



HAL
open science

Profil moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques

Alice Marceau

► **To cite this version:**

Alice Marceau. Profil moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS003 . tel-01960902

HAL Id: tel-01960902

<https://theses.hal.science/tel-01960902>

Submitted on 19 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LILLE

École Doctorale Biologie-Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Hématologie

Alice Marceau Ep. Renaut

PROFIL MOLÉCULAIRE DES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES PÉDIATRIQUES

Soutenue publiquement le 4 juillet 2018 devant le jury composé de :

Professeur Hélène CAVÉ

Présidente

Professeur Olivier KOSMIDER

Rapporteur

Professeur Pierre-Simon ROHRLICH

Rapporteur

Docteur Meyling CHEOK

Examineur

Professeur Claude PREUDHOMME

Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre-Simon Rohrllich et le Professeur Olivier Kosmider d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Professeur Hélène Cavé pour l'intérêt porté à ce travail lors des comités de suivi de thèse. C'est un honneur de vous voir présider ce jury.

Merci au Docteur Meyling Cheok d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Après mon master 2 à tes côtés, la boucle est bouclée !

Je remercie le Professeur Claude Preudhomme d'avoir dirigé cette thèse durant ces quelques (!) années. Merci de votre confiance au quotidien, c'est toujours un plaisir de participer aux beaux projets que vous proposez au laboratoire.

Je remercie chaleureusement mes collègues et amis biologistes du laboratoire d'hématologie : Thomas, Elise, Olivier, Nathalie, Christophe, Florent, Valérie, Stéphanie, Martine, Laurence. Je n'oublie pas Aline qui m'a tout appris de la biologie moléculaire et qui a laissé un grand vide ici. Je remercie également Benoît pour sa participation active aux techniques de RT-MLPA. Mes remerciements les plus profonds s'adressent à Nicolas sans qui ce travail n'aurait jamais abouti. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide, les figures, la rédaction de l'article... C'est toujours un plaisir de travailler à tes côtés et j'espère un jour pouvoir t'appeler « chef ! ».

J'adresse mes sincères remerciements aux ingénieurs (en particulier Sandrine et Maxime), aux techniciens et aux secrétaires sans qui tout notre travail au laboratoire ne pourrait exister.

Je remercie Laurène, future collègue, pour son travail sur les prédispositions et pour son enthousiasme au quotidien.

Je remercie vivement Hélène Lapillonne de m'avoir acceptée sur ce beau projet. Merci à tous les biologistes et cliniciens impliqués sur le protocole ELAM02, pour votre travail au quotidien auprès des patients et leurs familles.

Mes derniers remerciements s'adressent à ma famille et mes amis, trop nombreux pour être tous cités. Je ne remercierai jamais assez mes parents de tout ce qu'ils font pour nous.

Enfin mes dernières pensées s'adressent à Pierre-Yves pour son soutien chaque jour, à Arthur et Gaspard mes filous...

Table des matières

Table des illustrations.....	5
A. Figures	5
B. Tableaux	5
Abréviations	7
Résumé.....	9
Abstract	10
Les leucémies aiguës myéloïdes : introduction générale.....	11
A. Définition.....	11
B. Epidémiologie.....	11
C. Etiologies	11
1. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à d'autres cancers et/ou dysfonctions organiques	12
2. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à des anomalies plaquettaires pré-existantes	15
3. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale « pures » (sans maladie pré-existante ou atteinte d'organe)	16
D. Présentation clinique.....	16
E. Diagnostic biologique	17
1. Cytologie.....	17
2. Immunophénotypage.....	18
3. Cytogénétique conventionnelle et FISH.....	18
4. Biologie moléculaire	18
F. Classifications des LAM	20
1. Classification FAB.....	20
2. Classification OMS.....	21
G. Facteurs pronostiques.....	22
1. Cytogénétique	23
2. Génétique moléculaire.....	23
3. Réponse au traitement.....	23
H. Principes de traitement des LAM pédiatriques.....	24
Objectifs	25
Matériel et méthodes.....	26

A. Patients et protocole ELAM02.....	26
B. Cytogénétique et détection des transcrits de fusion	28
C. Analyses mutationnelles par NGS	31
D. Analyses statistiques	33
Résultats.....	35
A. Caractéristiques des patients au diagnostic.....	35
B. Profil moléculaire des LAM pédiatriques	37
1. Mutations géniques.....	37
2. Transcrits de fusion	39
3. Profil moléculaire du protocole ELAM02	40
C. Association du profil moléculaire avec les anomalies cytogénétiques des LAM pédiatriques .	41
D. Impact des anomalies moléculaires sur l’obtention d’une rémission complète	45
E. Réarrangements de <i>NUP98</i> dans la cohorte ELAM02	47
F. Impact des anomalies moléculaires sur la survie des patients	47
G. Classification moléculaire des LAM pédiatriques.....	52
Discussion	56
Conclusion	61
Bibliographie.....	62
Annexe.....	71

Table des illustrations

A. Figures

Figure 1: Schéma thérapeutique du protocole ELAM02	27
Figure 2: Principe de la technique de LD-RTPCR (90).....	29
Figure 3: Design des transcrits de fusion recherchés.....	30
Figure 4: Préparation de la librairie selon le système Ampliseq	32
Figure 5: Préparation de la librairie selon le système Haloplex	33
Figure 6: Répartition des LAM au diagnostic selon la classification FAB (n=385)	36
Figure 7: Distribution des groupes cytogénétiques dans la cohorte étudiée (n=385).....	36
Figure 8: Distribution des groupes cytogénétiques en fonction de la classe d'âge	37
Figure 9: Fréquence des gènes mutés (>1%) dans la cohorte de LAM pédiatriques	38
Figure 10: Nombre de gènes mutés en fonction du groupe cytogénétique	39
Figure 11: Nombre de gènes mutés en fonction de la classe d'âge.....	39
Figure 12: Fréquence des anomalies moléculaires dans le protocole ELAM02	41
Figure 13: Profil génomique des LAM pédiatriques à CBF et <i>KMT2A</i> réarrangés.....	42
Figure 14: Profil génomique des LAM pédiatriques à caryotype normal, défavorable et autres	43
Figure 15: Association entre les mutations et les différents groupes cytogénétiques	44
Figure 16: Circos plot illustrant la coexistence des anomalies moléculaires des LAM pédiatriques	45
Figure 17: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction de la présence d'un transcrite <i>NUP98</i>	47
Figure 18: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction du groupe cytogénétique.....	48
Figure 19: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction de mutations géniques	50
Figure 20: Devenir des LAM pédiatriques	52
Figure 21: Devenir des LAM pédiatriques en séparant les réarrangements de <i>KMT2A</i>	53
Figure 22: Impact du statut <i>FLT3</i> -ITD dans les LAM pédiatriques à risque moléculaire défavorable...	54

B. Tableaux

Tableau 1: Classification OMS des LAM, édition 2016	21
Tableau 2: Translocations chromosomiques avec prévalence plus élevée dans les LAM pédiatriques comparées aux LAM de l'adulte	22
Tableau 3: Caractéristiques des patients au diagnostic de LAM (cohorte totale ELAM02 vs. cohorte étudiée)	35
Tableau 4: Transcrits de fusion identifiés par LD-RTPCR.....	40

Tableau 5: Caractéristiques des patients en fonction de l'obtention d'une rémission complète après deux cures de chimiothérapie intensive	45
Tableau 6: Analyse multivariée sur l'obtention d'une rémission complète.....	46
Tableau 7: Analyses multivariées sur la survie à 3 ans des LAM pédiatriques.....	51
Tableau 8: Survie globale à 3 ans selon la classification moléculaire	53
Tableau 9: Survie globale à 3 ans selon la classification ELN 2017	54

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	FANC : Fanconi anemia complementation groups
AF : anémie de Fanconi	FISH : fluorescence <i>in situ</i> hybridization
ANKRD26 : ankyrin repeat domain 26	FLT3-ITD : Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication
AraC : aracytine	FPD : familial platelet disorder
ARN : acide ribonucléique	IC : intervalle de confiance
ASXL1 : additional sex combs like 1	IDH : isocitrate déshydrogénase
BCOR : BCL6 corepressor	IL2 : interleukine 2
BCORL1 : BCL6 corepressor like 1	ISHCN : international system for human cytogenetic nomenclature
BOM : biopsie ostéo-médullaire	JAK2 : Janus kinase 2
BRCA : breast cancer	KMT2A : lysine (K) méthyltransférase 2A
CBF : core binding factor	LA : leucémie aiguë
CBL : Casitas B-lineage lymphoma	LAL : leucémie aiguë lymphoïde
cDNA : ADN complémentaire	LAM : leucémie aiguë myéloïde
CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha	LAP : leucémie aiguë promyélocytaire
CMF : cytométrie en flux	LCR : liquide céphalo-rachidien
CMMRD : constitutional mismatch repair deficiency	LD-RTPCR : ligation-dependent reverse transcription polymerase chain reaction
CN : caryotype normal	LMC : leucémie myéloïde chronique
COG : children's oncology group	LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile
CSF3R : colony stimulating factor 3 receptor	LSC : cellules souches leucémiques
CSH : cellules souches hématopoïétiques	MLL : mixed lineage leukemia
DC : dyskératose congénitale	MPO : myéloperoxydase
DDX41 : DEAD-box helicase 41	MRD : minimal residual disease
DNMT3A : DNA méthyltransférase 3A	NF1 : neurofibromatose de type 1
EFS : event-free survival	NGS : next-generation sequencing
EGIL : European group for the immunological characterization of leukemias	NIPBL : nipped-b-like protein
ELN : European LeukemiaNet	NPM1 : nucléophosmine 1
ETV6 : ETS variant 6	OMIM : online mendelian inheritance in man
EZH2 : enhancer of zeste homolog 2	OMS : organisation mondiale de la santé
FAB : French-American-British	

OS : overall survival

PHF6 : plant homeodomain-like finger protein
6

PTEN : phosphatase and tensin homolog

PTPN11: tyrosine-protein phosphatase non-
receptor type 11

RC : rémission complète

RUNX1 : runt-related transcription factor 1

SAMD9/L : sterile alpha motif domain-
containing protein 9/like

SETBP1 : SET binding protein 1

SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1

SMC : structural maintenance of
chromosomes

SMD : syndrome myélodysplasique

SNC : système nerveux central

SNP : single nucleotide polymorphism

SRP72 : signal recognition particle subunit 72

SRSF2 : serine/arginine-rich splicing factor 2

STAG2 : stromal antigen 2

TAM : transient abnormal myelopoiesis

TET2 : ten eleven translocation 2

TK : tyrosine kinase

TP53 : tumor protein 53

U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor
1

VAF : variant allele frequency

WT1 : Wilms' tumor 1

ZRSR2 : zinc finger CCCH-type, RNA binding
motif and serine/arginine rich 2

Résumé

Malgré une amélioration de la prise en charge thérapeutique au cours des dernières années, les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) pédiatriques sont des hémopathies graves, avec des taux de rechute pouvant atteindre 30% et des taux de survie inférieurs à 75%. Une meilleure description des anomalies moléculaires chez les enfants atteints de LAM est nécessaire pour affiner le pronostic de ces patients. En utilisant le séquençage haut débit ciblé sur 36 gènes et la technique de LD (ligation-dépendent) RT-PCR, ce travail décrit le profil moléculaire ainsi que sa signification pronostique chez 385 enfants atteints de LAM *de novo* inclus dans l'essai clinique prospectif ELAM02. 76 % des patients présentent au moins une mutation parmi les gènes étudiés. Les mutations les plus fréquentes concernent les gènes contrôlant les voies de signalisation des tyrosine kinases (61 %), suivis par les facteurs de transcription (16 %), les suppresseurs de tumeurs (14 %), les modificateurs de la chromatine (9 %), la méthylation de l'ADN (8 %), la cohésine (5 %) et le spliceosome (3 %). De plus, un transcrite de fusion est détecté dans près de la moitié des cas. Au final, les réarrangements impliquant le CBF, les mutations de *NPM1* et double-mutations de *CEBPA* (*CEBPA*-dm) représentent 37% de la cohorte et définissent un sous-groupe moléculaire au pronostic favorable (survie globale à 3 ans: 92,1%) alors que les fusions impliquant *NUP98*, les mutations *WT1*, *RUNX1* et *PHF6* (15% de la cohorte) constituent un sous-groupe moléculaire au pronostic péjoratif (survie globale à 3 ans: 46,1%). Les réarrangements de *KMT2A* (21 % de la cohorte) sont associés à un risque intermédiaire. Malgré quelques similitudes, le profil moléculaire et sa signification pronostique diffèrent entre les LAM de l'enfant et de l'adulte. Ces résultats contribuent à affiner la stratification du risque pronostique des LAM pédiatriques et ainsi améliorer leur prise en charge thérapeutique. Cette classification moléculaire reste à valider dans d'autres cohortes pédiatriques indépendantes.

Abstract

Despite major treatment improvements over the past decades, pediatric acute myeloid leukemia (AML) is still a life-threatening malignancy with relapse rates up to 30% and survival rates below 75%. A better description of the pattern of molecular aberrations in childhood AML is needed to refine prognostication in such patients. We report here the comprehensive molecular landscape using both high-throughput sequencing focused on 36 genes and ligation-dependent RT-PCR in 385 children with *de novo* AML enrolled in the prospective ELAM02 trial and we evaluated their prognostic significance. 76% of patients had at least one mutation among the genes we screened. The most common class of mutations involved genes that control kinase signaling (61%) followed by transcription factors (16%), tumor suppressors (14%), chromatin modifiers (9%), DNA methylation controllers (8%), cohesin genes (5%) and spliceosome (3%). Moreover, a recurrent transcript fusion was detected in about a half of pediatric patients. Overall, CBF rearrangements, *NPM1* and double *CEBPA* mutations represented 37% of the cohort and defined a favorable molecular subgroup (3-years overall survival: 92.1%) while *NUP98* fusions, *WT1*, *RUNX1* and *PHF6* mutations (15% of the cohort) segregated into a poor molecular subgroup (3-years overall survival: 46.1%). *KMT2A*-rearrangements (21% of the cohort) were associated with an intermediate risk. Despite some overlaps, the spectrum of molecular aberrations and their prognostic significance differ between childhood and adult AML. These data have important implications to contribute in refining risk stratification of pediatric AML and show the need for further validations in independent pediatric cohorts.

Les leucémies aiguës myéloïdes : introduction générale

Cette introduction générale se concentrera principalement sur les LAM pédiatriques.

A. Définition

Les LAM sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes issues de la transformation oncogénique de progéniteurs myéloïdes. Il en résulte une prolifération clonale de cellules tumorales ayant perdu leur potentiel de différenciation : les blastes. Ce processus malin est lié à l'acquisition d'événements génétiques conférant à la cellule myéloïde un avantage de survie associé à un blocage de différenciation. L'expansion du clone leucémique conduit à un envahissement de la moelle osseuse, du sang périphérique, puis de différents tissus ou organes par ces blastes leucémiques. Le caractère aigu des LAM sous-entend une aggravation rapide des signes cliniques et biologiques de la maladie avec une évolution rapidement fatale en l'absence de traitement efficace.

B. Epidémiologie

Chez l'enfant, les hémopathies malignes les plus fréquentes comportent les leucémies aiguës dont 15 à 20% de LAM. L'incidence des LAM chez les bébés de moins de 1 an est de 1.5 cas/100000 habitants/an puis cette incidence diminue à 0.9/100000 chez les enfants de 1 à 4 ans et à 0.4/100000 de 5 à 9 ans. Ensuite elle augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte avec une incidence de 16.2/100000 chez les personnes âgées de plus de 65 ans (1). En France, on estime à 80 nouveaux cas de LAM par an chez les enfants et adolescents de 0 à 18 ans avec un sex-ratio (M/F) de 1.1 (2,3). La survie globale à 5 ans de ces patients ne cesse de s'améliorer au fil du temps pour atteindre 69.4% (64.5-74.2) sur la période 2005-2009 (4).

C. Etiologies

Les causes sous-jacentes des LAM sont inconnues et les LAM pédiatriques se présentent en général *de novo*. Les traitements par chimiothérapie et radiothérapie constituent des facteurs de risque dans le développement de LAM secondaires. Le risque de développer une leucémie est augmenté après des traitements par alkylants, inhibiteurs de topoisomères II (en particulier l'étoposide) et, dans une moindre mesure, après irradiation (5). Les séries pédiatriques de LAM secondaires restent rares en comparaison avec les sujets âgés (6,7). Les cas de LAM secondaires à un traitement antérieur sont estimés à 3.5% des LAM pédiatriques avec un délai moyen entre le cancer primaire et la LAM de 5 ans et un âge moyen au diagnostic de la LAM de 15 ans (8,9).

Chez les adultes et sujets plus âgés, la LAM peut également survenir à la suite d'un syndrome myélodysplasique (SMD) mais chez l'enfant, la survenue de LAM précédée par l'évolution clonale

d'hémopathies comme les SMD ou les leucémies myélomonocytaires juvéniles (LMMJ) reste rare (1% des cas pédiatriques contre 17% chez les adultes de moins de 60 ans) (1,9).

De nombreux facteurs génétiques constitutionnels sont aujourd'hui connus pour être associés à un risque accru de développer une LAM. La majorité de ces altérations génétiques perturbe l'hématopoïèse normale et contribue à l'émergence d'un clone hématopoïétique anormal. La dernière classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a d'ailleurs ajouté une section sur les néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale (10).

1. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à d'autres cancers et/ou dysfonctions organiques

Le syndrome de **Li-Fraumeni** (OMIM #151623) est causé par des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *TP53* selon un mode autosomique dominant. Ce syndrome est caractérisé par un risque accru de développer tout type de cancer incluant des tumeurs solides et leucémies avant l'âge de 45 ans (11,12). Chez les enfants porteurs de ce syndrome, environ 9% vont développer une leucémie à un âge médian de 11 ans (13).

Le syndrome **CMMRD** (constitutional mismatch repair deficiency, OMIM #276300) est un syndrome de prédisposition aux cancers rare, autosomique récessif lié à des mutations bi-alléliques de gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*), également impliqués dans le syndrome de Lynch. Ce syndrome confère un risque accru de développer des cancers principalement cérébraux, gastro-intestinaux et hématologiques à partir de l'enfance et continuant à l'âge adulte. Environ un tiers des patients CMMRD vont développer une hémopathie. L'âge médian de survenue de cette hémopathie est de 6 ans avec principalement des lymphomes non hodgkiniens et parfois des leucémies aiguës (10 cas de LAM décrits parmi 56 hémopathies liés à un syndrome CMMRD)(14).

Les **RASopathies** sont caractérisées par des mutations entraînant l'activation de la voie de signalisation RAS et conférant un risque accru de cancer. Elles regroupent plusieurs syndromes comme la neurofibromatose de type 1 (NF1), le syndrome de Noonan ou le syndrome CBL. Cliniquement, les patients présentent le plus souvent un retard du développement, des malformations congénitales (notamment cardiaques), une dysmorphie faciale. La NF1 (OMIM #162200) est associée à un risque accru de tumeurs solides mais également de leucémies myélomonocytaires juvéniles (LMMJ) et moins fréquemment de LA (15). Le syndrome de Noonan (OMIM #163950) est lié à une mutation d'un gène de la voie RAS dont *PTPN11* représente presque la moitié des cas. Environ 30% des enfants avec syndrome de Noonan vont développer une myéloprolifération transitoire et bénigne, plus rarement des progressions en LMMJ (16). Des cas de LAL-B, le plus souvent hyperdiploïdes, ont également été décrits (17). Le syndrome CBL (OMIM #613563) est dû à des mutations germinales du gène *CBL*, codant pour la protéine Casitas B-lineage

lymphoma, une E3 ubiquitine ligase qui régule négativement la voie des tyrosines kinases. Ce syndrome est associé à une prédisposition aux LMMJ (18).

L'anémie de **Fanconi** (AF, OMIM #227650) est un syndrome caractérisé par un défaut de réparation de l'ADN, une aplasie médullaire et une prédisposition à développer des cancers. Les différents gènes incriminés appartiennent à la voie FANCD1/BRCA2, impliquée dans la réparation des cassures double-brin avec un mode de transmission autosomal récessif. La triade clinique associe un retard statural, des malformations congénitales et des signes cutanés de type taches café au lait. Le risque relatif de cancer en cas d'anémie de Fanconi est d'environ 48 et il augmente à 700 fois pour les cas de LAM. Chez les enfants présentant des mutations bialléliques *FANCD1/BRCA2*, l'incidence cumulée de leucémies (LAM principalement) est de 80% à 10 ans. Les autres cancers développés sont de type variés : tumeurs cérébrales, néphroblastomes et neuroblastomes. Au total, l'incidence cumulée d'apparition d'un cancer (tumeurs solides et/ou leucémies) est de 97% à l'âge de 7 ans. En revanche, un faible nombre de ces enfants vont développer une aplasie médullaire sévère. A l'inverse, les autres patients avec AF (non *FANCD1/BRCA2*) vont développer une aplasie médullaire sévère dans la moitié des cas, ainsi que 20% de LAM et 30% de tumeurs solides à 40 ans (19).

Les mutations germinales du gène **GATA2**, codant pour un facteur de transcription important dans l'hématopoïèse, sont décrites dans des syndromes autosomiques dominants prédisposant aux SMD et progressant en LAM. Le syndrome d'Emberger (OMIM #614038) est défini par un lymphœdème primaire et une prédisposition aux SMD progressant souvent en LAM (20). Le syndrome MonoMAC (OMIM #614172) est caractérisé par une monocytopenie profonde, des lymphopénies B et NK, des infections mycobactériennes disséminées et une prédisposition aux SMD/LAM (21). Un cas exceptionnel de LAL-B avec caryotype complexe (incluant une monosomie 7) a été décrit chez un enfant de 11 ans avec syndrome MonoMAC (22). Une étude de l'EWOOG-MDS (European Working Group of MDS in Childhood) incluant 426 enfants et adolescents avec SMD a démontré que 7% des cas et 15% des cas avancés (AREB et AREB-t) étaient attribués à des mutations germinales de *GATA2* (23). Les mutations de *GATA2* étaient plus fréquentes parmi les patients avec monosomie 7, avec un pic à l'adolescence. Les autres anomalies cytogénétiques associées étaient la trisomie 8 et der(1;7) (résultant en une perte du bras long du chromosome 7). Étonnamment, dans 71% de ces cas *GATA2* mutés, les SMD apparaissent sporadiquement sans antécédents familiaux d'hémopathies malignes. De plus, la présence d'une mutation germinale de *GATA2* ne confère pas un mauvais pronostic en survie globale à ces SMD pédiatriques, malgré un risque important de progression. Au final, cette étude identifie les mutations de *GATA2* comme l'altération germinale la plus fréquente prédisposant aux SMD de l'enfant avec 70% des cas montrant une monosomie 7. Des mutations somatiques d'*ASXL1* ont été décrites dans 29% de patients avec mutations germinales de *GATA2* et semblent

associés à une progression en LMMC, suggérant la nécessité d'un second événement coopérateur pour la transformation maligne (24).

La dyskératose congénitale (DC) est une aplasie médullaire constitutionnelle caractérisée par une triade clinique associant une dystrophie unguéale, des anomalies de pigmentation cutanée et une leucoplasie buccale. Des complications entraînent fréquemment des fibroses pulmonaires, des cirrhoses hépatiques et des tumeurs solides de la tête et du cou. Une dizaine de gènes ont été décrits dans ce syndrome : *DKC1* avec une transmission liée à l'X, *TERC*, *TERT*, *TINF2*, *ACD* avec une transmission autosomique dominante et *CTCT*, *RTEL1*, *NHP2*, *NOP10*, *WRAP53* avec une transmission autosomique récessive (25). L'ensemble des produits de ces gènes est impliqué dans la maintenance des télomères qui sont des séquences d'ADN répétitives et non codantes à l'extrémité des chromosomes. Les enfants atteints de DC ont un risque 196 fois plus élevé de développer une LAM (26). Des mutations germinales de *TERC* et *TERT* sont décrites à la fois chez les enfants et les adultes entraînant des pathologies « DC-like » voire des hémopathies malignes familiales « pures ». Le terme de **téломéropathies** semble aujourd'hui plus approprié pour décrire ces différentes affections.

Les enfants ayant une trisomie 21 constitutionnelle ont un risque élevé de développer une leucémie (incidence 10 à 20 fois supérieure). Une prolifération myéloïde transitoire (TAM : transient abnormal myelopoiesis) apparaît en période néonatale chez 10% de ces enfants et se résout spontanément en 1 à 2 mois le plus souvent. Les LAM associées au syndrome de **Down** se développent en général dans les 3 premières années de vie des enfants avec une surreprésentation des LAM7 selon la classification FAB (French-American-British). Ainsi les jeunes enfants (<4 ans) avec syndrome de Down ont un risque de développer une leucémie aiguë mégacaryoblastique 500 fois plus élevé que les autres enfants. Ces proliférations mégacaryoblastiques sont caractérisées par des mutations de *GATA1* et de la voie JAK-STAT(10,27).

Le syndrome MIRAGE (pour myélodysplasie, infection, retard de croissance, hypoplasie surrénalienne, phénotypes génitaux, entéropathie) a été décrit chez 11 patients portant des mutations germinales du gène **SAMD9** (28). Parmi eux, 2 patients ont développé un SMD avec monosomie 7 à l'âge de 2 et 3 ans et en sont décédés. Parallèlement, le syndrome d'ataxie-pancytopénie (OMIM #159550) a été attribué aux mutations germinales du gène **SAMD9L** (29). Le phénotype de ce syndrome est variable avec l'apparition de troubles neurologiques de 6 à 62 ans et la présence inconstante d'anémie et/ou thrombopénie. Historiquement, une fratrie de 5 enfants décrite en 1978 présentait un syndrome d'ataxie-pancytopénie avec leur père et parmi eux, 2 enfants sont décédés de LAM (30). Récemment, une cohorte pédiatrique de 46 SMD primaires a décrit 8 patients portant des mutations germinales de *SAMD9* ou *SAMD9L* (31). Enfin, une cohorte française de 179 patients atteints d'aplasies médullaires non étiquetées a identifié 16 patients

porteurs de mutations de *SAMD9/SAMD9L* dont la majorité étaient des enfants montrant également des myélodysplasies (32).

Les mutations germinales du gène ***SRP72*** ont été mises en évidence chez 2 familles avec aplasie médullaire et myélodysplasie (33). La première famille décrite montrait une fratrie de 3 enfants (11, 12 et 14 ans) avec aplasie et leur mère présentait des signes de dysplasie. Des troubles auditifs semblent également associés.

2. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à des anomalies plaquettaires pré-existantes

Les mutations germinales du gène ***RUNX1***, facteur de transcription clé dans l'hématopoïèse, sont responsables d'un syndrome autosomique dominant nommé FPD/AML (Familial Platelet Disorder/AML, OMIM #601399). Ce syndrome, décrit dans une quarantaine de familles dans la littérature, entraîne un risque accru de développer des SMD et LA, principalement myéloïdes. Le phénotype clinique est variable mais la thrombopénie est le plus souvent modérée avec une tendance hémorragique. L'incidence des cas de SMD et LAM semble supérieure à 40% avec un âge médian de survenue d'une hémopathie maligne de 33 ans (6 à 76 ans)(34). La transformation en LAM semble associée à l'acquisition d'un événement additionnel somatique, impliquant principalement le second allèle de *RUNX1* (35). Une revue récente de 25 patients FPD/AML parmi 15 familles françaises montre le développement de 10 LAM et 3 LAL-T avec un âge de survenue variant de 6 à 60 ans (36). Parmi ces patients sont décrits 4 cas pédiatriques avec 3 LAM (6, 12 et 12 ans) et une LAL-T (14 ans). Les mutations germinales du gène ***ANKRD26*** ont été identifiées comme causales des thrombopénies héréditaires, selon le mode autosomal dominant, de type 2 (THC2, OMIM #188000)(37). La thrombopénie est le plus souvent modérée avec un déficit en granules alpha. Une revue italienne de 105 cas mutés *ANKRD26* montre la survenue de 10 hémopathies malignes dont 7 LA (38). Une étude élargie de 222 cas retrouve 4.9% de LA, 2.2% de SMD et 1.3% de LMC, ce qui suggère une incidence plus élevée que dans la population générale (39). Enfin une cohorte pédiatrique incluant 5 familles a été rapportée avec 5 enfants âgés de 2 à 16 ans porteurs de mutations d'*ANKRD26*. Aucun cas d'hémopathie maligne n'avait été décrit au moment du diagnostic de la thrombopénie (40).

Les thrombopénies de type 5 (THC5, OMIM #616216), de mode autosomique dominant, sont liées à des mutations germinales du gène ***ETV6*** (anciennement *TEL*), codant pour un répresseur transcriptionnel. La thrombopénie est modérée et environ 25% des porteurs de mutations d'*ETV6* vont développer une hémopathie maligne, principalement des LAL dans l'enfance (41–43). Une étude rétrospective de 4405 LAL pédiatriques a identifié 35 (0.79%) patients avec mutations germinales d'*ETV6*. Ces enfants présentaient un âge plus élevé au diagnostic (10.2 ans contre 4.7 ans) et plus fréquemment un caryotype hyperdiploïde (44).

3. Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale « pures » (sans maladie pré-existante ou atteinte d'organe)

Les LAM familiales avec mutations germinales du gène **CEBPA** forment un syndrome autosomique dominant (OMIM #601626) avec apparition de la leucémie sans phase pré-existante de dysplasie ou de cytopénie ni manifestations non hématologiques (45). Parmi les LAM mutées **CEBPA**, on estime entre 7% et 11% des cas avec une mutation germinale de **CEBPA** et le plus souvent l'acquisition d'une seconde mutation somatique au moment de la transformation (46,47). Dans une étude multicentrique incluant 10 familles mutées **CEBPA**, l'âge médian d'apparition de la LAM est de 24.5 ans (1.75-46 ans) avec une pénétrance presque complète (seulement 3 porteurs asymptomatiques contre 24 patients avec LAM) (48). Ces LAM familiales ont un pronostic favorable comparable aux LAM avec mutations somatiques de **CEBPA**. Elles sont également un modèle unique d'évolution de la maladie avec des récurrences dues à des nouveaux clones leucémiques indépendants (mutations somatiques différentes de **CEBPA**).

Les mutations germinales du gène **DDX41** définissent un syndrome autosomique dominant prédisposant aux hémopathies myéloïdes (OMIM #616871). Les 19 premiers cas décrits ont développé des hémopathies myéloïdes, principalement des LAM et SMD avancés, à un âge médian de 68 ans (44-88 ans) (49). Une autre étude incluant 9 familles décrit également l'apparition de LAM/SMD à un âge avancé (57 ans) mais aussi une famille avec 3 cas de lymphomes folliculaires (50). A ce jour, aucun cas pédiatrique de mutations germinales de **DDX41** n'a été décrit (49-52).

D. Présentation clinique

Les manifestations cliniques des LAM sont polymorphes, non spécifiques et variables d'un enfant à l'autre. Elles sont généralement liées à l'infiltration leucémique de la moelle osseuse, entraînant des cytopénies et donc des signes cliniques d'insuffisance médullaire (53). Le syndrome anémique est fréquent avec fatigue, pâleur cutanéomuqueuse et dyspnée. En cas de thrombopénie, un syndrome hémorragique peut être observé. Un syndrome infectieux avec fièvre et infections à répétition peut également apparaître en cas de neutropénie. Des signes cliniques d'infiltration tumorale sont aussi observés de façon variable : douleurs osseuses, splénomégalie, hépatomégalie, adénopathies. Une hypertrophie gingivale ou des localisations cutanées (leucémides) sont plus fréquentes dans les LAM à composante monocytaire. Une atteinte neuro-méningée est observée dans 5 à 10% des LAM de l'enfant (9). Des chloromes ou sarcomes granulocytaires sont également décrits dans 2 à 4% des cas, principalement chez les jeunes enfants (âge médian de 5 ans) (54). Un syndrome de leucostase, lié à l'accumulation des blastes dans les capillaires, peut survenir en cas d'hyperleucocytose importante

(>100 G/L) (55). La symptomatologie est essentiellement pulmonaire (dyspnée, détresse respiratoire aiguë) et neurologique (troubles de la vigilance, coma, convulsions).

E. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique d'une LAM chez l'enfant requiert la réalisation d'un myélogramme avec une étude morphologique (+ cytochimies), un immunophénotypage, un caryotype, de la FISH (fluorescence *in situ* hybridization) et de la biologie moléculaire spécifique, ce qui est comparable à la pratique usuelle chez les adultes. Ces analyses au diagnostic peuvent être réalisées sur le sang périphérique si l'état du patient contre-indique la réalisation de l'aspiration médullaire. L'examen du LCR (liquide céphalo-rachidien) semble également nécessaire chez les enfants afin de mettre en évidence une éventuelle atteinte neuro-méningée (9). Cependant, pour les patients à tendance hémorragique, notamment en cas de thrombopénie sévère ou coagulopathie dans les LAP (leucémie aiguë promyélocytaire), la ponction lombaire peut être différée. Une atteinte du SNC (système nerveux central) est généralement définie par la présence de plus de 5×10^6 /L leucocytes dans le LCR avec des blastes sur un étalement non contaminé par du sang périphérique.

1. Cytologie

La classification morphologique des LAM est basée sur le phénotype de lignée (indifférenciée, myéloïde, monoblastique, érythroblastique ou mégacaryoblastique) et définie par la classification FAB (56). L'étude morphologique apprécie le pourcentage de blastes indifférenciés, avec granulations ou atypiques ainsi que la présence éventuelle de corps d'Auer ou de signes de myélodysplasie. Les cytochimies confirment l'affiliation myéloïde (MPO : myéloperoxydase positive) et/ou la différenciation monoblastique (estérase positive). Les LA mégacaryoblastiques et avec différenciation minimale (M7 et M0 selon la classification FAB) sont à confirmer par l'immunophénotypage, bien que les LAM7 aient des caractéristiques morphologiques typiques (9,57). La présence de myélofibrose fréquemment associée aux LA mégacaryoblastiques peut conduire à sous-estimer le pourcentage de blastes, à la fois en cytologie et en cytométrie en flux. En cas de décompte de blastes < 20%, une nouvelle aspiration médullaire avec biopsie ostéo-médullaire (BOM) est nécessaire.

La différenciation entre LAM et SMD avancé chez les enfants peut être difficile en cas de faible pourcentage de blastes et la réalisation d'une BOM est alors nécessaire. En effet, la distinction entre LAM et SMD est importante pour le choix du traitement puisqu'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) sera systématique en cas de SMD. Des anomalies génétiques spécifiques de LAM, une hyperleucocytose, des atteintes extra-médullaires et une progression rapide (2-4 semaines) sont en faveur d'une LAM plutôt qu'un SMD (9). En cas de décompte de blastes <20% avec

une anomalie génétique récurrente telle que t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), le diagnostic de LAM sera retenu (58).

2. Immunophénotypage

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode rapide pour déterminer la lignée des blastes et distinguer les LAM des LAL. L'immunophénotypage est nécessaire pour classer les LAM0 (cytochimie de la MPO négative mais positivité des marqueurs myéloïdes en CMF : MPO, CD13, CD33, CD117) et les LAM7 (positivité de marqueurs plaquettaires : CD41, CD61). Il n'existe pas à ce jour de standardisation des panels d'anticorps utilisés mais un panel minimal permettant de satisfaire les critères OMS et EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) a été proposé (9,58,59).

3. Cytogénétique conventionnelle et FISH

Le caryotype est indispensable à la prise en charge des LAM et permet de détecter des anomalies cytogénétiques structurelles et numériques dans 70-80% des LAM de l'enfant. Certaines translocations cryptiques ou perte de matériel chromosomique peuvent être uniquement détectées par FISH.

Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes dans les LAM pédiatriques incluent les t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) (regroupées sous le terme de LAM-CBF : core binding factor), t(15;17)(q22;q21) et les réarrangements 11q23 impliquant le gène *KMT2A* (anciennement *MLL*, jusqu'à 25% des cas) et représentant ensemble 50% des LAM chez l'enfant, fréquence plus élevée que chez les adultes (60). Certaines anomalies sont prédominantes chez les enfants comme la t(1;22)(p13;q13)/*RBM15(OTT)-MKL1(MAL)*, en particulier dans les LAM7 du nouveau-né (61). D'autres anomalies cryptiques sont rapportés comme la (7;12)(q36;p13)/*ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)*, fréquemment associée à une trisomie 19 chez les enfants de moins de 18 mois (62), et la t(5;11)(q35;p15.5)/*NUP98-NSD1*, prédominant dans les LAM à caryotype normal (CN)(63). Les t(9;11)(p22;q23)/*KMT2A(MLL)-MLLT3(AF9)* forment une nouvelle entité dans la classification OMS qui recommandent l'identification des partenaires dans les translocations impliquant *KMT2A* (58).

En cas de caryotype non informatif, il est recommandé de rechercher par FISH les gènes de fusions suivants : *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA* et réarrangement de *KMT2A* (9). En cas de caryotype normal, la FISH *NUP98* est habituelle dans les LAM pédiatriques.

4. Biologie moléculaire

De nombreuses mutations géniques et expression aberrante de gènes sont décrites dans les LAM de l'enfant. Le modèle classique de leucémogénèse (ou « two-hit model ») résulte de l'acquisition de

mutations coopératrices d'au moins 2 classes (64) : les mutations de classe I entraînant un avantage prolifératif, comme les anomalies impliquant les tyrosine kinases, et les mutations de classe II induisant un blocage de la différenciation, comme les translocations impliquant le CBF. Les progrès techniques du séquençage à haut débit ont contribué à élargir le spectre des mutations en identifiant de nouvelles classes d'altération. Ainsi les mutations ou réarrangements identifiés dans les LAM peuvent être classés en 8 catégories fonctionnelles (65) :

- Les voies de signalisation avec l'exemple des mutations du gène *FLT3* conférant un avantage prolifératif via les voies RAS-RAF, JAK-STAT et PI3K-AKT.
- Les mutations de facteurs de transcription (comme *RUNX1*) ou réarrangements impliquant la fusion de facteurs de transcription (comme t(8;21)(q22;q22)) entraînant une dérégulation transcriptionnelle et un blocage de la différenciation hématopoïétique.
- Les mutations du gène *NPM1* (codant pour la nucléophosmine 1) entraînant une localisation cytoplasmique aberrante de la protéine.
- Les mutations des gènes du spliceosome (tels que *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* et *ZRSR2*) entraînant des anomalies d'épissage de l'ARN.
- Le complexe de la cohésine (avec les mutations des gènes *RAD21*, *STAG2*, *SMC1A*, *SMC3*) impliqué dans la ségrégation des chromosomes et la régulation transcriptionnelle.
- Les mutations de gènes tels que *ASXL1* et *EZH2* entraînant une dérégulation des modifications post-traductionnelles des histones et les fusions impliquant le gène *KMT2A* perturbant d'autres méthyltransférases comme *DOT1L*.
- La dérégulation de la méthylation de l'ADN avec les mutations de gènes tels que *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* et *IDH2*.
- Les suppresseurs de tumeurs (comme TP53) impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN.

Dans les LAM-CN, de nombreuses mutations comme *NPM1*, *FLT3*, *WT1* et *CEBPA* sont cliniquement importantes et devraient être incluses dans le diagnostic standard (66–69). Les mutations des gènes de la voie RAS et de *KIT* sont fréquentes, en particulier dans les LAM-CBF (70,71). Les mutations de gènes impliqués dans la méthylation tels que *TET2*, *IDH1/2* et *DNMT3A* sont fréquentes dans les LAM de l'adulte mais rares dans les LAM pédiatriques (72). A ce jour, de nombreux gènes impliqués dans d'autres catégories fonctionnelles (spliceosome, complexe de la cohésine...) sont décrits comme mutés de façon récurrente dans les LAM (65) mais sont uniquement évalués dans le cadre de la recherche lors d'essais cliniques.

La congélation de blastes primaires, d'ADN et d'ARN est pertinente dans le soin au patient puisque ce biobanking permet la confirmation d'analyses initiales ou la recherche de nouvelles anomalies (en

cas de rechute par exemple). Ce biobanking est également un pré-requis dans le cadre de la recherche translationnelle. Ce matériel congelé peut être utilisé pour identifier de nouveaux marqueurs pronostiques, valider une méthode de MRD (minimal residual disease) et permettre toute recherche expérimentale pertinente (9).

F. Classifications des LAM

1. Classification FAB

Etablie en 1976 par un groupe coopérateur franco-américano-britannique, la classification FAB repose sur des critères cytologiques et cytochimiques (56). Elle permet de distinguer huit entités (de M0 à M7) selon la lignée d'origine des blastes et le degré de maturation résiduelle :

- **LAM0** : LAM avec différenciation minimale (57)

>90% de blastes indifférenciés, MPO négative (<3%), phénotype myéloïde en CMF (MPO, CD13, CD33, CD117)

- **LAM1** : LAM sans maturation

>90% de blastes avec ou sans granulations, MPO positive

- **LAM2** : LAM avec maturation

>30% de blastes, différenciation granulocytaire >10% +/- signes de myélodysplasie, MPO positive

- **LAM3** : LA promyélocytaire

>30% de promyélocytes anormaux avec corps d'Auer en fagots, MPO positive

- **LAM4** : LA myélomonocytaire

>30% de blastes myéloïdes + >20% de monocytes dystrophiques dans la moelle osseuse (ou >5G/L monocytes dans le sang), MPO faiblement positive ou négative, estérases positives

LAM4 à éosinophiles anormaux (LAM4éo) : sous-entité avec excès médullaire d'éosinophiles anormaux

- **LAM5** : LA monoblastique

LAM5a : >80% de monoblastes, estérases positives

LAM5b : monoblastes et maturation monocyttaire (promonocytes, monocytes)

- **LAM6** : LA érythroïde

>30% de myéloblastes (parmi les éléments granulo-monocytaires) et >50% d'érythroblastes médullaires avec dysérythropoïèse, phénotype en CMF : CD36

- **LAM7** : LA mégacaryoblastique

Mégacaryoblastes/mégacaryocytes dystrophiques, myélofibrose, MPO négative et phénotype en CMF : CD41, CD61

Dans la classification FAB, la LAM était définie par une blastose médullaire supérieure à 30%.

2. Classification OMS

Les critères considérés par l'OMS dans cette classification des LAM incluent des données qui n'étaient pas prises en compte dans la classification FAB, telles que les anomalies cytogénétiques, la notion de myélodysplasie pré-existante ou les antécédents de chimiothérapie. Dans la classification OMS 2001, le seuil de la blastose médullaire définissant une LAM a été abaissé à 20% (73). La dernière édition, publiée en 2016, est résumée dans le tableau 1 (10).

Tableau 1: Classification OMS des LAM, édition 2016

LAM avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LAM avec inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LAP avec <i>PML-RARA</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entité provisoire: LAM avec <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec mutation <i>NPM1</i>
LAM avec mutation biallélique <i>CEBPA</i>
Entité provisoire: LAM avec mutation <i>RUNX1</i>
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie
LAM, sans autre spécification par ailleurs
LAM avec différenciation minimale
LAM sans maturation
LAM avec maturation
Leucémie aiguë myélomonocytaire
Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire
Leucémie érythroïde pure
Leucémie aiguë mégacaryoblastique
Leucémie aiguë à composante basophile
LA avec myélofibrose
Sarcome myéloïde
Proliférations myéloïdes liés au syndrome de Down
Prolifération myéloïde transitoire
Leucémies myéloïdes associées au syndrome de Down

Un grand nombre d'anomalies cytogénétiques récurrentes et équilibrées sont individualisées dans cette classification. Certaines anomalies plus rares sont couramment retrouvées dans les LAM de l'enfant (cf. Tableau 2) mais ne représentent pas de nouvelles catégories (10).

Tableau 2: Translocations chromosomiques avec prévalence plus élevée dans les LAM pédiatriques comparées aux LAM de l'adulte

Translocations	Fusions de gènes	Fréquence chez enf./adulte	Groupe d'âge	Commentaires/pronostic
t(1;22)(p13.3;q13.1)	<i>RBM15(OTT)-MKL1(MAL)</i>	0,8%/0%	Nourrissons	LAM7-FAB/intermédiaire
t(7;12)(q36.3;p13.2)	<i>MNX1-ETV6</i>	0,8%/<0,5%	Nourrissons	+19 comme anomalie secondaire/défavorable
t(8;16)(p11.2;p13.3)	<i>KAT6A-CREBBP</i>	0,5%/<0,5%	Nourrissons et enfants	rémission spontanée possible dans petite enfance; pronostic intermédiaire plus tard
t(6;9)(p23;q34.1)	<i>DEK-NUP214</i>	1,7%/1%	Enfants plus âgés; rares chez nourrissons	défavorable; 65% avec <i>FLT3-ITD</i>
11q23.3	<i>KMT2A (MLL)</i> réarrangé	25%/5-10%	Nourrissons 50%	pronostic dépendant du gène partenaire
t(9;11)(p21.3;q23.3)	<i>KMT2A-MLLT3</i>	9,5%/2%	Enfants	intermédiaire
t(10;11)(p12;q23.3)	<i>KMT2A-MLLT10</i>	3,5%/1%	Enfants	défavorable
t(6;11)(q27;q23.3)	<i>KMT2A-MLLT4</i>	2%/<0,5%	Enfants	défavorable
t(1;11)(q21;q23.3)	<i>KMT2A-MLLT11</i>	1%/<0,5%	Enfants	favorable
Translocations chromosomiques cryptiques				
t(5;11)(q35.3;p15.5)	<i>NUP98-NSD1</i>	7%/3%; 16% des patients <i>FLT3-ITD</i>	Enfants plus âgés et jeunes adultes	défavorable; 80% avec <i>FLT3-ITD</i> /associé à échec induction
inv(16)(p13.3q24.3)	<i>CBFA2T3-GLIS2</i>	3%/0%	10% des nourrissons, 20% des LAM7-FAB	défavorable
t(11;12)(p15.5;p13.5)	<i>NUP98-KDM5A</i>	3%/0%	enfants<5ans, 10% des LAM7-FAB	intermédiaire

G. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques les plus importants sont les anomalies génétiques et la réponse au traitement, avec des différences entre les LAM de l'adulte et de l'enfant. L'âge au diagnostic est un facteur pronostic indépendant chez les adultes et également chez les moins de 18 ans (74,75). Une hyperleucocytose au diagnostic est associée à un risque élevé de décès précoce et d'échec de réponse au traitement (76).

1. Cytogénétique

Comme pour les adultes, les LAM-CBF et t(15;17)(q22;q21) chez les enfants sont prédictives d'un pronostic favorable. La translocation t(1;11)(q21;q23)/*KMT2A-MLLT11(AF1Q)* a été décrite comme de bon pronostic mais le pronostic des différentes fusions impliquant *KMT2A (MLL)* reste hétérogène (77). Les anomalies cytogénétiques conférant un pronostic défavorable incluent la monosomie 7, t(6;11)(q27;q23)/*MLL-MLLT4(AF6)*, t(10;11)(p12;q23)/*MLL-MLLT10*, t(7;12)(q36;p13)/*ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)*, t(6;9)(p23;q34)/*DEK-NUP214*, t(5;11)(q35;p15.5)/*NUP98-NSD1* et les anomalies 12p. De plus, les anomalies défavorables décrites dans les LAM de l'adulte comme la délétion 5q, inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2)/*GATA2, MECOM* sont très rares chez les enfants (9). La présence d'un caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques, en excluant les translocations récurrentes) confère un pronostic très défavorable chez les adultes mais cela reste controversé chez les enfants (78,79). Les facteurs de risque intermédiaire sont les LAM-CN et les autres caryotypes. Les LAM-CN représentent un groupe très hétérogène et le pronostic des patients dépend fortement de la présence d'anomalies moléculaires additionnelles et/ou de translocations cryptiques. La valeur pronostique des autres anomalies cytogénétiques récurrentes plus rares reste à élucider.

2. Génétique moléculaire

Dans les LAM-CN, les mutations de *NPM1* et double-mutations de *CEBPA (CEBPA-dm)* sont de pronostic favorable (66,67). La présence d'une mutation *FLT3-ITD* (internal tandem duplication) avec un ratio muté/sauvage >0.4 a été décrit comme de mauvais pronostic (80). L'association avec une translocation cryptique comme *NUP98-NSD1* ou des mutations de *NPM1* ou *WT1* semble modifier l'impact pronostique de *FLT3-ITD* (63,81). Les mutations géniques impliquant d'autres gènes comme *KIT* ou *RUNX1* ont un impact pronostique qui reste à clarifier.

3. Réponse au traitement

La réponse au traitement d'induction est un facteur pronostique indépendant (76,82). La mesure de la MRD est recommandée pour tous les patients, notamment dans le cadre des essais cliniques qui l'utilisent pour la stratification du traitement. La maladie résiduelle est évaluable par différentes approches techniques : la cytologie (avec une sensibilité médiocre), la CMF et la quantification de transcrits de fusion ou expression de gènes par biologie moléculaire. La mesure de MRD par CMF, réalisable chez plus de 96% des enfants, semble un facteur pronostique indépendant et prédictif du risque de rechute (83). L'évaluation de la MRD par biologie moléculaire est limitée aux caractéristiques génétiques initiales (transcrit de fusion ou mutation de *NPM1* par exemple) mais montre de fortes spécificité et sensibilité (jusqu'à 10^{-5}). Ces techniques permettent l'identification précoce de rechutes mais nécessitent encore une standardisation entre laboratoires (84).

H. Principes de traitement des LAM pédiatriques

Dans la mesure du possible, les enfants atteints de LAM sont traités au sein d'essais cliniques contrôlés. Le traitement standard repose sur une chimiothérapie intensive à base d'anthracycline et de cytarabine (+ATRA : acide tout trans-rétinoïque dans les LAP) avec un minimum de 4 ou 5 cures. La cure d'induction standard comprend 3 jours d'anthracycline (daunorubicine à minimum 60mg/m², idarubicine 10-12mg/m² ou mitoxantrone 10-12mg/m²) et 7 jours de cytarabine (100-200mg/m²). Après une ou 2 cures d'induction, plus de 85% des enfants sont en rémission complète (RC). Dans la plupart des études pédiatriques, 3 cures de consolidation sont ensuite administrées. L'allogreffe de CSH en RC1 n'est pas recommandée dans les LAM pédiatriques avec facteur de risque favorable. Dans les autres groupes de risque, l'indication d'allogreffe en RC1 est encore discuté. En RC2, l'allogreffe de CSH est systématiquement proposé aux enfants éligibles. Même si une atteinte neuro-méningée n'est présente que dans 5 à 10% des LAM pédiatriques, une prophylaxie par chimiothérapie intrathécale est systématiquement proposée. Environ 30% des LAM pédiatriques vont rechuter dont la moitié de façon précoce *i.e.* dans l'année suivant le diagnostic. Une chimiothérapie de réinduction sera alors administrée suivie par une allogreffe de CSH. Le récent développement de nouvelles molécules, telles que les anticorps monoclonaux ou inhibiteurs de tyrosine kinase, nécessite encore des études ciblées sur la population pédiatrique (9).

Objectifs

Les LAM sont définies comme des hémopathies clonales liées à l'accumulation d'anomalies génétiques successives. Ces dernières années, la mise en place du séquençage haut-débit (NGS : next-generation sequencing) a permis l'identification de nouvelles mutations géniques confirmant l'hétérogénéité de ces pathologies (85). Les mutations et transcrits de fusion récurrents affectent un grand nombre de gènes aujourd'hui classés en 8 catégories fonctionnelles : voie de signalisation des tyrosine kinases, facteurs de transcription, suppresseurs de tumeurs, méthylation de l'ADN, modification de la chromatine, complexe de la cohésine, spliceosome et le gène *NPM1* (65). La plupart des études sont basées sur de larges cohortes de LAM de l'adulte (86,87) mais les profils génétiques sont bien différents entre les LAM de l'adulte et de l'enfant (88,89). De plus, malgré une amélioration de la prise en charge thérapeutique, les LAM pédiatriques présentent un taux de rechute d'environ 30% et une survie globale inférieure à 75% (90). Dans ce contexte, une meilleure description du profil des anomalies génétiques dans les LAM pédiatriques serait intéressante pour affiner le pronostic et améliorer le devenir de ces patients.

Ce travail décrit le profil moléculaire d'une large cohorte de LAM pédiatriques incluses dans le protocole clinique ELAM02 et propose une nouvelle classification pronostique moléculaire adaptée à ce groupe de patients.

Matériel et méthodes

A. Patients et protocole ELAM02

Le protocole ELAM02 est un essai clinique multicentrique de traitement des LAM de l'enfant et de l'adolescent avec étude randomisée d'un traitement d'entretien par interleukine 2 (IL2) [ClinicalTrials.gov NCT00149162]. Un total de 438 enfants et adolescents âgés de 0 à 18 ans ont été inclus entre mars 2005 et décembre 2011. L'objectif principal de ce protocole de recherche clinique est d'étudier l'intérêt d'un traitement d'entretien par IL2 de manière randomisée chez les patients non allogreffés, sur la survie sans rechute, en RC à l'issue du traitement par chimiothérapie d'induction/consolidation dans le cadre de la prise en charge habituelle des LAM. Un des objectifs secondaires est d'étudier les facteurs pronostiques biologiques. Les critères de non inclusion de cet essai étaient les LAP, LAM secondaires à un traitement antérieur et les trisomies 21 constitutionnelles (syndrome de Down). Le traitement dans le cadre du protocole ELAM02 était constitué de (cf. Figure 1) :

- Un traitement d'induction associant mitoxantrone ($12\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 5 jours) et aracytine (AraC $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 7 jours) avec une évaluation de la chimiosensibilité
- Une première cure de consolidation associant de l'AraC à hautes doses ($3\text{g}/\text{m}^2 \times 2/\text{j}$, 3 jours) et de l'amsacrine ($100\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 3 jours)
- Deux cures de consolidation associant AraC ($200\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 4 jours), étoposide ($100\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 4 jours) et daunorubicine ($40\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$, 4 jours) puis AraC ($3\text{g}/\text{m}^2 \times 2/\text{j}$ J1, J2, J8, J9) et L-asparaginase ($6000\text{U}/\text{m}^2/\text{j}$ J2, J9) pour les patients non allogreffés
- Une prophylaxie ou traitement neuroméningé par des injections intrathécales triples (+AraC à hautes doses).

Une allogreffe de moelle géno-identique était recommandée pour les patients ayant un donneur familial HLA identique à l'exclusion des patients du groupe de risque standard. Une allogreffe de moelle phéno-identique était indiquée pour les patients ayant des facteurs de très mauvais pronostic (groupe de risque élevé). Le protocole de recherche thérapeutique est un traitement d'entretien par IL2 pour la moitié des patients, en RC persistante à l'issue de l'ensemble de la chimiothérapie, selon un mode randomisé. L'IL2 était administrée en cures de 5 jours/mois avec une injection sous-cutanée/jour, pendant 1 an (12 cures au total). La RC était définie cytologiquement par un myélogramme de richesse normale avec une maturation normale des différentes lignées, un pourcentage de blastes $<5\%$ et un hémogramme normal.

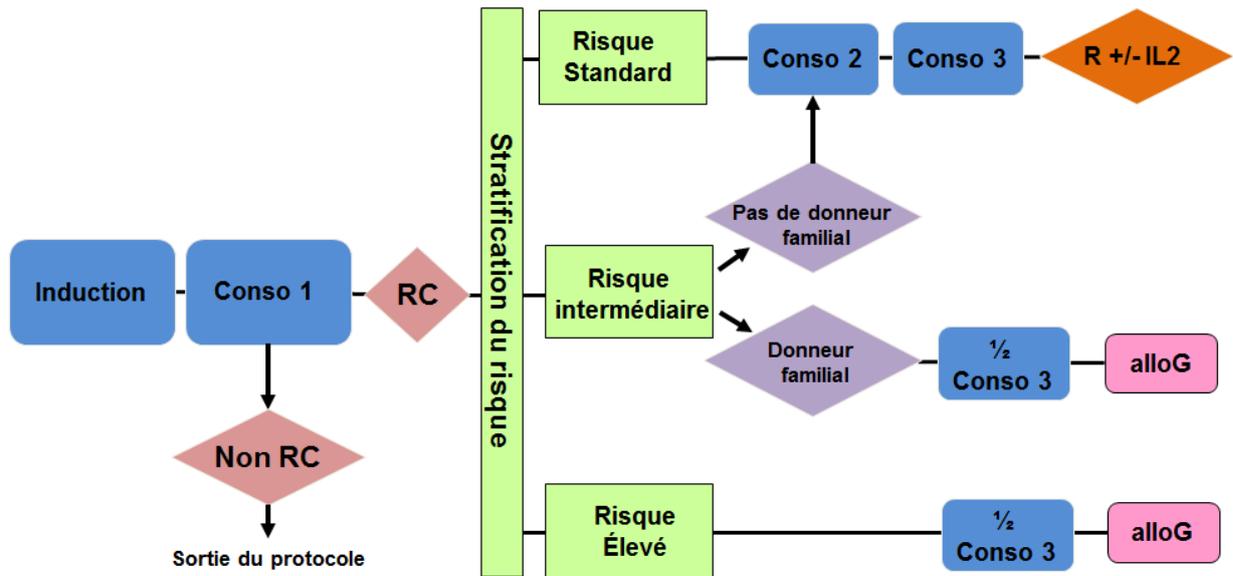


Figure 1: Schéma thérapeutique du protocole ELAM02

Le groupe de risque standard correspondait aux patients avec t(8 ;21) lors des recommandations initiales du protocole. Un amendement de juin 2010 a modifié ces recommandations en ajoutant les patients présentant les caractéristiques suivantes :

- t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16) et MRD post-consolidation 1 avec diminution supérieure à 3 log par rapport au diagnostic
- CN et mutation de *NPM1* sans *FLT3*-ITD
- CN et *CEBPA*-dm sans *FLT3*-ITD
- t(1;11)(q21 ;q23)
- t(9;11)(p21-22 ;q23) isolée et leucocytes < 50G/L au diagnostic et absence d'atteinte neuroméningée au diagnostic.

Le groupe de risque intermédiaire (indication de greffe intrafamiliale) comporte les patients qui ne correspondent ni au groupe de risque standard (pas d'indication de greffe en RC1) ni au groupe de risque élevé (indication de greffe non apparentée). Selon les recommandations initiales du protocole ELAM02, le groupe de risque élevé correspondait aux patients avec monosomie 7, anomalie 5q, t(9;22), t(6;9), leucémie secondaire à un SMD et les patients pauciblastiques (blastose < 30%) après les cures d'induction et consolidation 1. Après l'amendement de 2010 ont été ajoutés dans ce groupe les patients suivants :

- t(10;11)(p12;q23)
- inv(3)(q21q26) ou t(3;3)(q21;q26)

- caryotype complexe (défini par un minimum de 3 anomalies avec au moins une anomalie de structure en excluant les LAM CBF et les anomalies de *MLL*)
- absence de RC après consolidation 1, si une RC est obtenue ultérieurement
- présence de *FLT3*-ITD avec un ratio muté/sauvage > 0.4

Le présent travail a étudié 385 patients inclus dans le protocole ELAM02. La sélection des patients est basée sur la disponibilité d'ADN génomique suffisant au moment du diagnostic de la LAM.

B. Cytogénétique et détection des transcrits de fusion

Les analyses cytogénétiques étaient réalisées localement sur prélèvement de moelle osseuse en utilisant les bandes R- ou G-. Les résultats ont été revus de façon centralisée et décrits selon l'ISHCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Les caryotypes ont été regroupés comme suit :

- CBF réarrangé *i.e.* inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) et t(8;21)(q22;q22)
- *KMT2A (MLL)* réarrangé
- Caryotype normal (CN)
- Défavorables *i.e.* monosomie 7, t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) et caryotype complexe
- Autres anomalies cytogénétiques

D'autre part, tous les échantillons au diagnostic ont été analysés par une technique de LD-RTPCR (ligation-dependent reverse-transcriptase PCR, cf. Figure 2)(91). Après rétrotranscription, l'échantillon de cDNA est incubé avec le mélange d'amorces. En cas de présence d'un transcrit de fusion, les 2 sondes impliquées s'hybrident au niveau de la jonction aberrante du cDNA. L'étape de ligation permet la création d'une liaison covalente entre les 2 sondes puis une amplification par PCR est réalisée grâce aux amorces universelles U1 et U2. Le transcrit de fusion est ensuite identifié par pyroséquençage.

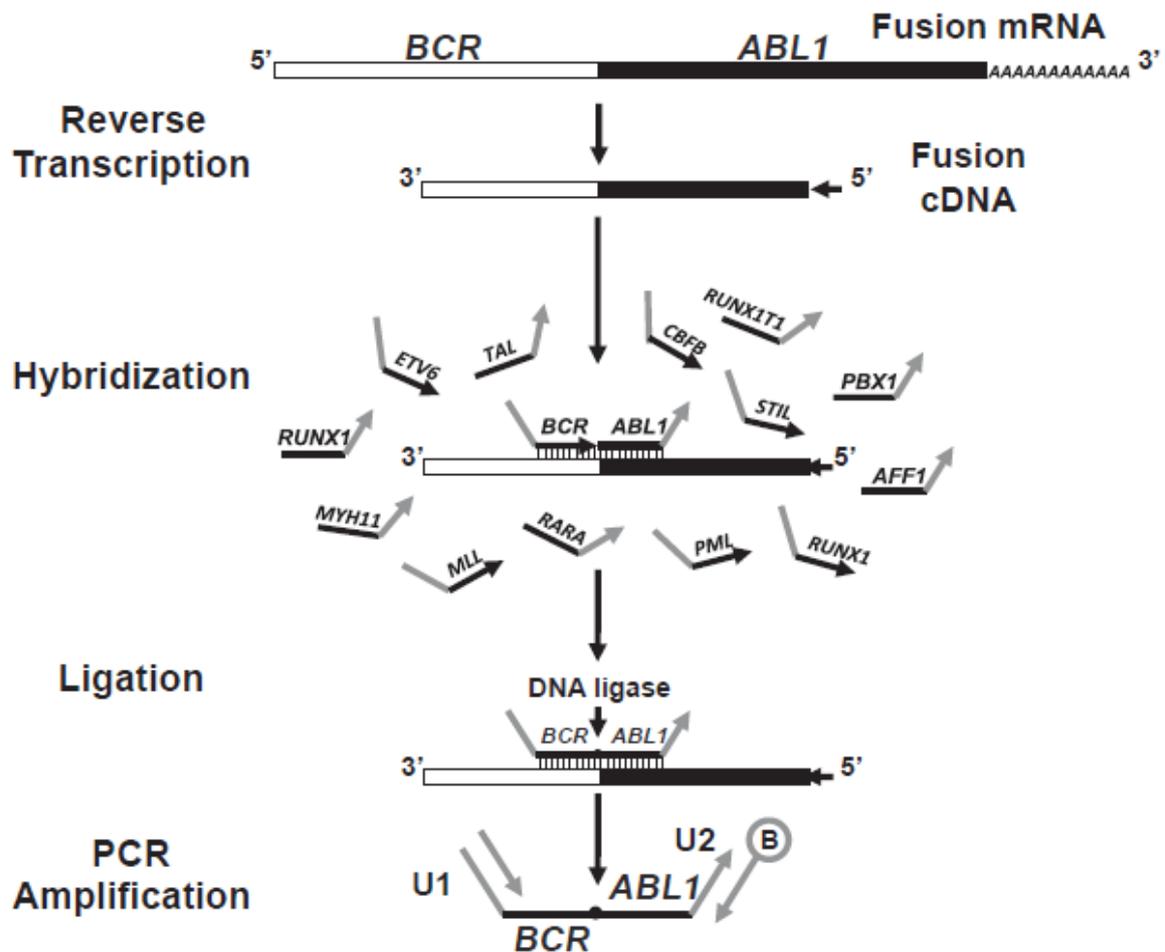


Figure 2: Principe de la technique de LD-RT-PCR (91)

Le mix oligonucléotidique utilisé comporte 240 amorces permettant la détection de plus de 50 réarrangements géniques récurrents ainsi que la duplication partielle en tandem de *KMT2A* (*KMT2A-PTD*)(cf. Figure 3).

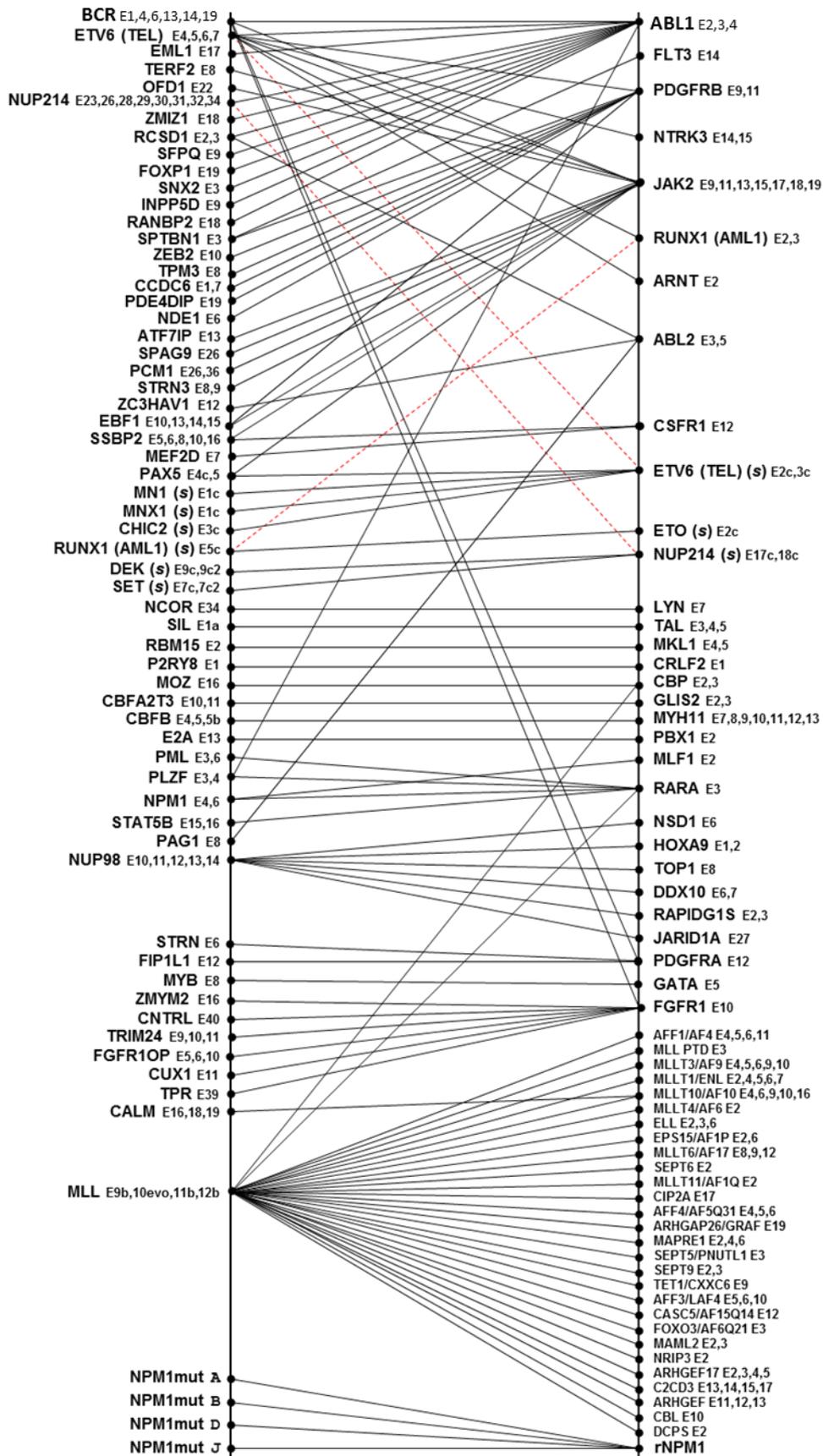


Figure 3: Design des transcrits de fusion recherchés

C. Analyses mutationnelles par NGS

Les ADN génomiques extraits de moelle osseuse au diagnostic ont été séquencés pour 36 gènes mutés de façon récurrente dans les hémopathies myéloïdes. Le panel étudié inclut les gènes suivants :

- Voie de signalisation des tyrosine kinases (TK) : *CBL* (exons 8-9), *FLT3* (exon 20), *JAK2* (exons 12, 14, 16), *KIT* (exons 8-13, 17), *KRAS* (exons 2-3), *MPL* (exon 10), *NRAS* (exons 2-3), *PTPN11* (exons 3, 13), *SETBP1* (exon 4)
- Facteurs de transcription : *CEBPA* (exon 1), *ETV6* (exons 1-8), *GATA1* (exon 2), *GATA2* (exons 2-6), *RUNX1* (exons 1-6)
- Suppresseurs de tumeur : *PHF6* (exons 2-10), *PTEN* (exons 5-7), *TP53* (exons 2-11), *WT1* (exons 7, 9)
- Modificateurs de la chromatine : *ASXL1* (exons 11-12), *BCOR* (exons 2-15), *BCORL1* (exons 1-12), *EZH2* (exons 2-20)
- Méthylation de l'ADN : *DNMT3A* (exons 2-23), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *TET2* (exons 3-11)
- Complexe de la cohésine : *NIPBL* (exons 2-47), *RAD21* (exons 2-14), *SMC1A* (exons 1-25), *SMC3* (exons 1-29), *STAG2* (exons 3-35)
- Complexe d'épissage : *SF3B1* (exons 13-18), *SRSF2* (exon 1), *U2AF1* (exons 2, 6), *ZRSR2* (exons 1-11)
- *NPM1* (exon 11)

Deux technologies de NGS ont été utilisées permettant une validation croisée de l'ensemble des variants détectés. Dans un premier temps, la construction des bibliothèques a été effectuée par PCR multiplex grâce au système Ampliseq (Thermofisher)(cf. Figure 4).

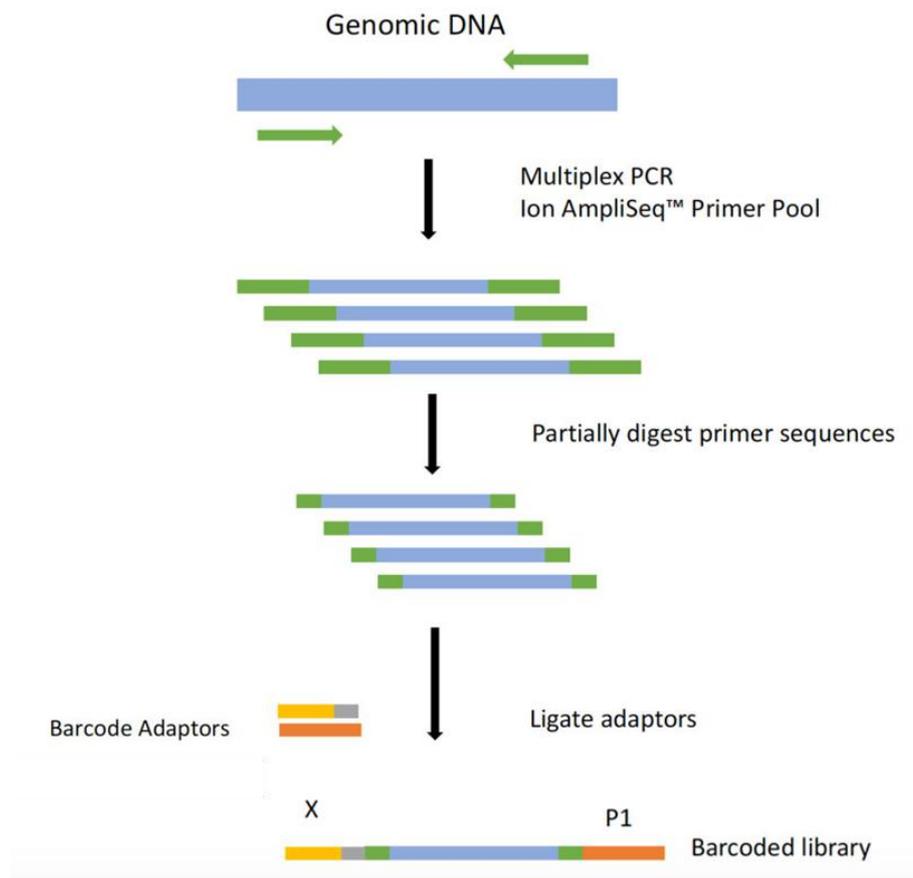


Figure 4: Préparation de la librairie selon le système Ampliseq

Après PCR en émulsion et enrichissement, le séquençage a été réalisé sur Ion Proton (Thermofisher) utilisant une chimie de séquençage par synthèse avec détection du signal non optique (variation de pH). Les données brutes sont ensuite analysées avec la suite d'outils Torrent Browser et avec le logiciel d'analyse SeqNext (JSI medical system). Dans un second temps, les librairies ont également été préparées selon le système d'enrichissement ciblé Haloplex (Agilent technologies)(cf. Figure 5).

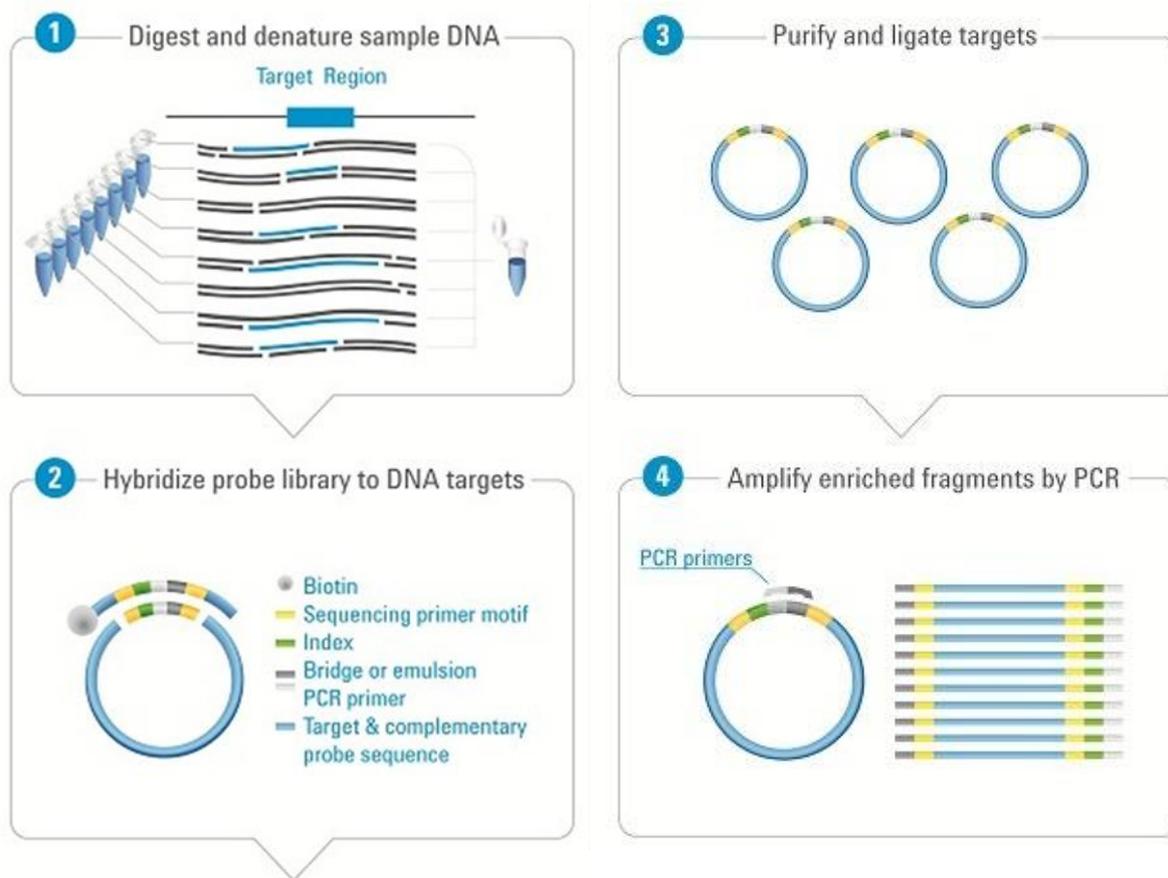


Figure 5: Préparation de la librairie selon le système Haloplex

Après amplification par bridge PCR, le séquençage de la librairie a été réalisée sur MiSeq (Illumina) utilisant une chimie de séquençage par synthèse avec détection optique du signal par des nucléotides marqués. Les données brutes ont été analysées avec SureCall (Agilent technologies) et avec le logiciel d'analyse SeqNext. Une importante profondeur de couverture (>1500x) a été obtenue pour l'ensemble des gènes analysés avec les deux technologies de NGS, ce que a permis la détection de variants avec une VAF (variant allele frequency) jusqu'à 1%. Les variants non-sens et insertions/délétions frameshift (entraînant un décalage du cadre de lecture) ont tous été considérés comme mutations relevantes. Les variations faux-sens ont été retenues en l'absence de description dans les bases de données publiques de polymorphismes (SNP : single nucleotide polymorphism) et les effets fonctionnels sur la protéine ont été prédits par un ensemble de 6 outils de prédiction (92). La présence de *FLT3*-ITD a été recherchée pour tous les patients par analyse de fragments (93).

D. Analyses statistiques

La survie sans événement (EFS : event-free survival) et la survie globale (OS : overall survival) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées au modèle de Cox. L'EFS est mesurée à partir de la date de diagnostic de la LAM jusqu'à la date de survenue d'un premier événement (échec

d'induction, rechute ou décès) ou jusqu'à la date des dernières nouvelles. Les patients n'ayant pas obtenus de RC étaient considérés en échec à J60. L'OS est calculée à partir de la date de diagnostic de la LAM jusqu'à la date de décès quelle que soit la cause ou jusqu'à la date des dernières nouvelles. Les données ont été analysées et comparées sans censure à la greffe pour les patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH en RC. Les comparaisons entre sous-groupes de patients ont été réalisées par le test de Mann-Whitney pour les variables continues et par le test exact de Fisher ou Chi-deux pour les variables qualitatives. Les hazard ratios (HR) sont donnés avec un intervalle de confiance (IC) de 95%. Les analyses multivariées estimant l'effet indépendant des covariables ont été réalisées en utilisant le modèle à risques proportionnels de Cox. Les variables associées à une P-value <0.10 dans l'analyse univariée ou décrites comme facteurs validés ont été inclus dans le modèle multivarié ; puis une sélection pas à pas (stepwise regression) a été réalisée. Tous les tests ont été réalisés de façon bilatérale et les P-values <0.05 ont été définies comme statistiquement significatives. Les analyses ont été réalisées sur les logiciels SPSS 22.0 (IBM analytics) et R version 3.2.3 (R Development Core Team).

Résultats

A. Caractéristiques des patients au diagnostic

Parmi les 385 patients analysés dans ce travail, 210 étaient des garçons (54.5%) et 175 des filles (45.5%). L'âge médian au diagnostic de la LAM était de 8.6 ans (0-18) et la leucocytose initiale médiane était de 16.6 G/L (0.40-575). La cohorte étudiée (n=385) n'était pas différente de la cohorte totale (n=438) du protocole ELAM02 (cf. Tableau 3).

Tableau 3: Caractéristiques des patients au diagnostic de LAM (cohorte totale ELAM02 vs. cohorte étudiée)

Caractéristiques	Nombre de patients (%) Protocole ELAM02 (n=438)	Nombre de patients (%) Cohorte étudiée (n=385)
Sexe		
M	238 (54.3)	210 (54.5)
F	200 (45.7)	175 (45.5)
Age médian, années (min-max)	8.2 (0-18)	8.6 (0-18)
Leucocytose médiane, G/L (min-max)	15.4 (0.40-575)	16.6 (0.40-575)
Cytogénétique		
CBF-réarrangé	97 (22.1)	92 (23.9)
inv(16)/t(16;16)	36 (8.2)	35 (9.1)
t(8;21)	61 (13.9)	57 (14.8)
<i>KMT2A (MLL)</i> -réarrangé	95 (21.7)	79 (20.5)
t(9;11)	40 (9.1)	36 (9.4)
non t(9;11)	55 (12.6)	43 (11.1)
Caryotype normal	109 (24.9)	101 (26.2)
Autres	77 (17.6)	73 (19)
Défavorable	55 (12.5)	40 (10.4)
caryotype complexe	39 (8.9)	27 (7)
monosomie 7	11 (2.5)	9 (2.3)
t(6;9)	5 (1.1)	4 (1)
Rémission	398 (90.9)	350 (90.9)
EFS, 3 ans	56% (49.7-63.6)	58.9% (54-63.9)
OS, 3 ans	71.5% (65-78)	76.1% (71.8-80.4)

La distribution des LAM au diagnostic pour la classification FAB était la suivante : 24 LAM0, 62 LAM1, 90 LAM2, 48 LAM4, 31 LAM4éo, 86 LAM5, 11 LAM6, 19 LAM7 et 14 LAM inclassables (cf. Figure 6).

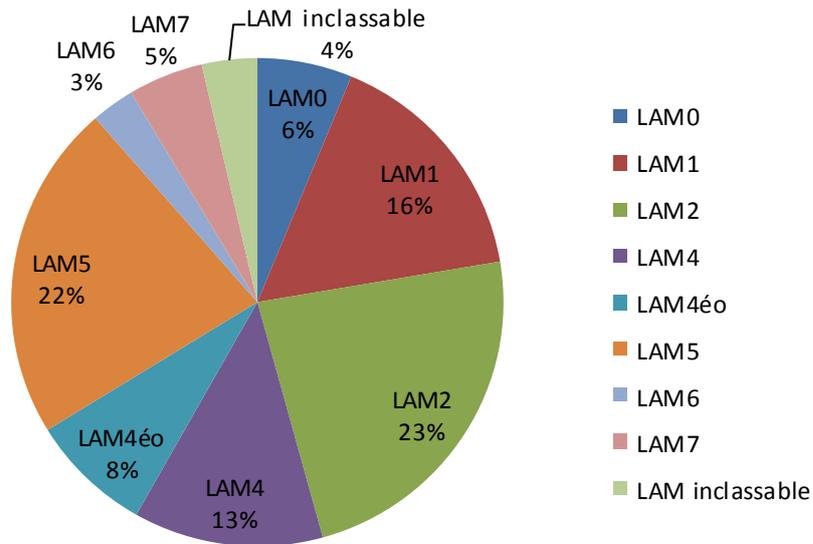


Figure 6: Répartition des LAM au diagnostic selon la classification FAB (n=385)

La distribution des groupes cytogénétiques était la suivante : CN (n=101, 26.2%), CBF réarrangé (n=92, 24% dont 57 t(8;21) et 35 inv(16)/t(16;16)), *KMT2A* (*MLL*) réarrangé (n=79, 21%), défavorable (n=40, 10% dont 27 caryotypes complexes, 9 monosomies 7 et 4 t(6;9)) et autres anomalies cytogénétiques (n=73, 19%)(cf. Tableau 3 et Figure 7). Aucune inv(3)/t(3;3) n'a été identifiée dans cette étude.

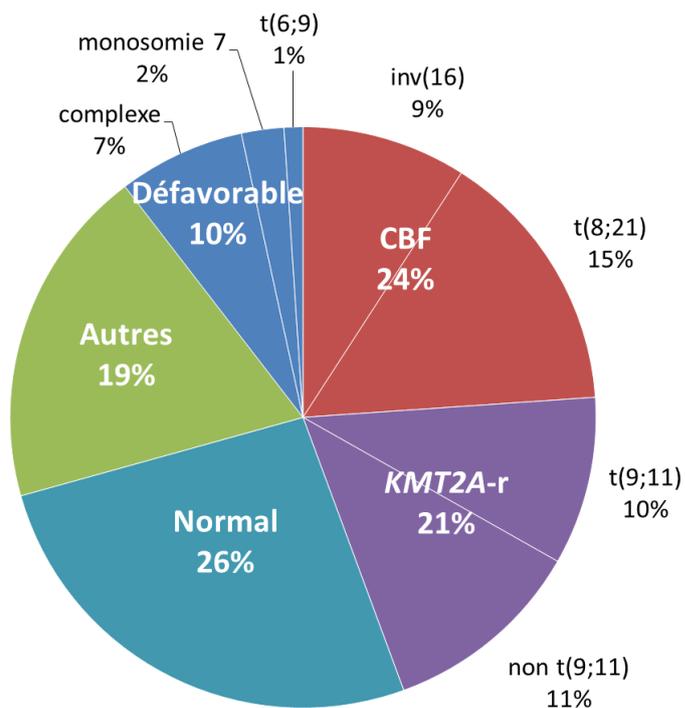


Figure 7: Distribution des groupes cytogénétiques dans la cohorte étudiée (n=385)

La répartition cytogénétique était significativement corrélée avec l'âge des patients au diagnostic : les enfants plus jeunes présentant plus de réarrangements de *KMT2A* tandis que la fréquence des LAM CBF et LAM à CN augmente avec l'âge (cf. Figure 8).

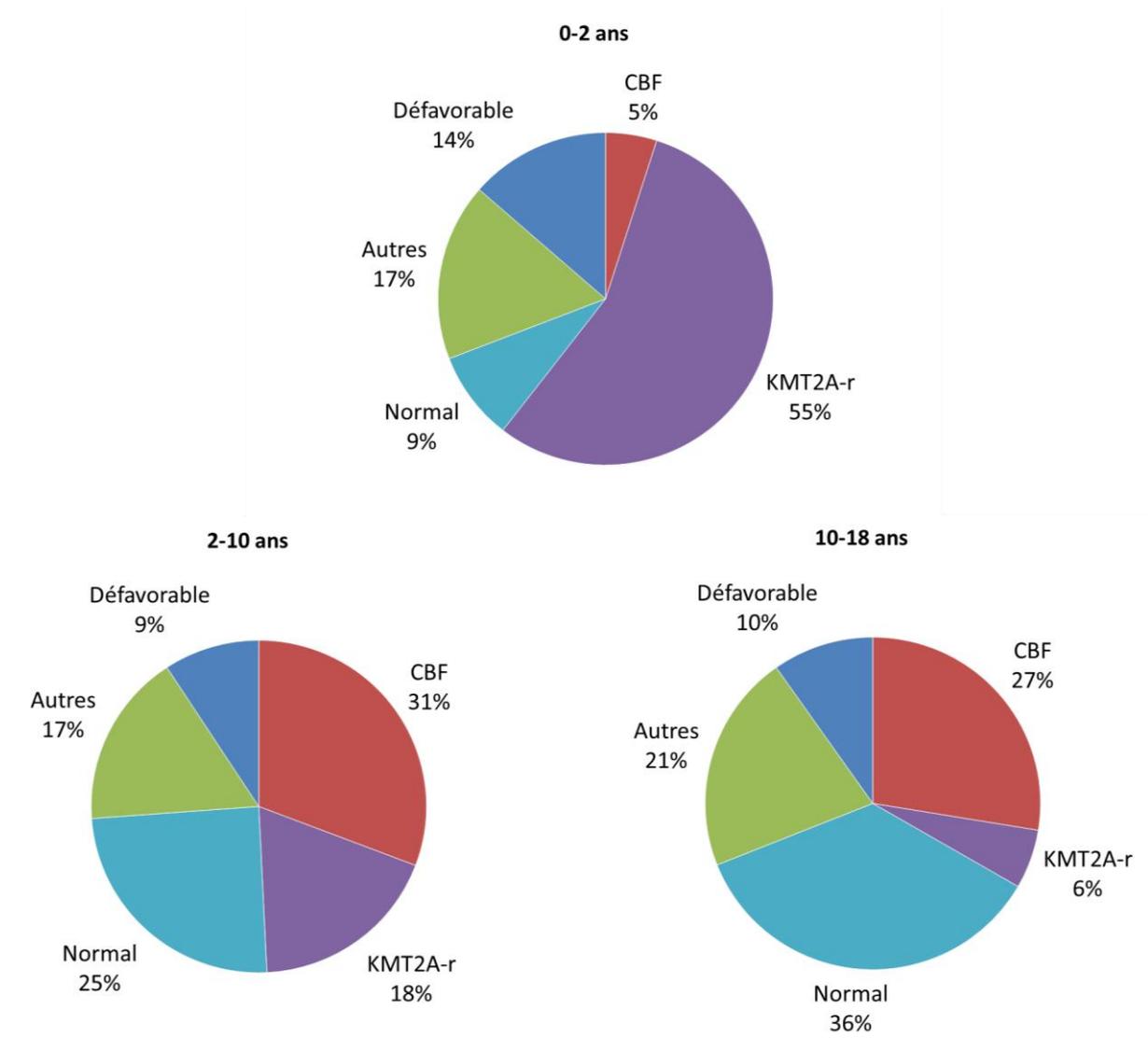
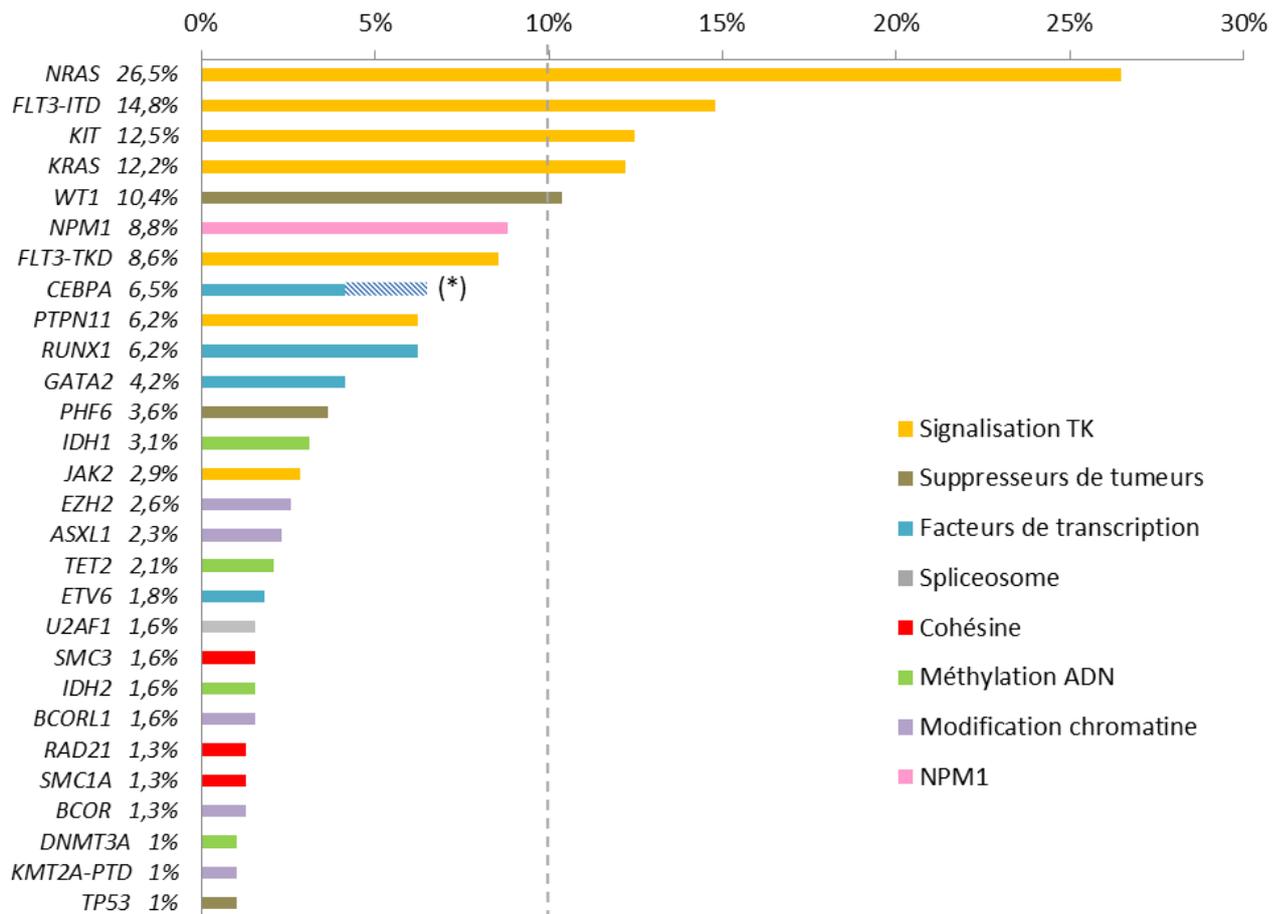


Figure 8: Distribution des groupes cytogénétiques en fonction de la classe d'âge

B. Profil moléculaire des LAM pédiatriques

1. Mutations géniques

Les analyses moléculaires par NGS ont permis l'identification de 579 mutations parmi 35 gènes différents. Un total de 28 gènes étaient mutés chez plus de 1% de la cohorte étudiée avec seulement 5 gènes (*NRAS*, *FLT3*, *KIT*, *KRAS* et *WT1*) mutés chez plus de 10% des patients (cf. Figure 9).



* dont 4.2% et 2.3% de mutations bialléliques et monoalléliques de CEBPA, respectivement

Figure 9: Fréquence des gènes mutés (>1%) dans la cohorte de LAM pédiatriques

La classe fonctionnelle impliquant les gènes les plus fréquemment mutés est la voie de signalisation des TK (61% de la cohorte étudiée) suivie par les facteurs de transcription (16%), supresseurs de tumeurs (14%), modificateurs de la chromatine (9%), méthylation de l'ADN (8%), cohésine (5%) et spliceosome (3%). Au total, 76% des patients (292/385) présentaient au moins une mutation parmi les gènes analysés. Le nombre moyen de gènes mutés étaient de 1.5 par patient (de 0 à 5) avec un nombre plus important de gènes mutés dans les LAM à CN (moyenne 2.2, de 0 à 5) et un nombre plus faible de gènes mutés en cas de réarrangements de *KMT2A* (moyenne 0.7, de 0 à 3)(cf. Figure 10).

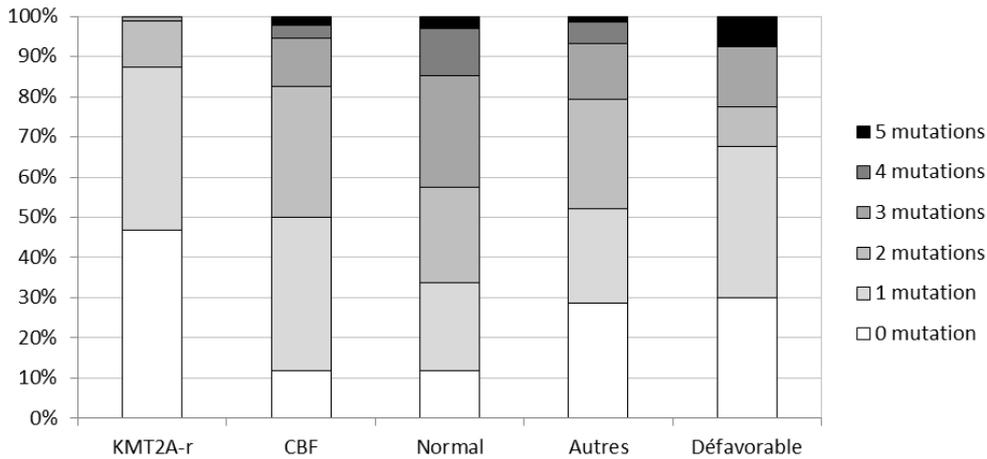


Figure 10: Nombre de gènes mutés en fonction du groupe cytogénétique

Le nombre moyen de gènes mutés augmente avec l'âge (moyennes de 0.7, 1.5 et 1.9 pour les 0-2 ans, 2-10 ans et 10-18 ans respectivement, $P < 0.001$), principalement dû à la distribution différente des groupes cytogénétiques (cf. Figure 11).

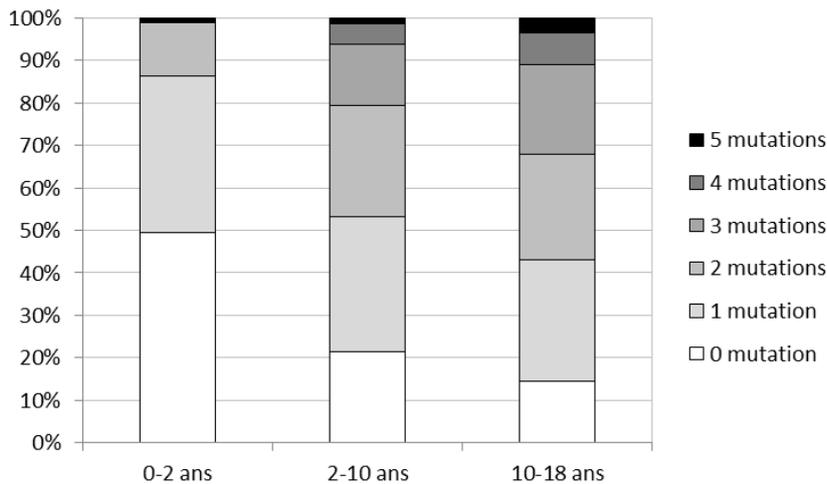


Figure 11: Nombre de gènes mutés en fonction de la classe d'âge

2. Transcrits de fusion

La technique de LD-RT-PCR a permis l'identification de 191 transcrits de fusion (représentant 23 fusions géniques différentes) au sein des 385 LAM pédiatriques étudiées. Les transcrits de fusion les plus fréquemment détectés étaient *RUNX1-RUNX1T1* (15%), *KMT2A-MLLT3* (9%) et *CBFB-MYH11* (9%). Tous les autres transcrits de fusion étaient retrouvés chez moins de 5% des patients (cf. Tableau 4). Le gène *KMT2A* était réarrangé dans 79 LAM (21%) avec 13 partenaires différents dont *MLLT3* (*AF9*) est le plus fréquent ($n=36$, 46% des LAM réarrangés pour *KMT2A*) suivi par *MLLT10* (*AF10*) ($n=13$, 16%), *ELL* ($n=6$, 8%), *MLLT1* (*ENL*) ($n=5$, 6%) et *MLLT4* (*AF6*) ($n=5$, 6%). Seulement 3

patients avec un réarrangement de *KMT2A* (détecté par FISH) n'ont pas eu de partenaire identifié. La fusion cryptique *NUP98-NSD1* a été retrouvée chez 9 patients (2.3% de la cohorte globale) dont 5 avaient un CN.

Tableau 4: Transcrits de fusion identifiés par LD-RTPCR

Transcrits de fusion	Anomalie cytogénétique correspondante	Nombre de patients positifs (%)
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	t(8;21)(q22;q22)	57 (14.8%)
<i>KMT2A-MLLT3</i>	t(9;11)(p22;q23)	36 (9.4%)
<i>CBFB-MYH11</i>	inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22)	35 (9.1%)
<i>KMT2A-MLLT10</i>	t(10;11)(p12;q23)	13 (3.4%)
<i>NUP98-NSD1</i>	t(5;11)(q35;p15.5)	9 (2.3%)
<i>KMT2A-ELL</i>	t(11;19)(q23;p13.1)	6 (1.6%)
<i>KMT2A-MLLT1</i>	t(11;19)(q23;p13.3)	5 (1.3%)
<i>KMT2A-MLLT4</i>	t(6;11)(q27;q23)	5 (1.3%)
<i>PICALM-MLLT10</i>	t(10;11)(p13;q21)	5 (1.3%)
<i>DEK-NUP214</i>	t(6;9)(p22;q34)	4 (1.0%)
<i>KMT2A-MLLT11</i>	t(1;11)(q21;q23)	3 (0.8%)
<i>KMT2A-SEPT6</i>	t(X;11)(q24;q23)	2 (0.5%)
<i>KAT6A-CREBBP</i>	t(8;16)(p11;p13)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-ABI1</i>	t(10;11)(p12;q23)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-ADARB2</i>	t(10;11)(p15.3;q23)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-EPS15</i>	t(1;11)(p32;q23)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-KIAA1524</i>	t(3;11)(q13.3;q23)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-PICALM</i>	t(11;11)(q14;q23)	1 (0.3%)
<i>KMT2A-SEPT5</i>	t(11;22)(q23;q11.2)	1 (0.3%)
<i>MN1-ETV6</i>	t(12;22)(p13;q12)	1 (0.3%)
<i>MYB-GATA1</i>	t(X;6)(p11;q23)	1 (0.3%)
<i>NUP98-JARID1A</i>	t(11;12)(p15;p13)	1 (0.3%)
<i>RBM15-MKL1</i>	t(1;22)(p13;q13)	1 (0.3%)

3. Profil moléculaire du protocole ELAM02

Un total de 9 gènes mutés et 3 transcrits de fusion différents ont été chacun identifiés chez plus de 5% de la cohorte étudiée. Comme précédemment décrit, les gènes les plus mutés appartiennent à la voie de signalisation des TK (*N/KRAS*, *FLT3*, *KIT*, *PTPN11*), suivis par les mutations de *WT1* (10%), *NPM1* (9%), *CEBPA* (6.5%) et *RUNX1* (6%). Les transcrits de fusion récurrents les plus décrits sont les fusions impliquant le CBF et le gène *KMT2A* (cf. Figure 12).

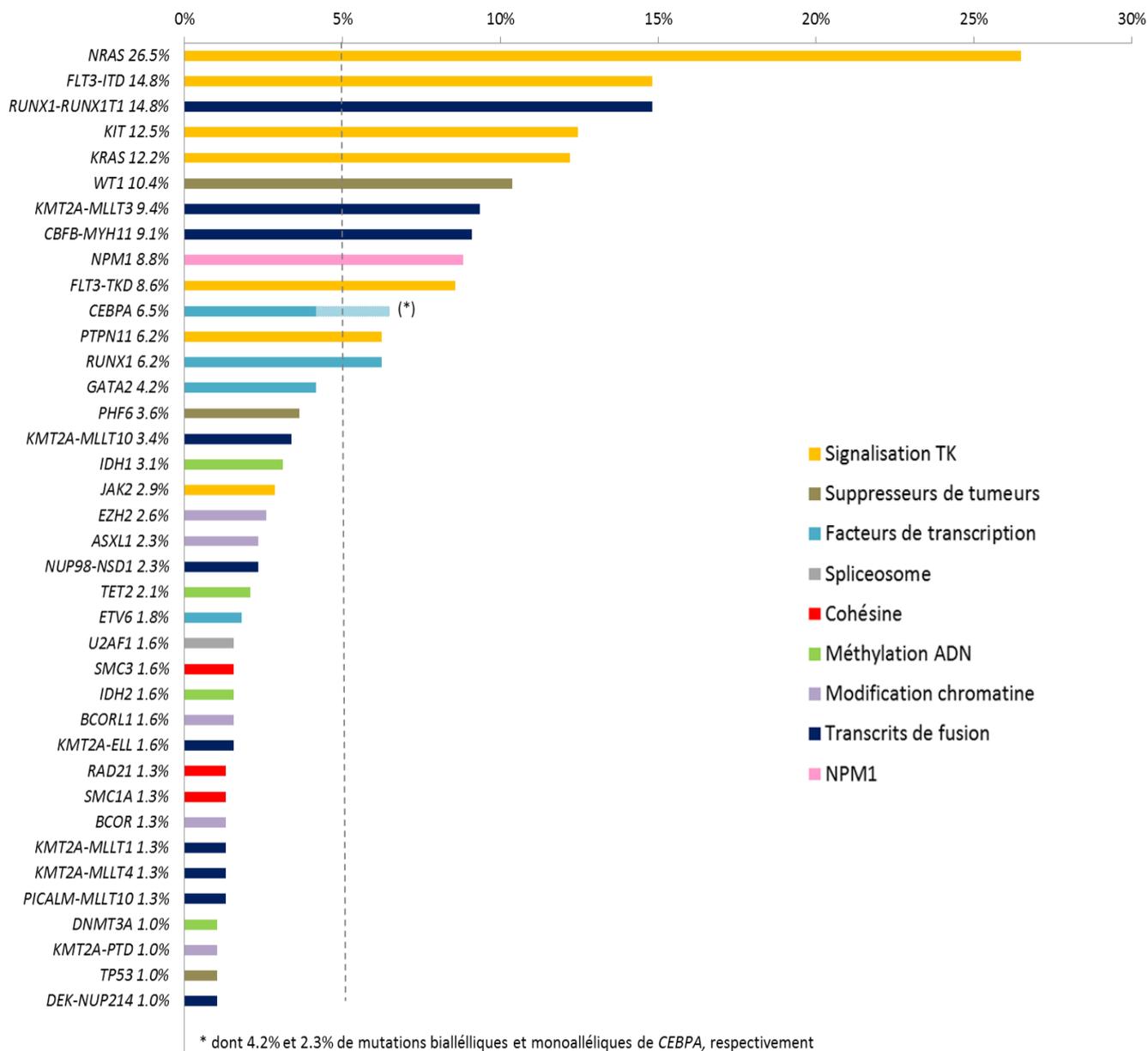


Figure 12: Fréquence des anomalies moléculaires dans le protocole ELAM02

Au total, les différentes analyses moléculaires ont permis d'identifier au moins une anomalie moléculaire (mutation ou transcrite de fusion) chez 344 patients parmi les 385 étudiés (89%). Les 41 patients restants présentaient les caractéristiques cytogénétiques suivantes : CN (n=12), caryotype complexe (n=9), monosomie 7 (n=2) et autres anomalies cytogénétiques (n=18).

C. Association du profil moléculaire avec les anomalies cytogénétiques des LAM pédiatriques

Les figures 13 et 14 décrivent la coexistence des différentes mutations géniques au sein des différents groupes cytogénétiques.

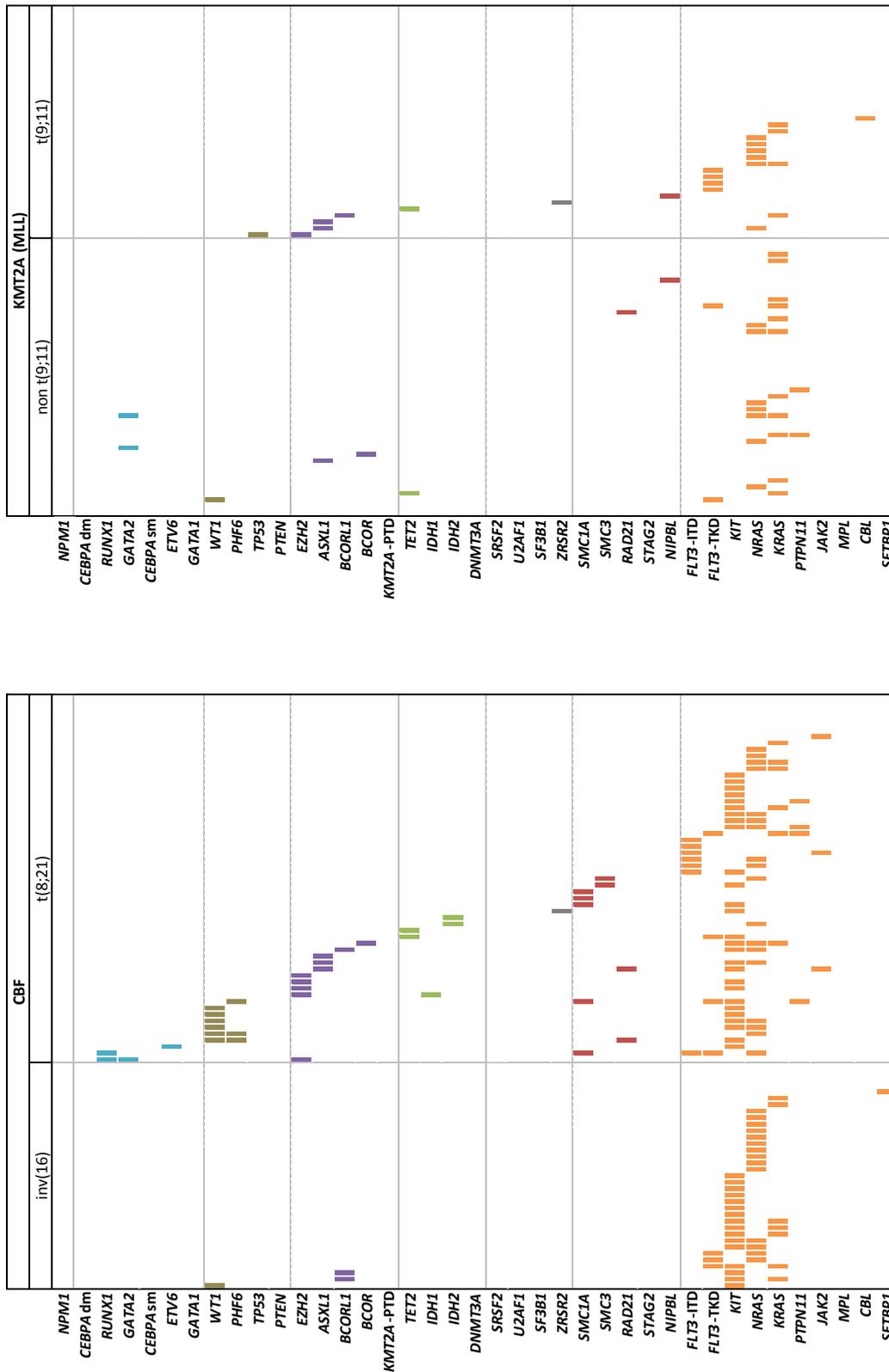
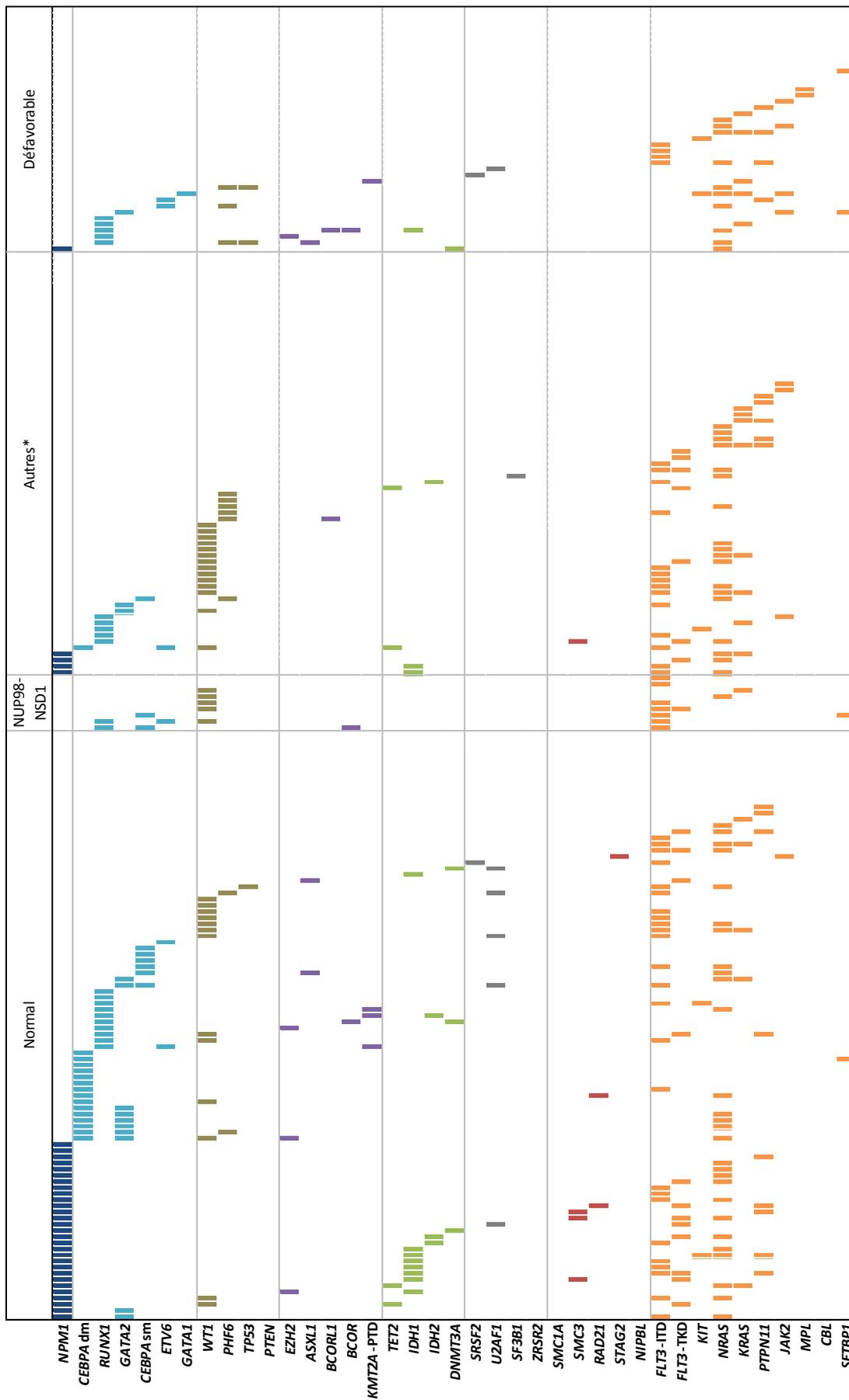


Figure 13: Profil génomique des LAM pédiatriques à CBF et *KMT2A* réarrangés

Chaque colonne représente le profil mutationnel d'un patient et chaque barre colorée représente une mutation. La première ligne représente le groupe cytogénétique de chaque patient. Les gènes sont regroupés en 8 catégories :

- NPM1
- Méthylation ADN
- Suppresseurs de tumeur
- Cohésine
- Facteurs de transcription
- Spliceosome
- Modification chromatine
- Signalisation TK



* Caryotypes anormaux excluant t(8;21), inv(16)/t(16;16), réarrangements de KMT2A et caryotypes défavorables

Figure 14: Profil génomique des LAM pédiatriques à caryotype normal, défavorable et autres

Les patients avec transcrite *NUP98-NSD1* sont répartis au sein des CN (n=5) et caryotype anormal autre (n=4).

Les mutations de *NPM1*, *FLT3*-ITD et *CEBPA*-dm sont associées aux caryotypes normaux ($P < 0.001$ pour chaque comparaison) tandis que les mutations de *WT1* sont liées au groupe des autres anomalies cytogénétiques ($P < 0.001$). Les réarrangements du CBF sont étroitement associés aux mutations de *KIT* ($P < 0.001$), *RAS* ($P = 0.012$) et de la cohésine ($P = 0.024$). Les mutations impliquant les régulateurs de l'épigénétique et de la cohésine sont restreints aux patients avec t(8 ;21) alors qu'elles sont quasiment absentes dans les inv(16)/t(16 ;16)(cf. Figure 13). D'autre part, aucune association mutationnelle n'a été retrouvée dans les caryotypes défavorables et les réarrangements de *KMT2A* (cf. Figure 15).

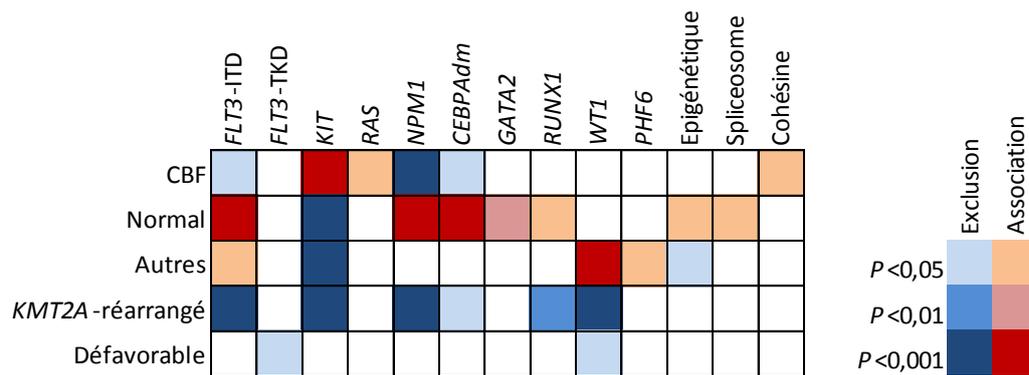


Figure 15: Association entre les mutations et les différents groupes cytogénétiques

La significativité statistique a été calculée par le test exact de Fisher avec ajustement par la méthode de Benjamini-Hochberg.

L'étude de la co-occurrence des mutations montre que les mutations de *NPM1* sont fortement associées avec *FLT3*-ITD ($P = 0.009$), *FLT3*-TKD (tyrosin kinase domain, $P = 0.001$) et les mutations de l'épigénétique ($P < 0.001$). Les mutations de *GATA2* sont significativement liées aux mutations de *CEBPA*-dm ($P < 0.001$) et les mutations de *WT1* sont associées aux *FLT3*-ITD ($P < 0.001$). Les mutations de *RUNX1* sont liées aux mutations de l'épigénétique ($P < 0.001$). Considérant les fusions *NUP98-NSD1* comme une seule entité, une forte association est retrouvée avec les mutations *FLT3*-ITD ($P < 0.001$) et *WT1* ($P = 0.002$)(cf. Figure 16).

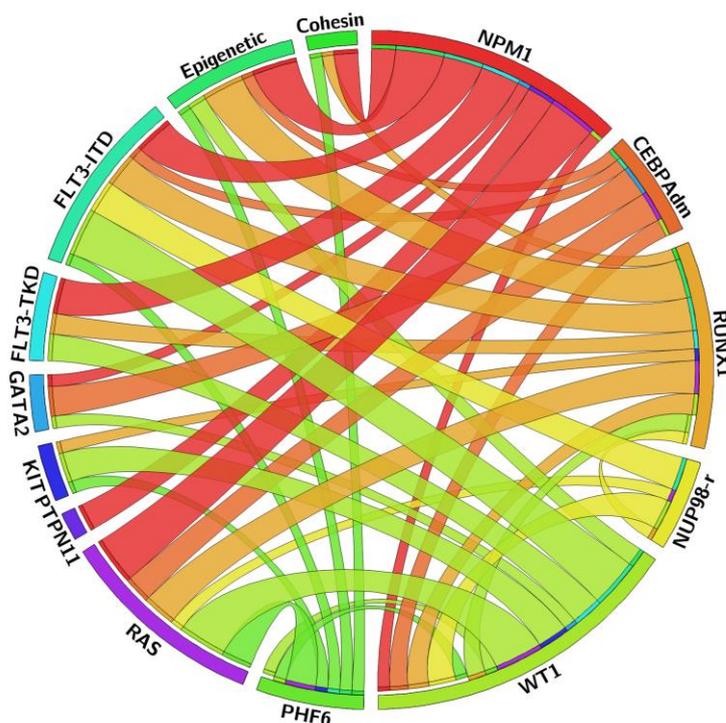


Figure 16: Circos plot illustrant la coexistence des anomalies moléculaires des LAM pédiatriques

D. Impact des anomalies moléculaires sur l'obtention d'une rémission complète

Parmi les 385 patients inclus dans cette étude, 350 (91%) ont obtenu une RC après deux cures de chimiothérapie intensive. En analyse univariée, une leucocytose initiale >30G/L, le groupe des autres anomalies cytogénétiques, les fusions de *NUP98*, les mutations de *FLT3-ITD* et *WT1* sont associés à des échecs d'induction plus fréquents (cf. Tableau 5).

Tableau 5: Caractéristiques des patients en fonction de l'obtention d'une rémission complète après deux cures de chimiothérapie intensive

Caractéristiques	Nombre de patients	RC	non RC	P
Sexe (M/F)	210/175	187/163	23/12	0.164
Leucocytose>30G/L	148	128	20	0.017*
Cytogénétique				0.028*
CBF	92	88	4	0.094
<i>KMT2A</i> -réarrangé	79	76	3	0.079
Normal	101	90	11	0.545
Autres	73	61	12	0.023*
Défavorable	40	35	5	0.389
Fusions <i>NUP98</i>	10	5	5	0.001*
Mutations géniques				
Signalisation TK	236	213	23	0.792
<i>FLT3-ITD</i>	57	46	11	0.004*
<i>FLT3-TKD</i>	33	31	2	0.754
<i>KIT</i>	48	46	2	0.286

<i>NRAS</i>	102	94	8	0.609
<i>KRAS</i>	47	42	5	0.598
<i>CBL</i>	1	1	0	1.000
<i>PTPN11</i>	24	22	2	1.000
<i>JAK2</i>	11	10	1	1.000
<i>MPL</i>	2	2	0	1.000
<i>SETBP1</i>	4	3	1	0.318
Facteurs de transcription	61	55	6	0.825
<i>CEBPA</i>	25	24	1	0.715
<i>RUNX1</i>	24	20	4	0.257
<i>GATA2</i>	16	16	0	0.380
<i>GATA1</i>	1	1	0	1.000
<i>ETV6</i>	7	6	1	0.490
Epigénétique	58	54	4	0.629
-Modification chromatine	33	33	0	0.058
<i>ASXL1</i>	9	9	0	1.000
<i>EZH2</i>	10	10	0	0.609
<i>BCOR</i>	5	5	0	1.000
<i>BCORL1</i>	6	6	0	1.000
-Méthylation ADN	30	26	4	0.336
<i>IDH1</i>	12	11	1	1.000
<i>IDH2</i>	6	4	2	0.095
<i>DNMT3A</i>	4	4	0	1.000
<i>TET2</i>	8	7	1	0.537
Suppresseurs de tumeurs	54	44	10	0.018
<i>WT1</i>	40	31	9	0.005*
<i>TP53</i>	4	4	0	1.000
<i>PHF6</i>	14	13	1	1.000
Cohésine	19	19	0	0.239
<i>SMC1A</i>	5	5	0	1.000
<i>SMC3</i>	6	6	0	1.000
<i>RAD21</i>	5	5	0	1.000
<i>STAG2</i>	1	1	0	1.000
<i>NIPBL</i>	2	2	0	1.000
Spliceosome	11	9	2	0.263
<i>SRSF2</i>	2	1	1	0.174
<i>U2AF1</i>	6	5	1	0.438
<i>SF3B1</i>	1	1	0	1.000
<i>ZRSR2</i>	2	2	0	1.000
<i>NPM1</i>	34	34	0	0.058

Malgré le faible nombre de cas, seule la présence d'une fusion impliquant *NUP98* reste associée à une échec d'induction en analyse multivariée ($P=0.038$)(cf. Tableau 6).

Tableau 6: Analyse multivariée sur l'obtention d'une rémission complète

Variables	SHR	95% IC	P
Leucocytose>30×G/L	0.550	0.260-1.165	0.119
Fusions <i>NUP98</i>	0.215	0.050-0.922	0.038*
<i>FLT3</i> -ITD	0.569	0.234-1.380	0.212
Mutations <i>WT1</i>	0.419	0.164-1.073	0.070

E. Réarrangements de *NUP98* dans la cohorte ELAM02

Les patients présentant un réarrangement de *NUP98* représentent 2.6% de la cohorte étudiée (10/385) avec une fusion *NUP98-NSD1* retrouvée chez 9 patients. Le caryotype était normal pour 5 patients et complexe pour l'unique cas présentant un transcrite de fusion *NUP98-JARID1A*. Les 4 patients restants appartenaient au groupe des autres anomalies cytogénétiques. L'âge médian au diagnostic est de 9.9 ans (1.3-16.8 ans) et la leucocytose initiale médiane est de 179.8G/L (12.2-436). Les mutations les plus fréquemment associées à ce sous-groupe sont *FLT3-ITD* (7/10), *WT1* (5/10), *CEBPA* (monoalléliques; 2/10) et *RUNX1* (2/10)(cf. Figure 14). Au total, les patients réarrangés pour *NUP98* montrent un pronostic défavorable avec la moitié des patients n'obtenant pas de RC. A 3 ans, la survie sans événement et la survie globale de ce sous-groupe sont de 10% (95%IC : 0-28.6) et 25% (95%IC : 0-54) respectivement comparées à 60.5% (95%IC : 55.5-65.5) et 77.3% (95%IC : 73.1-81.6) dans les cas *NUP98* non réarrangés (cf. Figure 17).

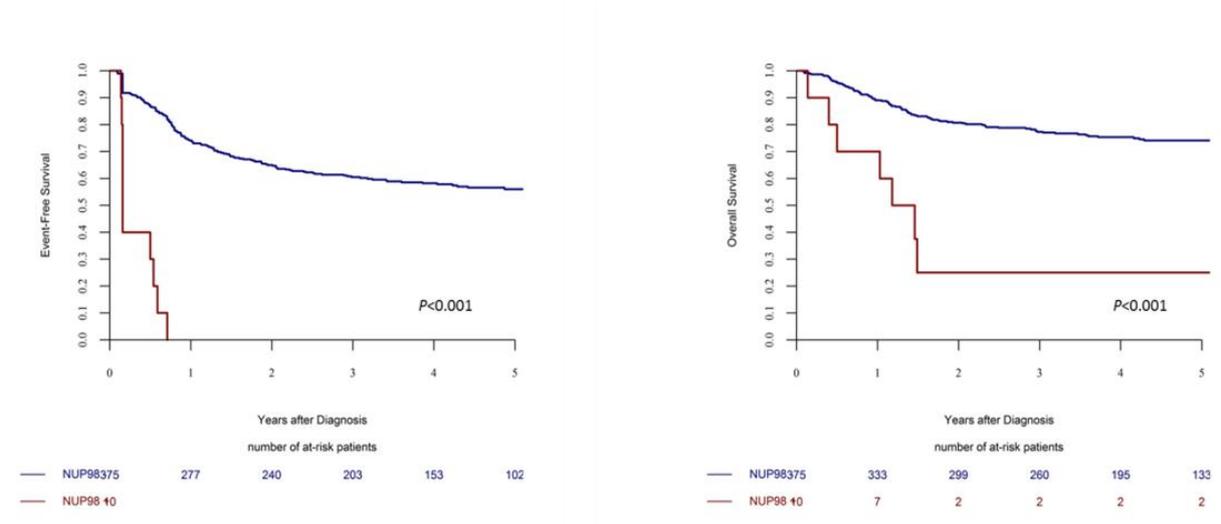


Figure 17: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction de la présence d'un transcrite *NUP98*

F. Impact des anomalies moléculaires sur la survie des patients

A 3 ans, la survie sans événement et la survie globale de l'ensemble de la cohorte étudiée sont estimées à 58.9% (95%IC : 54-63.9) et 76.1% (95%IC : 71.8-80.4) respectivement avec un suivi médian de 59 mois. Les survies sans événement et globale en fonction des groupes cytogénétiques sont présentées dans la figure 18. En OS, le sous-groupe des patients présentant un réarrangement CBF a le meilleur devenir, à l'inverse des patients avec un caryotype défavorable ou autre.

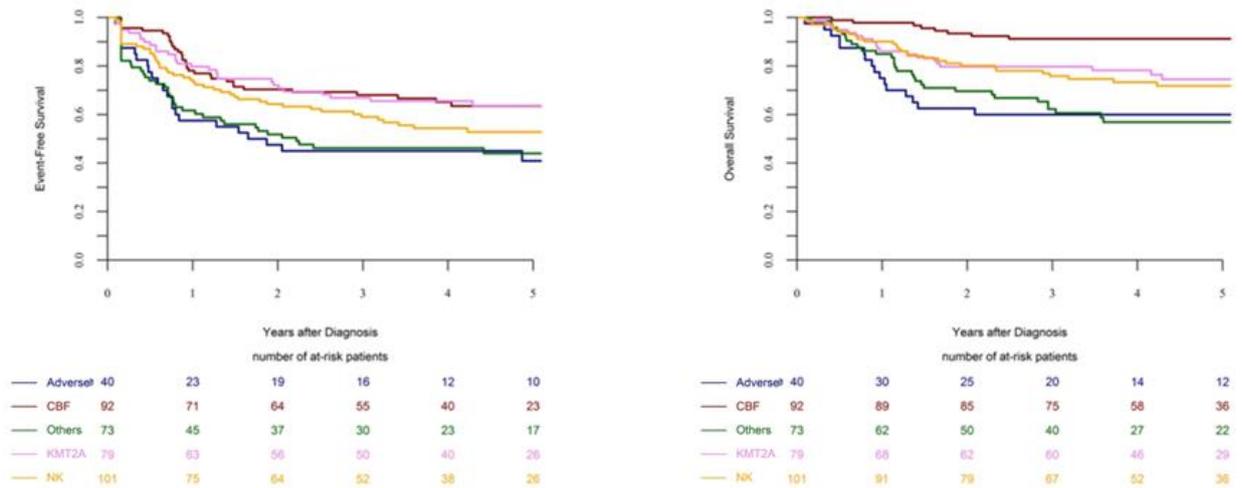
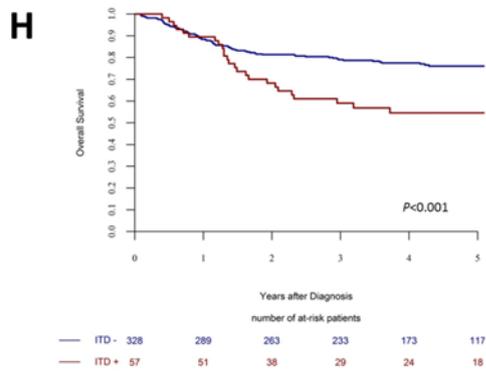
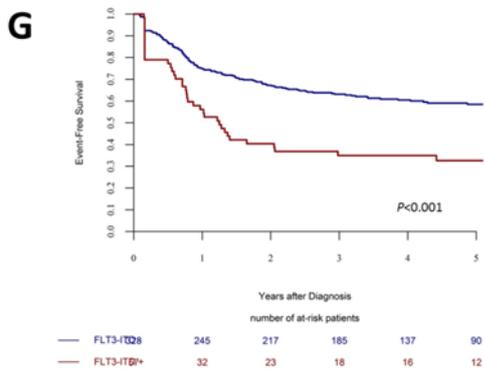
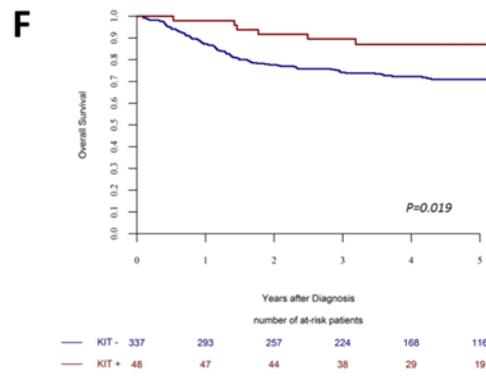
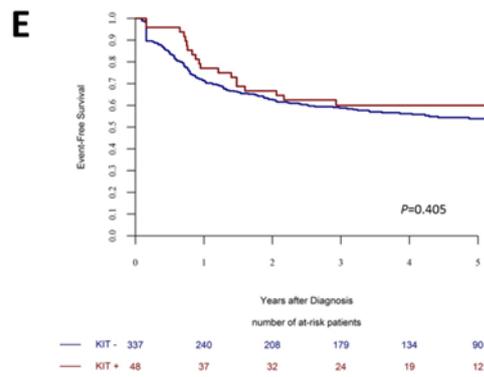
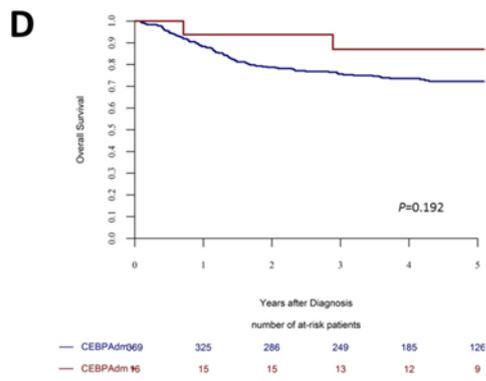
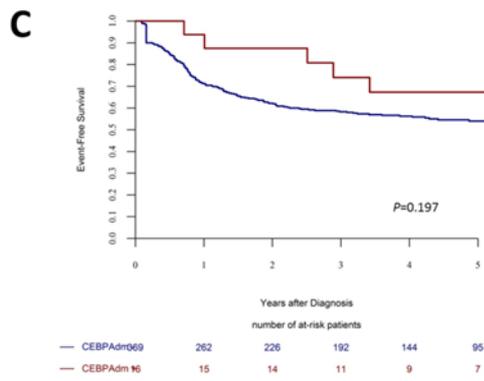
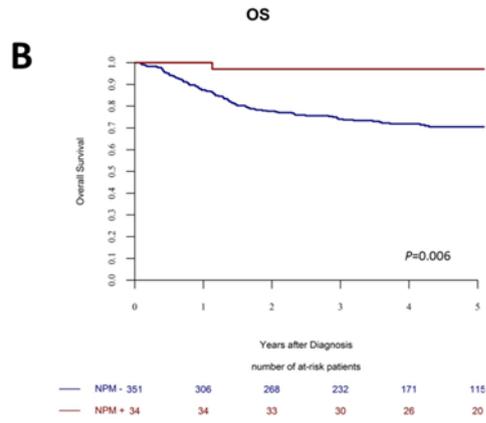
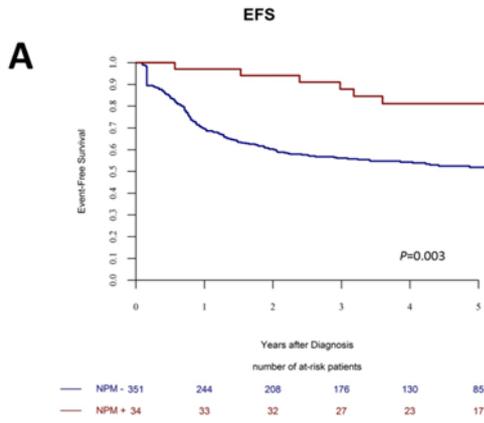


Figure 18: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction du groupe cytogénétique

En analyse univariée, les mutations de *NPM1*, *CEBPA*-dm et *KIT* sont associées à une meilleure survie (significative ou tendance à la significativité en EFS et/ou OS, cf. Figure 19A-F). En revanche, les mutations de *FLT3*-ITD, *WT1*, *RUNX1* et *PHF6* sont associées à des OS et/ou EFS plus courtes (cf. Figure 19G-N).



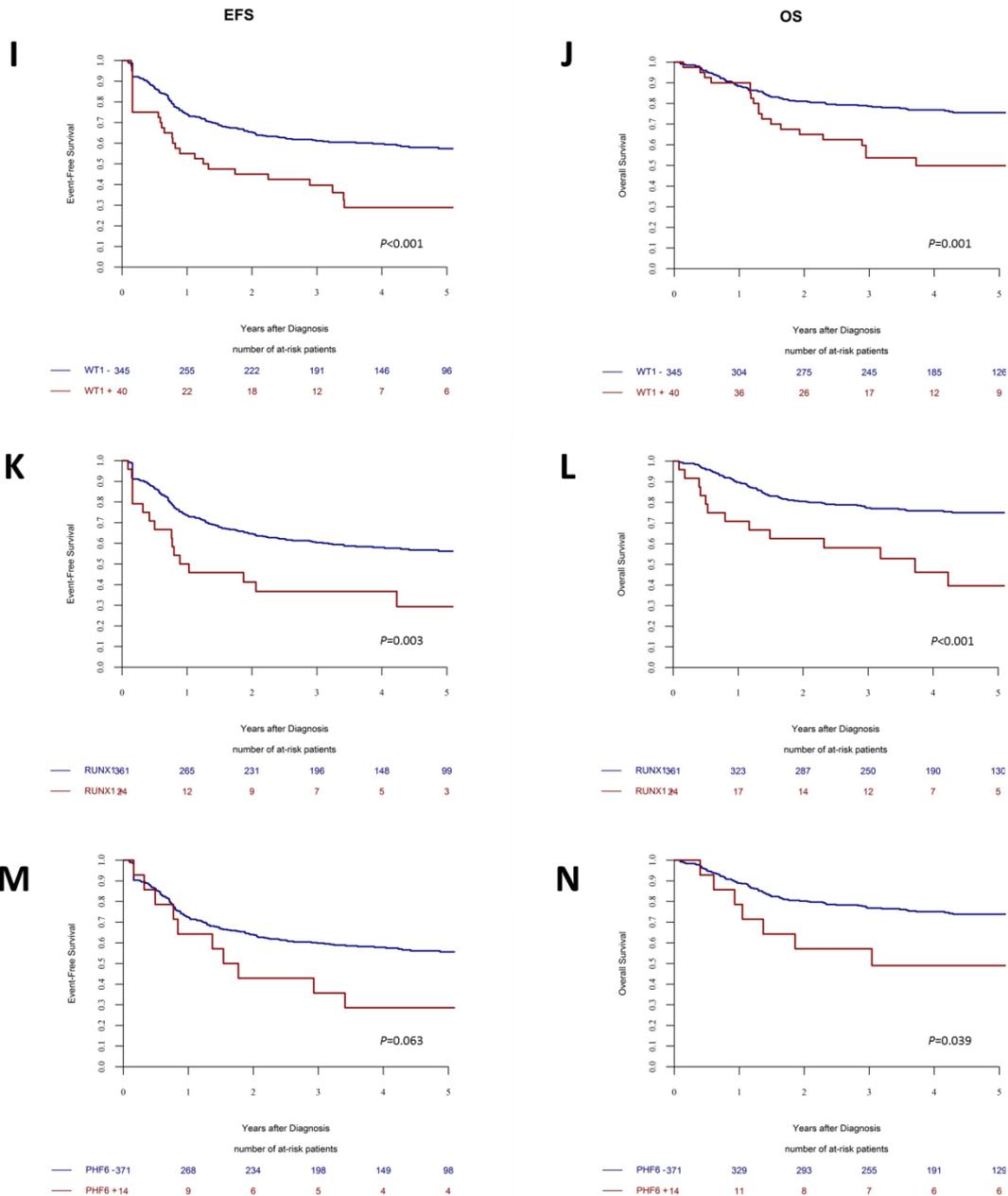


Figure 19: Courbes de survie des LAM pédiatriques en fonction de mutations géniques

Les courbes OS et EFS sont représentées pour les mutations géniques montrant un impact sur le devenir des patients : *NPM1* (A-B), *CEBPA-dm* (C-D), *KIT* (E-F), *FLT3-ITD* (G-H), *WT1* (I-J), *RUNX1* (K-L), *PHF6* (M-N).

Les analyses pronostiques multivariées sont présentées dans le tableau 7. Les facteurs testés incluent les mutations de *NPM1*, *CEBPA-dm*, *FLT3-ITD*, *RUNX1*, *WT1* et *PHF6* ainsi que la leucocytose initiale, les groupes cytogénétiques et les fusions impliquant *NUP98*. Les mutations de *KIT* ont été exclues du fait de leur forte association avec les réarrangements CBF.

Tableau 7: Analyses multivariées sur la survie à 3 ans des LAM pédiatriques

Variables	EFS			OS		
	SHR	95% IC	P	SHR	95% IC	P
Leucocytose>30×G/L	1.58	1.15-2.17	0.005*	1.93	1.30-2.86	0.001*
Cytogénétique						
CBF	0.47	0.27-0.80	0.006*	0.16	0.07-0.37	<0.001*
<i>KMT2A</i> -réarrangé	0.52	0.30-0.91	0.021*	0.53	0.27-1.04	0.066
Normal	0.96	0.56-1.62	0.868	0.91	0.47-1.73	0.762
Autres	0.83	0.48-1.42	0.490	0.83	0.44-1.58	0.571
Défavorable	-	-	0.009*	-	-	<0.001*
Fusions <i>NUP98</i>	3.79	1.81-7.92	<0.001*	-	-	-
Mutations géniques						
<i>NPM1</i>	0.21	0.09-0.46	<0.001*	0.12	0.03-0.51	0.004*
<i>CEBPA</i> -dm	0.35	0.14-0.89	0.027*	0.22	0.05-0.95	0.042*
<i>FLT3-ITD</i>	1.71	1.14-2.57	0.010*	-	-	-
<i>WT1</i>	1.71	1.10-2.66	0.018*	1.83	1.07-3.15	0.027*
<i>RUNX1</i>	-	-	-	1.88	1.02-3.44	0.043*
<i>PHF6</i>	-	-	-	2.33	1.04-5.17	0.038*

Cinq facteurs sont significativement associés à un risque plus élevé d'événement selon le modèle de Cox :

- Leucocytose initiale >30G/L (P=0.005)
- Fusions *NUP98* (P<0.001)
- *FLT3-ITD* (P=0.010)
- Mutations de *WT1* (P=0.018)
- Caryotype défavorable (P=0.009).

A l'inverse, 4 facteurs sont significativement associés à un risque plus faible d'événement :

- Mutations de *NPM1* (P<0.001)
- *CEBPA*-dm (P=0.027)
- Réarrangements CBF (P=0.006)
- Réarrangements de *KMT2A* (P=0.021).

En OS, l'analyse multivariée révèle 5 facteurs avec un impact négatif :

- Leucocytose initiale >30G/L (P=0.001)
- Mutations de *WT1* (P=0.027)
- Mutations de *RUNX1* (P=0.043)
- Mutations de *PHF6* (P=0.038)
- Caryotype défavorable (P<0.001).

Inversement, 3 facteurs montrent un impact positif sur l'OS :

- Mutations de *NPM1* (P=0.004)
- *CEBPA*-dm (P=0.042)

- Réarrangements CBF ($P < 0.001$).

G. Classification moléculaire des LAM pédiatriques

En considérant les résultats des analyses multivariées et les marqueurs moléculaires importants validés dans différentes études (9,66,90,94), une nouvelle classification moléculaire a été définie, permettant d'affiner le pronostic des LAM pédiatriques. Cette classification moléculaire est basée sur les prédictions de survie globale et sépare les LAM en 3 groupes (cf. Figure 20A) : risque moléculaire favorable (*RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFB-MYH11* ou mutations de *NPM1* ou *CEBPA*-dm, $n=142$), risque moléculaire défavorable (fusion *NUP98* ou mutations de *RUNX1* ou *WT1* ou *PHF6*, $n=59$) et risque moléculaire intermédiaire (tous les autres cas, $n=184$). Les patients présentant un réarrangement CBF et une mutation de *WT1*, *RUNX1* ou *PHF6* ont été inclus dans le sous-groupe à risque moléculaire favorable. Ni le caryotype ni les autres mutations géniques n'ont pu mieux séparer les patients au sein du sous-groupe à risque moléculaire intermédiaire.

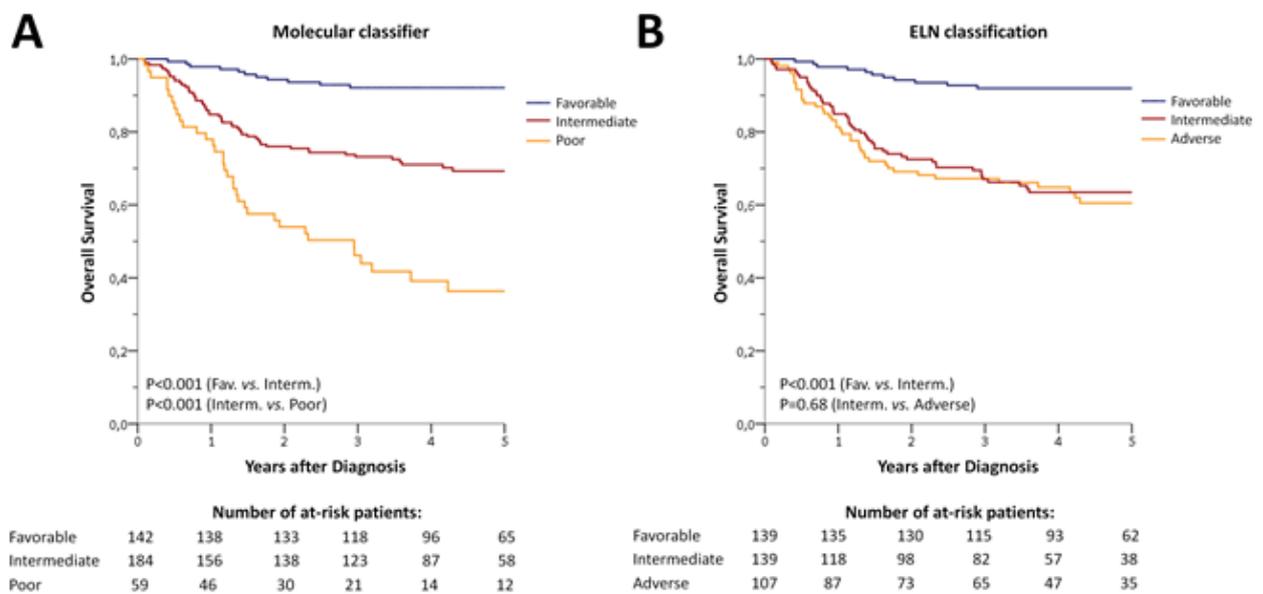


Figure 20: Devenir des LAM pédiatriques

A) Devenir des LAM pédiatriques selon la nouvelle classification moléculaire

Favorable : *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFB-MYH11* ou mutation de *NPM1* ou *CEBPA*-dm ; Poor (défavorable) : fusion *NUP98* ou mutations de *RUNX1* ou *WT1* ou *PHF6* ; Intermediate (intermédiaire) : tous les autres patients.

B) Devenir des LAM pédiatriques selon la classification ELN (European LeukemiaNet) 2017

A 3 ans, la survie globale est de 92.1% (95%IC : 87.6-96.6, médiane non atteinte) pour le sous-groupe à risque moléculaire favorable, 73.2% (95%IC : 66.7-79.6, médiane non atteinte) pour le sous-groupe à risque intermédiaire et 46.1% (95%IC : 33.1-59.2, médiane à 2.33 ans) pour le sous-groupe à risque moléculaire défavorable (cf. Tableau 8).

Tableau 8: Survie globale à 3 ans selon la classification moléculaire

Sous-groupe de la classification moléculaire	Nombre de patients	OS à 3 ans
Favorable	142	92.1% [95%IC : 87.6-96.6]
Mutations <i>NPM1</i>	34	97.1%
<i>CEBPA</i> -dm	16	87.1%
Réarrangements CBF	92	91.2%
Intermédiaire	184	73.2% [95%IC : 66.7-79.6]
<i>KMT2A</i> -réarrangé	79	79.7%
Autres profils	105	68.2%
Défavorable	59	46.1% [95%IC : 33.1-59.2]
Fusions <i>NUP98</i>	10	25.0%
Mutations <i>PHF6</i>	9	44.4%
Mutations <i>RUNX1</i>	20	59.6%
Mutations <i>WT1</i>	20	42.8%
Total	385	76.1% [95%IC : 71.8-80.4]

En séparant les réarrangements de *KMT2A* au sein du sous-groupe de risque moléculaire intermédiaire, une tendance à une meilleure survie globale est retrouvée pour ces patients mais cela n'atteint pas la significativité ($P=0.15$)(cf. Figure 21). Ainsi les réarrangements de *KMT2A* n'ont pas été individualisés dans la classification moléculaire. Les mêmes résultats étaient observés en séparant les transcrits *KMT2A-MLL3 (AF9)* des autres réarrangements de *KMT2A*.

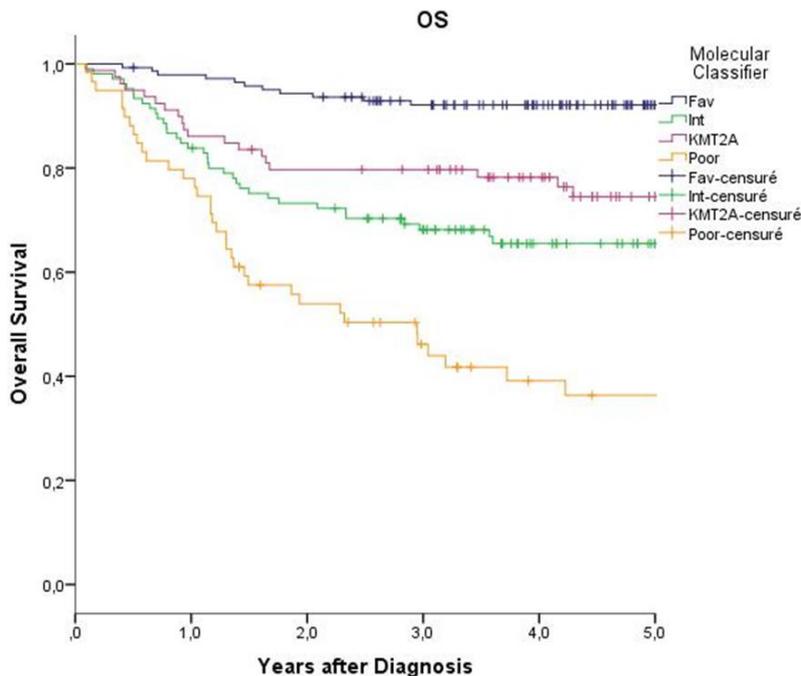


Figure 21: Devenir des LAM pédiatriques en séparant les réarrangements de *KMT2A*

La séparation des réarrangements de *KMT2A* (courbe violette) avec les autres profils de risque moléculaire intermédiaire (courbe verte) ne permet pas d'atteindre une différence statistique significative ($P=0.15$).

Bien que les mutations de *FLT3*-ITD n'aient pas été retenues comme un facteur pronostique indépendant dans la classification moléculaire, sa co-occurrence chez les patients à risque moléculaire défavorable définit un sous-groupe de patients au pronostic très sombre (OS à 3 ans : 23.8% vs. 58.8% ; P=0.024)(cf. Figure 22).

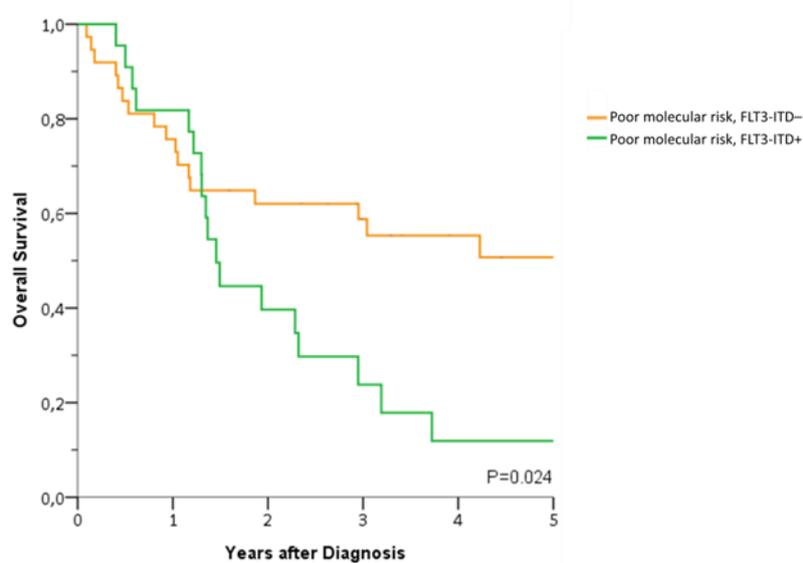


Figure 22: Impact du statut *FLT3*-ITD dans les LAM pédiatriques à risque moléculaire défavorable

Parmi les patients à risque moléculaire défavorable (fusion *NUP98* ou mutations de *RUNX1* ou *WT1* ou *PHF6*, n=59), 22 présentaient une mutation *FLT3*-ITD (n=22, courbe verte).

En revanche, le statut *FLT3*-ITD n'a aucun impact sur le groupe à risque moléculaire intermédiaire (P=0.75) ou chez les patients *NPM1* mutés (P=0.72).

Enfin, la classification moléculaire a été comparée à la classification European LeukemiaNet (ELN) 2017 (95) qui est actuellement utilisée pour stratifier les LAM chez les adultes. Un total de 139 patients ont été classés dans le groupe favorable dans les 2 classifications. Seuls 3 LAM mutées *NPM1* classées dans le groupe favorable de la classification moléculaire décrite dans ce travail ont été reclassées comme intermédiaire ou défavorable selon la classification ELN du fait d'un ratio élevé pour *FLT3*-ITD (n=2) ou un caryotype complexe (n=1). De façon intéressante, la classification ELN ne permet pas de séparer les sous-groupes intermédiaires et défavorables dans cette cohorte pédiatrique (cf. Figure 20B et Tableau 9).

Tableau 9: Survie globale à 3 ans selon la classification ELN 2017

Classification ELN	Nombre de patients	OS à 3 ans
Favorable	139	91.9% [95%IC : 87.4-96.5]
Intermédiaire	139	67% [95%IC : 59.1-75]
Défavorable	107	67.2% [95%IC : 58.3-76.1]

L'ensemble de ces résultats montrent que la classification ELN n'a pas de signification pronostique dans les LAM pédiatriques, particulièrement dans les LAM non favorables. Ainsi l'utilisation de la nouvelle classification moléculaire pourrait améliorer la stratification pronostique des enfants et adolescents atteints de LAM.

Discussion

Une meilleure connaissance des anomalies moléculaires dans les LAM a considérablement amélioré la prise en charge des patients durant ces dernières années. Cependant, la plupart des études rapportées s'intéressent aux cohortes de sujets adultes. L'essai clinique multicentrique français ELAM02 a permis de définir l'incidence des anomalies moléculaires ainsi que leur signification pronostique dans les LAM pédiatriques. En effet, les LAM de l'enfant et de l'adolescent sont des hémopathies avec un plus faible taux de survie comparées aux LAL (OS à 5 ans 69.4% contre 89.2% respectivement)(4). La définition de nouveaux facteurs pronostiques pourrait améliorer la stratification thérapeutique de cette population.

Ce travail a mis en évidence le profil mutationnel d'une cohorte de 385 LAM pédiatriques. Les mutations les plus fréquemment retrouvées impliquent la voie de signalisation des TK (en particulier *NRAS*, *KRAS*, *FLT3* et *KIT*). Ces mutations concernent 61% des patients et les mutations de *N/KRAS* et *KIT* sont préférentiellement retrouvées dans le sous-groupe des LAM CBF. Les mutations de *KIT* montrent un impact favorable sur la survie globale du fait de leur très forte association avec les réarrangements CBF. La présence des mutations de *KIT* ou *N/KRAS* au sein du sous-groupe CBF ne semble pas avoir d'impact clinique (70,96,97). Une précédente étude sur le profil mutationnel des LAM CBF s'est intéressée à une cohorte globale incluant des sujets adultes (issus du protocole CBF2006) et pédiatriques (du protocole ELAM02)(71). Il est décrit la forte prévalence des mutations impliquant les gènes de l'épigénétique et de la cohésine au sein des LAM avec t(8 ;21), mais pas dans les inv(16)/t(16 ;16). Concernant les mutations *FLT3*-ITD, leur signification pronostique dans les LAM pédiatriques reste controversée, malgré une tendance à conférer un impact négatif (68). Dans ce travail, 15% des patients présentent une mutation *FLT3*-ITD, principalement liée aux caryotypes normaux. La présence de *FLT3*-ITD est associée à une EFS réduite mais sans influence sur la survie globale en analyse multivariée. De manière intéressante, les mutations de *FLT3*-ITD sont retrouvées dans des sous-groupes hétérogènes de LAM incluant les LAM CBF ou mutées *NPM1* avec un impact pronostique favorable mais aussi dans les LAM *NUP98*-réarrangés ou *WT1* mutées associées à un pronostic défavorable. Ainsi au sein des LAM mutées *NPM1* (66) ou dans le sous-groupe à risque moléculaire intermédiaire, la présence de *FLT3*-ITD n'influence pas le devenir des patients. En revanche, au sein du groupe à risque moléculaire défavorable, la présence d'une mutation *FLT3*-ITD confère un pronostic très sombre, comme précédemment décrit dans d'autres études pédiatriques (63,81,98).

Les facteurs de transcription représentent la seconde classe fonctionnelle la plus fréquemment mutée dans cette cohorte pédiatrique (16% des patients). Les mutations bialléliques de *CEBPA*

(*CEBPA*-dm) représentent seulement 4.2% des LAM de l'enfant et montrent un impact pronostique favorable indépendant en EFS et OS, comme précédemment décrit dans une autre grande cohorte pédiatrique (94). De plus, les mutations de *GATA2* sont fréquemment associées aux mutations *CEBPA*-dm, sans impact pronostique supplémentaire (99). Les mutations de *RUNX1* sont retrouvées dans 6.2% des LAM de notre cohorte avec un impact pronostique défavorable. Comme les mutations de *CEBPA*-dm, les mutations de *RUNX1* sont principalement associées au sous-groupe des CN et sont exclusives des mutations de *NPM1*.

Ensuite, toutes les autres classes de mutations sont décrites dans moins de 10% des LAM pédiatriques. Alors que les mutations impliquant les gènes liés à la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) sont très fréquentes dans les LAM de l'adulte (jusqu'à 50%)(100), seulement 8% des enfants et adolescents présentent ces mutations, particulièrement dans les CN. Parmi les LAM pédiatriques à CN (n=101/385), 3 patients présentent des mutations de *DNMT3A* (toutes sur le codon R882), 12 ont des mutations d'*IDH1* (codon R132), 4 ont des mutations d'*IDH2* (codon R140 uniquement) et 3 ont des mutations de *TET2*. Ces résultats sont comparables à la cohorte du COG (Children's Oncology Group)(72).

Par ailleurs, l'utilisation systématique de la technique de LD-RT-PCR a permis la détection de transcrits de fusion récurrents dans presque la moitié de la cohorte pédiatrique. Les transcrits impliquant le gène *KMT2A* (lysine(K)-specific methyltransferase 2A, anciennement *MLL*) représentent 21% des LAM de l'enfant. Ainsi la dérégulation de la méthylation semble un événement critique dans la leucémogénèse des LAM à la fois chez les enfants et les adultes, bien que les régulateurs génétiques impliqués soient différents. Parmi les cas *KMT2A* réarrangés, le transcrit *KMT2A-MLLT3* (anciennement *AF9*) est de loin le plus fréquent, représentant presque la moitié des fusions *KMT2A*. Dans ce travail, les transcrits impliquant *KMT2A* sont associés à une meilleure survie en EFS mais leur pronostic reste intermédiaire en OS et dans la classification moléculaire finale. Les transcrits de fusion *KMT2A-MLLT3* ne présentent pas un meilleur pronostic que les autres transcrits *KMT2A*, comme décrit dans une large cohorte rétrospective de LAM pédiatriques avec réarrangements de *KMT2A* (77). En effet, dans cette étude rapportant 756 enfants avec une LAM réarrangée *KMT2A*, la présence d'une t(9;11)(p22;q23) ne confère pas un pronostic favorable. En revanche, la présence d'une t(1;11)(q21;q23) était prédictive d'une survie améliorée à l'inverse des t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p12;q23) et t(10;11)(p11.2;q23) avec un pronostic péjoratif. Le faible nombre de cas pour chacun de ces sous-groupes dans le protocole ELAM02 ne permet pas de les évaluer individuellement.

Les fusions impliquant une des sous-unités du CBF sont retrouvées chez 24% des patients et sont associées à un pronostic favorable. Conformément à de précédentes études (9,66,78,90,94), les

réarrangements impliquant le CBF, les mutations de *NPM1* et *CEBPA*-dm définissent un sous-groupe particulier au pronostic favorable. Ensemble, ces anomalies sont retrouvées dans plus d'un tiers des LAM pédiatriques et constituent le sous-groupe à risque moléculaire favorable dans la classification présentée dans ce travail. A l'inverse, les fusions de *NUP98* sont associées à un pronostic sombre, principalement dû aux échecs d'induction. Malgré le faible nombre de patients (n=10), la présence d'une fusion *NUP98* reste un facteur pronostique indépendant en EFS dans les LAM pédiatriques, comme précédemment décrit (63,98,101). La technique de LD-RTPCR a permis de détecter ces transcrits cryptiques en cytogénétique conventionnelle puisque la technique de FISH pour *NUP98* n'était pas encore recommandée au moment des inclusions dans le protocole ELAM02 (années 2005 à 2011). D'autres anomalies sont associées à un impact défavorable sur la survie des patients comme les mutations de *WT1*, *RUNX1* et *PHF6*. Dans une précédente étude du COG (69), les mutations de *WT1* montraient un impact pronostique défavorable, comparable aux données de l'ELAM02 qui décrivent les mutations de *WT1* comme un facteur péjoratif indépendant en EFS et en OS. De manière intéressante, les LAM avec mutations de *RUNX1* ont été ajoutées comme entité provisoire dans la dernière classification OMS (10), considérant qu'elles représentent un groupe biologique distinct avec un pronostic péjoratif comparé aux autres LAM *de novo* (102–105). Toutes les études rapportées concernent de larges cohortes de sujets adultes (>18 ans), et les analyses du protocole ELAM02 montrent que les mutations de *RUNX1* définissent également un sous-groupe avec un pronostic défavorable dans les LAM pédiatriques. Une récente étude japonaise confirme le caractère péjoratif des mutations de *RUNX1* dans les LAM de l'enfant et de l'adolescent (106). Enfin, les mutations de *PHF6* sont des événements rares dans les LAM pédiatriques et aucun impact pronostique n'a été défini dans ce sous-groupe jusqu'alors (107). Les mutations de *PHF6* représentent 3.6% de la cohorte des 385 patients étudiés et montrent un impact pronostique défavorable indépendant. Ainsi le sous-groupe à risque moléculaire défavorable dans la classification finale est constitué par les enfants et adolescents présentant une fusion impliquant *NUP98* et/ou une mutation de *WT1*, *RUNX1* ou *PHF6* (en l'absence de critères de pronostic favorable), et représentent 15% des LAM pédiatriques étudiées. De plus, la présence d'une mutation *FLT3*-ITD dans ce sous-groupe identifie des patients au pronostic très sombre. Ces résultats semblent très intéressants dans le contexte actuel de l'utilisation des inhibiteurs de *FLT3*. En effet, la midostaurine (PKC412) a récemment obtenu l'AMM (autorisation de mise sur le marché) pour le traitement des LAM *de novo* de l'adulte avec mutation de *FLT3*, en association avec une chimiothérapie standard d'induction et de consolidation. Cette autorisation fait suite à l'essai de phase 3 RATIFY ayant démontré une amélioration des survie globale et survie sans évènement chez les patients (18-59 ans) avec LAM mutées *FLT3* ayant reçu la midostaurine en induction, consolidation et entretien (108). A ce jour, un

seul essai sur la midostaurine a été mené chez les enfants (109). Cette étude de phase 1/2, arrêtée prématurément, visait à établir l'innocuité, la tolérance et l'efficacité de la midostaurine dans les LAM pédiatriques. D'autres inhibiteurs de FLT3, comme le sorafénib, le crénolanib ou le quizartinib sont actuellement en cours d'étude dans les LAM de l'enfant et de l'adolescent, en association avec une chimiothérapie standard mais également en maintenance post-allogreffe de CSH (110).

La prise en charge des patients atteints de LAM est guidée par les dernières recommandations de l'ELN qui a établi une stratification des risques en fonction des anomalies génétiques présentes au diagnostic (95). Ces recommandations s'appliquent aux sujets adultes et à ce jour, les différentes catégories de risque proposées n'ont pas été évaluées dans les LAM pédiatriques. Sur les données du protocole ELAM02, la classification ELN ne permet pas la séparation des catégories de risque intermédiaire et défavorable, ce qui démontre l'intérêt d'une classification adaptée et spécifique des LAM de l'enfant et adolescent. Le nouveau protocole MyeChild 01 permettra dans un futur proche la validation voire l'ajustement de la classification pronostique moléculaire établie à partir des données de l'essai clinique ELAM02. MyeChild 01 est un essai clinique international de phase 3 randomisé chez les enfants et adolescents atteints de LAM avec étude de la dose optimale du Gemtuzumab Ozogamicin (GO) dispensée en combinaison avec la chimiothérapie d'induction. Un des objectifs du protocole est de réserver l'allogreffe de CSH aux patients de haut risque. Cette stratification du risque est basée sur les résultats de cytogénétique et biologie moléculaire au diagnostic. Les techniques de NGS et LD-RTPCR utilisées dans ce travail seront systématiquement réalisées lors du screening moléculaire à l'inclusion du protocole MyeChild 01. De manière intéressante, les mutations de *RUNX1* et les transcrits impliquant *NUP98* font notamment partie des anomalies de haut risque. Dans cet essai clinique, la stratégie thérapeutique sera également adaptée en fonction de l'évolution de la MRD par CMF ou biologie moléculaire. La MRD par CMF étant applicable à plus de 95% des patients sera systématiquement évaluée après chaque cure. L'évaluation de la MRD en biologie moléculaire sera limitée aux transcrits CBF (*RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11*) et aux mutations de *NPM1*. Une étude japonaise récente a montré que des taux élevés de transcrits *RUNX1-RUNX1T1* étaient un marqueur prédictif de rechute dans les LAM pédiatriques (111).

Les taux élevés de rechute dans les LAM ont été attribués à l'existence de cellules initiatrices de leucémie ou cellules souches leucémiques (LSC) qui sont caractérisées par leur auto-renouvellement, leur résistance aux chimiothérapies et leur capacité à générer une leucémie dans des souris *in vivo* (112). Dans le but de développer des biomarqueurs pronostiques liées aux propriétés « souches », l'expression différentielle spécifique de 17 gènes a permis d'établir un score nommé « LSC17 ». Ce score LSC17 est un facteur pronostique puissant et indépendant dans les LAM de l'adulte (113). Les patients avec un score LSC17 élevé montrent une survie limitée avec les thérapies actuelles incluant

l'allogreffe de CSH. A ce jour, la valeur pronostique du score LSC17 n'a pas été évaluée dans les LAM de l'enfant. Une des perspectives de cette thèse est d'évaluer l'intérêt pronostique du score LSC17 sur la cohorte de LAM pédiatriques du protocole ELAM02 et de corrélérer ce score avec le profil moléculaire déjà établi.

Enfin, une autre perspective intéressante de ce travail est d'évaluer l'incidence des syndromes de prédisposition aux LAM de l'enfant. En effet, dans le protocole ELAM02 étaient exclus les syndromes pré-existants tels que le syndrome de Down ou l'anémie de Fanconi. Hors depuis quelques années ont été décrits un nombre croissant de facteurs génétiques prédisposant aux LAM qui constituent désormais une section spécifique dans la dernière classification OMS (10). Les techniques de NGS mises en place dans ce travail ont permis d'analyser un panel large de gènes à la recherche de mutations somatiques. Néanmoins le caractère constitutionnel de certaines mutations impliquant les gènes *CEBPA*, *GATA2*, *ETV6*, *RUNX1* et *TP53* ne peut être exclu. Ainsi une étude est en cours afin d'évaluer la persistance de ces mutations sur le matériel de rémission complète des enfants concernés au sein de l'essai clinique ELAM02. En effet, la découverte d'un syndrome de prédisposition génétique aux LAM entraîne des implications sur les modalités de surveillance et la prise en charge des apparentés (12). Ainsi il semble nécessaire d'effectuer un conseil génétique afin de dépister la mutation chez les apparentés. D'autre part, l'allogreffe constitue le traitement de choix chez ces patients. La recherche de donneurs compatibles impose de tenir compte du statut mutationnel des apparentés en plus de la compatibilité HLA.

Conclusion

Ce travail rapporte le profil moléculaire complet d'une vaste cohorte de LAM pédiatriques *de novo* incluses dans l'essai clinique ELAM02 et propose une classification pronostique basée sur les mutations géniques et transcrits de fusion retrouvés dans cette population spécifique. Malgré quelques similitudes entre les LAM de l'adulte et de l'enfant, les patients pédiatriques présentent un profil d'anomalies génétiques différent, en particulier un nombre restreint de mutations impliquant les gènes de l'épigénétique. La classification moléculaire décrite a confirmé le groupe de risque favorable incluant les fusions CBF, les mutations de *NPM1* et *CEBPA-dm*, et redéfinit un groupe de risque défavorable avec les mutations de *WT1*, *RUNX1*, *PHF6* et les fusions de *NUP98*. Les LAM avec réarrangements de *KMT2A* sont incluses dans le groupe à risque intermédiaire, sans aucune différence entre les transcrits *KMT2A-MLLT3* et les autres fusions *KMT2A*. Finalement, ces résultats ont d'importantes implications pour redéfinir la stratification pronostique des LAM pédiatriques et devront être validés sur des cohortes pédiatriques indépendantes.

Bibliographie

1. de Rooij JDE, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*. 2015 Jan 9;4(1):127–49.
2. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2010 May;19(3):173–81.
3. Desandes E, Lacour B, Belot A, Molinie F, Delafosse P, Tretarre B, et al. Cancer Incidence and Survival in Adolescents and Young Adults in France, 2000–2008. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013 Apr 11;30(4):291–306.
4. Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, Gatta G, Clavel J, Stefan DC, et al. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *Lancet Haematol*. 2017;4(5):e202–e217.
5. Travis LB. The Epidemiology of Second Primary Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Oct 20;15(11):2020–6.
6. Sandler ES, Friedman DJ, Mustafa MM, Winick NJ, Bowman WP, Buchanan GR. Treatment of children with epipodophyllotoxin-induced secondary acute myeloid leukemia. *Cancer*. 1997;79(5):1049–1054.
7. Weiss B, Vora A, Huberty J, Hawkins RA, Matthay KK. Secondary myelodysplastic syndrome and leukemia following 131i-metaiodobenzylguanidine therapy for relapsed neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 25(7):543–7.
8. Davis KL, Marina N, Arber DA, Ma L, Cherry A, Dahl GV, et al. Pediatric acute myeloid leukemia as classified using 2008 WHO criteria: a single-center experience. *Am J Clin Pathol*. 2013 Jun;139(6):818–25.
9. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3187–205.
10. 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*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
11. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988 Sep 15;48(18):5358–62.
12. Porter CC, Druley TE, Erez A, Kuiper RP, Onel K, Schiffman JD, et al. Recommendations for Surveillance for Children with Leukemia-Predisposing Conditions. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):e14–22.
13. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman J-M, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From *TP53* Mutation Carriers. *J Clin Oncol*. 2015 Jul 20;33(21):2345–52.

14. Ripperger T, Schlegelberger B. Acute lymphoblastic leukemia and lymphoma in the context of constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *Eur J Med Genet.* 2016 Mar;59(3):133–42.
15. Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M. Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *Br J Cancer.* 1994;70(5):969.
16. Niemeyer CM. RAS diseases in children. *Haematologica.* 2014 Nov 1;99(11):1653–62.
17. Cavé H, Caye A, Strullu M, Aladjidi N, Vignal C, Ferster A, et al. Acute lymphoblastic leukemia in the context of RASopathies. *Eur J Med Genet.* 2016 Mar;59(3):173–8.
18. Pérez B, Mechinaud F, Galambrun C, Romdhane NB, Isidor B, Philip N, et al. Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. *J Med Genet.* 2010;47(10):686–691.
19. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014 Sep;27(3–4):214–21.
20. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet.* 2011 Sep 4;43(10):929–31.
21. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood.* 2011 Sep 8;118(10):2656–8.
22. Koegel AK, Hofmann I, Moffitt K, Degar B, Duncan C, Tubman VN. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with MonoMAC syndrome/GATA2 haploinsufficiency. *Pediatr Blood Cancer.* 2016 Oct 1;63(10):1844–7.
23. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Starý J, Hasle H, Masetti R, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood.* 2016 Mar 17;127(11):1387–97.
24. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica.* 2014 Feb 1;99(2):276–81.
25. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood.* 2014;124(18):2775–2783.
26. Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study: Malignancies and Survival in IBMFS. *Br J Haematol.* 2010 Apr;no-no.
27. Khan I, Malinge S, Crispino J. Myeloid leukemia in Down syndrome. *Crit Rev Oncog.* 2011;16(1–2):25–36.
28. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet.* 2016 May 16;48(7):792–7.

29. Chen D-H, Below JE, Shimamura A, Keel SB, Matsushita M, Wolff J, et al. Ataxia-Pancytopenia Syndrome Is Caused by Missense Mutations in SAMD9L. *Am J Hum Genet.* 2016 Jun;98(6):1146–58.
30. Li FP, Potter NU, Buchanan GR, Vawter G, Whang-Peng J, Rosen RB. A family with acute leukemia, hypoplastic anemia and cerebellar ataxia: Association with bone marrow C-monosomy. *Am J Med.* 1978 Dec 1;65(6):933–40.
31. Schwartz JR, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Wang S, Bryant V, et al. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nat Commun.* 2017 Nov 16;8(1):1557.
32. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germline mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood.* 2017 Nov 16;blood-2017-09-806489.
33. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, Velangi M, Ho A, Hossain U, et al. Exome Sequencing Identifies Autosomal-Dominant SRP72 Mutations Associated with Familial Aplasia and Myelodysplasia. *Am J Hum Genet.* 2012 May 4;90(5):888–92.
34. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations: Familial MDS/AL. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Mar;1310(1):111–8.
35. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5583–7.
36. Antony-Debré I, Duployez N, Bucci M, Geffroy S, Micol J-B, Renneville A, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016 Apr;30(4):999–1002.
37. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro G, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the Ankirin Repeat Domain 26 Gene, Cause an Autosomal-Dominant Form of Inherited Thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet.* 2011 Jan;88(1):115–20.
38. Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood.* 2011;117(24):6673–6680.
39. Noris P, Favier R, Alessi M-C, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 2013 Sep 12;122(11):1987–9.
40. Boutroux H, Petit A, Auvrignon A, Lapillonne H, Ballerini P, Favier R, et al. Childhood diagnosis of genetic thrombocytopenia with mutation in the ankyrine repeat domain 26 gene. *Eur J Pediatr.* 2015 Oct;174(10):1399–403.
41. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012 Jan 12;481(7380):157–63.
42. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, Callaghan M, Noris P, Savoia A, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2015 Mar 25;47(5):535–8.

43. Melazzini F, Palombo F, Balduini A, De Rocco D, Marconi C, Noris P, et al. Clinical and pathogenic features of *ETV6* -related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016 Nov;101(11):1333–42.
44. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, Nishii R, Qian M, Devidas M, et al. Germline genetic variation in *ETV6* and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *Lancet Oncol*. 2015 Dec;16(16):1659–66.
45. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of *CEBPA* in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2403–2407.
46. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic *CEBPA* Mutations Are a Frequent Second Event in Families With Germline *CEBPA* Mutations and Familial Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2008 Nov;26(31):5088–93.
47. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011;117(8):2469–2475.
48. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bodor C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline *CEBPA* mutations. *Blood*. 2015 Sep 3;126(10):1214–23.
49. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in *DDX41* in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015 May;27(5):658–70.
50. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, Phung C, Rafidi G, Lee MK, et al. Novel germ line *DDX41* mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood*. 2016;127(8):1017–1023.
51. Li R, Sobreira N, Witmer PD, Pratz KW, Braunstein EM. Two novel germline *DDX41* mutations in a family with inherited myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *haematologica*. 2016;101(6):e228–e231.
52. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, Ellison A, Lowe R, Tummala H, et al. Germline heterozygous *DDX41* variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016 Oct;30(10):2083–6.
53. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;1999(341):1051–1062.
54. Reinhardt D, Creutzig U. Isolated Myelosarcoma in Children--Update and Review. *Leuk Lymphoma*. 2009 Jul;43:565–74.
55. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, Dworzak M, Stary J, Lehrnbecher T. Early Deaths and Treatment-Related Mortality in Children Undergoing Therapy for Acute Myeloid Leukemia: Analysis of the Multicenter Clinical Trials AML-BFM 93 and AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2004 Nov;22(21):4384–93.
56. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–458.

57. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. 1991;78(3):325–329.
58. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.
59. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567–574.
60. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):497–529.
61. Mercher T, Busson-Le Coniat M, Nguyen Khac F, Ballerini P, Mauchauffé M, Bui H, et al. Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1;22) of infant AML-M7. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Jan;33(1):22–8.
62. Slater RM, von Drunen E, Kroes WG, Weghuis DO, van den Berg E, Smit EM, et al. t(7;12)(q36;p13) and t(7;12)(q32;p13)--translocations involving ETV6 in children 18 months of age or younger with myeloid disorders. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):915–20.
63. Hollink IHM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3645–56.
64. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *ASH Educ Program Book*. 2004;2004(1):80–97.
65. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
66. Hollink I, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters T, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*. 2009;23(2):262–270.
67. Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Pollard J, Stirewalt DL, Hurwitz C, et al. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6558–66.
68. Wu X, Feng X, Zhao X, Ma F, Liu N, Guo H, et al. Prognostic significance of FLT3-ITD in pediatric acute myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Mol Cell Biochem*. 2016 Sep;420(1–2):121–8.
69. Ho PA, Zeng R, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Pollard JA, et al. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):702–10.
70. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, et al. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(9):1536–1542.

71. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2451–9.
72. Ho PA, Kutny MA, Alonzo TA, Gerbing RB, Joaquin J, Raimondi SC, et al. Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Aug;57(2):204–9.
73. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Sep 18;100(7):2292–302.
74. Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, Zimmermann M, Reinhardt D, Döhner H, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: A common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. *Cancer*. 2008 Feb 1;112(3):562–71.
75. Løhmann DJA, Abrahamsson J, Ha S-Y, Jónsson ÓG, Koskenvuo M, Lausen B, et al. Effect of age and body weight on toxicity and survival in pediatric acute myeloid leukemia: results from NOPHO-AML 2004. *Haematologica*. 2016 Nov;101(11):1359–67.
76. Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Henze G, Graf N, Löffler H, et al. Definition of a standard-risk group in children with AML. *Br J Haematol*. 1999 Mar 1;104(3):630–9.
77. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2489–96.
78. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2674–81.
79. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2010 Jun;28(16):2682–9.
80. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3654–61.
81. Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Zimmermann M, Balgobind BV, Arentsen-Peters ST, Alders M, et al. Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(23):5951–5960.
82. Abrahamsson J, Forestier E, Heldrup J, Jahnukainen K, Jónsson OG, Lausen B, et al. Response-guided induction therapy in pediatric acute myeloid leukemia with excellent remission rate. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jan 20;29(3):310–5.
83. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, Pounds SB, Shurtleff SA, Wang KY, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Oct 10;30(29):3625–32.

84. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Østergaard M, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFB-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):198–205.
85. Marceau-Renaut A, Renneville A, Preudhomme C. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a-t-il déjà sa place dans nos laboratoires d'onco-hématologie ? *Hématologie*. 2013;19(2).
86. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079–1089.
87. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
88. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, Rasche M, von Neuhoff C, Alpermann T, et al. Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups: Genetics in AML Covering All Age Groups. *Cancer*. 2016 Dec 15;122(24):3821–30.
89. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med*. 2017 Dec 11;24(1):103–12.
90. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, et al. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):2949–62.
91. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. 2016 Mar;30(3):757–60.
92. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol*. 2014 Jan;10(1):e1003440.
93. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1247–54.
94. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, et al. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J*. 2014 Jul;4(7):e226–e226.
95. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47.
96. Klein K, Kaspers G, Harrison CJ, Beverloo HB, Reedijk A, Bongers M, et al. Clinical Impact of Additional Cytogenetic Aberrations, *cKIT* and *RAS* Mutations, and Treatment Elements in Pediatric t(8;21)-AML: Results From an International Retrospective Study by the International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 20;33(36):4247–58.

97. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y, et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood*. 2010;115(12):2372–2379.
98. Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB, Loken MR, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report. *Blood*. 2014;124(15):2400–2407.
99. Marceau-Renaut A, Guihard S, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C, Cheok M. Classification of CEBPA mutated acute myeloid leukemia by GATA2 mutations. *Am J Hematol*. 2015 mai;90(5):E93–4.
100. Renneville A, Abdelali RB, Chevret S, Nibourel O, Cheok M, Pautas C, et al. Clinical impact of gene mutations and lesions detected by SNP-array karyotyping in acute myeloid leukemia patients in the context of gemtuzumab ozogamicin treatment: results of the ALFA-0701 trial. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):916–32.
101. Bisio V, Zampini M, Tregnago C, Manara E, Salsi V, Di Meglio A, et al. NUP98-fusion transcripts characterize different biological entities within acute myeloid leukemia: a report from the AIEOP-AML group. *Leukemia*. 2017 Apr;31(4):974–7.
102. Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood*. 2011;117(8):2348–2357.
103. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Tseng M-H, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5352–61.
104. Mender JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzeler KH, et al. *RUNX1* Mutations Are Associated With Poor Outcome in Younger and Older Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and With Distinct Gene and MicroRNA Expression Signatures. *J Clin Oncol*. 2012 Sep;30(25):3109–18.
105. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P, et al. *RUNX1* Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis From the AML Study Group. *J Clin Oncol*. 2011 Apr;29(10):1364–72.
106. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Shiraishi Y, Ohki K, et al. RUNX1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia are associated with distinct genetic features and an inferior prognosis. *Blood*. 2018 Jan 1;blood-2017-11-814442.
107. Rooij JD, Heuvel-Eibrink MM, Rijdt NK, Verboon LJ, Haas V, Trka J, et al. PHF6 mutations in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(5):967–971.
108. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):454–64.
109. Zwaan CM, Söderhäll S, Brethon B, Luciani M, Rizzari C, Sternberg D, et al. A Phase 1/2, Open-Label, Dose-Escalation Study of Midostaurin in Pediatric Patients (Pts) with Relapsed or

Refractory (R/R) Acute Leukemia: Final Results of Study ITCC-024 (CPKC412A2114). *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):2564–2564.

110. Sexauer AN, Tasian SK. Targeting FLT3 Signaling in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Front Pediatr*. 2017;5:248.
111. Matsuo H, Iijima-Yamashita Y, Yamada M, Deguchi T, Kiyokawa N, Shimada A, et al. Monitoring of fusion gene transcripts to predict relapse in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Int*. 2018 Jan;60(1):41–6.
112. Kreso A, Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar;14(3):275–91.
113. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016 Dec;540(7633):433–7.

Annexe

Article publié dans *Hemasphere*

Molecular profiling defines distinct prognostic subgroups in childhood AML: a report from the French ELAM02 study group

Alice Marceau-Renaut^{1,2*}, Nicolas Duployez^{1,2*}, Benoît Ducourneau^{1,3}, Myriam Labopin⁴, Arnaud Petit^{4,5}, Alexandra Rousseau⁶, Sandrine Geffroy^{1,2}, Maxime Bucci¹, Wendy Cuccuini⁷, Odile Fenneteau⁸, Philippe Ruminy⁹, Brigitte Nelken¹⁰, Stéphane Ducassou¹¹, Virginie Gandemer¹², Thierry Leblanc¹³, Gérard Michel¹⁴, Yves Bertrand^{15,16}, André Baruchel¹³, Guy Leverger^{4,5}, Claude Preudhomme^{1,2} and Hélène Lapillonne^{4,17}

¹CHU Lille, Laboratory of Hematology, Lille, France;

²INSERM, UMR-S 1172, Lille, France;

³CH Valenciennes, Laboratory of Hematology, Valenciennes, France;

⁴INSERM, U938, CDR Saint-Antoine, UPMC Paris 6, Paris, France;

⁵AP-HP, Pediatric Hematology and Oncology Department, Trousseau Hospital, Paris, France;

⁶AP-HP, Department of Clinical Pharmacology and Clinical Research Unit of East of Paris, Saint Antoine Hospital, Paris, France;

⁷AP-HP, Department of Cytogenetics, Saint-Louis Hospital, Paris, France;

⁸AP-HP, Laboratory of Hematology, Robert Debré University Hospital, Paris, France;

⁹INSERM U918, Centre Henri Becquerel, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, University of Rouen, Rouen, France;

¹⁰CHU Lille, Department of Pediatric Hematology-Oncology, Lille, France;

¹¹Paediatric Oncology Haematology Unit/CEREVANCE/CIC 1401, Inserm CICP, University Hospital of Bordeaux, Paediatric Hospital, Bordeaux, France;

¹²Department of Pediatric Hematology/Oncology, University Hospital of Rennes, Rennes 1 University, Rennes, France;

¹³AP-HP, Department of Pediatric Hematology and Immunology, Robert Debré University Hospital, Paris, France;

¹⁴CHU Marseille La Timone, Department of Pediatric Hematology, Marseille, France;

¹⁵Claude Bernard University, Lyon, France;

¹⁶Hospices Civils de Lyon, Institute of Hematology and Oncology Pediatrics, Lyon, France;

¹⁷AP-HP, Laboratory of Hematology, Trousseau Hospital, Paris, France.

*These authors contributed equally to this work

Correspondence: Hélène Lapillonne (helene.lapillonne@aphp.fr)

Short title:

Molecular profiling defines distinct prognostic subgroups in childhood AML.

Funding:

This work was supported by the French National Cancer Institute (INCA-DGOS_5797) and by a grant from the French Ministry of Health (PHRC-K 2003 no 03142). The Trousseau laboratory received funding from the Association Laurette Fugain and La Fondation de France to support molecular study and the ELAM02 national tumor Bank.

Conflict-of-interest disclosure:

The authors declare no conflicts of interest.

Authorship contributions:

GL was the principal investigator of the ELAM02 study. AR ensured database management. ML performed statistical analysis. AP, BN, SD, VG, TL, GM, YB, AB and GL enrolled patients in the study. AM-R, ND, BD, SG, MB, PR, CP and HL performed genetic analysis and analyzed mutational data. WC reviewed all cytogenetic data. OF reviewed all cytologic diagnosis. AM-R, ND, CP and HL performed the research and wrote the paper. GL, CP and HL revised the manuscript, which was approved by all the authors.

Abstract

Despite major treatment improvements over the past decades, pediatric acute myeloid leukemia (AML) is still a life-threatening malignancy with relapse rates up to 30% and survival rates below 75%. A better description of the pattern of molecular aberrations in childhood AML is needed to refine prognostication in such patients. We report here the comprehensive molecular landscape using both high-throughput sequencing focused on 36 genes and ligation-dependent RT-PCR in 385 children with *de novo* AML enrolled in the prospective ELAM02 trial and we evaluated their prognostic significance. 76% of patients had at least one mutation among the genes we screened. The most common class of mutations involved genes that control kinase signaling (61%) followed by transcription factors (16%), tumor suppressors (14%), chromatin modifiers (9%), DNA methylation controllers (8%), cohesin genes (5%) and spliceosome (3%). Moreover, a recurrent transcript fusion was detected in about a half of pediatric patients. Overall, CBF rearrangements, *NPM1* and double *CEBPA* mutations represented 37% of the cohort and defined a favorable molecular subgroup (3-years OS: 92.1%) while *NUP98* fusions, *WT1*, *RUNX1* and *PHF6* mutations (15% of the cohort) segregated into a poor molecular subgroup (3-years OS: 46.1%). *KMT2A*-rearrangements (21% of the cohort) were associated with an intermediate risk. Despite some overlaps, the spectrum of molecular aberrations and their prognostic significance differ between childhood and adult AML. These data have important implications to contribute in refining risk stratification of pediatric AML and show the need for further validations in independent pediatric cohorts.

Introduction

Approximately 20% of childhood acute leukemia is of myeloid origin. Acute myeloid leukemia (AML) is defined as a clonal disorder caused by stepwise accumulation of successive genetic defects. In recent years, the use of genetic data to inform disease classification and clinical practice has been an active field of research. Improvements in identifying such molecular and cytogenetic aberrations have revealed the heterogeneity of this group of diseases. Recurrent mutations and gene fusions have been shown to affect a wide range of genes that have been classified into 8 functional categories: kinase signaling, transcription factors, tumor suppressors, DNA methylation, chromatin modifiers, cohesin, spliceosome and the *NPM1* gene(1). Consequently, some genetic alterations with major prognostic significance – such as *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11*, *t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1*, single *NPM1* mutations and *CEBPA* double mutations (*CEBPA*_{adm}) – have been implemented into the World Health Organization (WHO) classification of AML(2). Nevertheless, most of investigations are based on the study of large cohorts of adult AML patients(3,4) while genetic profiles are known to be quite different between adults and children with AML(5). Moreover, despite major treatment improvements over the past decades, pediatric AML is still associated with relapse rates up to 30% and survival rates below 75%(6). In this context, a better description of the pattern of molecular aberrations in childhood AML remains a great challenge to refine prognostication and improve outcome in such patients.

We report here the comprehensive molecular landscape of a large and well-annotated cohort of *de novo* pediatric AML enrolled in the prospective ELAM02 trial and propose a new prognostic molecular classifier in this particular group of patients.

Methods

Patients

The present study focuses on 385 patients of the 438 children treated in the ELAM02 trial (Treating Patients With Childhood Acute Myeloid Leukemia With Interleukin-2; ClinicalTrials.gov NCT00149162). Patient selection was based on the availability of genomic DNA at AML diagnosis. Children aged 0 to 18 years with newly diagnosed AML were enrolled between March 2005 and December 2011. Acute promyelocytic leukemia, therapy-related AML and Down syndromes were excluded from the ELAM02 trial. The study was approved by the Ethics Committee of Saint-Antoine Paris University Hospital (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris) and by the Institutional Review Board of the French Regulatory Agency and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Cytogenetic analyses and extensive fusion transcripts detection

Cytogenetic analyses were locally performed on bone marrow samples using R- or G-banding. Results were centrally reviewed and described in accordance with the International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karyotypes were classified as follows: CBF-rearranged [*i.e.* inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) and t(8;21)(q22;q22)], *KMT2A*-rearranged, normal karyotype, adverse [*i.e.* monosomy 7, t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) and complex karyotype] and other aberrations. A complex karyotype was defined by the presence of 3 or more unrelated chromosome abnormalities. Furthermore, all diagnosis samples were screened for more than 50 recurrent gene rearrangements and *KMT2A*-partial tandem duplication (*KMT2A*-PTD) using ligation-dependent RT-PCR amplification assay (LD-RT-PCR) as previously described by Ruminy et al.(7).

Mutational analysis

Genomic DNA from bone marrow aspirates at diagnostic was studied by high-throughput sequencing (HTS) of 36 genes recurrently mutated in myeloid malignancies. The studied panel included genes encoding proteins involved in kinase signaling [*CBL* (exons 8-9), *FLT3* (exon 20), *JAK2* (exons 12, 14, 16), *KIT* (exons 8-13, 17), *KRAS* (exons 2-3), *MPL* (exon 10), *NRAS* (exons 2-3), *PTPN11* (exons 3, 13), *SETBP1* (exon 4)], transcription factors [*CEBPA* (exon 1), *ETV6* (exons 1-8), *GATA1* (exon 2), *GATA2* (exons 2-6), *RUNX1* (exons 1-6)], tumor suppressors [*PHF6* (exons 2-10), *PTEN* (exons 5-7), *TP53* (exons 2-11), *WT1* (exons 7, 9)], chromatin modifiers [*ASXL1* (exons 11-12), *BCOR* (exons 2-15), *BCORL1* (exons 1-12), *EZH2* (exons 2-20)], DNA methylation [*DNMT3A* (exons 2-23), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *TET2* (exons 3-11)], cohesin complex [*NIPBL* (exons 2-47), *RAD21* (exons 2-14), *SMC1A* (exons 1-25), *SMC3* (exons 1-29), *STAG2* (exons 3-35)], RNA splicing [*SF3B1* (exons 13-18), *SRSF2* (exon 1), *U2AF1* (exons 2, 6), *ZRSR2* (exons 1-11)] and *NPM1* (exon 11). Two distinct HTS technologies were used to allow direct cross validation. Firstly, libraries were prepared using the Ampliseq System according to the manufacturer's instructions and run on Ion Proton (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Raw data were analyzed with both Torrent Browser (ThermoFisher) and SeqNext (JSI Medical System, Los Angeles, CA, USA). Secondly, libraries were also prepared using the Haloplex Target Enrichment System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and run on MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw data were processed by SureCall (Agilent Technologies) and SeqNext (JSI Medical System). A high depth of coverage (>1500x) was obtained for all genes with both HTS technologies, allowing detection of mutations with a variant allele frequency (VAF) until 1%. Frameshift and nonsense variants were always considered as relevant mutations. Single

nucleotide variants were retained in the absence of description into public databases of human polymorphisms, and effects on protein function were predicted with 6 established prediction tools: SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), PolyPhen-1, PolyPhen-2, MAPP (Multivariate Analysis of Protein Polymorphism), PhD-SNP (Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphism) and SNAP (Screening for Non-Acceptable Polymorphisms)(8). The presence of the *FLT3*-internal tandem duplication (ITD) was performed for all patients by fragment analysis as previously described(9).

Statistical methods

Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by cause-specific hazard Cox models. EFS was measured from the date of diagnosis to the date of the first event (induction failure, relapse or death) or to the date of last follow-up. Patients who failed to achieve complete remission (CR) were considered as failures at day 60. OS was measured from the date of diagnosis to the date of death from any cause or last follow-up. Data were analyzed and compared without censor at transplant for patients who received allogeneic stem cell transplantation in first CR. Comparisons between patient subgroups were performed by the Mann-Whitney test for continuous variables and by Chi-square or Fisher's exact test for categorical variables. Hazard ratios (HRs) are given with 95% confidence interval (CI). Multivariate analysis assessing the independent effect of the covariates were performed using Cox proportional hazard model. Variables associated with the outcome and a P-value <0.10 in univariate analysis or known as validated factors were included in the multivariable models. Then a backward and forward stepwise selection was performed. All P-values were two-sided and values <0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed with the SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and R3.2.3 software packages (R Development Core Team, Vienna, Austria).

Results

Patients' characteristics at diagnosis

Among the 385 patients in this study, 210 were male and 175 were female. The median age at AML diagnosis was 8.6 years (range, 0-18) and the median white blood cell (WBC) count was $16.6 \times 10^9/L$ (range, 0.40-575). The present cohort was not different from the entire ELAM02 cohort (Table S1). The distribution in the cytogenetic subgroups was as follows: normal karyotype (n=101, 26.2%), CBF-rearranged (n=92, 24% including t(8;21): n=57 and inv(16)/t(16;16): n=35), *KMT2A* (*MLL*)-rearranged (n=79, 21%), adverse karyotype (n=40, 10% including complex karyotype: n=27, monosomy 7: n=9 and t(6;9): n=4) and other

aberrations (named “others” hereafter) (n=73, 19%) (Table S1 and Figure 1). Inv(3) or t(3;3) were not identified in the current study. Cytogenetic appeared significantly different according to age with younger children harboring more *KMT2A*-rearrangements while other cytogenetic subgroups increased with age, especially for CBF-rearrangements and normal karyotypes (Figure 1).

Molecular profiling in childhood AML and association with cytogenetic aberrations

Molecular analyses with HTS and LD-RTPCR allowed the identification of 579 mutations involving 35 different genes as well as 191 fusion transcripts (23 different fusion genes) among 385 pediatric patients.

Twenty-eight genes were mutated in more than 1% of our cohort but only 5 genes (*NRAS*, *FLT3*, *KIT*, *KRAS* and *WT1*) were mutated in more than 10% (Figure 2). The most common class of mutations involved genes that control kinase signaling (61% of the whole cohort) followed by transcription factors (16%), tumor suppressors (14%), chromatin modifiers (9%), DNA methylation controllers (8%), cohesin genes (5%) and spliceosome (3%). Overall, 76% of patients (292/385) had at least one mutation among the genes we examined. The mean number of mutated genes was 1.5 per patient (range, 0-5) with the highest rate of mutations in normal karyotype AML (mean 2.2; range, 0-5) and the lowest rate in *KMT2A*-rearranged AML (mean 0.7; range, 0-3). The mean number of mutated genes increased with age (means of 0.7, 1.5 and 1.9 for 0-2 years, 2-10 years and 10-18 years respectively, $P < 0.001$) mostly due to the different distribution of cytogenetic subgroups (Figures S1 and S2).

The most frequent identified fusion transcripts were *RUNX1-RUNX1T1* (15%), *KMT2A-MLLT3* (9%) and *CBFB-MYH11* (9%). All other fusion transcripts were found in less than 5% of patients (Figure 2 and Table S2). *KMT2A* were found to be rearranged in 79 AML (21%) with 13 different partners among which *MLLT3* was by far the most common (n=36, 46% of *KMT2A*-rearranged AML) followed by *MLLT10* (n=13, 16%), *ELL* (n=6, 8%), *MLLT1* (n=5, 6%) and *MLLT4* (n=5, 6%). Only 3 patients with *KMT2A*-rearrangement (identified by fluorescent in situ hybridization) had no identified partner. The cryptic *NUP98-NSD1* fusion was found in 9 patients (2.3% of the whole cohort) in which 5 had a normal karyotype.

Taken together, we identified at least one molecular aberration (mutations or fusion transcripts) in 344 (89%) out of 385 patients. Cytogenetics in the 41 remaining patients was distributed as follows: normal karyotype (n=12), complex karyotype (n=9), isolated monosomy 7 (n=2) and other karyotype aberrations (n=18).

Figure 3 depicts the interrelationship among the various mutations in cytogenetic subgroups. The mutational spectrum for the different age groups is provided in Supplemental Figure S3. As expected, *NPM1* mutations, *FLT3*-ITD and *CEBPA* biallelic mutations (*CEBPAdm*) were

associated with normal cytogenetics ($P < 0.001$ for each comparison) whereas *WT1* mutations were linked with the “other” subgroup ($P < 0.001$) (Figure 4). CBF rearrangements were closely associated with *KIT* ($P < 0.001$), *RAS* ($P = 0.012$) and cohesin mutations ($P = 0.024$). Notably, mutations involving epigenetic regulators and cohesin genes were restricted to patients with t(8;21) AML while they were nearly absent in inv(16)/t(16;16) AML, as we described previously in a larger cohort of CBF AML including both pediatric and adult patients(10). On the other hand, no association was found in adverse cytogenetics and *KMT2A*-rearranged subgroups. We also investigated mutation co-occurrences showing that *NPM1* mutations were strongly associated with *FLT3*-ITD ($P = 0.009$), *FLT3*-TKD ($P = 0.001$) and mutations in epigenetic controllers ($P < 0.001$). *GATA2* mutations were significantly associated with *CEBPAdm* ($P < 0.001$), as previously described(11,12) and *WT1* mutations appeared associated with *FLT3*-ITD ($P < 0.001$). *RUNX1* mutations were significantly associated with mutations in epigenetic controllers ($P = 0.001$) (Figure 5). Considering that the *NUP98-NSD1* fusion has been associated with specific findings(13–17), the 9 positive patients were grouped together as a unique entity whatever karyotype aberrations for subsequent analyses. Consequently, a strong association was found between *NUP98-NSD1* fusion and *FLT3*-ITD ($P < 0.001$) and *WT1* mutations ($P = 0.002$).

Impact of molecular abnormalities on complete remission rate and clinical outcome

Among the 385 patients included in this study, 350 (91%) achieved CR after two courses of intensive induction chemotherapy. In univariate analysis, *FLT3*-ITD, *WT1* mutations, WBC count higher than $30 \times 10^9/L$, “other” cytogenetics and *NUP98* fusions were associated with more induction failures (Table S3). Despite the small number of cases, only the presence of a *NUP98* fusion remained associated with induction failure in multivariate analysis ($P = 0.038$) (Table 1). Characteristics of *NUP98*-rearranged cases are detailed below.

At 3 years, EFS and OS for the whole cohort were estimated at 58.9% (95%CI: 54-63.9) and 76.1% (95%CI: 71.8-80.4) respectively with a median follow-up of 59 months. EFS and OS according to cytogenetic subgroups are presented in Supplemental Figure S4. In univariate analysis, *NPM1* mutations, *CEBPAdm* and *KIT* mutations were associated with significant or a trend of higher OS and/or EFS (Figure S5A-F). By contrast, *FLT3*-ITD, *WT1*, *RUNX1*, *PHF6* and *NUP98*-rearrangements were associated with poorer OS and/or EFS (Figure S5G-P).

Multivariate prognostic analyses for the HR are indicated in Table 2. Co-tested factors included *NPM1*, *CEBPAdm*, *FLT3*-ITD, *RUNX1*, *WT1* and *PHF6* mutations as well as WBC count, cytogenetic subgroups and *NUP98* fusions. *KIT* mutations were excluded because of a strong association with CBF rearrangements. Five factors were demonstrated to be

significantly associated with a higher risk of event by cause-specific hazard Cox models: (1) WBC count higher than $30 \times 10^9/L$ ($P=0.005$); (2) *NUP98* fusions ($P<0.001$); (3) *FLT3-ITD* ($P=0.01$); (4) *WT1* mutations ($P=0.018$) and adverse cytogenetics ($P=0.009$). On the other hand, 4 factors were significantly associated with a lower risk of event: (1) *NPM1* mutations ($P=0.009$); (2) *CEBPA*dm ($P=0.027$); (3) *CBF* rearrangements ($P=0.006$) and (4) *KMT2A* rearrangements ($P=0.021$). A similar analysis for OS revealed 5 factors that have a negative impact: (1) WBC count higher than $30 \times 10^9/L$ ($P=0.001$); (2) *WT1* mutations ($P=0.027$); (3) *RUNX1* mutations ($P=0.043$); (4) *PHF6* mutations ($P=0.038$) and (5) adverse cytogenetics ($P<0.001$). On the other hand, 3 factors were shown to positively impact OS: (1) *NPM1* mutations ($P=0.004$), (2) *CEBPA*dm ($P=0.042$) and *CBF* rearrangements ($P<0.001$).

NUP98-rearranged cases

NUP98-rearranged cases represented 2.6% of this cohort (10/385) with the fusion of *NUP98-NSD1* being found in 9 patients. The karyotype was normal in 5 patients and complex for the sole patient with *NUP98-JARID1A* fusion transcript. The 4 remaining patients belonged to the “other” cytogenetic subgroup. The median age was 9.9 years (range, 1.3-16.8) and median WBC count was $179.8 \times 10^9/L$ (range, 12.2-436). The most frequent mutations associated with this specific subgroup were *FLT3-ITD* (7/10), *WT1* (5/10), *CEBPA* (monoallelic mutation; 2/10) and *RUNX1* (2/10). Overall, *NUP98*-rearranged cases showed poor prognosis with a half of patients who did not achieve CR. At 3 years, EFS and OS in *NUP98*-rearranged cases were 10% (95%CI: 0-28.6) and 25% (95%CI: 0-54) respectively compared with 60.5% (95%CI: 55.5-65.5) and 77.3% (95%CI: 73.1-81.6) in *NUP98*-negative cases (Figure S5O-P).

Molecular classifier in childhood AML

Considering results from multivariate analysis and strong molecular markers validated among studies(6,18–20) (*i.e.*, *NPM1* mutations and *CEBPA*dm), we defined a molecular classifier, refining the prognosis in childhood AML. The molecular classifier was based on OS predictions and segregate AML into 3 groups (Table S4 and Figure 6A): favorable molecular risk (*RUNX1-RUNX1T1* or *CBFB-MYH11* or *NPM1* mutation or *CEBPA*dm, $n=142$); poor molecular risk (*NUP98* fusion or *RUNX1* or *WT1* or *PHF6* mutation, $n=59$); intermediate molecular risk (all others, $n=184$). Patients who harbored both a *CBF* rearrangement and *WT1*, *RUNX1* or *PHF6* mutations were included in the favorable subgroup. Neither karyotype nor other gene mutations were able to discriminate within patients in the intermediate molecular risk subgroup. At 3 years, OS was 92.1% (95%CI: 87.6-96.6, median not reached) for the favorable molecular risk subgroup, 73.2% (95%CI: 66.7-79.6, median not reached) for the intermediate molecular risk subgroup and 46.1% (95%CI: 33.1-59.2, median 2.33 years)

for the poor molecular risk subgroup. Although *KMT2A*-rearrangements were associated with a trend of better outcome compared with non-*KMT2A*-rearranged cases from the intermediate subgroup, it did not reach statistical significance ($P=0.15$). Consequently, *KMT2A*-rearrangements were not included in the classifier. The same results were observed when separating *KMT2A-MLL3* rearrangements and other *KMT2A*-rearrangements. While *FLT3*-ITD was not retained as an independent prognostic factor for molecular classification, its co-occurrence in patients with poor molecular risk defined a subgroup of patients with the worst prognosis (3-years OS: 23.8% vs. 58.8%; $P=0.024$) (Figure S6). By contrast, *FLT3*-ITD had no impact in the intermediate molecular risk group ($P=0.75$) or in *NPM1*-mutated patients ($P=0.72$).

Finally, the molecular classifier was compared to the 2017 European LeukemiaNet (ELN) classification(21) which is currently used to stratify adult patients with AML. A total of 139 patients were classified in the favorable subgroup with both classifications. Only 3 *NPM1*-mutated-AML were classified as favorable according to the molecular classifier and as intermediate or adverse according to the ELN classification because of high *FLT3*-ITD ratio ($n=2$) or complex karyotype ($n=1$). Interestingly, the ELN classification fails to separate intermediate and adverse subgroups in our pediatric cohort (Figure 6B and Table S5). Together, these data show that the ELN classification lacks of prognostic significance in childhood AML, especially in non-favorable AML and the use of the present molecular classification could improve risk stratification in pediatric patients.

Discussion

The better knowledge of molecular aberrations in AML has greatly improved the management of AML patients over the past decades. However, most of reported studies have focused on adult cohorts. The ELAM02 trial gave us the opportunity to investigate incidences and prognostic significances of molecular aberrations in childhood AML which currently remains a life-threatening malignancy with poor outcome compared to acute lymphoblastic leukemia.

The most common mutations involved genes controlling kinase signaling (especially *NRAS/KRAS*, *FLT3*-ITD, *KIT* mutations). These mutations concerned 61% of the whole cohort and were found in all cytogenetic subgroups. All but *FLT3*-ITD had no independent impact on outcome. To date, the prognostic significance of *FLT3*-ITD in pediatric AML remains controversial(22). In the present study, *FLT3*-ITD was associated with reduced EFS but did not influence OS in multivariate analysis in the whole cohort. Importantly, *FLT3*-ITD were found in heterogeneous diseases including *NPM1*-mutated or CBF AML which have

shown to have a highly favorable outcome but also in *NUP98*-rearranged and *WT1*-mutated AML which are associated with poor prognosis. Among *NPM1*-mutated childhood AML, *FLT3*-ITD did not impact outcome in line with a previous study (23). Transcription factors were the second most common class of mutations (16% of the whole cohort). *CEBPA^{dm}* and *RUNX1* mutations defined independent molecular subgroups of patients (4.2% and 6.2% respectively) associated with highly favorable and poor outcome respectively. Both mutations were mutual exclusive with *NPM1* mutations and occurred almost exclusively in normal karyotype-AML. By contrast, all other classes of mutations were found in less than 10% of patients. Importantly, while mutations within DNA-methylation-related genes (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) are highly prevalent in adult AML (together higher than 50%)(24), only 8% of children with AML harbor such mutations, especially in normal karyotype-AML. Among normal karyotype-AML (n=101/385), 3 patients harbored *DNMT3A* mutations (all at codon R882), 12 had *IDH1* mutations (codon R132), 4 had *IDH2* mutations (codon R140) and 3 had *TET2* mutations. These results are in line with a previous report from the Children's Oncology Group(25). Moreover, the systematic use of LD-RTPCR allowed the detection of recurrent transcript fusions in about a half of pediatric patients. Fusions involving one of the two CBF subunits or the *KMT2A* gene were found in 24% and 21% of patients respectively. Among *KMT2A*-rearranged cases, the *KMT2A-MLL3* fusion was by far the most common, representing nearly the half of *KMT2A* fusions. While CBF rearrangements were associated with a favorable prognosis, *KMT2A* rearrangements were associated with an intermediate outcome in the present study. *KMT2A-MLL3* fusion did not show a better prognosis than other *KMT2A* rearrangements in line with a recent large retrospective study of *KMT2A*-rearranged pediatric AML(26).

In accordance with previous reports(6,18–20,27), CBF rearrangements, *NPM1* mutations and *CEBPA^{dm}* defined a particular subgroup with good prognosis. Together, these aberrations were found in more than one third of childhood AML. By contrast, *NUP98* fusions were associated with the worse prognosis, mostly due to induction failures. Other aberrations associated with poor outcome included *RUNX1*, *PHF6* and *WT1* mutations. In a previous report by the Children's Oncology Group, *WT1* mutations were shown to be an independent factor of poor prognosis both on EFS and OS(28). Interestingly, AML with *RUNX1* mutations has been added to the last WHO classification as a provisional entity(2), considering they represent a biologically distinct group with a possibly worse prognosis in adults AML(29). Our results show that *RUNX1* mutations also defined a distinct subgroup with poor outcome in childhood AML. Finally, *PHF6* mutations are a rare event in childhood AML and to our knowledge, their prognosis impact has not been reported in a large series(30). Importantly,

by contrast to the adult-based-ELN classification, the present molecular classification identified a group of pediatric patients with particular poor prognosis. Moreover, the co-occurrence of *FLT3*-ITD in this subgroup identified patients with the worst outcome. This result remains of great interest in the context of *FLT3* inhibitors use.

In conclusion, we reported the comprehensive genomic landscape of a large cohort of pediatric *de novo* AML enrolled in the ELAM02 trial and proposed a prognostic classification based on gene mutations and fusions in this particular group of patients. Despite some overlaps between childhood and adult AML, pediatric patients harbored a different pattern of molecular aberrations, especially with fewer mutations within epigenetic-related genes. We confirmed the favorable-risk group including CBF fusions, *NPM1* mutations and *CEBPA* biallelic mutations and refined the poor-risk group including *RUNX1*, *WT1* and *PHF6* mutations as well as *NUP98* fusions. *KMT2A*-rearranged AML were included in the intermediate-risk group with no difference between *KMT2A-MLLT3* and other *KMT2A* fusions in this study. Overall, these results have important implications to contribute in refining risk stratification of pediatric AML and show the need for further validations in independent pediatric cohorts.

Acknowledgements

The authors are grateful to Christophe Roumier and Olivier Nibourel (Tumour Bank, CHU Lille) for handling, conditioning, and storing patient samples. The work of all clinical research assistants is also acknowledged here. The authors would like to thank all the patients, their families and the staff of all the centers of Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE) for their implication in the trial.

References

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
2. 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*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
3. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079–1089.
4. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
5. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, Rasche M, von Neuhoff C, Alpermann T, et al. Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups: Genetics in AML Covering All Age Groups. *Cancer*. 2016 Dec 15;122(24):3821–30.
6. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, et al. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):2949–62.
7. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. 2016 Mar;30(3):757–60.
8. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, et al. PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Comput Biol*. 2014 Jan 16;10(1):e1003440.
9. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2016 Nov 14;35(2):185–93.

10. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2451–9.
11. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Tizazu B, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jul 12;120(2):395–403.
12. Marceau-Renaut A, Guihard S, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C, Cheok M. Classification of CEBPA mutated acute myeloid leukemia by GATA2 mutations. *Am J Hematol*. 2015 mai;90(5):E93–4.
13. Akiki S, Dyer SA, Grimwade D, Ivey A, Abou-Zeid N, Borrow J, et al. NUP98-NSD1 fusion in association with FLT3-ITD mutation identifies a prognostically relevant subgroup of pediatric acute myeloid leukemia patients suitable for monitoring by real time quantitative PCR. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Nov;52(11):1053–64.
14. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. A rare but specific subset of adult AML patients can be defined by the cytogenetically cryptic NUP98-NSD1 fusion gene. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):245–8.
15. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3645–56.
16. Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB, Loken MR, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report. *Blood*. 2014 Oct 9;124(15):2400–7.
17. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park M-J, Jo A, Mitani S, et al. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Jul;52(7):683–93.
18. Creutzig U, Heuvel-Eibrink MM van den, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, Bont E de, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3187–205.
19. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, et al. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J*. 2014 Jul 11;4(7):e226.

20. Hollink I, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters T, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*. 2009;23(2):262–270.
21. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47.
22. Wu X, Feng X, Zhao X, Ma F, Liu N, Guo H, et al. Prognostic significance of FLT3-ITD in pediatric acute myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Mol Cell Biochem*. 2016 Sep;420(1–2):121–8.
23. Hollink IHIM, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TCJM, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*. 2008 Nov 20;23(2):262–70.
24. Renneville A, Abdelali RB, Chevret S, Nibourel O, Cheok M, Pautas C, et al. Clinical impact of gene mutations and lesions detected by SNP-array karyotyping in acute myeloid leukemia patients in the context of gemtuzumab ozogamicin treatment: Results of the ALFA-0701 trial. *Oncotarget*. 2013 Dec 21;5(4):916–32.
25. Ho PA, Kutny MA, Alonzo TA, Gerbing RB, Joaquin J, Raimondi SC, et al. Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Aug;57(2):204–9.
26. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2489–96.
27. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y, et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood*. 2010;115(12):2372–2379.
28. Ho PA, Zeng R, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Pollard JA, et al. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):702–10.
29. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P, et al. *RUNX1* Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis From the AML Study Group. *J Clin Oncol*. 2011 Apr;29(10):1364–72.
30. Rooij JD, Heuvel-Eibrink MM, Rijdt NK, Verboon LJ, Haas V, Trka J, et al. PHF6 mutations in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(5):967–971.

Tables

Table 1. Multivariate analysis for complete remission achievement.

Variables	SHR	95% CI	p-value
WBC>30×10 ⁹ /L	0.550	0.260-1.165	0.119
<i>NUP98</i> fusions	0.215	0.050-0.922	0.038*
<i>FLT3-ITD</i>	0.569	0.234-1.380	0.212
<i>WT1</i> mutations	0.419	0.164-1.073	0.070

CI=confidence interval, SHR=specific hazard ratio, WBC=white blood cell.

The *P* values that are statistically significant are indicated in bold.

* Statistically significant (Cox proportional hazard model).

Table 2. Multivariate analysis for 3-years EFS and OS.

Variables	EFS			OS		
	SHR	95% CI	p-value	SHR	95% CI	p-value
WBC>30×10 ⁹ /L	1.58	1.15-2.17	0.005*	1.93	1.30-2.86	0.001*
Cytogenetics						
CBF	0.47	0.27-0.80	0.006*	0.16	0.07-0.37	<0.001*
<i>KMT2A</i> -rearranged	0.52	0.30-0.91	0.021*	0.53	0.27-1.04	0.066
Normal	0.96	0.56-1.62	0.868	0.91	0.47-1.73	0.762
Others	0.83	0.48-1.42	0.490	0.83	0.44-1.58	0.571
Adverse	-	-	0.009*	-	-	<0.001*
<i>NUP98</i> fusions	3.79	1.81-7.92	<0.001*	-	-	-
Gene mutations						
<i>NPM1</i>	0.21	0.09-0.46	<0.001*	0.12	0.03-0.51	0.004*
<i>CEBPA</i> dm	0.35	0.14-0.89	0.027*	0.22	0.05-0.95	0.042*
<i>FLT3-ITD</i>	1.71	1.14-2.57	0.010*	-	-	-
<i>WT1</i>	1.71	1.10-2.66	0.018*	1.83	1.07-3.15	0.027*
<i>RUNX1</i>	-	-	-	1.88	1.02-3.44	0.043*
<i>PHF6</i>	-	-	-	2.33	1.04-5.17	0.038*

CI=confidence interval, EFS=event-free survival, OS=overall survival, SHR=specific hazard ratio, WBC=white blood cell.

The *P* values that are statistically significant are indicated in bold.

* Statistically significant (Cox proportional hazard model)

Figures

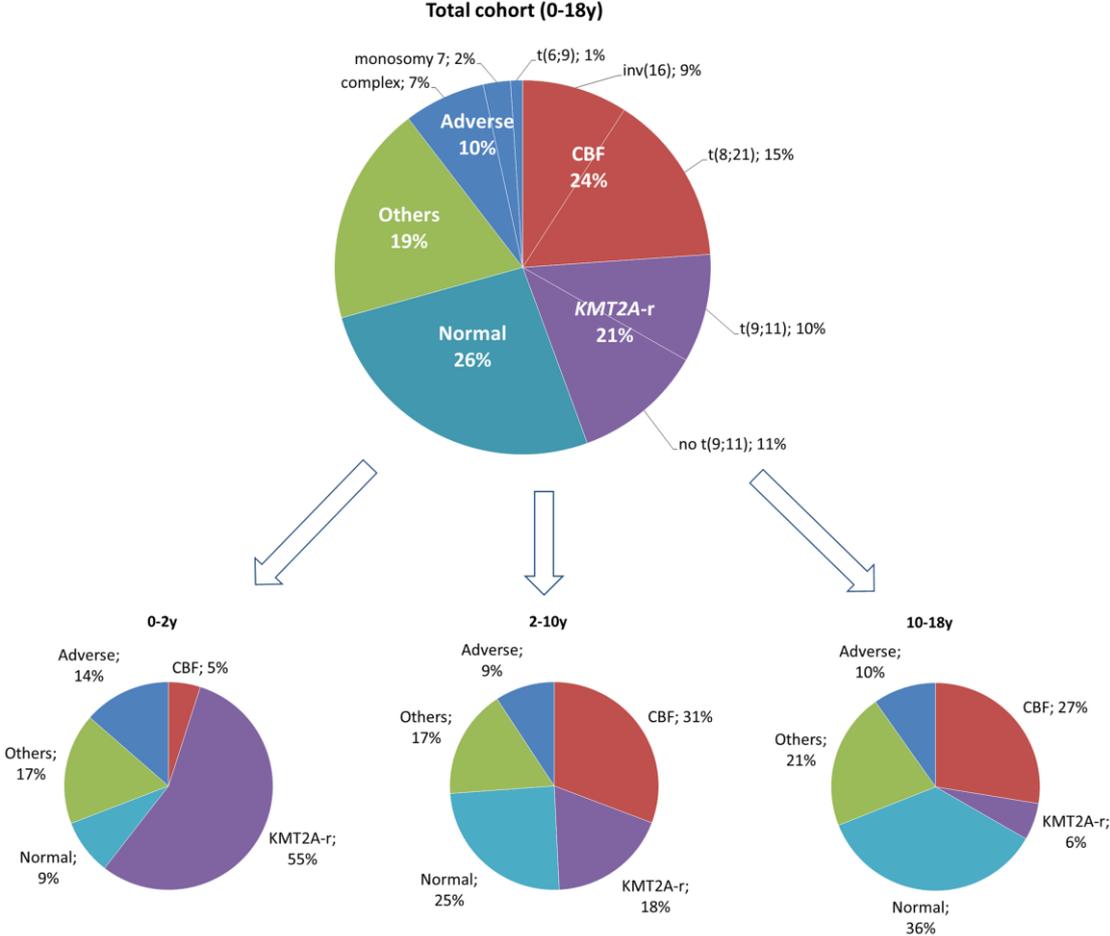
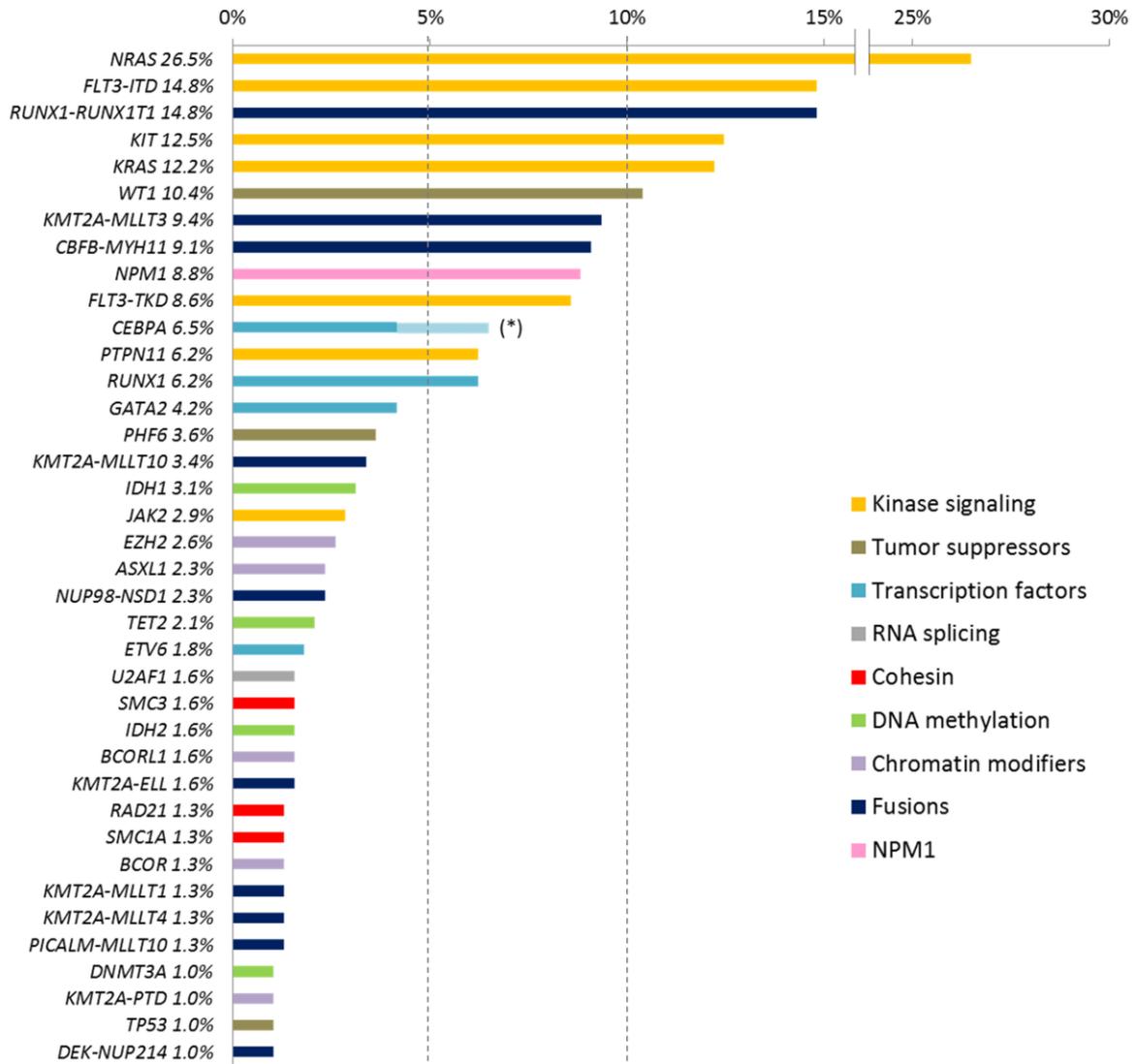
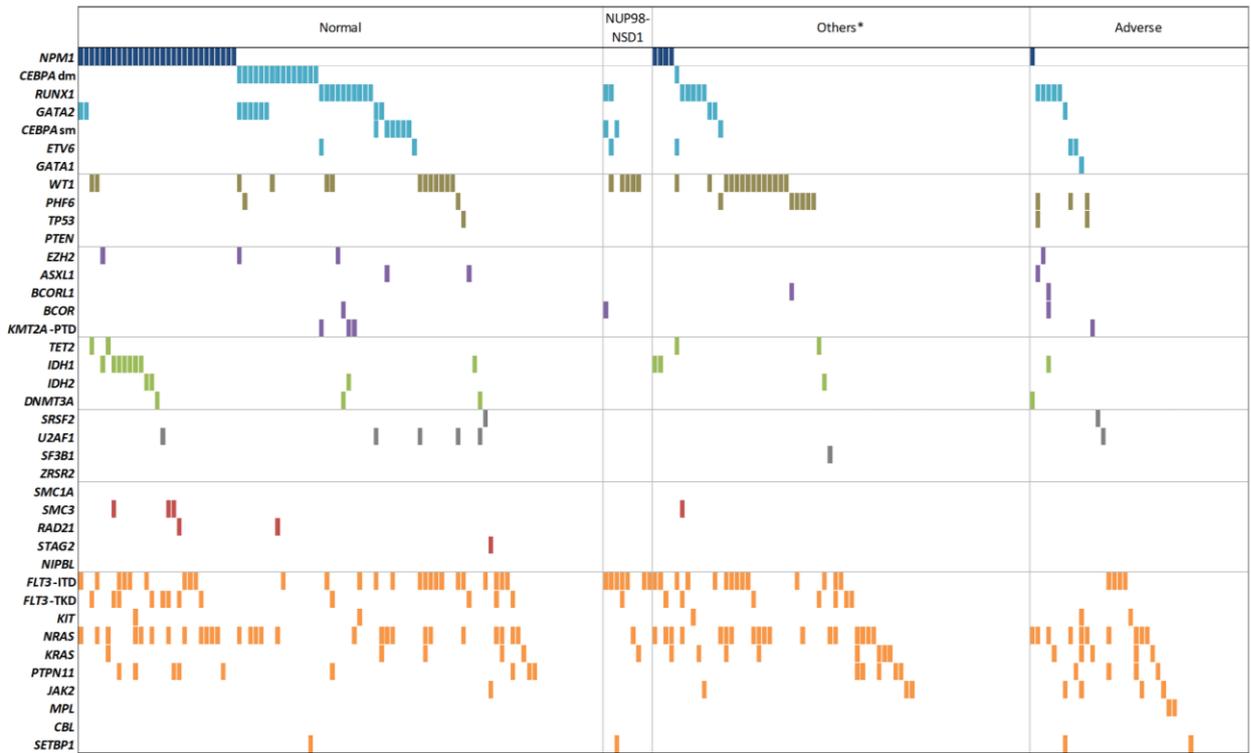


Figure 1. Distribution of the cytogenetic subgroups in the studied cohort and according to age classes.



* including 4.2% and 2.3% of biallelic and monoallelic *CEBPA* mutations respectively

Figure 2. Gene mutations and fusion transcripts frequencies in childhood AML.
Only aberrations detected with a frequency higher than 1% are shown.



* Abnormal karyotype excluding t(8;21), inv(16)/t(16;16), *KMT2A*-rearrangements and adverse karyotypes.

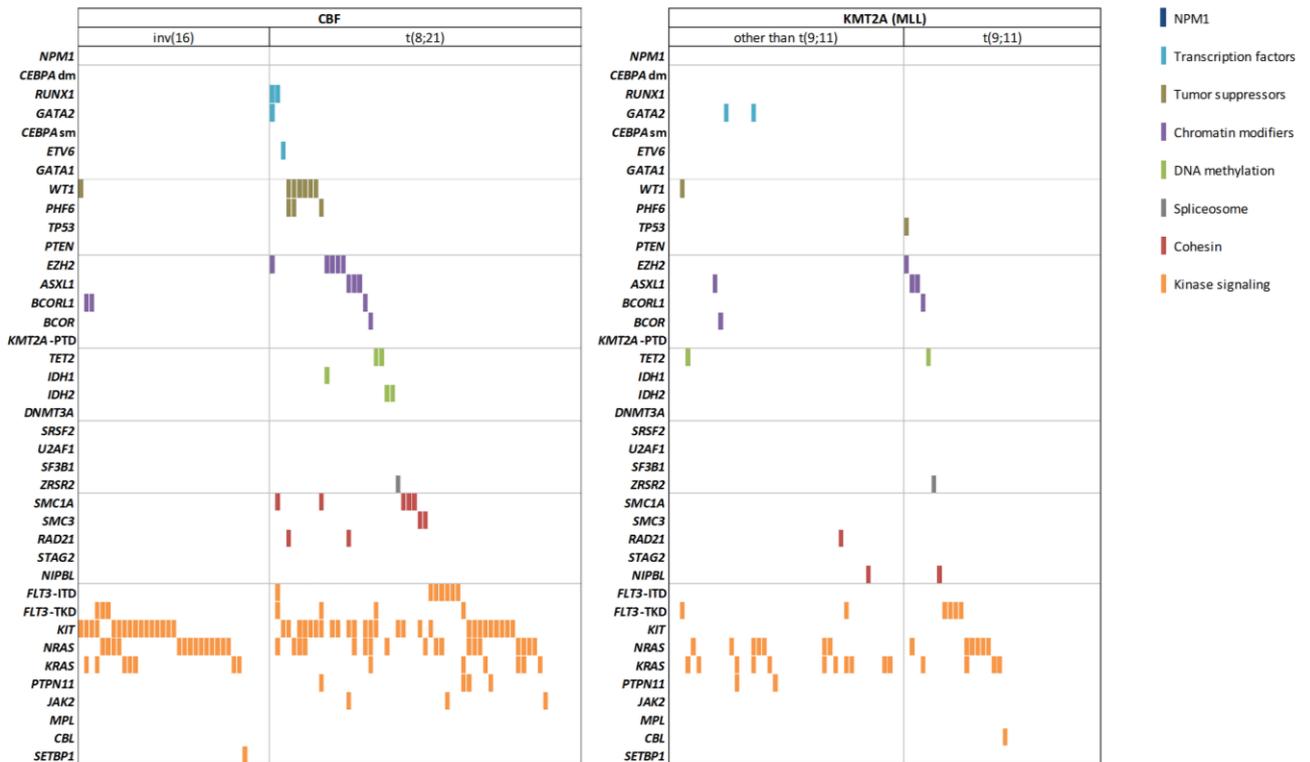


Figure 3. Genomic landscape of childhood AML.

Each column represents the mutation pattern in one individual patient and each colored box represents a gene mutation. Genes are groups in 8 categories (in decreasing order): 1) *NPM1*; 2) Transcription factors; 3) Tumor suppressors; 4) Chromatin modifiers; 5) DNA

methylation; 6) Spliceosome 7) Cohesin complex; 8) Kinase signaling. The first row at the top represents the cytogenetic subgroup for each patient. Patients with *NUP98-NSD1* are distributed among normal karyotype (n=5) and abnormal karyotype “other” (n=4).

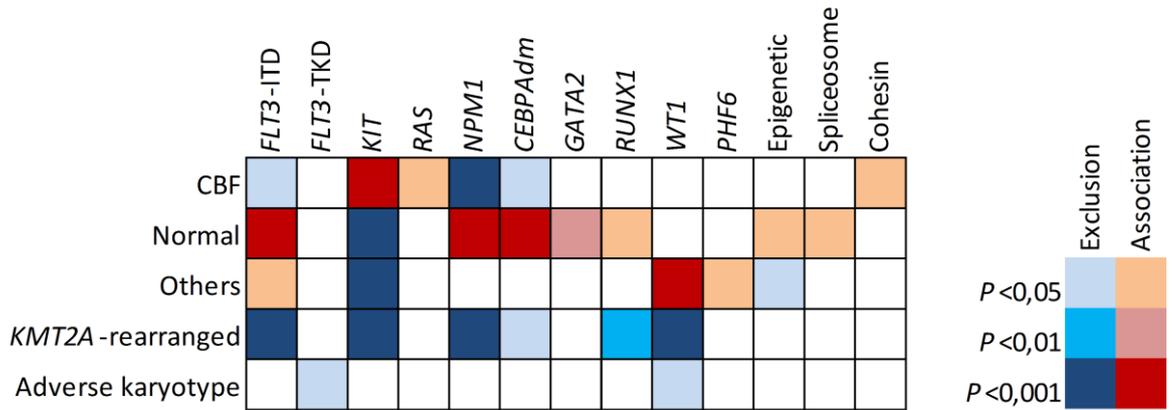


Figure 4. Associations between mutations and cytogenetic subgroups.

Statistical significance was assessed using the Fisher exact test with adjustment with the Benjamini-Hochberg method.

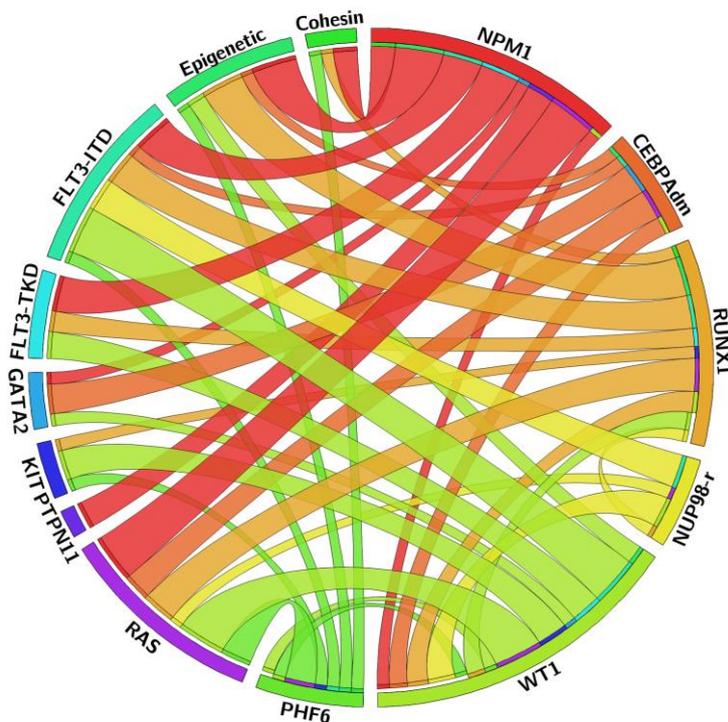


Figure 5. Circos plot diagram illustrating the pairwise co-occurrence of molecular aberrations in childhood AML.

This figure was designed with the Circos online application (circos.ca).

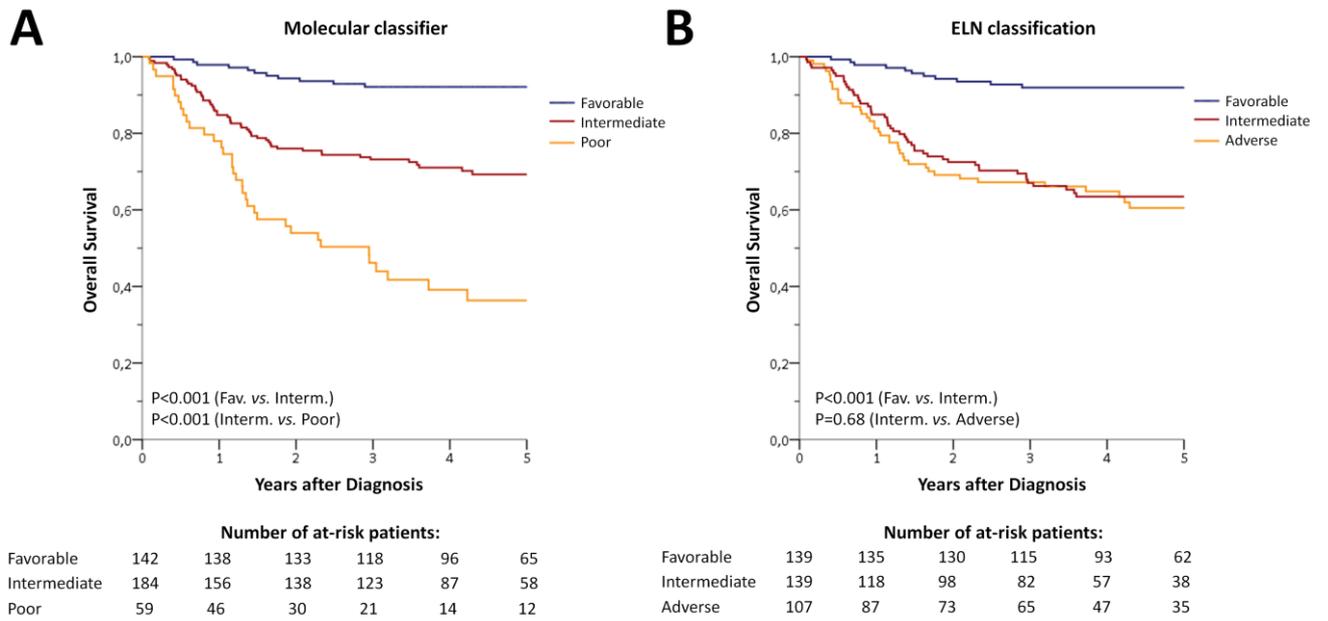


Figure 6. Childhood AML outcome.

(A) Childhood AML outcome according to the molecular classifier. Favorable molecular risk: *RUNX1-RUNX1T1* or *CBFB-MYH11* or *NPM1* mutation or *CEBPAdm*; poor molecular risk: *NUP98* fusion or *RUNX1* or *WT1* or *PHF6* mutation; intermediate molecular risk (all others). (B) Childhood AML outcome according to the 2017 European LeukemiaNet (ELN) classification (21).