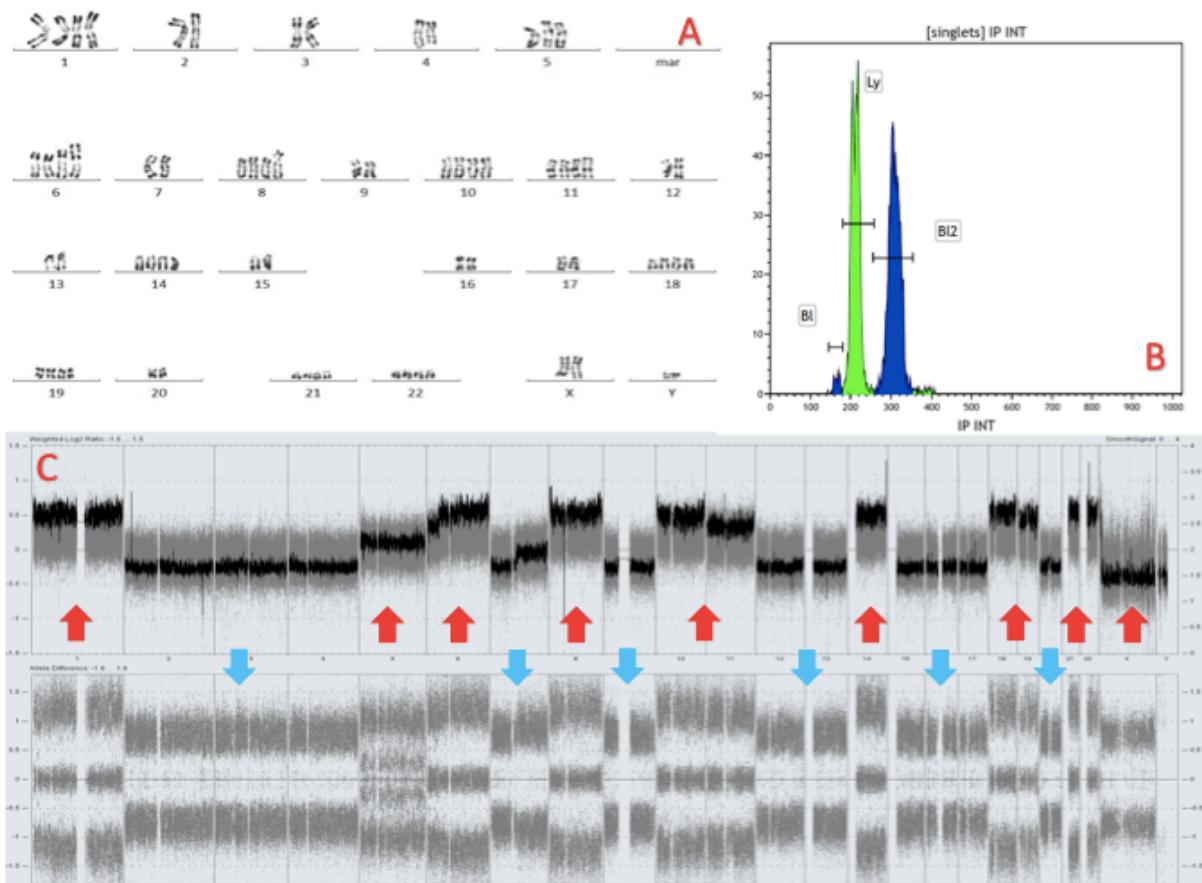


Figure 21. Résultats des analyses de cytogénétique du cas n°6

(A) Caryotype médullaire standard : 69<4n>XXYY,-2,-2,-3,-3,-4,-4,-5,add(6)(p22),-7,-7,-9,-9,-12,-12,-13,-13,-15,-15,-16,-16,-17,-17,-20,-20. (B) Index d'ADN sur sang : en vert le pic de fluorescence des lymphocytes (MFI = 212) et en bleu les pic de blastes : Bl, clone hypodiploïde, MFI = 166 ; Bl2 clone dupliqué, MFI = 308. Ils correspondent respectivement à des index d'ADN à 0,78 et 1,5. (C) Profil CGH/SNP-array avec de haut en bas : log R ratio et allèle différence. On retrouve, pour chaque paramètre les gains identifiés au caryotype (flèches rouges) et les UPD pour les chromosomes disomiques (flèches bleues). On voit nettement la perte d'hétérozygotie (disparition de la ligne de base, allele difference = 0).

DISCUSSION

En 2016, le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH) a émis un certain nombre de recommandations concernant la prise en charge cytogénétique des LALB. Il est ainsi recommandé de réaliser un caryotype médullaire de manière systématique, associé à un caryotype sur sang en cas de prélèvement de moelle impossible (du fait d'une fibrose médullaire) et de blastose sanguine (blastes $\geq 1G/L$). En ce qui concerne les analyses FISH, seule la FISH BCR-ABL1 semble obligatoire en toute circonstance ainsi que la FISH ETV6-RUNX1 chez les patients de moins de 25ans. La FISH MLL (KMT2A) est non systématique mais recommandée. La FISH E2A-PBX1-HLF est quant à elle obligatoire en cas de suspicion de t(1;19) ou t(17;19). Pour eux, la FISH doit être considérée comme un examen complémentaire orienté par le caryotype, l'immunophénotypage et le contexte épidémiologique du patient (âge, facteurs de risque...). Ainsi, si le caryotype est informatif, la FISH n'est pas indispensable mais des FISH ciblées ou RT-PCR sont recommandées pour confirmer ou éliminer certaines anomalies en fonction des protocoles. En revanche, si celui-ci est non informatif, insuffisant ou en échec, les analyses d'hybridation in situ doivent absolument être mises en place. Elles permettent notamment de confirmer les aneuploïdies suspectées au caryotype ou douteuses. En effet, en cas de doute entre une hyperdiploïdie standard et une duplication d'hypodiploïdie, il est recommandé de réaliser certaines FISH discriminantes : centromère du chromosome 1 ou 6 (tétraploïdes dans le 2^e cas) et centromère du 4 ou du 17 (triploïdes dans le 1^{er} cas) (20). Enfin, la place de l'index d'ADN et surtout de la CGH semble moins claire. Mais, le GFCH recommande tout de même que toute anomalie soit confirmée par deux techniques différentes. En 2010, le Réseau de Biologie Innovatrice en onco-Hématologie (RuBIH) recommande une réalisation systématique et obligatoire de l'index d'ADN pour tout nouveau diagnostic de LAL B (87).

Au sein de notre CHU, les patients nouvellement diagnostiqués d'une LAL B au sein du service d'Onco-Hématologie pédiatrique du Pr MICHEL, bénéficient systématiquement d'un caryotype, des 3 à 5 FISH mentionnées précédemment, d'un index d'ADN (uniquement à partir de 2016) et d'un caryotype moléculaire par CGH/SNP-array si la qualité et la quantité de prélèvement le permettent. Il n'existe pas de hiérarchisation ou de sélection dans la

réalisation des techniques de détermination de la ploïdie. Notre étude effectuée sur 118 cas de LAL B dont 58 avec une aneuploïdie vraie, révèle une concordance entre ces différentes techniques dans 94,8% des cas (55 cas sur 58). Au sein de notre cohorte, les anomalies de la ploïdie ont pu être mises en évidence d'emblée par le caryotype standard sans erreur dans 90% des cas (1 faussement normal, 2 faussement hyperdiploïdes et 3 échecs). La FISH, ainsi que l'index d'ADN, sont venus rectifier le problème pour les 3 cas d'échecs de culture et le caryotype faussement normal (cas n°4). Finalement, l'apport de la CGH/SNP-array fut surtout de confirmer et compléter les résultats de la cytogénétique conventionnelle, voire éventuellement de corriger quelques erreurs d'identification des chromosomes gagnés ou perdus mal étiquetés du fait de la mauvaise qualité des mitoses. Pour les cas n°3 et 4 elle a effectivement permis de confirmer ce qui était suspecté en FISH et/ou CMF et d'apporter un résultat exhaustif. Elle a aussi permis d'identifier les délétions telles que IKZF. En revanche, pour le cas n°5, c'est bien la SNP-array qui a permis de trancher.

D'après l'ensemble de nos résultats, nous mettons en évidence finalement que dans la grande majorité des cas, toutes les techniques de détermination de la ploïdie sont concordantes. Nous pouvons alors nous poser la question de leur intérêt/redondance. Néanmoins, dans quelques situations, nous atteignons les limites de certaines techniques et d'autres viendront alors combler les lacunes.

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, le caryotype des cellules anormales est un examen indispensable de première intention à réaliser systématiquement. Il s'agit d'une technique globale permettant de visualiser l'ensemble du génome et tout type d'anomalies. Par ailleurs, il reste une technique simple, rapide, peu coûteuse, réalisable par le plus grand nombre de laboratoires et standardisable. Pour les LALB, en 24h, si tout se passe bien, il est possible d'obtenir un résultat préliminaire avec une orientation diagnostique et pronostique. Ce qui le rend presque aussi rapide que la cytologie standard. Malheureusement, son atout principal demeure son inconvénient numéro 1 pour l'interprétation et la conclusion. En effet, du fait de sa capacité de vision générale des chromosomes, sa résolution s'en retrouve assez faible vis à vis des autres techniques (5 Mb maximum). Ainsi, de nombreuses anomalies dites « cryptiques » ne sont pas ou peu visibles sur le caryotype car trop petites et doivent être recherchées par d'autres méthodes lorsqu'elles sont suspectées ou si elles ont un intérêt pronostic significatif. Par exemple, lorsque l'on regarde le cas de la translocation (12;21)(q22;q22), celle-ci est non visible au caryotype dans la majorité des cas, ce que nous

avons d'ailleurs confirmé au sein de notre cohorte de patients puisque seulement 11% de ces translocations ont été clairement identifiées sur le caryotype. Pour autant, il s'agit d'une anomalie classante dans la classification OMS 2016 et de bon pronostic donc devant absolument être détectées. Ce problème de sensibilité technique est moins important lorsqu'il s'agit d'anomalies de la ploïdie. En effet, nous retrouvons des gains et des pertes de chromosomes entiers qui constituent des anomalies de grandes tailles donc facilement identifiables en cytogénétique standard.

De plus, les limites techniques du caryotype sont également bien présentes. Il est effectivement nécessaire de réaliser une culture cellulaire afin d'obtenir des mitoses, ce qui presuppose de pouvoir récupérer un prélèvement frais avec des cellules vivantes. Ce détail peut parfois être logistiquement très compliqué et nécessite un transport rapide. L'obtention de cellules en métaphases n'est pas systématique et les échecs de cultures sur des prélèvements très pauvres rendent impossible toute conclusion. Ce fut le problème, entre autre, de notre cas n°3 pour lequel la culture est restée en échec et aucune métaphase n'a pu être obtenue. Dans ce cas, les frottis de moelle étaient eux aussi désertiques avec une numération sanguine très leucopénique. Les formes aplasiques de leucémies aigues ne sont pas rares et on peut même retrouver de véritables fibroses médullaires. Dans ces cas, le caryotype est presque toujours en échec et le diagnostic reposera sur de la FISH interphasique, la CGH/SNP-array et éventuellement l'index d'ADN. Plus fréquemment, il arrive que l'on obtienne quelques mitoses mais non suffisamment pour identifier le ou les clones. Concernant notre étude, sur les 118 cas de LALB, nous observons 5 situations d'échec total de culture (soit 4%) et tout de même 7 prélèvements avec des caryotypes informatifs suffisants mais incomplets (soit 5,9%).

Il est également important de noter que des cellules physiologiques peuvent répondre plus facilement aux facteurs de croissance ce qui peut engendrer un résultat faussement normal. Les cellules leucémiques ont tendance à avoir un index mitotique faible, ce qui est à prendre en compte si les métaphases identifiées semblent sans anomalies. Nous avons observé ce problème dans le cas n°4 où l'ensemble des mitoses analysées est apparu parfaitement normale. La FISH ETV6-RUNX1, faite de manière systématique dans notre laboratoire, a permis de révéler un clone avec quatre signaux RUNX1 parfaitement séparés les uns des autres excluant une amplification intra-chromosomique et évoquant une potentielle térasomie 21. Les sondes centromériques réalisées à la suite de ce premier résultat ont confirmé la présence des trisomies et térasomies évocatrices d'une forme hyperdiploïde de LA, confirmée ensuite par la CGH. Pour rappel, le caryotype normal n'est pas très informatif en ce

qui concerne le pronostic de la maladie. Cela dépendra des mutations identifiées par la biologie moléculaire mais dans la majorité des cas, il reste de pronostic intermédiaire à l'inverse de l'hyperdiploïdie élevée classique qui est de bon pronostic. L'orientation pronostique a donc été retardée dans ce cas par les résultats du caryotype initial faussement normal.

Dans ce 4^{ème} cas, même si la FISH a pu rattraper assez rapidement la situation, il a été nécessaire d'en réaliser de nombreuses pour récupérer une information assez complète ou du moins suffisante : IGH/MYC/CEP8, CEP 4, 6, 8, 10, 18 et X. En effet, la FISH, contrairement au caryotype, est une technique ciblée qui ne peut bien souvent venir qu'en complément du caryotype en cas d'anomalie suspectée. Cette analyse ne pourra répondre qu'à la question posée et ne permettra pas de visualiser d'autres anomalies. Ainsi, dans notre cas précédemment décrit (cas n°4), les sondes BCR-ABL1, MLL, 7q22 et E2A-PBX1 n'ont montré aucune anomalie puisqu'elles ne concernaient pas des chromosomes surnuméraires chez le patient. Si la FISH ETV6-RUNX1 n'avait pas été utilisée, l'hyperdiploïdie n'aurait pas été suspectée.

Au-delà de ces inconvénients notables, l'hybridation in situ comporte néanmoins un certain nombre d'avantages non négligeables. Elle offre tout d'abord un niveau de résolution bien meilleur que le caryotype (100 à 300Kb). Par ailleurs, comme indiqué précédemment, la FISH métaphasique nécessite une étape de culture mais ce n'est pas le cas de la FISH interphasique qui peut quant à elle être réalisée sur une plus grande variété de prélèvements. Elle peut donc venir rattraper la situation lorsque le prélèvement est très pauvre ou fibrosé, en cas d'échec de culture, si on ne dispose que de prélèvements tissulaires en coupe (rare dans les LAL) ou encore dans le cas où la seringue héparinée pour le caryotype n'a pas été prélevée et qu'on ne dispose que de lames d'étalement de moelle. Ces conditions sont rares mais elles arrivent et la FISH représentera une des seules analyses réalisables rapidement. Toutefois, afin de valider les sondes utilisées en l'absence de métaphases dans le prélèvement, il faudra utiliser des lames témoin avec mitoses.

Enfin, la FISH interphasique peut permettre l'identification de sous-clones n'ayant pas poussé à la culture cellulaire et donc non visualisés au caryotype, ceux-ci pouvant parfois être extrêmement minoritaires et pourtant avoir un intérêt pronostic indéniable comme c'est le cas dans les hypodiploïdies dupliquées. Cette méthode permet de compter 100, 200 voire 1000 noyaux, les petits clones sont donc plus facilement identifiés que sur les 20 mitoses classiques du caryotype à condition d'utiliser les sondes adéquates. Un certain nombre d'études

indiquent que la FISH peut être plus efficace que le caryotype dans la détermination des anomalies de la ploïdie. Par exemple, pour mettre en évidence de manière ciblée et avec certitude certaines trisomies identifiées comme étant de meilleur pronostic (88), ou encore, en utilisant des sondes ciblant les principaux chromosomes surnuméraires afin de dépister rapidement les hyperdiploïdies élevées classiques (71). L'intérêt de la FISH, en complément du caryotype, apparaît donc indéniable en particulier si ce dernier est non informatif.

Concernant l'index d'ADN, cette analyse présente l'avantage d'être réalisable très rapidement le jour même du diagnostic en même temps que le reste de l'immunophénotypage. Il est possible de la faire sur sang et il n'est donc pas nécessaire d'attendre le prélèvement de moelle. Il peut donc constituer une technique de détermination très rapide de la ploïdie. Il faut préciser que l'analyse de l'index n'a été mise en place au sein de notre laboratoire qu'à partir de 2016 expliquant le fait qu'elle n'ait pas été effectuée pour l'ensemble des patients. De plus, dans les cas où il n'y avait pas assez de prélèvement ou pas assez de cellules normales pour comparer, l'analyse n'a pas été faite diminuant à nouveau le nombre de patients qui en ont bénéficié (57%). Par ailleurs, l'index analyse un grand nombre de cellules, bien plus grand que la cytogénétique conventionnelle, la FISH ou même la CGH. Il peut donc théoriquement mettre en évidence des clones de toute petite taille. Par exemple, dans notre cas n° 2, le clone majoritaire hypodiploïde identifié au caryotype a bien été mis en évidence avec un index d'ADN à 0,79. Cette technique a également permis d'identifier un deuxième clone minoritaire représentant 5% des cellules et correspondant à la duplication du premier. Cela s'est vérifié dans le cas n°6 pour lequel le cytogramme de l'index d'ADN identifiait bien 3 pics : les lymphocytes normaux, les blastes pseudo triploïdes et le clone hypodiploïde sévère. Cependant, pour le cas n°5, tout comme le caryotype et le FISH, l'index d'ADN n'a pu identifier que le clone dupliqué et était donc lui aussi en échec. Dans ce cas, le clone était à priori entièrement dupliqué, ce qui explique que la forme near-haploïde n'ait pas pu être identifiée en caryotype, FISH ou CMF. Ainsi, dans les situations où nous avons assez de cellules normales dans le prélèvement et qu'au moins une petite partie du clone ancestral non dupliqué est présente, l'index d'ADN affiche une bonne sensibilité.

Par ailleurs, il peut arriver que l'index ne soit pas parfaitement concordant avec le nombre modal identifié en cytogénétique conventionnelle. En 1991, Morton établit que chaque chromosome est constitué d'un nombre spécifique de Mégabases (Mb) qui correspond lui-même à un pourcentage du nombre total de Mb pour les 46 chromosomes (un peu plus de 4% pour le chromosome 1 versus 0,88% pour le chromosome 22) (89). On peut donc

aisément comprendre que l'index d'ADN puisse varier en fonction du sexe, des chromosomes gagnés ou perdus et de la présence ou non d'anomalies structurelles. Cependant, la plupart des études de corrélation comme celle de Rachieru-Sourriseau en 2010 ont été réalisées avec une majorité de cas d'hyperdiploïdie standard où l'on retrouve des gains non aléatoires des mêmes chromosomes (83). Il est donc tout à fait logique de se dire qu'un index d'ADN qui n'est pas parfaitement concordant avec le caryotype et qui s'écarte des droites de corrélation puisse constituer un point d'alerte. En effet, cela pourrait signifier que le patient n'a pas le profil chromosomique habituel d'hyperdiploïdie élevée mais plutôt une forme atypique qui doit inciter à aller chercher plus loin. Cette donnée intéressante, qui mériterait toutefois d'être évaluée correctement via des études, pourrait constituer une indication à la réalisation de la CGH/SNP dans le cadre d'une utilisation non systématique de cette technique.

L'index d'ADN a enfin apporté des données manquantes dans les cas d'échec de caryotype avec l'exemple du cas n°3. Concernant ce dernier, malgré l'échec de culture, l'index montre bien un ratio à 1,2, ce qui a ensuite été confirmé par la FISH et la CGH. Pour ce cas, 3 techniques ont été effectuées alors que deux auraient suffi. Nous pouvons donc nous poser la question de l'utilité de réaliser l'index d'ADN systématiquement en toute circonstance. Néanmoins, cette analyse reste une technique rapide, peu chère et avec la meilleure sensibilité si le prélèvement le permet.

La CGH/SNP-array permet une analyse globale du génome et des chromosomes avec une haute résolution grâce à l'utilisation de sondes de plus en plus petites et très précises. La précision étant nettement meilleure que celle du caryotype, elle permet d'identifier des anomalies cryptiques qui n'avaient pas été vues en cytogénétique conventionnelle. Plusieurs études ont pu mettre en évidence l'existence d'anomalies du nombre de copies (CNA) dans les LAL pouvant parfois avoir un impact pronostic lorsqu'elles touchent certains gènes (90)(91). Pour rappel, une CNA n'est autre qu'une variation du nombre de copie (CNV) jugée pathologique. Ainsi, la CGH/SNP-array est la seule à pouvoir identifier ces anomalies de petite tailles à type de duplications, amplifications ou microdélétions qui peuvent intéresser des gènes suppresseurs de tumeur ou impliqués dans la prolifération ou différenciation, ayant un impact pronostic indéniable tels que IKZF1, ERG, PAX5, CDKN2A, TP53... (92)(93). A noter, que ces CNA constituent des anomalies secondaires et sont susceptibles d'être sous-clonales, de disparaître ou de varier entre le diagnostic et une éventuelle rechute (94).

Par ailleurs, cette technique peut venir compléter et aider la cytogénétique conventionnelle dans la détermination de l'origine de certains marqueurs ou réarrangements

complexes. En effet, comme nous l'avons dit précédemment, la qualité des chromosomes d'un caryotype, et à fortiori dans le cas des LALB, peut rendre très compliquée l'identification de certaines anomalies voire de certaines paires chromosomiques (en particulier ceux appartenant au même groupe). Dans le contexte des anomalies de la ploïdie, au-delà du nombre modal, les trisomies et tétrasomies identifiées ont une valeur pronostique indépendante. Les techniques de CGH, de même que la FISH, peuvent ainsi avoir un avantage par rapport au caryotype standard. En effet, celles-ci permettent d'identifier avec certitude les chromosomes surnuméraires et viennent compléter et affiner le diagnostic et pronostic initial issu du caryotype. Pour rappel, un des problèmes posé par la FISH reste qu'il faut connaître à l'avance ce que l'on cherche pour pouvoir le trouver. Dans les cas les plus simples, cela ne posera pas de soucis. L'orientation par le caryotype et l'utilisation de sondes protocolaires systématiques permettra d'obtenir les informations nécessaires. Néanmoins, nous ne serons jamais complètement exhaustifs via l'hybridation *in situ* et, dans des situations plus complexes ou en cas d'échec de culture par exemple nous nous retrouverons vite limités par le nombre de sondes utilisées. La CGH quant à elle permet une analyse du génome complètement à l'aveugle et sans préjugé grâce à l'utilisation de milliers de sondes oligonucléotidiques (92). De nombreuses études mettent en avant le caractère supérieur des analyses dites « microarray » vis à vis de la cytogénétique standard. Surtout en ce qui concerne la résolution, l'automatisation ou encore le rendement bien meilleur (95). Un autre avantage de la CGH est que, la culture cellulaire n'étant pas nécessaire, il est possible de visualiser des anomalies y compris sur des cellules non proliférantes. Elle sera ainsi indispensable en cas d'échec de caryotype, lorsque les prélèvements sont trop pauvres ou dans les situations où le caryotype apparaît faussement normal.

Malgré tous les avantages indéniables de la CGH, elle ne peut à elle seule remplacer l'ensemble des autres techniques et ne constitue qu'un complément nécessaire. En effet, par définition, cette analyse ne met en évidence que les anomalies déséquilibrées, gain ou perte de matériel. Or la plupart des anomalies primaires des LALB ayant un impact pronostique sont des translocations équilibrées (96). Cependant, certaines anomalies de type Ph-like notamment sont associées à de petites CNV de type microdélétions aux points de cassure et peuvent donc parfois être détectées. De plus, nous ne pouvons pas non plus visualiser les anomalies qui concernent moins de 10 à 20% des cellules (95). Enfin, le profil seul de CGH ne permet pas forcément de localiser précisément le matériel supplémentaire ni même le mécanisme de la plupart des anomalies complexes (95). Dans ce cas, seul le caryotype permet d'avoir une vision générale de ce qu'il se passe et de comprendre. Finalement, de manière

générale, l'ensemble des publications mettant en évidence les mérites de la CGH/SNP-array concluent tout de même que là où elle est le plus efficace c'est en complément des autres techniques (97). Dans le cas particulier des anomalies de la ploïdie, la CGH/SNP-array semble tout de même avoir une grande place. Un avantage indéniable de la technologie de SNP-array demeure qu'elle soit capable d'identifier les pertes d'hétérozygotie (LOH) (92). Ceci correspond à la perte d'un des deux allèles ce qui peut entraîner une hémizygote (un seul allèle) ou le remplacement de l'allèle manquant par une copie de celui qui reste (16). Ces anomalies surviennent sans variation du nombre de copie et peuvent être compatibles avec des disomies uniparentales acquises (UPD) (98). Les UPD partielles de chromosomes ont été fréquemment identifiées dans plusieurs pathologies malignes et notamment les LAL. Celles concernant des chromosomes entiers sont bien plus fréquentes dans les LAL avec hyperdiploïdie (99). Il semblerait par exemple que les UPD du chromosome 9 ou 9p soient particulièrement fréquentes au sein des LAL pédiatriques (99). Dans notre cohorte, parmi les 55 patients avec hyperdiploïdie élevée, 19 présentaient des UPD (soit 35%) dont 7 avec des UPD du chromosome 9. La présence d'UPD partielles ou de chromosomes entiers mais portant sur une ou quelques paires chromosomiques n'a que peu d'impact diagnostique et la signification pronostique n'est pas encore clairement définie. Cependant la révélation d'UPD peut permettre la mise en évidence des hypodiploïdies masquées.

Cas particuliers : les hypodiploïdies masquées

Il n'est pas rare que les patients avec une hypodiploïdie sévère ou une « near-haploïdy » se présentent sous une forme dupliquée de leur caryotype initial. Dans ces cas à part, décrits entre autre par Pui et al en 1990 (100), la plupart des limites des techniques conventionnelles de première intention sont atteintes. Si nous ne sommes pas attentifs, il est facile de se laisser piéger. Cependant, l'enjeu pronostique pour le patient est majeur. En effet, une hypodiploïdie sévère ou une near-haploïdy sont associées à un pronostic défavorable (52)(49). Pour autant, elles se présentent, dans ces cas, comme des hyperdiploïdies classiques et qui seraient donc associées à un pronostic tout à fait favorable (38).

Ainsi, dans notre cas n° 5, le caryotype et l'index ADN ont identifié une apparente hyperdiploïdie standard à 55 chromosomes. La FISH confirme quant à elle les disomies et tétrasomies vues précédemment. De la même manière, dans notre cas n°6, nous observons une pseudo triploïdie à 69 chromosomes sur les techniques de cytogénétique avec un index cette fois-ci évocateur. Il apparaît que seule la SNP-array permet de révéler systématiquement

les hypodiploïdies cachées par la mise en évidence d'UPD pour l'ensemble des chromosomes disomiques. Plus précisément, chaque paire de chromosomes est constituée d'un chromosome issu du génome paternel et un autre issu du génome maternel. En cas d'UPD, les deux chromosomes ont la même origine ce qui suppose qu'il y a eu perte d'un des deux chromosomes homologues et duplication de l'autre. Lorsque cette anomalie est identifiée pour tous les chromosomes disomiques cela confirme une situation d'hypodiploïdie dupliquée dite « masquée ». Dans ces cas, la SNP-array apparaît évidemment toute puissante et indispensable pour rétablir la vérité. Néanmoins, une analyse fine et appropriée du caryotype peu permettre de suspecter le diagnostic et de ne pas se laisser piéger. Dans les deux cas (n°5 et 6) nous retrouvons un profil constitué essentiellement de disomies et de térasomies. Ainsi, dans le premier cas, on remarque un profil à 55 chromosomes mais atypique, ne présentant pas les trisomies habituellement retrouvées : térasomies pour les chromosomes X, 4, 10 et 21 mais une seule trisomie pour le chromosome 18. Dans le deuxième cas, en plus, le nombre modal à 69 peu classique doit faire évoquer la forme paratriploïde issue d'une duplication d'un clone hypodiploïde sévère. Il faut néanmoins relever qu'il existe une zone « grise », de chevauchement, entre 60 et 65 chromosomes où il est très difficile de faire la part des choses, en cytogénétique conventionnelle, entre une hypodiploïdie/paratriploïdie et une hyperdiploïdie. Cependant, une analyse attentive du profil chromosomique en caryotype ou en FISH permet de suspecter la situation et de ne pas orienter le clinicien trop rapidement vers des formes de très bon pronostic. De plus, il a été montré dans la littérature que certains chromosomes peuvent être discriminants. Les near-haploïdy présentent plus fréquemment des térasomies 14, 18, 21 et des gonosomes (57). Pour les hypodiploïdies/paratriploïdie cela concerne plus souvent les chromosomes 1, 6, 11, 18, 21 et 22 (101). Nous sommes donc loin du profil d'hyperdiploïdie sévère standard de bon pronostic (trisomies X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21). Dans ce sens, l'absence des trisomies classiquement identifiées et le caractère prépondérant des disomies et térasomies ou encore un nombre modal proche de 69 doit faire évoquer le problème.

Les paratriploïdies sont des entités assez rares chez l'enfant (0,3% des LAL (102)). En 1996, le GFCH établit une corrélation entre les triploïdies et les hypodiploïdies 30-39 du fait de leur profil chromosomique. Les disomies les plus fréquemment retrouvées dans le second groupe correspondant aux térasomies retrouvées dans le premier, l'un correspondant parfaitement à la duplication de l'autre (103). Ceci sera confirmé plus tard et considéré comme une seule et même entité de LALB de haut risque (101). A noter que nous retrouvons

chez ces patients une mutation TP53 quasiment systématiquement (plus de 90% (104)), et qui est même constitutionnelle dans la moitié des cas (57).

Ce qui apparaît intéressant dans notre dernier cas (n°6) est qu'à la rechute c'est le clone non dupliqué qui surgit au premier plan. Il sera cette fois-ci bien identifié en FISH et par l'index d'ADN même si le caryotype reste apparemment normal. Le caractère prépondérant du clone hypodiploïde à la rechute est quelque chose qui a bien été décrit dans la littérature (105).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandations précises concernant l'utilisation de la CGH/SNP-array dans le domaine de l'onco-hématologie. En 2019, dans un rapport à la haute autorité de santé traitant de l'apport de l'ACPA (analyse chromosomique sur puce à ADN) dans le contexte de LAL, le Pr Cavé indique que cette technique n'est pas indispensable. En effet, même si celle-ci permet d'identifier à la fois les anomalies de la ploïdie, les amplifications (ex : iAMP21), les délétions importantes (ex : gène IKZF1) et parfois même certaines anomalies Ph-like, d'autres techniques en sont aussi capables (MLPA, RT-PCR). Elle précise qu'il est préférable de choisir certaines techniques afin de les combiner au mieux plutôt que de toutes les réaliser. Dans ce sens, la CGH/SNP-array n'a d'intérêt qu'en cas de doute sur la ploïdie pour identifier les UPD qu'elle est la seule à pouvoir mettre en évidence ou dans l'optique de confirmer certaines aneuploïdies (16).

CONCLUSION

Actuellement, quatre techniques sont réalisées de manière systématique pour le diagnostic des LALB pédiatriques, dans le cadre de la recherche des anomalies de la ploïdie. Notre étude montre que dans la grande majorité des cas, les résultats obtenus avec ces différentes techniques sont parfaitement concordants. Bien qu'il faille toujours confirmer chaque anomalie par deux techniques, les résultats de notre étude nous incitent tout de même à réfléchir à une utilisation plus raisonnée et orientée de ces dernières. En effet, le recours à l'ensemble de ces analyses semble redondant et engendre un coût économique certain.

Le caryotype semble rester indéniablement l'examen obligatoire et d'orientation. Dans les cas les plus simples où toutes les mitoses nécessaires sont obtenues en assez bonne qualité, il est possible d'imaginer que seules les FISH protocolaires à la recherche des réarrangements majeurs soient réalisées en association avec le caryotype. Les techniques de biologie moléculaire autres que les techniques d'ACPA comme la MLPA, permettront en plus dans ces cas d'apporter les informations nécessaires telles que la recherche de délétion IKZF1.

A l'inverse, en cas de caryotype en échec, insuffisant ou de qualité très moyenne, une analyse FISH plus développée avec des sondes centromériques pertinentes ainsi que la CGH/SNP-array pourront alors être réalisées. Par ailleurs, dans le cas où le caryotype semble assez informatif mais atypique ou douteux, la FISH et surtout la SNP-array seront aussi nécessaires. A noter que dans tous les cas la SNP-array a bien plus d'intérêt que la CGH seule. Ainsi une technologie de puce à ADN avec SNP est à privilégier. L'index d'ADN, facile à réaliser, pourrait être fait de manière systématique. En effet, même si dans la majorité des situations, celui-ci est redondant vis à vis des analyses de cytogénétique, il permettra de confirmer les résultats et de compléter rapidement la FISH en cas d'échec de culture alors que le résultat de CGH/SNP-array sera bien plus tardif. De plus, une légère discordance entre l'index et le nombre modal en cytogénétique conventionnelle pourra faire suspecter un profil atypique et incitera également à réaliser une CGH/SNP-array.

Finalement, ces analyses présentent chacune des avantages et des limites spécifiques, comblant ainsi les failles les unes des autres. Elles conservent toutes un intérêt certain et leur combinaison appropriée permettra une recherche adéquate des anomalies de la ploïdie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Madhusoodhan PP, Carroll WL, Bhatla T. Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. juill 2016;46(7):229-41.
2. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*. juill 2001;2(7):429-36.
3. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet Lond Engl*. 15 janv 2000;355(9199):165-9.
4. Brown AL, de Smith AJ, Gant VU, Yang W, Scheurer ME, Walsh KM, et al. Inherited genetic susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. *Blood*. 10 2019;134(15):1227-37.
5. Malkin D. Li-Fraumeni Syndrome. *Genes Cancer*. avr 2011;2(4):475-84.
6. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. févr 2015;62(1):47-60.
7. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. oct 1995;9(10):1783-6.
8. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymphoide/108-leucemies-aigues-lymphoblastiques>
9. Mullighan CG. How advanced are we in targeting novel subtypes of ALL? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(4):101095.
10. Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. oct 1997;99(1):93-100.
11. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 2016;127(20):2391-405.
12. Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 8 avr 2004;350(15):1535-48.
13. Dastugue N, Suciù S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 28 mars 2013;121(13):2415-23.
14. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood*. 26 févr 2015;125(9):1383-6.
15. Moorman AV, Robinson H, Schwab C, Richards SM, Hancock J, Mitchell CD, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 sept 2013;31(27):3389-96.
16. Évaluation de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en cancérologie [Internet]. Haute Autorité de Santé. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3066998/fr/evaluation-de-l-analyse-chromosomique-sur-puce-a-adn-acpa-en-cancerologie

17. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 29 janv 2009;360(5):470-80.
18. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 28 août 2014;124(9):1434-44.
19. Hof J, Krentz S, van Schewick C, Körner G, Shalapour S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 août 2011;29(23):3185-93.
20. Baranger L, Cuccuini W, Lefebvre C, Luquet I, Perot C, Radford I, et al. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et de l'adulte: actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* 1 sept 2016;74(5):547-60.
21. Tran TH, Loh ML. Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2 déc 2016;2016(1):561-6.
22. Roberts KG, Reshmi SC, Harvey RC, Chen I-M, Patel K, Stonerock E, et al. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 23 août 2018;132(8):815-24.
23. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood.* 25 juin 2015;125(26):3977-87.
24. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* janv 1996;14(1):18-24.
25. Jovanovska A, Martinova K, Kocheva S, Trajkova-Antevska Z, Coneska-Jovanova B, Panovska-Stavridis I, et al. Clinical Significance of Minimal Residual Disease at the End of Remission Induction Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Open Access Maced J Med Sci.* 15 sept 2019;7(17):2818-23.
26. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med.* 27 août 1998;339(9):591-8.
27. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc.* janv 2018;60(1):4-12.
28. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ, Nachman JB, et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* mai 2000;18(9):1876-87.
29. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK. Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* févr 1996;10(2):213-24.
30. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* juill 2007;46(7):684-93.
31. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J.* 2 déc 1978;2(6151):1529-30.
32. Heerema NA, Palmer CG, Baehner RL. Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.*

juin 1985;17(2):165-79.

33. Dastugue N, Robert A, Payen C, Clément D, Kessous A, Demur C, et al. Prognostic significance of karyotype in a twelve-year follow-up in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* nov 1992;64(1):49-55.
34. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* mai 2012;26(3):123-35.
35. 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.* mai 2010;11(5):429-38.
36. 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.* déc 2010;203(2):209-14.
37. Paulsson K, Panagopoulos I, Knuutila S, Jee KJ, Garwicz S, Fioretos T, et al. Formation of trisomies and their parental origin in hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 15 oct 2003;102(8):3010-5.
38. Kaneko Y, Hayashi Y, Sakurai M. Chromosomal findings and their correlation to prognosis in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* nov 1981;4(3):227-35.
39. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* août 2009;48(8):637-60.
40. Blandin AT, Mühlmann D, Bougeon S, Gogniat C, Porter S, Beyer V, et al. Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 15 oct 2008;186(2):69-77.
41. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ, Crist WM, et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 15 juin 1992;79(12):3316-24.
42. Sharathkumar A, DeCamillo D, Bhamhani K, Cushing B, Thomas R, Mohamed AN, et al. Children with hyperdiploid but not triple trisomy (+4,+10,+17) acute lymphoblastic leukemia have an increased incidence of extramedullary relapse on current therapies: a single institution experience. *Am J Hematol.* janv 2008;83(1):34-40.
43. 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.* mai 2005;19(5):734-40.
44. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 15 oct 2003;102(8):2756-62.
45. Paulsson K. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: Chromosomal gains as the main driver event. *Mol Cell Oncol.* févr 2016;3(1):e1064555.
46. Paulsson K, Horvat A, Strömbeck B, Nilsson F, Heldrup J, Behrendtz M, et al. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(1):26-33.

47. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. août 2012;26(8):1797-803.
48. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. juin 2015;47(6):672-6.
49. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, Rivera GK, Look AT, Dodge RK, et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. juill 1987;70(1):247-53.
50. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, Sarel MG, Lee MK, Hutchinson R, et al. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood*. 15 déc 1999;94(12):4036-45.
51. Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, Shurtleff SA, Sandlund JT, Rivera GK, et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 15 déc 2003;98(12):2715-22.
52. 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*. 15 août 2007;110(4):1112-5.
53. Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. oct 1997;99(1):93-100.
54. 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*. juin 2004;125(5):552-9.
55. Mullighan CG, Jeha S, Pei D, Payne-Turner D, Coustan-Smith E, Roberts KG, et al. Outcome of children with hypodiploid ALL treated with risk-directed therapy based on MRD levels. *Blood*. 24 déc 2015;126(26):2896-9.
56. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. mars 2013;45(3):242-52.
57. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM, Raimondi SC, Hirsch BA, Loh ML, et al. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Genet*. 2019;238:62-8.
58. 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*. 15 août 2007;110(4):1112-5.
59. La cytogénétique moléculaire [Internet]. Disponible sur: <http://umvf.omsk-osma.ru/genetique-medicale/Enseignement/genchrom/cytomol.html>
60. Tjio JH, Levan A. The Chromosome Number of Man. In: Persaud TVN, éditeur. *Problems of Birth Defects* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1956 p. 112-8. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-6621-8_13
61. Nowell P, Hungerford DA, Nowell P. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. 1960;
62. Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer*. févr 2007;7(2):107-17.
63. Alberts B. *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Paris: Médecine sciences

publications; 2012.

64. Zech L. The identification of human chromosomes by fluorescence technics. *Biochem J.* oct 1971;124(5):38P-39P.
65. Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* janv 1968;49(1):219-22.
66. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet.* nov 1988;80(3):235-46.
67. 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 JMD.* avr 2007;9(2):134-43.
68. Bentz M, Döhner H, Cabot G, Lichter P. Fluorescence *in situ* hybridization in leukemias: « the FISH are spawning! » *Leukemia.* sept 1994;8(9):1447-52.
69. Kim SR, Kim HJ, Kim SH. [Clinical utility of fluorescence *in-situ* hybridization profile test in detecting genetic aberrations in acute leukemia]. *Korean J Lab Med.* oct 2009;29(5):371-8.
70. Tosi S, Ritterbach J, Maglia O, Harbott J, Riehm H, Masera G, et al. Double target *in situ* hybridization applied to the study of numerical aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* avr 1994;73(2):103-8.
71. Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Janka-Schaub G, Ludwig WD, et al. Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Leukemia.* mars 1998;12(3):427-33.
72. Berger A, Strehl S, Hekele A, Ambros PF, Haas OA, Gadner H. Interphase cytogenetic study of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1994;23(5):413-21.
73. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP, Beverloo HB, Smit EME, Vang-Nielsen K, et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* mai 2004;18(5):895-908.
74. Bishop R. Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Biosci Horiz Int J Stud Res.* 1 mars 2010;3(1):85-95.
75. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 30 oct 1992;258(5083):818-21.
76. Cours [Internet]. Disponible sur: http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique19/site/html/1_2.html
77. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* déc 1997;20(4):399-407.
78. Institut de Pathologie et de Génétique a.s.b.l. [Internet]. Disponible sur: <http://www.ipg.be/biologie-moleculaire/test-par-cgh-sur-micropuce/>
79. SNP Arrays - Haematological Malignancy Diagnostic Service [Internet]. Disponible sur: <http://hmds.info/diagnostic-service/techniques/snp-arrays>
80. Song S, Nones K, Miller D, Harliwong I, Kassahn KS, Pines M, et al. qpure: A tool to estimate tumor cellularity from genome-wide single-nucleotide polymorphism profiles. *PloS One.* 2012;7(9):e45835.
81. Smets LA, Homan-Blok J, Hart A, de Vaan G, Behrendt H, Hählen K, et al.

Prognostic implication of hyperdiploidy as based on DNA flow cytometric measurement in childhood acute lymphocytic leukemia--a multicenter study. Leukemia. mars 1987;1(3):163-6.

82. Determination of DNA Index by Flow Cytometry [Internet]. Disponible sur: <http://www.fmshk.com.hk/hkabth/em/200205.htm>
83. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, Robert A, Geneviève 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.* juin 2010;32(3):288-98.
84. Forestier E, Holmgren G, Roos G. Flow cytometric DNA index and karyotype in childhood lymphoblastic leukemia. *Anal Cell Pathol J Eur Soc Anal Cell Pathol.* 1998;17(3):145-56.
85. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* mai 1985;65(5):1079-86.
86. Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, Barisone E, Biondi A, Casale F, et al. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 janv 2008;26(2):283-9.
87. Macintyre E. Les guides de juste prescription du Réseau de biologie innovatrice en onco-hématologie (RuBIH), programme STIC 2004-9. *Hématologie.* 1 sept 2010;16(3):102-102.
88. Martin PL, Look AT, Schnell S, Harris MB, Pullen J, Shuster JJ, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol.* mai 1996;18(2):113-21.
89. Morton NE. Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 sept 1991;88(17):7474-6.
90. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* avr 2016;101(4):407-16.
91. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 15 nov 2008;112(10):4178-83.
92. Chen C, Heng EYH, Lim AST, Lau LC, Lim TH, Wong GC, et al. Chromosomal microarray analysis is superior in identifying cryptic aberrations in patients with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis/relapse as a single assay. *Int J Lab Hematol.* août 2019;41(4):561-71.
93. 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.* 12 avr 2007;446(7137):758-64.
94. 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.* 28 nov 2008;322(5906):1377-80.
95. Peterson JF, Aggarwal N, Smith CA, Gollin SM, Surti U, Rajkovic A, et al. Integration of microarray analysis into the clinical diagnosis of hematological malignancies: How much can we improve cytogenetic testing? *Oncotarget.* 31 juill 2015;6(22):18845-62.
96. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet.* avr 2004;36(4):331-4.
97. Xu X, Johnson EB, Leverton L, Arthur A, Watson Q, Chang FL, et al. The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies--a comparative

- study of three genetic testing methods. *Cancer Genet.* oct 2013;206(9-10):317-26.
98. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):1534-42.
99. 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.* 15 janv 2008;111(2):776-84.
100. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM, Shuster JJ, et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. *Blood.* 1 mars 1990;75(5):1170-7.
101. Charrin C, Thomas X, Ffrench M, Le QH, Andrieux J, Mozziconacci M-J, 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;104(8):2444.
102. Pui C, Carroll A, Head D, Raimondi S, Shuster J, Crist W, et al. Near-Triploid and Near-Tetraploid acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Blood.* 1 sept 1990;76:590-6.
103. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A Collaborative Study of the Group Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood.* 15 avr 1996;87(8):3135-42.
104. Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, Weissmann S, Kunze F, Kohlmann A, et al. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(6):524-36.
105. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood.* 26 2017;129(4):420-3.

Abréviations et Acronymes

ABL1 : *Abelson proto oncogen 1*

ABL2 : *Abelson proto oncogen 2*

ACPA : Analyse chromosomique sur puce à ADN

AD = Allèle différence

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BAF : B allele frequency

BCR : *Breakpoint cluster region*

CAALL : Protocole Français de traitement de la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant et de l'adolescent

CART cell : Chimeric Antigen Receptor T-cells

CD : Cluster de différenciation

CDKN2A : *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CEP : Centromere-specific enumeration probe (sonde centromérique)

CGH : Hybridation Génomique Comparative

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CMF : Cytométrie en flux

CN : Copy Number

CNA : Copy Number Abnormality (CNV pathologique)

CNV : Copy Number Variation

CRLF2 : *Cytokine Receptor-Like Factor 2*

CRP : Protéine C réactive

CSF1R : *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DUX4 : *Double homeobox 4*

E2A : *Immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47*

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGIL : European Group for Immunological Charactérisation of Leukemia

EPOR : Erythropoietin receptor

ERG : *ETS related gene*

ETV6 : *ETS Variant Transcription Factor 6*
FAB : Classification Franco-Americano Britannique
FISH : Florescence in situ hybridization
FRDU : 5-fluorodésoxyuridine
GFCH : Groupe Français de Cytogénétique Hématologique
HCl : Acide Chlorhydrique
HLF : *Hepatic leukemia factor*
IGH : *Immunoglobulin heavy*
IGK : *Immunoglobulin kappa*
IKZF : *IKAROS Family Zinc Finger*
IP : Iodure de propidium
JAK2 : *Janus Kinase 2*
Kb : Kilobase (1000 bases)
KMT2A : *Lysine méthyltransférase 2A*
KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LA : Leucémie aigüe
LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique
LAM : Leucémie aigüe myéloïde
LOH : Loss Of Heterozygosity
Mb : Mégabases (1 million de bases)
MEF2D : *Myocyte enhancer factor 2D*
MLL : *Mixed-Lineage Leukemia*
MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRD : Minimal residual disease
NF1 : *Neurofibromin 1*
NGS : Next-Generation Sequencing
NOR : Région d'Organisation Nucléolaire
NRAS : *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
NUTM1 : *nuclear protein in testis midline carcinoma family 1*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAX5 : *Paired box 5*
Pb : Paire de bases
PBS : Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)
PBX1 : *Pre-B-cell leukemia transcription factor 1*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGFRB : Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta

Ph : Chromosome Philadelphie

PNN : Polynucléaire neutrophile

PTI : Purpura thrombopénique idiopathique

PTPN11 : Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

RT-PCR : Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction

RuBIH : Réseau de Biologie Innovatrice en onco-Hématologie

RUNX1 : Runt-related Transcription Factor 1

RUNX1T1 : Runt-related Transcription Factor 1 Translocated to 1

SNP : Single Nucleotid Polymorphism

SSC : Citrate de solution saline-sodium

TP53 : Tumor Protein 53

UPD : Uniparental Disomy (Disomie Uniparentale)

ZNF384 : Zinc finger 384

ANNEXE

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des cas décrits

N° CAS	Date diag	Age au diag	Diagnostic	Ligne	CMF	Caryotype standard	Index d'ADN	FISH	CGH	Diagnostic final
1	12/02/19	12 ans	LAL	B	B2	55,XY,+X,+Y,+4,+6, +14,+17,+18,+21,21	2 pics avec index d'ADN à 1,19	Trisomies 6 17 14 18 +X tétra21	Trisomies 4, 6, 14, 17 et 18. Disomies X et Y. Térasomie 21.	Hyperdiploidie élevée standard
2	06/03/19	16 ans	LAL	B	B2	35,XY,2,-3,4,-7,9,- 12,-13,-15,-16,-17,-	3 pics dont 2 anormaux avec index à 0,79 et 1,5	Deux clones : un avec monosomies 9 et 12 majoritaire, un avec disomie 9, 12 et térasomie 11, 21 et 22. Troisième plus petit clone avec disomie 9 et térasomie 22	Perte des chromosomes 2, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 14, 16, 17 et 20	Hypodiploidie sevère
3	08/05/17	16 ans	LAL	B	B2	Echec caryo	2 pics avec index d'ADN à 1,2	Trisomies 8 9 17 et térasomie 21	Trisomies 4, 6, 8, 9, 10, 14, 17, 18. Térasomie 21. Disomie X. DelIKZF1, UPD 11, 15 et 16	Hyperdiploidie élevée standard
4	19/03/15	3 ans	LAL	B	B2	46,XX	Non réalisé	14, 17, 18 et térasomie 21	Gain X, 4, 6, 17, 18, 21	
5	17/09/17	10 ans	LAL	B	B2	55,XX,+X,+Y,+4,+4, +10,+10,+18,+21,+2	2 pics avec index d'ADN à 1,18	Tétraploidie 21, disomies 9, 11, 12, et 22	Gain X, 4, 10, 18, 21. UPD pour les autres.	Near haploidie duplique
6	17/11/17	14 ans	LAL	B	B2	69-48>XXXXY-2,-2,- 3,-3,-4,-4,- 5,add(6)(p22),-7,-7,- 9,-9,-12,-12,-13,-13,- 15,-15,-16,-16,-17,- 17,-20,-20	3 pics dont deux anormaux avec index à 1,5 et 0,78	Térasomies 1, 6, 11, 21 et 22, disomies 3, 7 et 17	Gain X, 1, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, 22. UPD pour les autres.	Hypodiploidie parat riploidie

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

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

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

J'informerais les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

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

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

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

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

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

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

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



