

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2017

2017 TOU3 2078

**MEMOIRE DE
DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
Biologie Médicale**

Présenté et soutenu publiquement
par

JUVIN Pierre-Yves

Apport du séquençage de nouvelle génération
dans le diagnostic
de cytopénie(s) inexplicée(s)

12 octobre 2017

Directeur : Pr. Delabesse Eric

JURY

Président :	Pr. Delabesse Eric
1 ^{er} assesseur :	Pr. Sié Pierre
2 ^{ème} assesseur :	Pr. Beyne-Rauzy Odile
3 ^{ème} assesseur :	Dr. De Mas Véronique
4 ^{ème} assesseur :	Dr. Rieu Jean-Baptiste

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 17 février 2017

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIÉ P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospita-Universitaires

M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
M. HOUJIN G.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme GANDIA-MAILLY P. (*)	Pharmacologie	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme BON C.	Biophysique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
Mme SÉRONIE-VIVIEN S.	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A.-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		PEM. PERE D.	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G.	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J.-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A.-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE A.	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELENDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
Mme FONTAN C.	Biophysique
Mme KELLER L.	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Pierre Sié, Professeur Emérite des Universités à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse. Vous me faites l'honneur de juger ce travail . Je vous remercie de votre confiance, de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon mémoire et vous prie d'accepter mes considérations les plus respectueuses.

À Madame la Professeure Odile Beyne-Rauzy, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour le temps que vous avez pris pour répondre à mes questions. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Aux docteurs Véronique DeMas, Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier et Jean-Baptiste Rieu, Praticien Hospitalier, merci encore d'avoir accepté de participer à ce jury et surtout merci pour le savoir que m'avez transmis pendant les longues heures de lecture au microscope et au laboratoire d'hématologie de l'oncopole de Toulouse.

À Monsieur le Professeur Eric DELABESSE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef de service du Laboratoire d'Hématologie au CHU de Toulouse. Je vous remercie de m'avoir permis la réalisation de ce travail en m'encadrant par vos précieux conseils. Vous me faites maintenant l'honneur de le présider, je vous prie d'accepter l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance. Je vous exprime surtout ma plus sincère gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée par le passé et pour le futur !

Je souhaiterais remercier particulièrement Naïs et Stéphanie pour leur précieuse aide sans laquelle ce travail n'aurait pas été possible.

J'ai une pensée sincère pour toutes les personnes que j'ai côtoyées tout au long de cet internat. Les biologistes je vous remercie pour toutes les connaissances transmises. Merci à Frédérique, Sophie, Felipe, Vincent, Jill, François, Erika, Isabelle, Cécile, Mickael du laboratoire d'hématologie de Toulouse. Je n'oublie pas Brigitte, Gilles, Marguerite et Ludovic du CHIC.

Egalement je souhaite associer à ces remerciements tous les techniciens que j'ai rencontrés. J'ai énormément appris grâce à vous tout au long des journées au laboratoire. Votre présence et bonne humeur ont aussi rendu mes gardes de nuit moins pénibles.

A ce travail qui conclut mon internat, je souhaite associer

Inès et Paul, Sam Sam Sam et Adrian, Edouard et Marion, ma petite Cécile. Grâce à vous ma reconversion fut un bonheur. Je ne compte pas les fous rires passés et à venir, je ne compte pas les bons moments, je ne compte pas les formidables week-end, je ne compte pas les dégustations œnologiques, je vous compte simplement comme amis.

Reda. Paragraphe à part pour un homme à part, un homme de parole et de valeur, d'humour et d'intelligence. Ceci n'est pas la fin, l'esprit Coubi animera nos prochaines joutes golfiques pendant encore longtemps.

Camille et Céline. Notre coloc nantaise de Saint-Agne fut formidable. Moi qui croyais ne pas rester, je fus triste de partir ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Camille, la coloc était toujours souriante grâce à ton dynamisme sans faille, à tes innombrables idées d'activités et ta bonne humeur. Merci à toi Céline pour tes Célinades, tes french cancan, la visite de Montségur, et la joie que tu donnes (si si je t'assure). Enfin comment oublier Julienggg, toujours au top, toujours partant, toujours aveyronnais, toujours au plus près de canard, toujours mon partenaire de raclées au Taboo.

Marine. On se voit trop peu. Notre petite échoppe bordelaise fut le lieu de nombreuses soirées mais ce fut pour moi l'occasion de découvrir une personnalité extraordinaire, généreuse, pugnace, infatigable. Je n'oublierai jamais la soirée que tu avais organisée pour mon départ. Merci !

Gabriel, merci pour ces thés à la menthe à refaire le monde au bord de la piscine. Vivement ton retour pour continuer nos élucubrations. Angèle, merci pour ta bonne humeur, tes idées découvertes (les jacobins, c'est toi !), nous avons encore beaucoup de choses à découvrir dans la région.

Les Castrais je pense à vous. Chloé, Marine, Fanny, Jonathan, Emilie, Stéphanie, et Marion. Que de rires dans nos repas à Gourjade ou à Toulouse.

Et tous les autres, pêle mêle Claire, Thierry, Romain, Jessica, Romain, Momo, Nicolas, JiBizz, Etienne, Hélène, Hadrien, Morgane et Manu (a qué si si), Camille, Raphaëlle, Louis Thomas, Barnabé, Agnès, Laurie, Carole, Elodie, Anthony, Cédric, Damien et tous ceux que j'ai oubliés

Anjani, je te remercie de tolérer mon intolérance, d'avoir la patience de supporter mon impatience, d'être un soutien sans faille, de m'accompagner dans mes goûts farfelus,

d'accepter mes idées saugrenues... merci de m'accepter tel que je suis. L'amour nous a procuré de beaux moments, il nous réserve encore le meilleur...

TABLE DES MATIERES

1. Généralités.....	12
1.1 Un peu d'histoire.....	12
1.2 Contextes	15
1.2.1 Contexte technologique.....	15
1.2.2 Contexte scientifique.....	16
1.3 Rationnel de l'étude – Concept de cytopénie(s) clonale(s).....	18
1.3.1 Physiopathologie de l'hémopathie myéloïde	18
1.3.2 Les difficultés du diagnostic de Syndrome Myélodysplasique (SMD).....	20
1.3.2.1 La définition OMS d'un syndrome myélodysplasique.....	20
1.3.2.2 L'évaluation de la dysplasie	20
1.3.2.3 Cytogénétique des syndromes myélodysplasiques.....	23
1.4 Objectif de l'étude.....	24
2 Méthode	25
2.1 Séquençage nouvelle génération.....	25
2.1.1 Préparation de la librairie.....	25
2.1.1.1 Obtention de l'ADN de patient	25
2.1.1.2 Préparation de la librairie	25
2.1.2 Séquençage par synthèse.....	28
2.1.2.1 Génération de cluster	28
2.1.2.2 Séquençage.....	30
2.1.3 Analyse des données.....	31
2.1.3.1 Qualité du séquençage.....	31
2.1.3.2 Alignement.....	33
2.1.3.3 Variant de séquence : quelle interprétation ?.....	34
2.1.3.4 Conséquence des substitutions	35
2.1.3.5 Conséquence des insertions et/ou délétions.....	36
2.1.3.6 Interprétation de données	36
2.1.3.7 Fréquence allélique d'un variant - Variant Allelic Frequency (VAF). 38	
2.2 Cohorte de patients.....	38
2.3 Gènes étudiés.....	39
3 Résultats.....	42
3.1 Population	42
3.2 Cytopénies.....	42

3.3 Cytologie	46
3.4 Anomalies cytogénétiques	46
3.5 Variants.....	47
3.6 Analyse	49
3.6.1 Caractéristiques générales.....	49
3.6.2 Cytopénies et variants.....	50
3.6.3 Dysplasie et variants	51
3.6.4 Critères OMS et variants.....	52
3.6.5 Analyse des variants	53
3.6.6 Evolution des cytopénies	53
4 Discussion.....	55
4.1 Cytopénies et variants	55
4.2 Dysplasie et variants	55
4.3 Profil des variants	57
4.4 Age et variant.....	61
4.5 Aspect médico-économique	63
4.5.1 Aspect économique.....	63
4.5.2 Prise en charge clinique.....	63
5 Conclusion	65
Annexes	66
Bibliographie	75

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Classification des syndromes myélodysplasiques selon l'association French-American-British 1982	13
Tableau 2 Classification générale des syndromes myélodysplasiques selon OMS 2016 ⁷	14
Tableau 3 Résumé des critères OMS 2016 pour le diagnostic d'un syndrome myélodysplasique	17
Tableau 4 Liste des dysplasies selon OMS 2016.....	21
Tableau 5 Anomalies récurrentes et leur fréquence au diagnostic de SMD (OMS 2016)	23
Tableau 6 PHRED score	32
Tableau 7 Liste des gènes séquencés	41
Tableau 8 Répartition des cytopénies	44
Tableau 9 Valeurs des cytopénies.....	44
Tableau 10 Caractéristiques générales des patients mutés.....	47
Tableau 11 Variants retrouvés et VAF correspondante	48
Tableau 12 Comparaison des patients mutés vs non mutés en fonction de l'âge et du sexe	49
Tableau 13 Comparaison des patients mutés vs non mutés en fonction des cytopénies	50
Tableau 14 Comparaison du nombre de cytopénie(s) VS la présence de variant(s) .	50
Tableau 15 Etude de la présence d'anémie VS la présence de variant(s).....	50
Tableau 16 Etude de la présence de thrombopénie VS la présence de variant(s)	50
Tableau 17 Tableau de contingence variant(s) VS dysplasie	51
Tableau 18 Principales causes de Dysérythropoïèse.....	51
Tableau 19 Tableau de contingence variant (s) VS dysplasie.....	52
Tableau 20 Tableau de contingence variants VS critères OMS biologiques.....	52
Tableau 21 Tableau de contingence variants VS critères OMS	52
Tableau 22 Tableau comparatif de 3 études sur la corrélation entre la dysplasie et la présence de variant(s).....	56
Tableau 23 Principaux variants des SMD, leur fréquence et leur importance.....	59
Tableau 24 Comparatif des études ayant évalué la présence de variants chez les ICUS.....	61

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Coût du séquençage du génome humain depuis 2001	16
Figure 2 Modèle de leucémogénèse des SMD et évolution vers la leucémie aiguë myéloïde ¹⁶	19
Figure 3 Exemples de dysplasie (Images tirées de Cazzola et al. ¹⁸).....	22
Figure 4 Obtention de cellules mononuclées médullaires.....	25
Figure 5 Hybridation, capture et amplification	27
Figure 6 Détails d'une amorce pour la technique Haloplex HS d'Agilent.....	28
Figure 7 Description d'une flow-cell	29
Figure 8 Hybridation et génération d'un cluster	29
Figure 9 Génération d'un cluster.....	30
Figure 10 Séquençage par synthèse ²⁴	31
Figure 11 Lecture en 2 temps ou séquençage "pair ended"	31
Figure 12 Signal optique obtenu par fragment séquencé issu à titre d'exemple de séquençage Sanger	32
Figure 13 Exemple d'alignement.....	33
Figure 14 Principe de couverture et de profondeur	34
Figure 15 Nombre de patients en fonction de l'anomalie moléculaire ou cytogénétique retrouvée.....	39
Figure 16 Répartition de la population selon le sexe et l'âge.....	42
Figure 17 Taux d'hémoglobine, de plaquettes et de neutrophiles des patients inclus	43
Figure 18 Cytopénies des patients inclus.....	45
Figure 19 Répartition des dysplasies.....	46
Figure 20 Fréquence des variants.....	47
Figure 21 Fréquence allélique des variants.....	49
Figure 22 Risque d'évolution du ICUS vers une hémopathie myéloïde en fonction du profil mutationnel ¹³	60
Figure 23 Fréquence de l'hématopoïèse clonale en fonction de l'âge.....	62

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

LAM : Leucémie aiguë myéloïde
FAB : French American British
OMS : Organisation mondiale de la santé
GFM : Groupe francophone des myélodysplasies
SMD : Syndrome myélodysplasique
ICUS : Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance
ADN : Acide désoxyribonucléique
NGS : Next Generation Sequencing
CHIP : Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential
CCUS : Clonal Cytopenia of Undetermined Significance
PCR : Polymerase Chain Reaction
VAF : Fraction Allélique du Variant
HbS : Hémoglobine S
HGVS : Human genome Variant Society
SNP : Single Nucleotide Polymorphsim
NCBI : National Center for Biotechnology and Information
NHGRI : National Human Genome Research Institute
ExAC : Exome Aggregation Consortium.
COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
JAK2: Janus kinase 2
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

1. Généralités

1.1 Un peu d'histoire

Dans les années 1920-1930, est identifié le rôle clef de la nutrition dans la genèse de certaines anémies. Les carences en fer, folates et vitamine B12 sont alors traitées par supplémentation en vitamines correspondantes. Cependant, les médecins s'aperçoivent non seulement qu'un nombre significatif d'anémies est résistant au traitement, mais que ces patients présentent des taux vitaminiques normaux. En 1938, Rhoads & Barker¹ introduisent le concept d'anémie réfractaire. Par la suite, les chercheurs se rendent compte que ces anémies réfractaires précèdent de façon plus ou moins chronique de nombreuses leucémies aiguës myéloïdes (LAM). En 1949, Hamilton & Paterson¹ suggèrent qu'un même facteur est responsable à la fois des cytopénies réfractaires et du développement d'une LAM. La notion de stade pré-leucémique est née, mais il reste à déterminer le facteur responsable de l'état pré-leucémique. En 1956, Bjorkman² décrit la présence de sidéroblastes dans la moelle osseuse des patients atteints d'anémie réfractaire. A peine 10 ans plus tard, en 1965, Dameshek³ émet l'hypothèse qu'une anémie réfractaire avec présence de sidéroblastes est un état néoplasique qui peut entraîner la survenue d'une LAM. Enfin, en 1973, suite à l'étude de centaines de cas, Saarni & Linman⁴ établissent un cadre assez précis de l'état pré-leucémique. Malgré des signes cliniques peu spécifiques (anémie, troubles de l'hémostase etc.), ces chercheurs ont identifié des anomalies morphologiques récurrentes des cellules hématologiques associées à l'état pré-leucémique. Les globules rouges présentent dans le sang une anisopoïkilocytose pendant que leurs précurseurs médullaires (érythroblastes) montrent différentes anomalies à titre d'asynchronisme de maturation, érythroblastes multi nucléés. Les polynucléaires neutrophiles possèdent des anomalies de segmentation et/ou de dégranulation. Les plaquettes sont anisocytaires avec des formes « macro » et les mégacaryocytes sont unilobés ou à noyaux séparés. Les bases de la dysplasie étaient nées.

En 1982, la French-American- British Cooperative group (F.A.B.) remplace la notion de stade pré-leucémique par la notion de syndrome myélodysplasique (SMD) car le terme pré-leucémie fut largement critiqué puisqu'il implique une évolution vers une leucémie aigüe malgré l'absence d'une telle issue dans de nombreux cas. La classification FAB des myélodysplasies regroupe alors 5 entités classées en fonction du nombre de blastes, de la présence de corps d'Auer, du taux de sidéroblastes en couronne et de la monocytose⁵. Les cinq pathologies classées en syndrome myélodysplasique furent donc, l'anémie réfractaire, l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne, l'anémie réfractaire avec excès de blastes, la leucémie myélo-monocytaire chronique et l'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (Tableau 1).

SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES	SANG PERIPHERIQUE	MOELLE OSSEUSE
Anémie réfractaire	Blastes ≤ 1%	Hyperplasie érythroïde +/- dysérythropoïèse Blastes ≤ 5%
Anémie réfractaire avec plus de 15% de sidéroblastes en couronne	Blastes ≤ 1%	Hyperplasie érythroïde +/- dysérythropoïèse Blastes ≤ 5% Sidéroblastes en couronne ≥15%
Anémie réfractaire avec excès de blastes	Blastes ≤ 5%	Dysgranulopoïèse +/- dysmegacaryopoïèse +/- dysérythropoïèse Blastes 5-20%
Anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation	Blastes ≥ 5%	Blastes 20-30% Présence de corps d'Auer
Leucémie myélo-monocytaire chronique	Monocytes ≥ 1x10 ⁹ /L Blastes ≤ 5% Dysgranulopoïèse présente ou absente	Promonocytes présents mais inférieurs à 5% du compte des blastes Blastes 5-20%

Tableau 1 Classification des syndromes myélodysplasiques selon l'association French-American-British 1982

Cette classification fut rapidement critiquée pour son côté surtout diagnostique et très peu pronostique car ne tenant pas compte des avancées de la recherche cytogénétique dans les syndromes myélodysplasiques. En effet, dès 1981, Yunis et al. ⁶ ont souhaité poursuivre les investigations au-delà des anomalies morphologiques en étudiant leurs anomalies cytogénétiques. C'est ainsi qu'ont été découvertes dans ces syndromes les récurrences des anomalies cytogénétiques telles que la délétion du bras long du chromosome 5 (del 5q), la monosomie du chromosome 7, la trisomie du chromosome 8 etc. C'est donc dans ce sens que l'organisation mondiale de la santé (OMS) a régulièrement révisé depuis 1999 la classification des myélodysplasies pour tenir compte des dernières connaissances cytologiques, morphologiques et cytogénétiques. La dernière révision de la classification OMS date de 2016 (Tableau 2).

TYPES DE SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES (SMD)
SMD avec dysplasie uni-lignée
SMD avec sidéroblastes en couronne (SMD-RS)
- SMD-RS et dysplasie uni-lignée
- SMD-RS et dysplasie multi-lignées
SMD avec dysplasie multi-lignées
SMD avec excès de blastes
SMD avec del(5q) isolée
SMD non classable
<i>Entité provisoire : Cytopénie réfractaire de l'enfance</i>

Tableau 2 Classification générale des syndromes myélodysplasiques selon OMS 2016⁷

Bien que chaque révision reprenne l'état de l'art pour utiliser les dernières avancées scientifiques afin de caractériser au mieux les myélodysplasies, il existe toujours une catégorie de SMD non classable (Tableau 2) et ce malgré les récentes données de biologie moléculaire.

Les données de biologie moléculaire accumulées jusqu'à ce jour n'offrent pas encore assez de recul bien que certains groupes experts commencent à les intégrer dans leur réflexion comme par exemple le Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM) dans son Consensus Français sur les syndromes myélodysplasiques et la leucémie myélomonocytaire chronique, diagnostic, classifications et traitement (mise à jour 2015)⁸. Il existe un réel besoin d'améliorer nos connaissances pour mieux caractériser ces SMD inclassables et aider le clinicien. Parmi ces SMD inclassables, une catégorie « basée sur une anomalie cytogénétique » n'existe que par la présence de cytopénie(s) associée(s) à au moins une anomalie caractéristique au caryotype sans autre anormalité. Sachant qu' environ 50% des SMD ont un caryotype normal⁹, il existe donc une grande part des SMD dont le diagnostic ne se fait que sur la présence d'une dysplasie. Celle-ci est déterminée par le cytologiste et son évaluation peut parfois présenter de réelles difficultés. Ainsi, il est évident qu'émerge rapidement une population brièvement décrite à ce jour par la classification OMS 2008 : les cytopénies chroniques sans étiologie, sans dysplasie franche et sans anomalie cytogénétique caractéristique qui ne peuvent être étiquetées syndrome myélodysplasique : les ICUS pour Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance¹⁰. L'objet de ce travail est d'utiliser les avancées de la biologie moléculaire pour participer à une meilleure caractérisation de ces cytopénies inexplicables (ICUS). Cette étude résulte de la conjonction de contextes technologique et clinique.

1.2 Contextes

1.2.1 Contexte technologique

Un variant de l'ADN se définit par le changement de la séquence de base(s) par rapport à une séquence de référence résultant d'une substitution, d'une délétion ou d'une insertion d'une base ou résultant d'un réarrangement de plus larges sections de gènes ou de chromosomes entre eux. Pour détecter un variant de façon précise, il est donc nécessaire :

- de déterminer l'ordre précis d'enchaînement des bases d'un gène, c'est le séquençage ;
- de connaître la séquence « normale » d'un gène.

Depuis la fin des années 1970, le séquençage des acides nucléiques est réalisé par la méthode Sanger qui ne sera pas détaillée dans ce travail. C'est par cette méthode qu'un consortium international, le « Human Genome Project », a réalisé le séquençage du génome humain entier. Ce projet a débuté en 1990 et a été achevé en 2003¹ pour un coût global de près de 3 milliards de dollars.

Cette méthode présente un faible rendement, possède un coût élevé à la base séquencée et ne permet pas de générer un nombre important de séquences. Les progrès technologiques ont permis l'apparition de nouveaux séquenceurs pour entrer dans l'ère du séquençage de nouvelle génération (NGS). Depuis une petite dizaine d'années les séquenceurs de nouvelle génération ont envahi le marché mondial avec l'apparition de "modèles de paillasses", à coût plus faible permettant à de plus en plus de laboratoires d'offrir un service de séquençage. La possibilité de séquencer massivement, rapidement et à faible coût a considérablement bouleversé le monde de la recherche. Le prix du séquençage du génome humain atteint désormais 1000 dollars, et la diminution des prix ne semble pas terminée (Figure 1).

¹ <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/hgp/description> Site internet au 18 Mai 2017

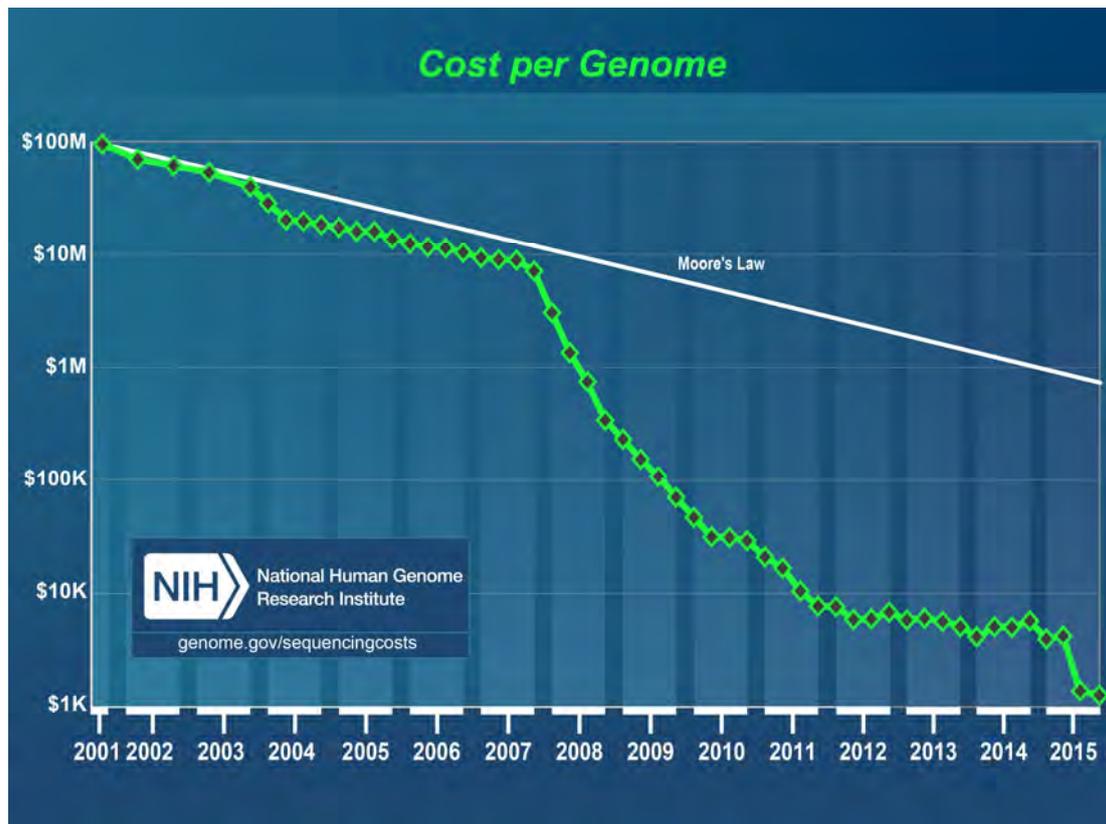


Figure 1 Coût du séquençage du génome humain depuis 2001²

Cet essor technologique a surtout permis de considérablement augmenter nos connaissances sur le génome humain. Cela a permis de découvrir de nouveaux gènes, de faire de la prédiction de fonctions, de mieux comprendre les voies de signalisation et métaboliques. On estime aujourd'hui que le génome humain est composé d'environ 20 000 gènes codant et que cela représente seulement 1 à 3 % du génome total ¹¹.

Cependant, cette accumulation de données facilement accessibles présente un enjeu de taille : l'analyse des données générées. Celle-ci requiert de puissants logiciels bio-informatiques et une grande expertise. En conséquence, à l'heure actuelle, l'analyse du génome entier ne peut se faire en routine dans un laboratoire mais pour répondre à une problématique donnée, il est possible de relativement rapidement séquencer des dizaines de gènes. Dans ce travail, une quarantaine de gènes mutés de manière récurrente dans les SMD et LAM sont séquencés.

1.2.2 Contexte scientifique

En 2004, une étude de Guralnik et al. ¹² réalisée au Etats-Unis a montré qu' approximativement 10% de la population des plus de 65 ans était anémique. Environ un tiers des anémies s'expliquent par des carences nutritionnelles, un second tiers s'explique par la

² https://www.genome.gov/images/content/costpergenome2015_4.jpg- Site internet au 03 Mai 2017

présence d'une insuffisance rénale et/ou d'une pathologie inflammatoire chronique et le dernier tiers regroupe toutes les autres causes plus ou moins évidentes dont les syndromes myélodysplasiques. Selon cette étude, les SMD représentent environ 5 à 6% des anémies du sujet de plus de 65 ans. Si l'on généralise aux cytopénies, dont l'anémie est la plus grande représentante en terme de fréquence, une cytopénie sans étiologie évidente aboutit relativement fréquemment à la réalisation d'un myélogramme pour exploration. Cependant, selon Kwok et al. ⁹, seulement 8 à 16% des myélogrammes réalisés pour exploration de cytopénies inexpliquées permettent d'affirmer le diagnostic de SMD selon les critères OMS 2016. Il reste donc encore au moins 80% des cytopénies inexpliquées malgré l'analyse cytologique et cytogénétique de la moelle osseuse. Le diagnostic de SMD n'est pas chose facile.

Comme l'indique le Tableau 3, il faut selon l'OMS 2016 un critère cytologique et/ou cytogénétique pour conclure à un SMD (à l'exception de la présence de la mutation *SF3B1*). En pratique, la dysplasie est évaluée microscopiquement et peut parfois être sujette à des interprétations différentes selon le cytologiste, aussi bien en termes de quantité que de qualité. Or, comme 50% des SMD sont diagnostiqués uniquement sur la présence de dysplasie car le caryotype est normal, cela explique la difficulté de poser le diagnostic de SMD dans de nombreux cas. Au sein d'une large étude, Malcovati et al. ¹³ ont observé que 56% de syndromes myélodysplasiques dont le diagnostic avait été fait uniquement sur une dysplasie comprise entre 10 et 25% ne progressaient pas dans le temps et ne présentaient aucune mutation de gène fréquemment impliqué dans les hémopathies myéloïdes. Pour ces auteurs, cela est un indice que le diagnostic de SMD peut être posé à tort malgré la présence de critères OMS.

CYTOPENIE(S) CHRONIQUE(S)	CYTOLOGIE (DYSPLASIE ≥ 10%)	CYTOGENETIQUE	DIAGNOSTIC
+	+	+	SMD
+	+	-	SMD
+	-	+	SMD
+	-	-	ICUS

Tableau 3 Résumé des critères OMS 2016 pour le diagnostic d'un syndrome myélodysplasique

En 2013, Papaemmanuil et al. ¹⁴ ont montré qu'au moins 80% des SMD avérés présentent une mutation sur un gène impliqué dans l'hématopoïèse. Ces résultats ouvrent la voie à une nouvelle approche. La recherche de mutations par biologie moléculaire pourrait être un outil supplémentaire au diagnostic des SMD. Ainsi, il est légitime de penser qu'un certain nombre de patients présentant une (des) cytopénie(s) chronique(s) inexpliquée(s) possède au moins une mutation fréquemment retrouvée dans les SMD non détectable par les techniques

classiques reconnues par l'OMS. Cargo et al.¹⁵ ont montré chez 69 patients ayant développé un SMD ou LAM, que la recherche d'anomalies moléculaires à un stade antérieur où la moelle n'était pas contributive par technique conventionnelle (cytologie et cytogénétique), permettait d'identifier des mutations dans 91% des cas. Cela suggère que la détection précoce de ces anomalies comme un marqueur intéressant d'évolution vers une hémopathie myéloïde. Malcovati et al. ont d'ailleurs montré que la présence de variants chez les patients présentant une ICUS augmentait très fortement la probabilité de progression vers une hémopathie myéloïde dans les 5 à 10 années suivantes¹³.

Si tel est le cas, sans pour autant permettre de porter le diagnostic de SMD en 2017, la présence d'une mutation apporterait un argument de clonalité pour une meilleure prise en charge. Egalement, cela participe à l'accumulation de données pour l'intégration de la biologie moléculaire dans la classification OMS des SMD. C'est d'ailleurs ainsi que le GFM le formule dans sa mise à jour de 2015. Dans les recommandations de niveau 3 du diagnostic de SMD, le GFM préconise la recherche de mutations somatiques par des examens spécialisés dont l'intérêt pour le diagnostic et la prise en charge restent en général à confirmer. Malgré tout, le GFM souligne que : « dans de rares cas, où la morphologie ne permet pas formellement le diagnostic de SMD, et où le caryotype est normal, la découverte d'au moins 2 mutations oriente vers le diagnostic de SMD dans un contexte évocateur. La présence de mutations n'intervient pas encore de façon déterminante dans la décision thérapeutique en routine mais la situation pourrait évoluer rapidement dans les années qui viennent».

1.3 Rationnel de l'étude – Concept de cytopénie(s) clonale(s)

1.3.1 Physiopathologie de l'hémopathie myéloïde

Le modèle de leucémogénèse en plusieurs étapes s'applique aux hémopathies myéloïdes (Figure 2). La cellule souche hématopoïétique normale acquiert successivement des anomalies génétiques aboutissant à la transformation maligne et à l'expansion clonale. La mutation initiale de la cellule souche, causée par des toxiques chimiques, des radiations ionisantes ou par mutation endogène aléatoire, conduit à des anomalies de la différenciation des progéniteurs myéloïdes associées à une augmentation de l'apoptose, ce qui se traduit par une insuffisance médullaire responsable des cytopénies périphériques. Ce premier clone myélodysplasique peut ensuite acquérir d'autres anomalies génétiques touchant le contrôle du cycle cellulaire ou des facteurs de transcription affectant la prolifération des cellules myéloïdes et conduisant à l'expansion clonale du contingent cellulaire anormal par avantage prolifératif. Enfin, l'instabilité génétique du clone favorise l'apparition d'anomalies génétiques additionnelles précipitant l'évolution vers le syndrome myélodysplasique puis la leucémie aiguë, avec un blocage de la différenciation cellulaire à un stade précoce de maturation.

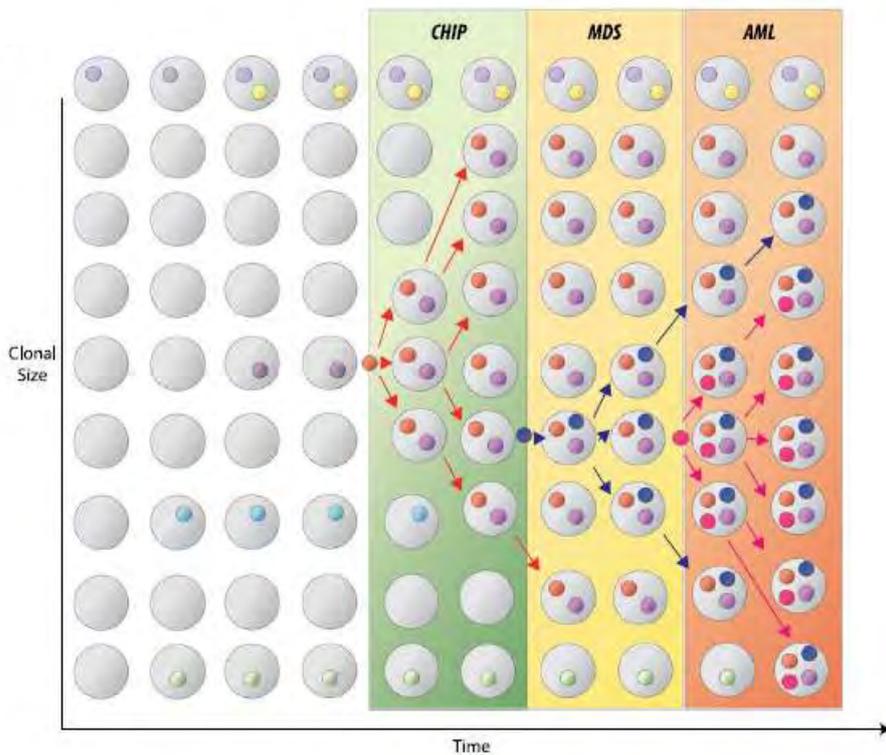


Figure 2 Modèle de leucémogénèse des SMD et évolution vers la leucémie aiguë myéloïde ¹⁶

Comme l'indique la Figure 2, une nouvelle entité antérieure au stade du syndrome myélodysplasique est créée : CHIP pour « Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential » ou hématoïèse clonale de signification indéterminée. Cela correspond à une population d'individus présentant une mutation somatique associée à une hémopathie mais sans aucun critère actuel justifiant le diagnostic d'hémopathie ¹⁶. En pratique, la recherche de CHIP ne pouvant se faire chez tous les patients, Kwok et al. ⁹ ont montré que la présence de variants était élevée chez les patients présentant une ICUS. Ce sont les cytopénies clonales de signification indéterminée (CCUS). Cette entité est particulièrement intéressante car la biologie moléculaire permet d'apporter un argument de clonalité dans une situation encore aujourd'hui souvent sans réponse pour le clinicien.

Ces données tendent à démontrer l'importance de la recherche de mutation(s) par séquençage chez les patients porteurs de cytopénies inexplicables et ce même en l'absence de diagnostic de SMD afin de documenter une clonalité.

1.3.2 Les difficultés du diagnostic de Syndrome Myélodysplasique (SMD)

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique n'est pas toujours facile à poser. En effet, celui-ci répond à des critères précis qui laissent encore un certain nombre de situations cliniques sans cadre.

1.3.2.1 La définition OMS d'un syndrome myélodysplasique

Le syndrome myélodysplasique est un groupe de maladie défini par une anomalie clonale de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par une (des) cytopénie(s) associée(s) ou non à de la dysplasie uni ou multi-lignée(s), une hématopoïèse inefficace, une apoptose accentuée et un risque accru de développement vers la leucémie aiguë myéloïde. Les cytopénies sont définies par :

- Anémie : hémoglobine < 10 g/dL
- Numération des neutrophiles : < $1,8 \times 10^9/L$
- Thrombopénie : plaquettes < $100 \times 10^9/L$

Cependant en France, l'anémie est définie par un seuil d'hémoglobine < 13 g/dL chez l'homme et < 12 g/dL chez la femme, la neutropénie est définie par une valeur absolue des neutrophiles < 1,5 G/L et une thrombopénie est définie par un taux de plaquettes < 150 G/L.¹⁷

Les seuils ne sont donc pas les mêmes et ouvrent la voie à des zones d'ombre. En effet, comment doit être considérée par exemple une anémie à 11 g/dL ? En France un taux de neutrophiles à 1,6 G/L est considéré comme normal et n'entraînera pas d'exploration.

Pour parer à toute éventualité, l'OMS laisse au final la décision du diagnostic de SMD au médecin, même si les valeurs des cytopénies du patient sont supérieures à celle préconisées.

1.3.2.2 L'évaluation de la dysplasie

La dysplasie est évaluée sur frottis médullaire par un cytologiste. Les 3 lignées érythrocytaire, granuleuse et mégacaryocytaire sont étudiées. Pour retenir une dysplasie, celle-ci doit être présente au moins dans 10% des cellules de la lignée.

Les dysplasies reconnues par l'OMS sont décrites dans le Tableau 4.

DYSERYTHROPOÏÈSE	DYSGRANULOÏÈSE	DYSMEGACARYOÏÈSE
<ul style="list-style-type: none"> - Anomalie de dénucléation - Pont internucléaire - Karyorrhesis - Noyaux multiples - Présence de mégaloblastes - Présence de sidéoblastes en couronne - Vacuolisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Taille anormalement grande ou petite - Hypolobulation (anomalie de pseudo Pelger-Huet) - Hypersegmentation - Dégranulation - Corps d'Auer 	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de micromégacaryocytes - Hypolobulation - Mégacaryocytes à noyaux séparés

Tableau 4 Liste des dysplasies selon OMS 2016

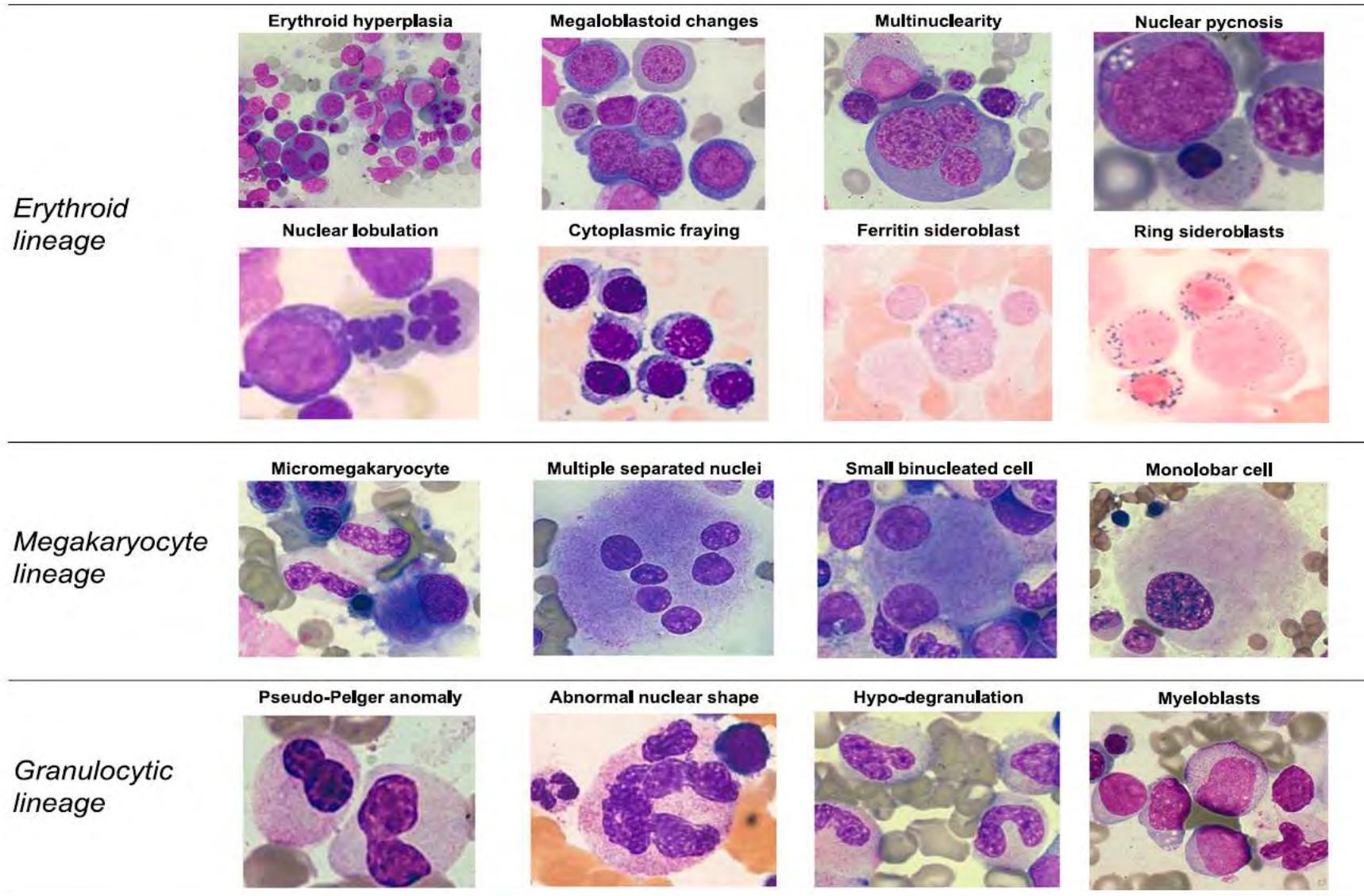


Figure 3 Exemples de dysplasie (Images tirées de Cazzola et al. ¹⁸)

Malgré des définitions précises, la dysplasie est évaluée par un cytologiste et l'appréciation peut parfois être sujette à interprétation aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif selon de nombreux facteurs dont la qualité du frottis médullaire. Aussi, une dysplasie n'est pas toujours une évidence de clonalité. De nombreux médicaments (cotrimoxazole, facteurs de croissance etc.), des carences nutritionnelles, des expositions aux métaux lourds etc. peuvent aussi induire une dysplasie cellulaire.

Par ailleurs des études ont montré :

- Une faible reproductibilité dans l'évaluation de la dysplasie entre différents cytologistes ¹⁹ ;
- La présence de dysplasie parfois significative chez des patients sains ²⁰ ;
- Une plus grande significativité de la dysgranulopoïèse et de la dysmégacaryopoïèse que de la dysérythropoïèse ²¹ ;
- Un seuil de 10% non discriminant conduisant à proposer d'autres seuils ²².

1.3.2.3 Cytogénétique des syndromes myélodysplasiques

L'analyse cytogénétique apporte un argument de clonalité présent dans la définition OMS. Le Tableau 5 présente les anomalies cytogénétiques décrites par l'OMS.

ANOMALIE	FREQUENCE
Non Equilibrée	
+8*	10%
-7 ou del(7q)	10%
-5 ou del(5q)	10%
del (20q)*	5-8%
-Y*	5%
i(17q) ou t(17p)	3-5%
-13 ou del (13q)	3%
del (11q)	3%
del(12p) ou t(12p)	3%
del (9q)	1-2%
idic(X)(q13)	1-2%
Equilibrée	
t(11 ;16)(q23;p13.3)	3%**
t(3 ;21)(q26.2;q22.1)	2%**
t(1 ;3)(p36.3;q21.2)	1%
t(2 ;11)(p21;q23)	1%
Inv(3)(q21q26.2)	1%
t(6 ;9)(p23;q34)	1%

Tableau 5 Anomalies récurrentes et leur fréquence au diagnostic de SMD (OMS 2016)

*la présence de ces anomalies isolées ne suffit pas au diagnostic de SMD

** anomalies retrouvées dans les SMD post chimiothérapie

Certaines anomalies cytogénétiques sont associées à une dysplasie. Une délétion 5q isolée est souvent caractérisée par la présence de mégacaryocyte unilobé. Une délétion 17p est régulièrement associée à une anomalie pseudo Pelger-Huët. Les anomalies cytogénétiques présentes dans le tableau, à l'exception de la trisomie 8, la délétion 20q et la monosomie Y, sont suffisantes à elles seules pour poser le diagnostic de syndrome myélodysplasique même en l'absence de signe morphologique. Cependant les anomalies cytogénétiques ne sont présentes que dans 50% des cas avérés de SMD.

1.4 Objectif de l'étude

Cette première partie a mis en lumière une entité brièvement décrite par l'OMS : les cytopénies chroniques inexplicées (ICUS). Celles-ci sont inexplicées car la cytogénétique n'apporte pas d'argument de clonalité (50% des cas) et la dysplasie est non significative. Compte tenu des récentes avancées scientifiques et techniques, ce travail a pour objectif d'évaluer l'apport du séquençage nouvelle génération sur l'analyse des cytopénies inexplicées afin d'apporter ou non un argument de clonalité chez les patients ICUS. Autrement dit, le but est de rechercher une CHIP chez les patients ICUS afin de mettre en évidence une CCUS dont l'évolution vers une hémopathie est mise en évidence par différentes études ^{13 23}. Le résultat permettra au clinicien soit de poursuivre les recherches d'autres étiologies ou alors d'organiser un suivi plus rapproché si une mutation est détectée.

2 Méthode

2.1 Séquençage nouvelle génération

Le séquençage de nouvelle génération comporte essentiellement 3 étapes principales :

- transformation de l'ADN afin de lui permettre de se fixer sur le support de séquençage et enrichissement des régions d'intérêts. C'est la préparation de la librairie.
- incorporation des bases complémentaires du brin d'ADN à séquencer.
- analyse et interprétation des données.

2.1.1 Préparation de la librairie

2.1.1.1 Obtention de l'ADN de patient

Le séquençage se réalise sur l'ADN des cellules mononuclées médullaires des patients. La moelle est un support intéressant car elle contient de nombreux précurseurs hématopoïétiques qui ne sont pas encore entrés dans la voie de l'apoptose et possèdent encore les mutations recherchées. La Figure 4 résume le mode d'obtention des cellules mononuclées médullaires.

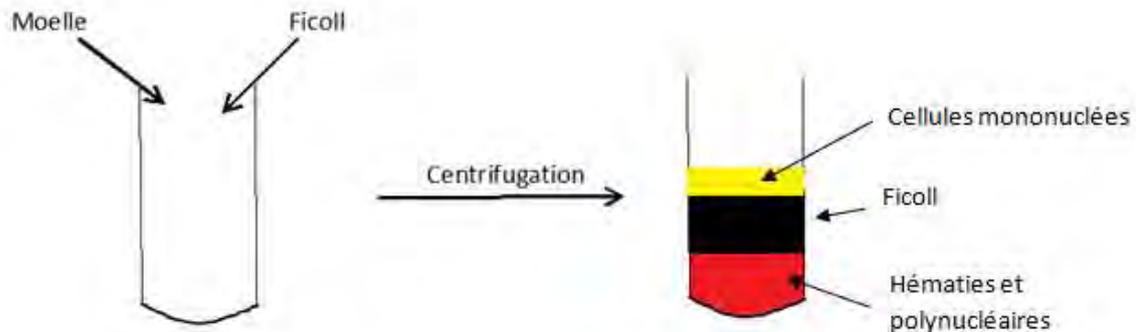


Figure 4 Obtention de cellules mononuclées médullaires

Les cellules mononuclées sont ensuite lysées afin que l'ADN soit libéré du noyau puis précipite en présence d'éthanol.

2.1.1.2 Préparation de la librairie

La librairie constitue l'ensemble des fragments d'intérêts à séquencer. Il existe plusieurs technologies afin de préparer la librairie :

- la librairie par capture par hybridation en solution. Cela consiste à hybrider l'ADN à des sondes marquées couvrant la région cible puis à laver pour éliminer l'ADN non marqué ;
- la librairie par amplicon. Cela consiste à amplifier les régions d'intérêts par PCR.

Au laboratoire d'hématologie de Toulouse, une technique par hybridation est utilisée : la technique Haloplex d'Agilent.

Fragmentation

La première étape de préparation de la librairie comprend une fragmentation de l'ADN génomique total de chaque patient, par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Ce sont des enzymes qui coupent un double brin d'ADN en un point précis. Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens 5' à 3' pour le second brin. Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases. (Exemple d'une séquence palindromique : GATC). Dans l'ADN, on rencontre statistiquement des séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ainsi, une séquence de 4 bases sera reconnue avec une fréquence statistique de $1 / 256$ paires de bases (pb) ($1 / 4^4$), soit une coupure statistique tous les 256 nucléotides, une séquence de 6 bases sera reconnue avec une fréquence statistique de $1 / 4^6$, soit 1 coupure statistique tous les 4096 nucléotides etc. Un mélange d'enzymes de restriction est utilisé afin d'obtenir des fragments d'environ 100 à 150pb.

Hybridation et capture

L'ADN est rendu simple brin. Les régions ciblées sont hybridées par des sondes couplées à de la biotine et conçues de manière à être complémentaires des deux extrémités de la région d'intérêt. Il y a autant de types de sondes que de régions d'ADN à séquencer. Autrement dit, une même région d'intérêt pouvant être fragmentée en plusieurs fractions, des milliers de sondes sont utilisées pour séquencer l'ADN. Dans notre étude 10545 sondes sont utilisées pour couvrir 1153 régions à séquencer (Figure 5 A).

La sonde étant de taille différente que le fragment à séquencer, l'hybridation de la sonde au fragment d'ADN entraîne la circularisation de celui-ci (Figure 5 B). Une ligase vient ensuite lier le fragment d'ADN à la partie centrale de la sonde (Figure 5 C).

L'isolement des fractions d'intérêt se fait par la capture de celle-ci par des billes de streptavidine qui ont une très forte affinité pour la biotine couplée aux sondes. Après un lavage, seuls restent les fragments d'intérêt.

Amplification

Une technique de polymérase chain reaction (PCR) est utilisée pour amplifier les fragments d'ADN. A la fin de la PCR, et après ouverture par le centre de la sonde des brins d'ADN circulaires, on obtient de nombreux fragments identiques du gène étudié (Figure 5D).

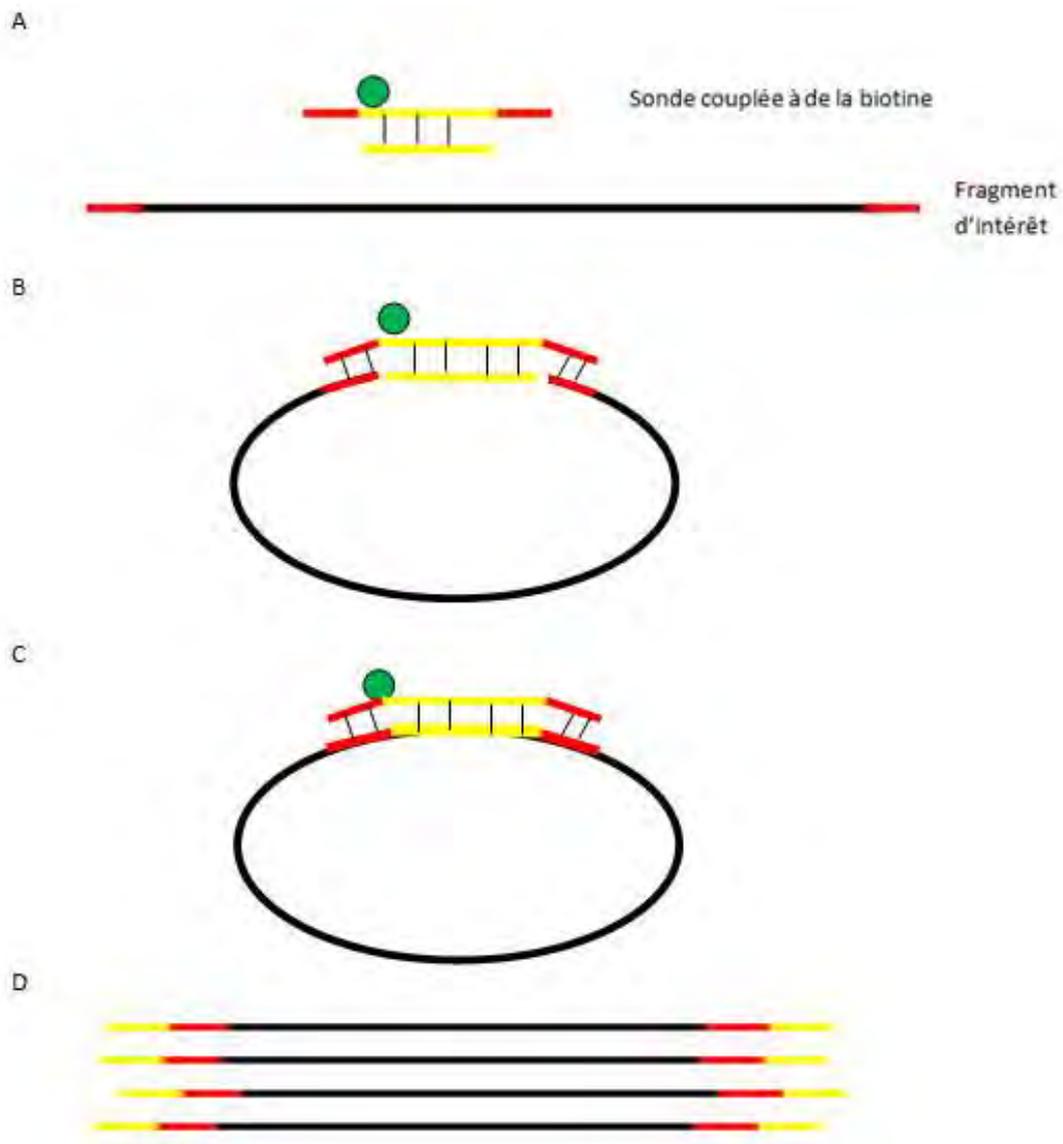


Figure 5 Hybridation, capture et amplification

Au total, la librairie est constituée de nombreux fragments identiques de tous les gènes étudiés.

En plus, des séquences complémentaires aux extrémités des fragments d'intérêts, la sonde conçue pour l'hybridation comporte différentes caractéristiques dans sa région centrale en vue du séquençage. Celle-ci est composée de séquences précises de nucléotides remplissant chacune un rôle particulier. La Figure 6 détaille la structure d'une amorce pour l'Haloplex HS Agilent.

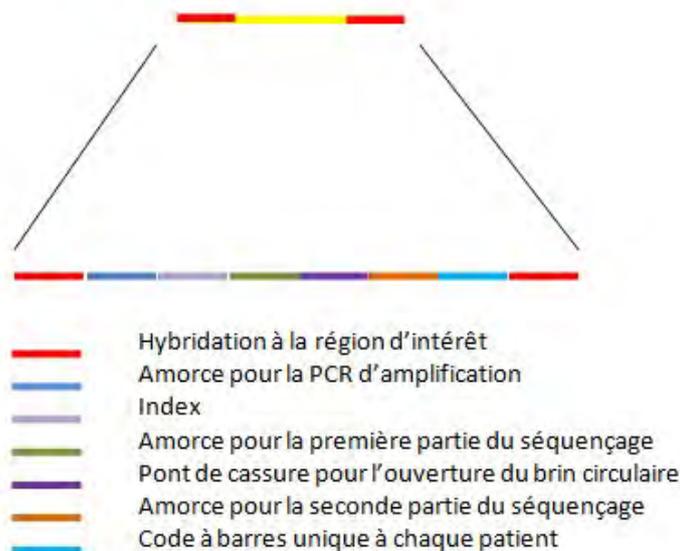


Figure 6 Détails d'une amorce pour la technique Haloplex HS d'Agilent

Une séquence code barres unique à chaque patient offre le très grand avantage de pouvoir étudier plusieurs patients à la fois. En effet, lors de l'analyse des séquences, la révélation du code à barres permettra d'attribuer la séquence au bon patient. En conséquence pour chaque patient une librairie est créée, puis elles sont toutes mélangées pour être séquencées au cours d'un même test. Au cours d'une seule et même série, 16 échantillons de patients sont analysés.

2.1.2 Séquençage par synthèse

Le séquençage s'effectue sur un appareil NextSeq 500 d'Illumina. Le principe est celui du séquençage par synthèse

2.1.2.1 Génération de cluster

Dans un premier temps, pour obtenir une intensité de signal suffisante, des groupes ou « clusters » de brins d'ADN identiques sont créés sur une lame de verre appelée « flow cell » sur laquelle sont accrochées des millions de séquences d'oligonucléotides (Figure 7)

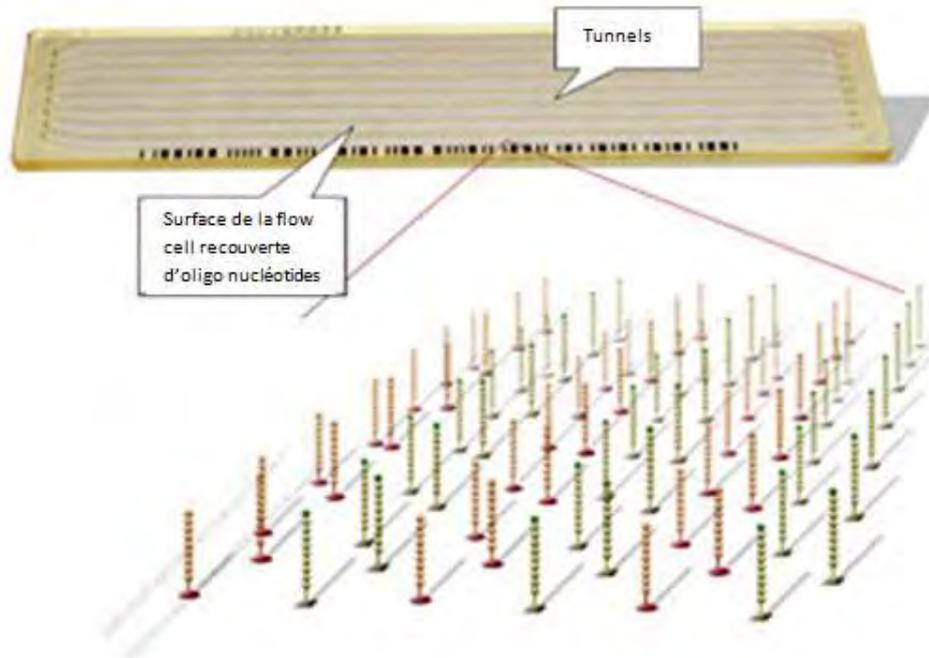


Figure 7 Description d'une flow-cell

Celles-ci sont complémentaires des amorces de séquençage contenues dans la sonde présentée ci-dessus. Ainsi les brins d'ADN vont s'hybrider aux oligonucléotides fixés dans la flow cell (Figure 8 B). Une polymérase va ensuite synthétiser un brin complémentaire à partir de l'oligonucléotide fixé dans la flow cell (Figure 8 C). Puis une étape de dénaturation déshybride les brins appariés et il ne reste que celui fixé à la flow cell (Figure 8 D).

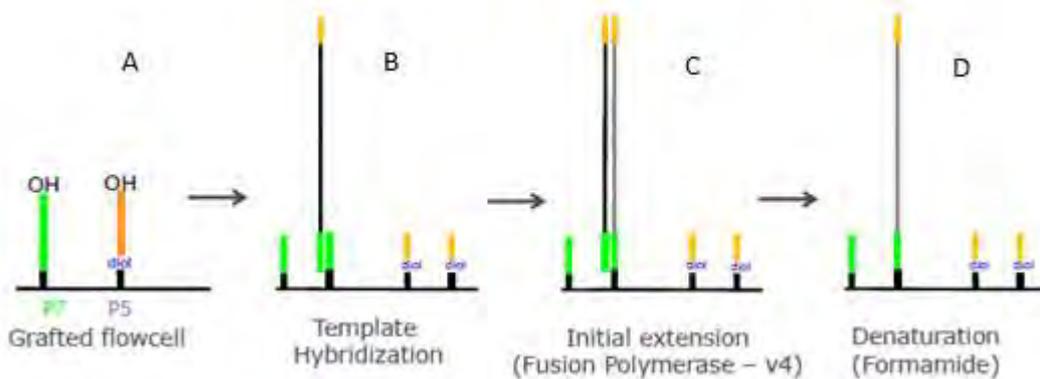


Figure 8 Hybridation et génération d'un cluster

Dans un second temps l'extrémité libre du brin d'ADN s'hybride avec l'oligonucléotide voisin fixé sur la flow cell (Figure 9 B). Une polymérase produit ensuite le brin complémentaire (Figure 9 C), et une dénaturation enlève les brins complémentaires non fixés à la flow cell (Figure 9 D). Cette étape est répétée environ 35 fois pour obtenir un îlot de brins identiques.

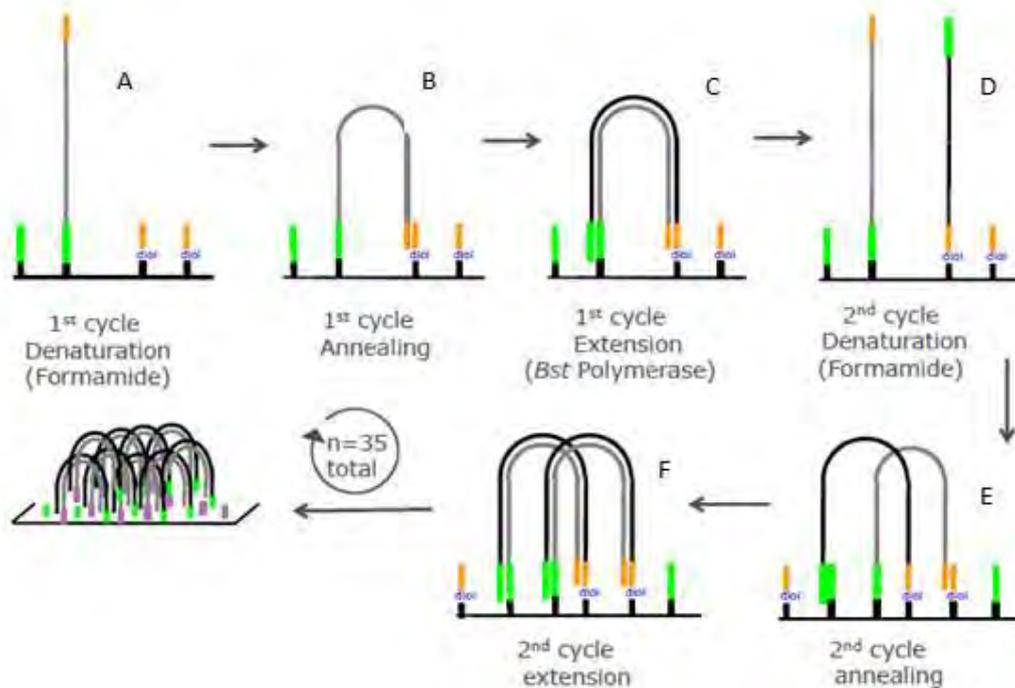


Figure 9 Génération d'un cluster

Au total la flow cell comporte de nombreux clusters de brins identiques. Le signal de détection lors du séquençage sera d'autant plus fort que le cluster contient de brins.

2.1.2.2 Séquençage

La réaction de séquençage est réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié. Chaque ADN a donc des coordonnées bien précises sur la flow cell. La réaction de séquençage se déroule, à partir d'une amorce, position après position en ajoutant un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Sous l'action de la polymérase, seule une base complémentaire peut s'hybrider à la fois. Une lecture laser permet alors de détecter l'émission fluorescente et cela simultanément pour toutes les positions incorporées. Pour chaque position, le signal est d'autant plus fort qu'il y a de bases hybridées et donc de brins au sein du cluster. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle. 150 cycles sont effectués dans cette étude, ce qui correspond approximativement à la longueur des fragments étudiés.

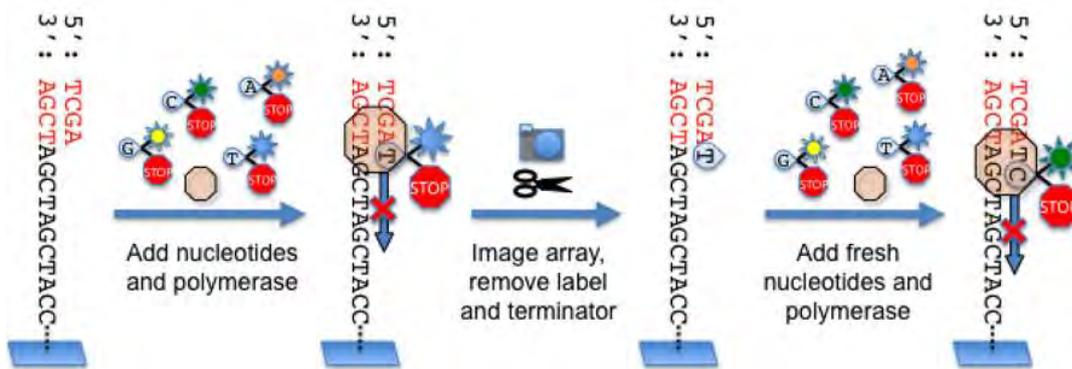


Figure 10 Séquençage par synthèse ²⁴

La technique Haloplex d'Agilent est une technique « pair ended » qui place deux amorces aux extrémités du fragment d'intérêt pour une lecture à partir des 2 extrémités. Le séquençage se fait en deux temps.



Figure 11 Lecture en 2 temps ou séquençage "pair ended"

Cette double lecture confère l'avantage d'une meilleure confiance dans les résultats obtenus. En effet plus une base est « lue », plus sa fiabilité est haute.

Par ailleurs, le code barres est également « lu », ce qui associé aux coordonnées de l'émission du signal permet de connaître précisément l'origine de la séquence et donc d'un patient précis.

2.1.3 Analyse des données

2.1.3.1 Qualité du séquençage

Avant de procéder à l'analyse du séquençage, on vérifie la qualité de celui-ci. Pour cela un score de fiabilité par base identifiée est défini en fonction de la qualité du signal observé. La technique la plus utilisée est le calcul du score PHRED. Celui-ci se détermine à partir de la lecture optique réalisée. La compilation de la lecture optique à chaque cycle permet d'obtenir

un signal par fragment. En fonction de la couleur, de l'intensité et de la résolution du pic, le séquenceur va attribuer une base à chaque pic.

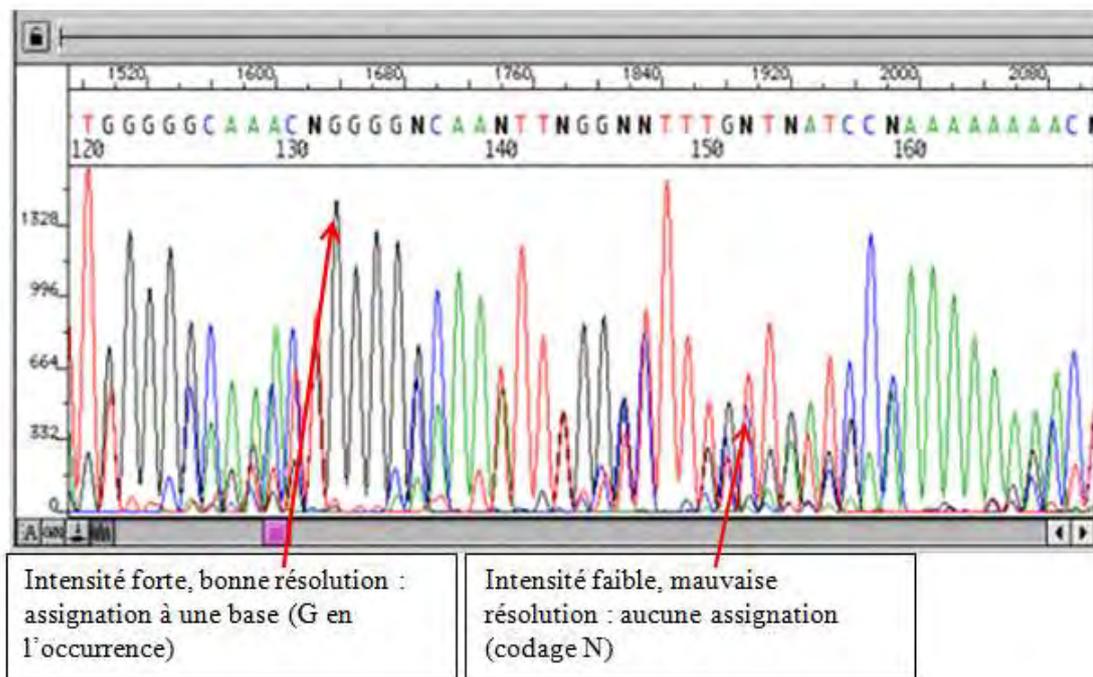


Figure 12 Signal optique obtenu par fragment séquencé issu à titre d'exemple de séquençage Sanger

Les paramètres d'assignation sont cependant influencés par :

- le bruit de fond ;
- la chimie imparfaite du séquençage, comme par exemple au cours d'un cycle aucune base ne s'insère ou, au contraire, plusieurs bases s'insèrent d'un coup ce qui crée dans les 2 cas un décalage ;
- l'accumulation de « déchets » au fur et à mesure des cycles qui perturbent la détection.

Le score PHRED utilise la transformée de Fourier pour décomposer et analyser le signal obtenu. En fonction, des fréquences et intensité de chaque pic on évalue sa fiabilité et donc son assignation à une base. Pour chaque base un score PHRED est attribué et cela est relié à la probabilité d'erreur d'identification d'une base (Tableau 6).

SCORE DE QUALITE PHRED	PROBABILITE D'UNE IDENTIFICATION INCORRECTE	PRECISION DE L'IDENTIFICATION D'UNE BASE
10	1 pour 10	90 %
20	1 pour 100	99 %
30	1 pour 1000	99.9 %
40	1 pour 10000	99.99 %
50	1 pour 100000	99.999 %

Tableau 6 PHRED score

Par exemple, si le score PHRED assigne un score de qualité de 30 à une base, la probabilité que cette base ait été identifiée incorrectement est de 1 pour 1000. La méthode la plus couramment utilisée pour déterminer une séquence consensus est de prendre en compte uniquement les bases avec un score de qualité égal ou supérieur à 20. Cependant au fur et à mesure de l'avancement du séquençage, le score PHRED diminue, notamment à cause de l'accumulation des déchets générés à chaque cycle. Cela explique le fait que de trop longs fragments d'ADN ne puissent pas être séquencés de façon fiable.

Pour notre étude plus de 90% des bases séquencées ont un score PHRED >30, leur assignation est donc fiable à 99.9%.

2.1.3.2 *Alignement*

Les fragments générés sont alignés par rapport au génome de référence de cette même séquence. La séquence génomique référence utilisée dans cette étude est la séquence Hg19 correspondant à l'assemblage GRCH37 en date de février 2009.

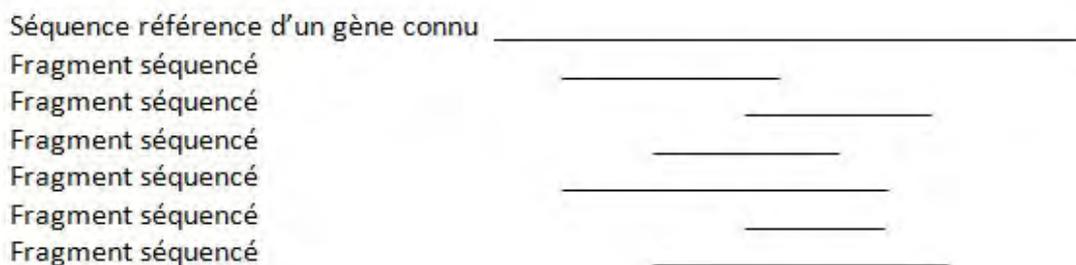


Figure 13 Exemple d'alignement

Le standard est d'utiliser deux logiciels distincts (dans notre cas NextGen et SureCall) ayant des sensibilités différentes sur la taille de l'alignement, la détection des insertions/délétions, les fractions alléliques (VAF) et la qualité de l'annotation.

L'alignement comporte deux principes généraux : la profondeur et la couverture de lecture.

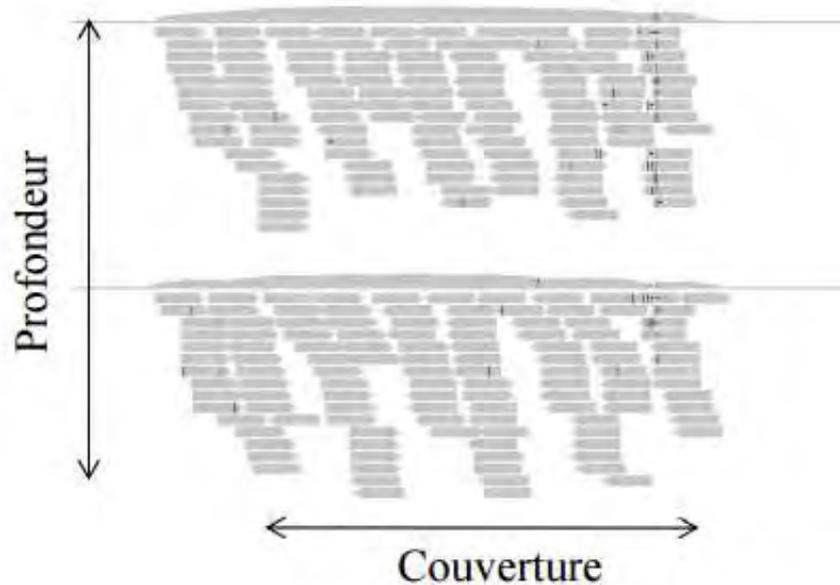


Figure 14 Principe de couverture et de profondeur

La profondeur de lecture est le nombre moyen de lecture par base à une position donnée. Notre étude en général offre une profondeur de 1000 à 1500X. Cela signifie que chaque base a été lue entre 1000 et 1500 fois. (Il n’y a pas de consensus sur un objectif de profondeur)

La couverture de lecture est la fraction de la référence couverte par au moins une lecture. Dans notre étude au moins 99% des bases des gènes cibles sont lues avec une profondeur supérieure à 100X.

2.1.3.3 Variant de séquence : quelle interprétation ?

Lorsque la séquence du gène du patient diffère de la séquence référence, l’interprétation du changement peut parfois être difficile. En effet, notamment en raison de la redondance du code génétique, un changement dans une séquence ADN peut parfois n’impliquer aucune conséquence clinique car un triplet de nucléotides (= codon) peut coder pour un même acide aminé³. Aussi, le changement peut se situer sur une région non codante ou non critique. Un changement n’est donc pas toujours synonyme d’effet délétère.

Historiquement une mutation est définie comme un changement dans la séquence d’ADN présent chez < 1% de la population²⁵. Une mutation est souvent, mais pas systématiquement, associée à une maladie²⁶. Un polymorphisme est quant à lui défini par un changement dans la séquence d’ADN présent chez >1% de la population. Le polymorphisme

³ <https://www.nature.com/scitable/definition/genetic-code-13> site internet visité le 26 Mai 2017

n'est fréquemment pas associé à une maladie mais il peut induire une prédisposition à une pathologie ²⁷. Dans le temps, la pratique a légèrement dévié des définitions et souvent, le terme mutation était associée à une maladie tandis que polymorphisme était lié à un changement sans lien avec une pathologie ²⁸. Ces définitions ont été établies avant l'avènement du NGS, et la connaissance du génome a fait évoluer ces notions. En effet, prenons l'exemple très connu de la drépanocytose. Cette pathologie est due à la substitution d'une adénine par une thymine sur le gène codant pour la synthèse de la globine beta. Cela entraîne la substitution d'une glutamine par une valine et la présence d'un gène appelé « HbS » codant pour une hémoglobine anormale. Ce variant du gène est présent à moins de 1% dans la population caucasienne, mais peut atteindre jusqu'à 18% dans la population de l'Angola du Nord ²⁹. Ainsi en fonction de la population étudiée, cette substitution est soit un polymorphisme, soit une mutation selon les anciennes définitions. De plus, la drépanocytose ne s'exprime cliniquement que si le sujet est homozygote « HbS » et donc il est parfois difficile de rapprocher la présence d'un variant avec l'expression clinique d'une maladie. Pour ces raisons, le Human Genome Variant Society a décidé de ne plus utiliser les termes mutation ou polymorphisme mais le terme variant pour nommer un changement dans la séquence d'un gène ²⁸.

2.1.3.4 Conséquence des substitutions

- Variant de type « faux-sens » : le codon muté code un autre acide aminé

La modification d'acide aminé au niveau de la protéine peut être tolérée par la cellule sans conséquence délétère, ce qui explique que de nombreuses variations de séquence de type « faux-sens » n'ont pas d'effet pathogène, et constituent par ailleurs une part importante des polymorphismes. Mais en fonction de la localisation de l'acide aminé touché, les mutations faux-sens peuvent avoir des effets délétères (altération du repliement protéique, de la stabilité protéique, de domaines fonctionnels, de sites d'interaction avec d'autres protéines, etc.), de type perte de fonction ou gain de fonction ³⁰.

- Variant de type « non-sens » : le codon muté code un codon stop

Ce type de mutation est généralement pathogène, responsable de la synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée⁴.

⁴ <https://www.nature.com/scitable/definition/nonsense-mutation-228> site visité le 27 mai 2017

- Le cas particulier des variants de type « synonyme » : le codon muté code pour le même acide aminé

Le code génétique étant « dégénéré » (plusieurs codons pouvant coder un même acide aminé), certaines substitutions au niveau de la séquence génomique ne modifient pas la séquence en acides aminés de la protéine correspondante et seraient donc sans effet pathogène. Ces variants « synonymes » ont ainsi également été appelés « silencieux ». Cependant, depuis quelques années, il a été clairement démontré que certains variants silencieux peuvent avoir un effet délétère, résultant non d'une modification directe de la séquence protéique, mais d'un effet sur la structure primaire du gène, de son cadre de lecture et au final sur l'expression protéique^{31 32}.

2.1.3.5 Conséquence des insertions et/ou délétions

Des insertions et/ou délétions de nucléotides entraînent un décalage de lecture de l'ADN. Puisque chaque codon comporte trois nucléotides, deux situations sont possibles⁵ :

- **Les insertions et/ou délétions de multiples de trois nucléotides**, n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture à proprement parler mais un gain ou une perte en acides aminés. Le retentissement fonctionnel est variable selon la localisation au niveau de la protéine.
- **Les insertions et/ou délétions de non-multiples de trois nucléotides**, responsables d'un décalage du cadre de lecture, qui entraînera la survenue prématurée d'un codon stop (ou dans de rares cas un décalage du codon stop en aval). L'effet délétère sera donc semblable à l'effet des variants non-sens: synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée.

2.1.3.6 Interprétation de données

Après avoir précisément nommé le changement, deux situations sont possibles : cette variation de séquence a déjà été décrite au préalable, ou non. Cette information sera obtenue par la consultation de bases de données.

Si la variation de séquence a déjà été rapportée, les informations disponibles peuvent permettre de savoir si elle a un caractère délétère qui a déjà été confirmé au préalable chez d'autres patients, ou au contraire si elle a été identifiée sans effets pathologiques dans la population générale. Différentes bases de données sont utilisées en fonction des caractéristiques de chacune.

⁵ <https://www.nature.com/scitable/definition/frameshift-mutation-frame-shift-mutation-frameshift-203> site visité le 27 Mai 2017

Bases de données répertorient les variants à priori non pathologiques :

- Db SNP : Single nucleotide polymorphism database. Cette base de données a été créée en 1998 par le National Center for Biotechnology and Information (NCBI) et le National Human Genome Research Institute (NHGRI) ;
- ExAC : Exome Aggregation Consortium. Cette base de données est le fruit d'un vaste projet de séquençage du génome humain portant sur environ 60706 sujets sains ³³.

Ces bases de données peuvent contenir des variants non pathologiques mais dont le caractère délétère pourra éventuellement se révéler dans le futur.

Bases de données répertorient les variants pathologiques :

- COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Comme son nom l'indique, cette base de données répertorie des variants connus et reconnus comme pouvant avoir une implication dans un processus cancéreux ;
- Publication de Papaemmanuil de 2016 portant sur 1500 LAM : Genomic classification of Acute Myeloid Leukemia ³⁴.

La situation est plus difficile pour les variations de séquence non rapportées au préalable, et la conclusion sur le caractère délétère ou non doit alors prendre en compte différents éléments.

En général, un variant non sens ou un variant entraînant un décalage du cadre de lecture aboutit à une perte de fonction de la protéine par la genèse de site STOP. Les conséquences des variants faux sens, des anomalies d'épissage sont moins certaines et un faisceau d'arguments est nécessaire pour déterminer les conséquences de ces anomalies. Est-ce que le changement d'acide aminé implique une différence de charge, de polarité d'encombrement stérique ? Est-ce que le variant se trouve dans une région essentielle de la protéine ? Des outils bio informatiques commencent à se développer afin de réaliser des prédictions sur la conséquence d'un variant sur la fonction d'une protéine. Est-ce que l'effet sera neutre, une perte de fonction ou un gain de fonction (forme hyperactive ou acquisition d'une nouvelle fonction) ?

L'évaluation de ce faisceau d'éléments constitue souvent la difficulté de l'interprétation des données mutationnelles, et ne permet malheureusement pas toujours d'aboutir à une conclusion formelle. Avec l'avènement des techniques d'analyse moléculaire

à haut débit, et la génération de plus en plus facile d'importantes quantités de données mutationnelles, l'interprétation risque de devenir un goulot d'étranglement et le développement d'outils bioinformatiques performants et adaptés est essentiel.

2.1.3.7 Fréquence allélique d'un variant - Variant Allelic Frequency (VAF)

La fréquence allélique d'un variant (VAF) d'un gène est définie comme la proportion d'ADN présentant ce variant rapporté au nombre de fois où ce gène a été séquencé chez ce patient³⁵. Par exemple si un gène a été séquencé 20 fois, et qu'un variant de ce gène a été retrouvé 8 fois alors la VAF est de 40%. La VAF donne une estimation de la proportion de chromosomes portant ce variant.

Si la VAF est de 100%, alors toutes les cellules analysées présentent ce variant et le patient est homozygote pour ce variant. Si elle est de 50%, soit toutes les cellules sont hétérozygotes pour ce variant, soit la moitié des cellules sont homozygotes pour ce variant. En effet, l'interprétation de la VAF peut être délicate compte tenu du fait que toutes les cellules analysées ne présentent pas le variant. Selon le chapitre « Physiopathologie de l'hémopathie myéloïde », dans le cadre de la recherche d'événements somatiques, on analyse une population de cellules (saine + clonale) contenant un clone malin sans connaître à priori la proportion de celui-ci. On analyse donc en général des cellules « saines » et un clone malin en même temps. Si la VAF est >50% on est certain qu'une partie du clone est homozygote, mais on ne connaît pas la proportion.

L'intérêt de déterminer la fréquence allélique d'un variant est réel et multiple. Jaiswal et al. ont montré que le risque de progression vers une hémopathie était d'autant plus grand que la VAF dans le sang est élevée au sein d'une population saine³⁶. Par ailleurs, la VAF est aussi un très bon indicateur de l'expression clinique d'une maladie. Une VAF du variant JAK2 V617F élevée (> 50%) oriente plutôt vers une polyglobulie de Vaquez alors qu'une VAF plus faible oriente vers une thrombocythémie essentielle³⁷. Dans les syndromes myélodysplasiques, la VAF du variant RUNX1 semble être associée à la sévérité de la thrombopénie³⁸. La VAF peut aussi être un marqueur pronostic car une étude a montré dans les LAM que plus la VAF du variant FLT3-ITD était importante, plus le taux de survie était faible³⁹.

2.2 Cohorte de patients

Les patients inclus dans l'étude ont été sélectionnés lors de réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) organisées depuis octobre 2016 comprenant le professeur Delabesse (réfèrent en biologie moléculaire du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse), le professeur Beyne-Rauzy (médecine interne), les docteurs De Mas et Rieu (cytologistes). Ces patients doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- Une cytopénie au moins est présente : une anémie et/ou une thrombopénie et /ou une neutropénie selon les normes françaises ;
- La cytopénie doit être chronique et inexpliquée. Pour cela un examen clinique approfondi n'a pas mis en évidence d'étiologie et les bilans vitaminiques (B9, B12), ferriques et inflammatoires sont normaux ou n'expliquent pas les cytopénies ;
- L'examen du frottis médullaire met en évidence une absence de dysplasie ou des dysplasies à la limite de la significativité pour affirmer un diagnostic de SMD sur la seule cytologie ;
- L'analyse cytogénétique ne met pas en évidence d'anomalie pouvant à elle seule affirmer le diagnostic de SMD ;
- La présence de matériel exploitable pour une analyse par séquençage de nouvelle génération.

2.3 Gènes étudiés

Les gènes séquencés dans cette étude sont au nombre de 39. Ils ont été choisis car ce sont ceux qui ont été les plus fréquemment décrits dans la littérature comme étant associés au syndrome myélodysplasique. La Figure 15 issue d'une étude de Papaemmanuil et al. ¹⁴ présente le nombre de patients ayant un syndrome myélodysplasique en fonction de l'anomalie moléculaire ou cytogénétique retrouvée sur 738 patients. On remarque que les variants les plus fréquemment retrouvés sont :

- > 10% : *SF3B1*, *TET2*, *SFRS2*, *ASXL1*.
- entre 5 et 10% : *DNMT3A*, *RUNX1* et *U2AF1*.

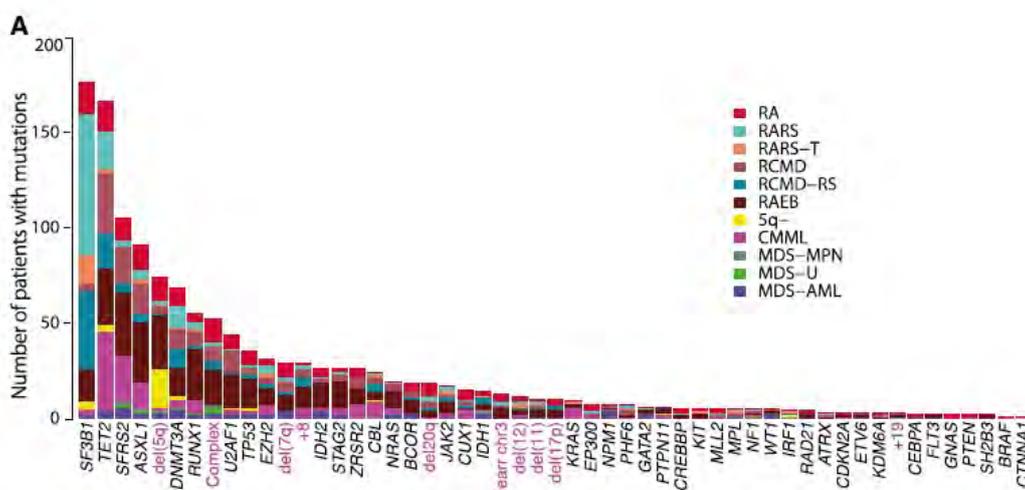


Figure 15 Nombre de patients en fonction de l'anomalie moléculaire ou cytogénétique retrouvée

Le Tableau 7 décrit les gènes étudiés, leurs fonctions et les conséquences des variants connus.

GENE	ROLE ⁶	CONSEQUENCE DES VARIANTS CONNUS
<i>ASXL1</i>	Modification de la chromatine	Perte de fonction
<i>BCOR</i>	Co-Represseur -antiapoptotique	Perte de fonction
<i>BCORL1</i>	Co-Represseur -antiapoptotique	Perte de fonction
<i>CBL</i>	Proto-oncogène ou suppresseur de tumeur	Perte de fonction / Gain de fonction
<i>CEBPA</i>	Facteur transcription – implication dans la différenciation cellulaire	Perte de fonction
<i>CSF3R</i>	Production et différenciation de la lignée granuleuse	Inconnu
<i>DNMT3A</i>	Méthylation ADN	Perte de fonction pour la plupart
<i>ETV6</i>	Régulation de la production de cellules sanguines	Perte de fonction
<i>EZH2</i>	Modification d'histones	Perte de fonction
<i>FLT3</i>	Contrôle du processus cellulaire de progéniteurs hématopoïétiques	Gain de fonction
<i>GATA1</i>	Différenciation progéniteurs hématopoïétiques	Perte de fonction
<i>GATA2</i>	Développement et prolifération de cellules hématopoïétiques	Perte de fonction
<i>GNAS</i>	Stimulation adénylate cyclase	Inconnu
<i>IDH1</i>	Production d'énergie, protection contre les dérivés oxygénés	Gain de fonction
<i>IDH2</i>	Production d'énergie, protection contre les dérivés oxygénés	Gain de fonction
<i>JAK2</i>	Contrôle production cellules sanguines	Gain de fonction
<i>KDM6A</i>	Modification d'histones	Inconnu
<i>KIT</i>	Croissance, division et survie cellulaire	Gain de fonction
<i>KRAS</i>	Croissance et division cellulaire	Gain de fonction
<i>MXRA5</i>	Re-modélisation de la matrice	Inconnu
<i>NF1</i>	Suppresseur de tumeur	Perte de fonction
<i>NPM1</i>	Contrôle répllication ADN et cycle cellulaire	Perte de fonction
<i>NRAS</i>	Division cellulaire, différenciation et apoptose	Gain de fonction
<i>PHF6</i>	Régulation de la transcription	Perte de fonction
<i>PTPN11</i>	Régulation voie RAS/MAPK	Gain de fonction

⁶ Source : <https://ghr.nlm.nih.gov/> Visité le 28 mai 2017

<i>RAD21</i>	Structure et organisation des chromosomes	Perte de fonction
<i>RUNX1</i>	Contrôle de l'hématopoïèse	Perte de fonction
<i>SETBP1</i>	Facteur de transcription	Perte de fonction
<i>SF3B1</i>	Régulation de l'épissage	Inconnu
<i>SMC1A</i>	Contrôle des chromosomes pendant cycle cellulaire	Inconnu
<i>SMC3</i>	Contrôle des chromosomes pendant cycle cellulaire	Inconnu
<i>SFRS2</i>	Régulation de l'épissage	Inconnu
<i>STAG2</i>	Cohésine	Inconnu
<i>TET2</i>	Suppresseur tumeur, production cellules sanguines	Perte de fonction
<i>TP53</i>	Suppresseur tumeur	Perte de fonction mais il existe des gains
<i>U2AF1</i>	Régulation de l'épissage	Inconnu
<i>WT1</i>	Croissance, division et apoptose	Perte de fonction
<i>ZRSR2</i>	Régulation de l'épissage	Inconnu

Tableau 7 Liste des gènes séquencés

3 Résultats

Les valeurs exactes des cytopénies de chaque patient, les résultats et conclusions des myélogrammes, le détail des variants détectés et les suivis des patients sont présentés dans la partie « Annexes ».

3.1 Population

35 patients ont été inclus lors de cette étude au sein du CHU de Toulouse depuis octobre 2016.

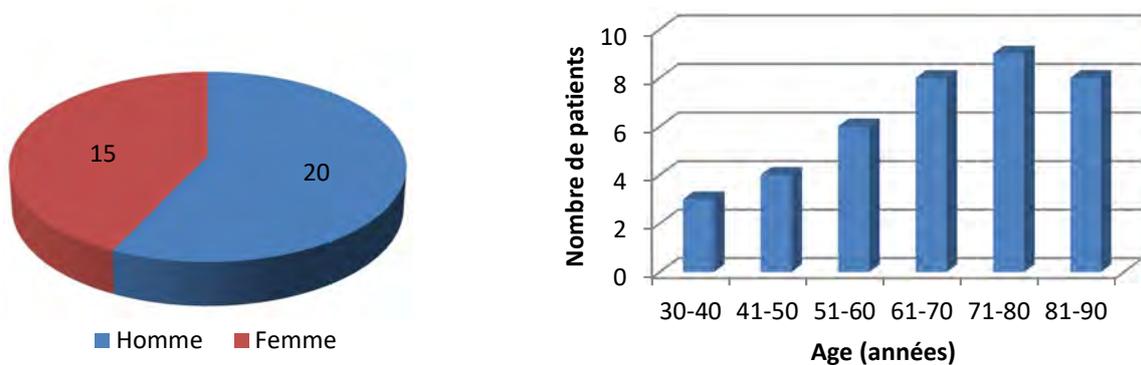


Figure 16 Répartition de la population selon le sexe et l'âge

Cette étude inclut légèrement plus d'hommes que de femmes (57% d'hommes et 43% de femmes). La moyenne d'âge est de 67 ans (37 à 90 ans) (Figure 16).

3.2 Cytopénies

Les numérations des patients inclus sont représentées dans la Figure 17.

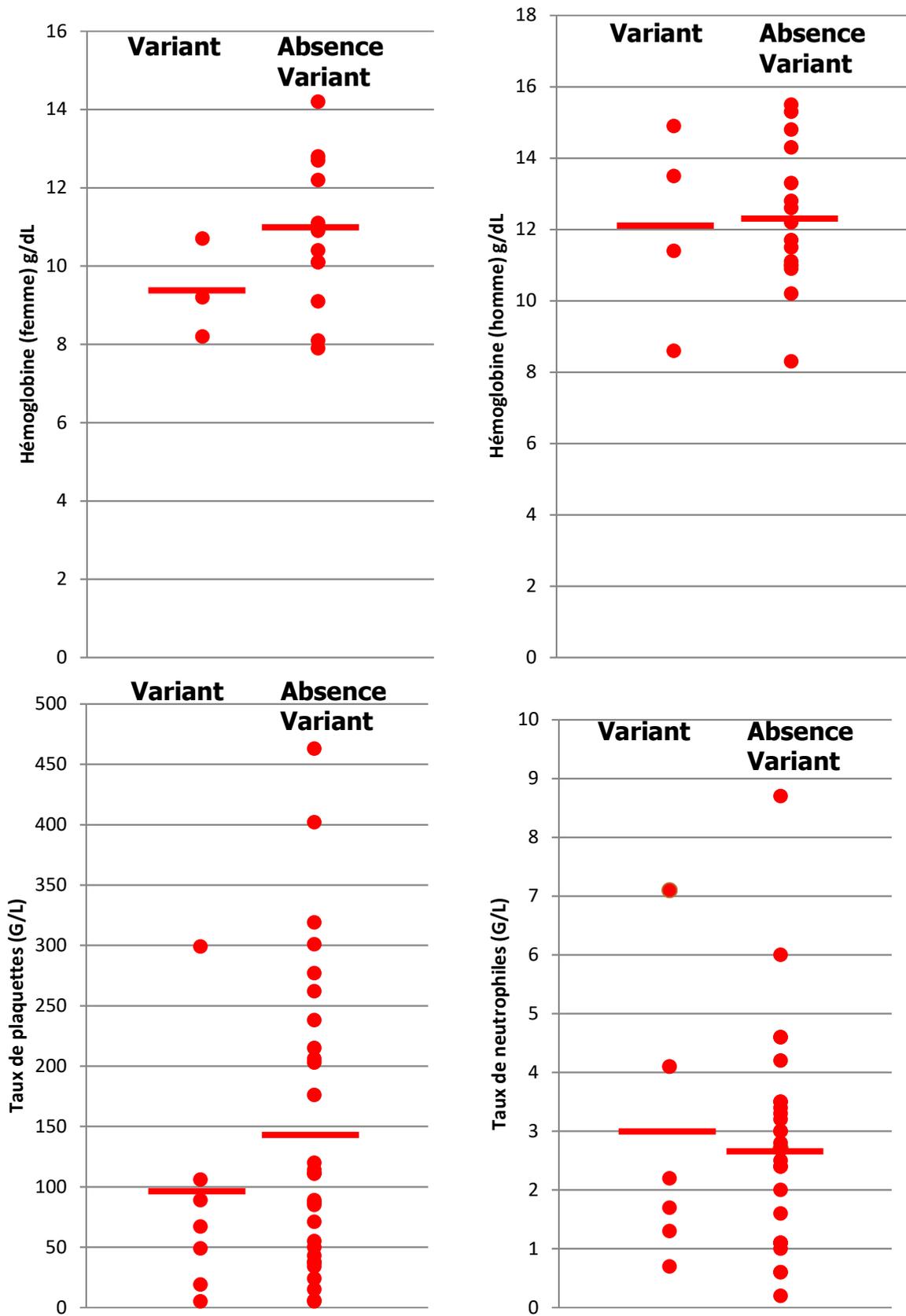


Figure 17 Taux d'hémoglobine, de plaquettes et de neutrophiles des patients inclus

Les cytopénies les plus fréquemment rencontrées sont : l'anémie (24 occurrences), la thrombopénie (23) puis la neutropénie (8), sachant que 16 patients présentent plusieurs cytopénies.

CYTOPENIES	FREQUENCE (EN NOMBRE)
Anémie isolée	10
Thrombopénie isolée	7
Neutropénie isolée	2
Anémie + Thrombopénie	10
Thrombopénie + Neutropénie	2
Pancytopénie	4

Tableau 8 Répartition des cytopénies

Chez la femme quand l'anémie est présente, celle-ci se situe à 9,6 g/dL et chez l'homme elle est à 10,9 g/dL. Les thrombopénies observées sont en moyenne à 60 G/L et la neutropénie à 0,8 G/L (Figure 18 ; Tableau 9).

CYTOPENIE	MOYENNE (INTERVALLE)
Anémie	
Femme	9,6 g/dL (7,9-10,9)
Homme	10,9 g/dL (8,3-12,2)
Thrombopénie	60 G/L (5-120)
Neutropénie	0,8 G/L (0,2 – 1,3)

Tableau 9 Valeurs des cytopénies

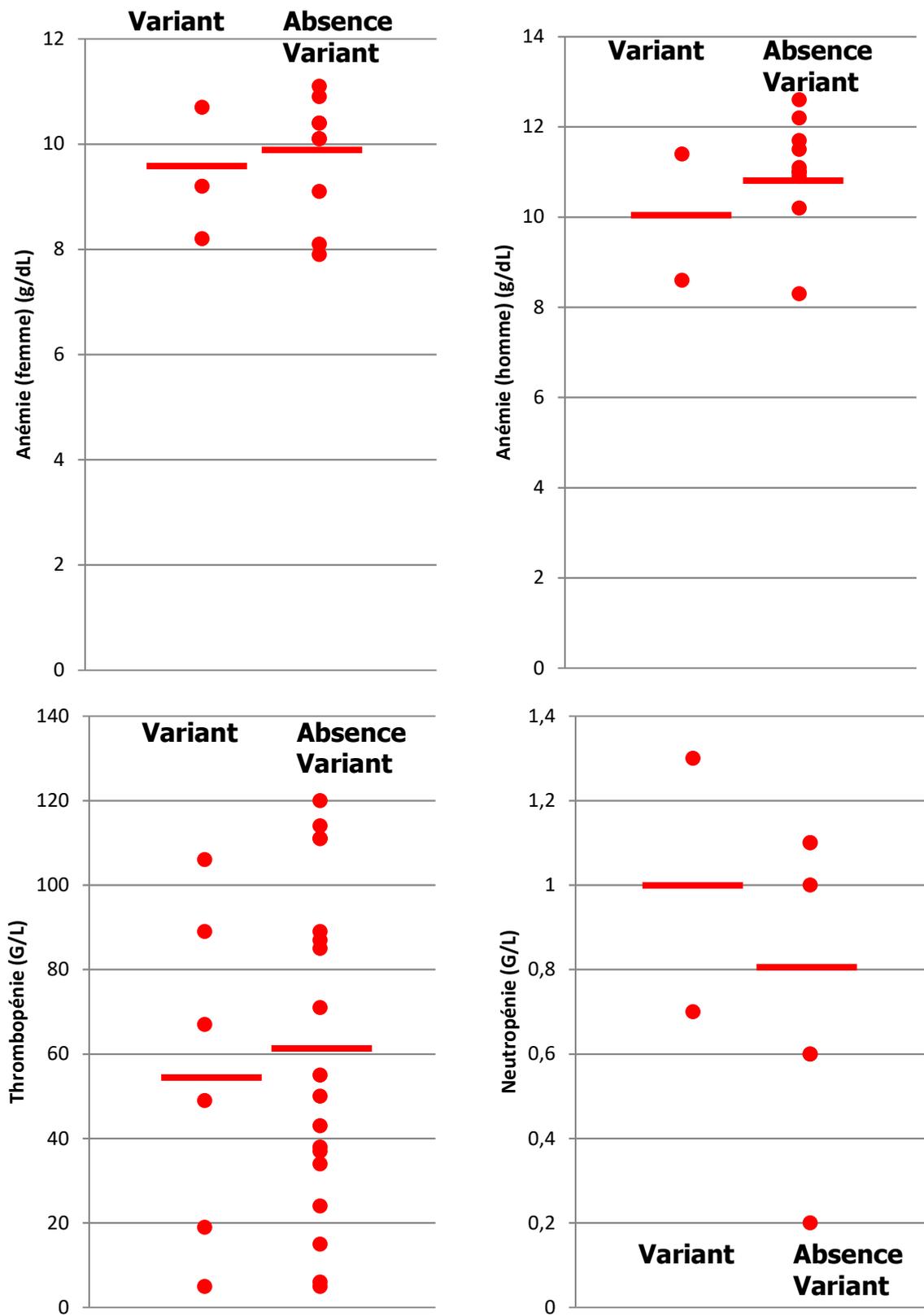


Figure 18 Cytopénies des patients inclus

3.3 Cytologie

Au niveau de la cytologie médullaire, parmi les 35 patients :

- 3 ne montrent aucun signe de dysplasie ;
- 14 montrent des signes de dysplasies non significatifs (<10%) ;
- 18 montrent des signes de dysplasies à la limite supérieure de la significativité (10-20%)

Lorsque la dysplasie est observée, la dysérythropoïèse a été notée 21 fois, la dysgranulopoïèse 18 fois et la dysmégacaryopoïèse 12 fois, sachant que dans 16 cas une dysplasie sur au moins 2 lignées est observée.

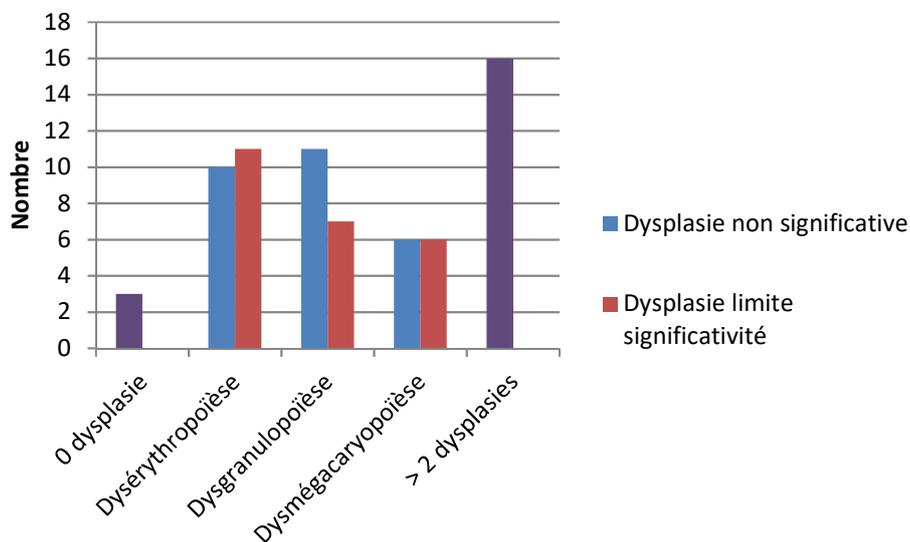


Figure 19 Répartition des dysplasies

3.4 Anomalies cytogénétiques

31 patients ont un caryotype sans aucune anomalie. 4 patients ont une anomalie considérée comme non significative dans les syndromes myélodysplasiques. 2 hommes de 75 et 77 ans ont une monosomie du chromosome Y, une femme de 65 ans présente une monosomie du chromosome X, et un patient présente une délétion 10p isolée dans 6 mitoses.

3.5 Variants

7 patients sur 35 présentent au moins un variant sur les gènes étudiés. Cela représente 20% de patients mutés. Le Tableau 10 présente les caractéristiques des patients mutés et non mutés.

	MUTES (7)	NON MUTES (28)
Age (années)	83 (75-90)	64 (37-87)
Sexe ratio H/F	1,3	1,1
Anémie	9,4 g/dL femme 10,0 g/dL homme	9,6 g/dL femme 11,0 g/dLhomme
Thrombopénie	56 G/L	61 G/L
Neutropénie	1 G/L	0,8 G/L
Dysplasie nulle ou < 10%	3	14
Dysplasie limite 10-20%	4	14

Tableau 10 Caractéristiques générales des patients mutés.

Parmi les 7 patients mutés, 6 ont deux variants ou plus. Parmi ceux-ci, les gènes mutés sont par ordre de fréquence *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *SF3B1*, *IDH1*, *WT1*, *ZRSR2*, *EZH* et *TP53*.

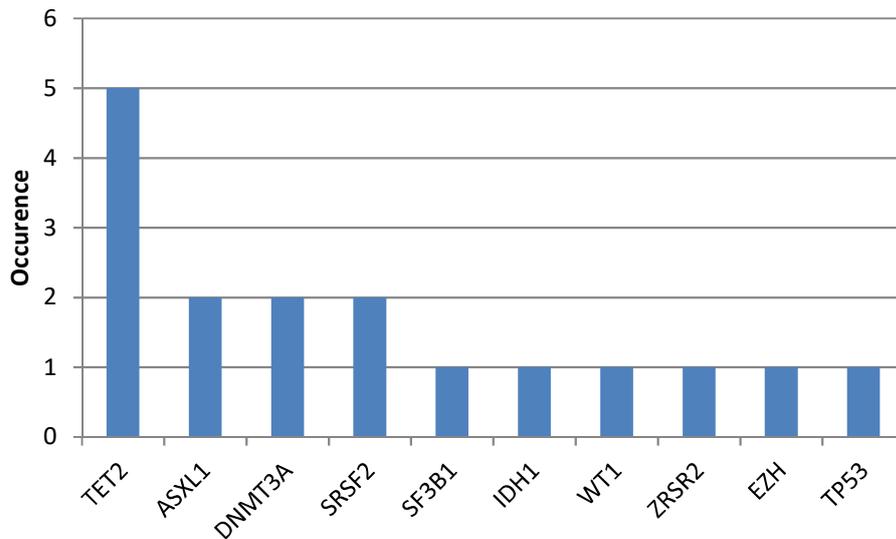


Figure 20 Fréquence des variants

Par patient, les variants retrouvés dans notre étude sont décrits dans le Tableau 11.

USPLN PATIENT	GENE	VARIANT	VAF%
64607	<i>DNMT3A</i>	NM_175629.2:c.768_769insC, NP_783328.1:p.T257delinsHCfs	24
	<i>SF3B1</i>	NM_012433.3(SF3B1_v001):c.2098A>G, NM_012433.3(SF3B1_i001):p.(Lys700Glu)	33
65712	<i>TET2</i>	NM_001127208.2(TET2_v001):c.2872C>T, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Gln958*)	42
66435	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5(ASXL1_v001):c.3456_3459del; NM_015338.5(ASXL1_i001):p.(His1153Valfs*17)	39
	<i>SRSF2</i>	NM_001195427.1(SRSF2_v001):c.284C>A, NM_001195427.1(SRSF2_i001):p.(Pro95His)	34
	<i>TET2</i>	NM_001127208.2(TET2_v001):c.3356del, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Leu1119Tyrfs*18)	35
61118	<i>IDH1</i>	NM_001282386.1:c.394C>T, NP_001269315.1:p.Arg132Cys	29
	<i>SRSF2</i>	NM_001195427.1:c.284C>G, NP_001182356.1:p.P95R	27
43029	<i>DNMT3A</i>	NM_175629.2(DNMT3A_v001):c.1290del, NM_175629.2(DNMT3A_i001):p.(Tyr432Thrfs*219)	39
	<i>TET2</i>	NM_001127208.2(TET2_v001):c.2470A>T, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Lys824*)	34
	<i>WT1</i>	NM_024426.4(WT1_i001):p.(Phe168Leu)	45
	<i>ZRSR2</i>	NM_005089.3(ZRSR2_v001):c.1004_1038dup, NM_005089.3(ZRSR2_i001):p.(Tyr347Profs*?)	35
64236	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5:c.1900_1922del; NP_056153.2:p.R634Rfs	40
	<i>EZH</i>	NM_004456.4:c.1967_1976del; NP_004447.2:p.A656Efs	44
	<i>TP53</i>	NM_001126112.2:c.826G>C; NP_001119584.1:p.A276P	45
65467	<i>TET2</i>	NM_001127208.2:c.2026delC et c.4457C>G, NP_001120680.1:p.Leu676Cysfs	35
	<i>TET2</i>	NM_001127208.2:p.Ser1486X	27

Tableau 11 Variants retrouvés et VAF correspondante

La fréquence allélique du variant (VAF) est en moyenne de 36%.

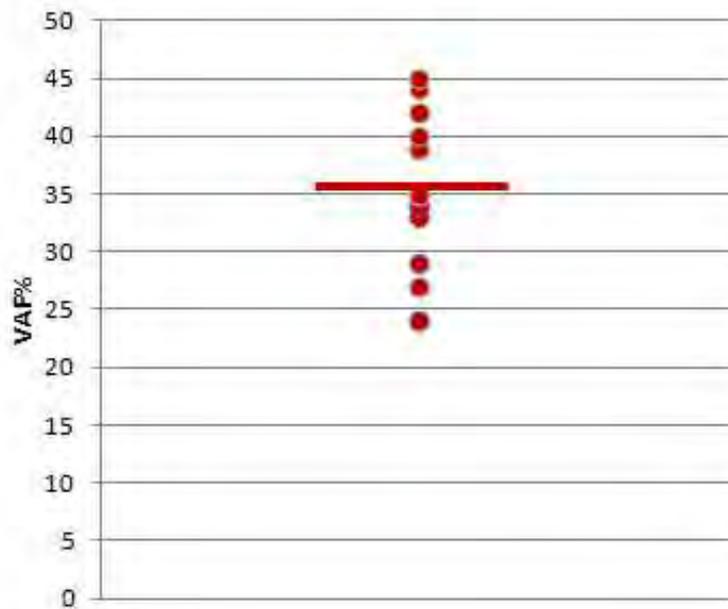


Figure 21 Fréquence allélique des variants

3.6 Analyse

Pour comparer les moyennes des échantillons, un test de Student au seuil de 5% a été réalisé. Pour réaliser des tests d'indépendance, un test exact de Fisher au seuil de 5% a été réalisé.

3.6.1 Caractéristiques générales

	MUTES (7)	NON MUTES (28)	DIFFERENCE (SEUIL - 5%)
Age (années)	83 (75-90)	64 (37-87)	Significative
Sexe H/F	1,3	1,1	Non Significative

Tableau 12 Comparaison des patients mutés vs non mutés en fonction de l'âge et du sexe

Les patients présentant un ou des variants sont significativement plus âgés que ceux n'en présentant pas. Il n'existe pas de différence significative chez les patients porteurs de variants entre les hommes et les femmes.

3.6.2 Cytopénies et variants

Variant et profondeur des cytopénies

	VARIANT (7)	NON VARIANT (28)	DIFFERENCE (SEUIL - 5%)
Anémie	9,4 g/dL femme 10,0 g/dL homme	9,6 g/dL femme 11,0 g/dL homme	Non Significative N/A
Thrombopénie	56 G/L	61 G/L	Non significative
Neutropénie	1 G/L	0,8 G/L	N/A

Tableau 13 Comparaison des patients mutés vs non mutés en fonction des cytopénies

N/A : Non Applicable car trop peu de patients sont présents dans un groupe pour réaliser des tests statistiques

Selon les caractéristiques de la population, il n'y a pas de différence significative entre les profondeurs des cytopénies des patients mutés et celles des patients non mutés.

Variant et nombre de cytopénies

	1 CYTOPÉNIE	2 CYTOPÉNIÉS OU PLUS
Variant(s)	2	5
Absence de variants	17	11

Tableau 14 Comparaison du nombre de cytopénie(s) VS la présence de variant(s)

p-value = 0,21, non significatif à 5%

Le nombre de cytopénies n'influe pas sur la présence de variant ou non au risque de 5%.

Variant et type de cytopénie

	ANEMIE	ABSENCE D'ANEMIE
Variant(s)	5	2
Absence de variants	19	9

Tableau 15 Etude de la présence d'anémie VS la présence de variant(s)

p-value = 1, non significatif à 5%

La présence d'une anémie n'influe pas sur la présence de variant au risque de 5%.

	THROMBOPENIE	ABSENCE THROMBOPENIE
Variant(s)	6	1
Absence de variants	17	11

Tableau 16 Etude de la présence de thrombopénie VS la présence de variant(s)

p-value = 0,38, non significatif à 5%

La présence d'une thrombopénie n'influe pas sur la présence de variant au risque de 5%.

L'influence de la neutropénie n'a pas pu être étudiée compte tenu du trop petit nombre de patients présentant cette cytopénie (8 patients au total).

3.6.3 Dysplasie et variants

17 patients ne montrent aucun signe de dysplasie ou une dysplasie non significative (<10%. 18 présentent une dysplasie médullaire à la limite de la significativité (10-20%) ce qui conduirait à les classer en syndrome myélodysplasique selon les critères OMS. En les classant selon la présence de variant ou non on obtient le Tableau 17.

	DYSPLASIE 10%-20%	DYSPLASIE < 10%
Variant(s)	4	3
Absence de variant	14	14

Tableau 17 Tableau de contingence variant(s) VS dysplasie
p value =1, non significatif au risque 5%

Le test statistique exact de Fisher indique qu'il n'y a pas de lien significatif (risque 5%) entre la présence de variant et la présence d'une dysplasie à la limite de la significativité.

Cependant on peut remarquer que la dysplasie la plus souvent mentionnée est la dysérythroïèse. Celle-ci est la plus difficilement appréciable et probablement la moins spécifique compte tenu des nombreuses situations qui peuvent affecter la morphologie de la lignée érythrocytaire sans que cela soit spécifique d'un syndrome myélodysplasique.

CONSTITUTIONNELLES	
	- Anémie congénitale dysérythroïétique
	- Thalassémie
	- Anémie sidéroblastique
	- Déficit en enzymes érythrocytaires
	- Pathologie de la membrane du globule rouge
ACQUISES	
	- Carence en vitamine B9, B12
	- Myélodysplasie
	- LAM 6
	- Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne
	- Carence martiale

Tableau 18 Principales causes de Dysérythroïèse⁷

⁷ Desk Reference For Hematology, N.K. Shinton, CRC Press, 2007

Il est donc intéressant de regarder si la présence d'une dysplasie autre que la dysérythropoïèse présente un lien avec la présence de variant.

	DYSERYTHROPOÏESE		DYSGRANULOPOÏESE		DYSMEGACARYOPOÏESE	
	<10%	10-20%	<10%	10-20%	<10%	10-20%
Variant(s)	2	1	1	3	1	2
Absence de variant	8	11	10	3	5	4

Tableau 19 Tableau de contingence variant (s) VS dysplasie

Sans faire d'analyse statistique, comme l'indique le Tableau 19, la présence de dysgranulopoïèse ou de dysmégacaryopoïèse n'est pas plus associée à la présence de variant(s).

3.6.4 Critères OMS et variants

Comme indiqué précédemment, les critères d'inclusion dans l'étude correspondent aux définitions françaises des cytopénies et non aux critères OMS. Est-ce que l'utilisation des critères OMS aurait eu un impact sur les résultats ? Le Tableau 20 présente la présence ou non de variant(s) en fonction des critères OMS biologiques.

	OMS BIOLOGIQUE	NON OMS BIOLOGIQUE
Variant(s)	7	0
Absence de variant	19	9

Tableau 20 Tableau de contingence variants VS critères OMS biologiques

p-value = 0,149, non significatif au risque de 5%

On observe donc que les patients mutés rentrent tous dans les critères OMS. Cependant cela n'est statistiquement pas significatif (risque 5%), probablement dû à la taille de l'échantillon. Par ailleurs si l'étude avait pris en compte uniquement les critères OMS biologiques, un quart des patients seraient porteurs de variants au lieu de 20% dans l'étude.

Même si l'on combine les patients présentant tous les critères OMS du SMD (cytologiques et biologiques), selon l'étude présentée ici, cela ne semble pas suffisant pour faire un lien significatif avec la présence de variant (Tableau 21).

	CRITERES OMS CYTO ET BIO	AUCUN CRITERE OMS
Variant(s)	4	0
Absence de variants	9	5

Tableau 21 Tableau de contingence variants VS critères OMS

p-value = 0,28, non significatif au risque de 5%

3.6.5 Analyse des variants

Les variants retrouvés dans cette étude sont ceux qui sont le plus classiquement décrits dans les syndromes myélodysplasiques. Dans l'étude référence de Papaemmanuil, les 10 variants les plus fréquemment retrouvés sont *SF3B1*, *TET2*, *SFRS2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53*, *EZH2* et *IDH2*.

Dans notre étude, 8 variants sur 10 retrouvés sont parmi le top 10 décrit par Papaemmanuil dans son étude sur les SMD¹⁴. Les deux autres variants *WT1* et *IDH1* sont aussi décrits par Papaemmanuil. Il faut noter également que ces variants figurent en bonne position dans l'étude de Jaiswal sur l'hématopoïèse clonale liée à l'âge³⁶.

3.6.6 Evolution des cytopénies

31 patients sur 35 ont bénéficié d'un suivi après leur inclusion. Le détail est décrit dans les annexes.

- 2 patients sont décédés :
 - le patient UsplN 64236 présentait des variants *ASXL1*, *EZH2* et *TP53*. Il est décédé des complications de son traitement pour une double néoplasie ORL.
 - le patient UsplN 64167 qui ne présentait pas de variant.
- 29 patients ont donc bénéficié d'un suivi de leur(s) cytopénie(s). Le suivi s'étend de 3 à 42 mois, avec une moyenne d'environ 11 mois entre le prélèvement médullaire d'inclusion dans l'étude et la dernière numération formule sanguine et/ou myélogrammes

5 patients ont une amélioration de leurs cytopénies.

- le patient UsplN 43029 est un patient de 85 ans, qui au moment du prélèvement médullaire en mai 2013 présentait une anémie à 11,4 g/dL et une thrombopénie à 19 G/L. Lors de son contrôle en décembre 2016, il ne présente plus de cytopénie. Cette amélioration est d'autant plus surprenante que les cytopénies de ce patient sont spontanément résolutive et que celui-ci présente un variant sur 4 gènes à une VAF moyenne de 38% (*DNMT3A*, *TET2*, *WT1* et *ZRSR2*).

2 patientes sans variant (patientes UsplN 63712 et 67538) ont vu une disparition de leur(s) cytopénie(s) suite à un ajustement de leur traitement de leur maladie chronique (polyarthrite rhumatoïde, lupus) ;

- le patient UsplN 63266 sans variant améliore sa thrombopénie d'apparition brutale sans traitement particulier (taux de plaquettes à 143G/L en mars 2017, pour un taux lors de l'inclusion à 37G/L) ;
- le patient UsplN 63039, sans variant, a eu, de façon antérieure à l'inclusion, un diagnostic de syndrome myélodysplasique avec excès de blastes type 2 sur une pancytopénie non retrouvée par la suite sur des myélogrammes de contrôle avec disparition des cytopénies sans traitement particulier.

24 patients ont une persistance de leur(s) cytopénie(s).

- 5 patients présentent des variants (patients numéros UsplN 64607, 65712, 66435, 61118 et 65467)
- 19 patients ne présentent pas de variant
 - 2 patients peuvent présenter une autre cause de cytopénie(s)
 - 1 patient présente une neutropénie considérée au final comme ethnique
 - 1 patiente en aplasie médullaire a vu l'apparition d'un clone HPN
 - 17 patients ont des cytopénies chroniques non expliquées par une hématopoïèse clonale puisque l'analyse NGS n'a pas permis la détection de variant sur des gènes fréquemment mutés dans les hémopathies myéloïdes.

4 Discussion

Une étude sur 35 patients a été réalisée au CHU de Toulouse afin de d'évaluer l'apport du séquençage de nouvelle génération dans les cas des cytopénies chroniques inexplicées(ICUS).

4.1 Cytopénies et variants

Cette étude corrobore les résultats d'autres travaux. Il ne semble pas y avoir de lien entre la profondeur d'une cytopénie et la présence de variant. Cela avait été déjà évoqué dans l'étude de Jaiswal en 2014 sur l'hématopoïèse clonale liée à l'âge ³⁶. Cela a été confirmé par les études de Kwok ⁹ en 2015, de Hansen en 2016 ²³ et de Malcovati en 2017 ¹³. Cependant notre étude présente l'avantage de comparer les cytopénies entre elles. En effet, toutes les études présentes dans la littérature comparent par exemple le taux moyen d'hémoglobine des patients inclus dans leurs études. Ceux-ci présentent au moins une cytopénie mais pas nécessairement une anémie. Ainsi les comparaisons prennent en compte le taux d'hémoglobine des patients qu'il y ait anémie ou non. Notre travail indique quant à lui qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la profondeur d'une cytopénie entre les patients mutés et ceux non mutés. Cela est à confronter au fait que tous les patients présentant un variant ont une profondeur de cytopénie correspondant aux critères OMS (hémoglobine < 10 g/dL, Plaquettes < 100 G/L et PNN < 1,8 G/L). Cela confirme la pertinence des seuils recommandés par l'OMS. On peut donc interpréter cela de la façon suivante : il semble pertinent de franchir un seuil de cytopénie pour espérer mettre en évidence des variants. Mais une fois ce seuil franchi, il ne semble pas exister de lien entre la profondeur de la cytopénie et la présence de variant. Cela suggère, sans pouvoir être prouvé à cause du nombre limité de patients, qu'une recherche de variant par NGS devrait être limitée à un ICUS répondant aux critères OMS et non aux critères français de cytopénie.

Par ailleurs, on peut s'intéresser au nombre de cytopénies en fonction du profil mutationnel. Là encore il ne semble pas y avoir de lien significatif entre le nombre de cytopénies et la présence de variant. Cependant, il faut rester très prudent sur cette observation car si Hansen ²³ le confirme dans son étude, Jaiswal indique le contraire dans son travail sur l'hématopoïèse clonale liée à l'âge ³⁶.

4.2 Dysplasie et variants

Le design de l'étude permet aussi d'étudier un autre point. En effet, lorsque le caryotype est normal, le diagnostic de SMD repose sur la cytologie. Lorsque celle-ci est à la limite de significativité, est ce que cela est en faveur d'une hématopoïèse clonale ? Notre

travail montre qu'il n'y a pas plus de variant lorsque la dysplasie est cytologiquement à la limite de la significativité et ce, quelle que soit la dysplasie observée.

Cela va dans le sens de l'étude de Parmentier et al. ²⁰ qui a trouvé une dysplasie significative selon les critères OMS chez presque un volontaire sain sur deux (46 % d'une étude de 120 volontaires sains). Lorsque la dysplasie est limite, voire légèrement supérieure au seuil de 10%, alors cela ne semble pas constituer à elle seule un argument suffisant pour poser le diagnostic de SMD car cela n'est pas significativement corrélé à un signe de clonalité. Certains travaux proposent même de rehausser les seuils de dysplasie de l'OMS de 10% à 20% ²⁰ voire parfois 40% pour la dysmégacarypoïèse bien que celle-ci soit considérée comme la plus significative ⁴⁰.

Ce point mérite encore d'être étudié car d'autres publications semblent montrer une corrélation entre la présence de dysplasie chez les patients ICUS et la présence de variant(s) (Tableau 22). En effet, Hansen ²³ a trouvé un lien significatif entre la présence de variant et l'observation d'une dysplasie limite chez les ICUS. Dans cette étude de 60 patients, 57% des patients ayant une dysplasie limite présente au moins un variant et 59% des patients ne présentant pas de dysplasie ne portent pas de variant. Même si cela est statistiquement significatif, ce résultat doit être nuancé par le fait qu'à l'inverse, il reste 43% des patients avec signe de dysplasie qui ne présentent pas de variant. Les chiffres restent proches d'une chance sur deux. Par ailleurs, remis dans le contexte de la difficulté de l'évaluation de la dysplasie ces conclusions sont particulièrement à considérer avec précaution. Kwok indique d'ailleurs dans son étude que 44% des patients ICUS avec dysplasie portent un variant et que seulement 17% des ICUS sans dysplasie portent un variant. Mais Malcovati et al. ¹³ ont observé au sein d'une large étude, un groupe de 34 patients dont le diagnostic SMD a été porté uniquement sur la présence d'une dysplasie comprise entre 10 et 25%. 19 patients (soit 56%) ne présentaient pas de variant (détection sanguine). Aucun de ces 19 patients n'ont évolué cliniquement dans le temps sur une moyenne de suivi de 64 mois. Selon ces auteurs cela renforce l'idée que parfois, le diagnostic de SMD peut être porté à tort, si celui-ci est uniquement basé sur la dysplasie car l'analyse moléculaire ne met pas en évidence d'argument de clonalité. Concomitamment, cela indique que le seuil de dysplasie actuel de l'OMS est critiquable et qu'il existe une tendance à ne pas présenter de mutations si aucune dysplasie n'a été observée.

PATIENT ICUS	HANSEN		KWOK		CHU TOULOUSE	
	Dysplasie	Absence	Dysplasie	Absence	Dysplasie	Absence
Variant	57%	41%	44%	17%	21%	17%
Absence de variant	43%	59%	56%	83%	79%	83%

Tableau 22 Tableau comparatif de 3 études sur la corrélation entre la dysplasie et la présence de variant(s)

4.3 Profil des variants

Les mutations retrouvées chez les patients ICUS sont celles les plus fréquemment retrouvées dans les SMD. La littérature scientifique à ce sujet corrobore cette observation. Kwok et al.⁹ Malcovati et al.¹³ et Hansen et al.²³ font exactement le même constat. Les patients CCUS ont le même profil mutationnel que les syndromes myélodysplasiques avérés de bas risque. Il faut cependant noter que ce sont par ordre de fréquence les gènes les plus souvent mutés dans l'hématopoïèse clonale liée à l'âge³⁶. L'intérêt de détecter ces mutations est d'aider à caractériser les cytopénies inexpliquées pour une meilleure prise en charge. En effet, la littérature scientifique indique 2 intérêts :

- Malcovati et al.¹³ ont montré que chez les patients CCUS la probabilité d'évolution vers une hémopathie myéloïde dans les 5 ans est de 82% et même de 95% dans les 10 ans alors que celle-ci n'est que de 9% (à 5 et 10 ans) chez les ICUS non mutés. Le risque augmenté d'évolution vers une hémopathie chez les patients mutés est également soutenu par le travail de Jaiswal et al.³⁶. Sur un suivi plus court de 20 mois en moyenne, Hansen et al.²³ remarquent également cette tendance.
- Le second intérêt est de potentiellement évoluer vers une classification moléculaire du SMD. Malcovati et al.¹³ ont montré que 19 SMD sur 34 diagnostiqués sur une dysplasie limite ne présentaient pas de variants détectables et que la maladie de ces patients n'avait pas du tout progressé sans traitement sur une moyenne de 64 mois, ce qui peut remettre en cause le diagnostic de SMD et appuyer pour l'avantage du NGS. Par ailleurs, Kwok et al.⁹ ont montré que les patients SMD bas risque et les CCUS avaient non seulement le même profil mutationnel mais aussi des VAF similaires. Malcovati et al. ont montré que les CCUS avaient la même survie que les SMD bas risque et que la progression de leur maladie (si l'on considère CCUS comme une maladie) était là encore la même que les SMD bas risque. Cela suggère fortement qu'une approche moléculaire de la caractérisation des ICUS a un intérêt tout particulier puisqu'au final la littérature tend à considérer un CCUS comme un SMD de bas risque.

Dans ces études, il n'y a pas cependant d'explication au fait que les SMD bas risque ont en moyenne un taux d'hémoglobine significativement plus bas que ceux des ICUS mutés (= CCUS). Mais il faut faire attention à cette conclusion car les études ne comparent pas des anémies entre elles mais des taux d'hémoglobine de patients non nécessairement recrutés sur une anémie.

Les variants retrouvés dans notre étude sont essentiellement des variants initiateurs de SMD. Ce sont des variants qui en général confèrent un avantage de survie et de

prolifération à la cellule souche ¹⁸ et donc ce sont des variants intervenant tôt dans le processus de leucémogénèse. D'ailleurs, le patient qui n'a qu'un seul variant présente un variant de *TET2* qui est selon la littérature un classique variant initiateur fondateur d'un clone malin. Le Tableau 23 issue d'une publication de Cazzola et al. ¹⁸ indique les variants fondateurs et les variants sous clonaux.

Biological pathways and genes	Frequency	Timing of mutation acquisition	Prognostic or predictive relevance of mutant gene
RNA splicing			
<i>SF3B1</i>	15-30%	More often a founding mutation	Associated with good overall survival and low risk of leukemic evolution
<i>SRSF2</i>	10-20%	More often a founding mutation	Associated with poor overall survival and high risk of leukemic evolution
<i>U2AF1</i>	<10%	More often a founding mutation	Associated with high risk of leukemic evolution
<i>ZRSR2</i>	<10%	More often a founding mutation	Not defined
DNA methylation			
<i>TET2</i>	20-30%	More often a founding mutation	No impact on overall survival, may predict response to hypomethylating agents
<i>DNMT3A</i>	10%	More often a founding mutation	Associated with unfavorable clinical outcome
<i>IDH/IDH2</i>	5%	More often a founding mutation	Associated with unfavorable clinical outcome
Chromatin modification			
<i>ASXL1</i>	15-20%	More often a subclonal mutation	Associated with unfavorable clinical outcome in all myeloid neoplasm
<i>EZH2</i>	5%	More often a subclonal mutation	Associated with unfavorable clinical outcome in all myeloid neoplasm
Transcription			
<i>RUNX1</i>	10%	More often a subclonal mutation	Associated with unfavorable clinical outcome
<i>BCOR</i>	<5%	More often a subclonal mutation	Associated with unfavorable clinical outcome
DNA repair control			
<i>TP53</i>	5%	Typical subclonal mutation	Associated with poor overall survival and high risk of leukemic evolution, predicts poor response to lenalidomide in MDS with del(5q)
Cohesin			
<i>STAG2</i>	<10%	More often a subclonal mutation	Associated with unfavorable clinical outcome
RAS pathway			
<i>CBL</i>	<5%	More often a subclonal mutation	Not defined in MDS
<i>NRAS/KRAS</i>	<5%	More often a subclonal mutation	Not defined in MDS
<i>NF1</i>	<5%	More often a subclonal mutation	Not defined in MDS
DNA replication			
<i>SETBP1</i>	<5%	More often a subclonal mutation	Associated with poor overall survival and high risk of leukemic evolution
Receptors			
<i>CSF3R</i>	<1%	Founding driver mutation in CNL	Mutation type may predict response to specific inhibitors

Tableau 23 Principaux variants des SMD, leur fréquence et leur importance

En termes d'association de variants entre eux, là encore nos patients CCUS présentent les mêmes associations que celles classiquement retrouvées dans les SMD. Malcovati et al.¹³ ont montré que dans les hémopathies myéloïdes les variants de :

- *TET2* étaient très souvent associés à ceux de *SRSF2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *DNMT3A* et de *ZRSR2* ;
- *ASXL1* étaient très souvent associés à ceux de *SRSF2*, *SF3B1*, *RUNX1* et de *TET2* ;
- *DNMT3A* étaient très souvent associés à ceux de *SF3B1* et de *TET2*.

Cette étude montre que certaines associations sont plus à risque d'évolution que d'autres, ce qui peut donc justifier l'intérêt de détecter des variants au diagnostic grâce au NGS afin d'étudier un maximum de gènes. Un variant *TET2* seul est moins à risque d'évolution défavorable que *SF3B1* seul. Un variant *TET2* associé à ceux d'*ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *EZH2*, *BCOR*, *TP53* ou de *IDH1/IDH2* présente un haut degré de risque d'évolution défavorable. Cela est aussi lié au nombre de variants retrouvés. Plus le nombre de variants est grand plus le risque final d'évolution vers une hémopathie myéloïde est fort. Notre étude ayant commencé seulement depuis essentiellement un an, le recul est insuffisant pour observer ce phénomène. Sur un an, aucune transformation en hémopathie myéloïde n'a eu lieu.

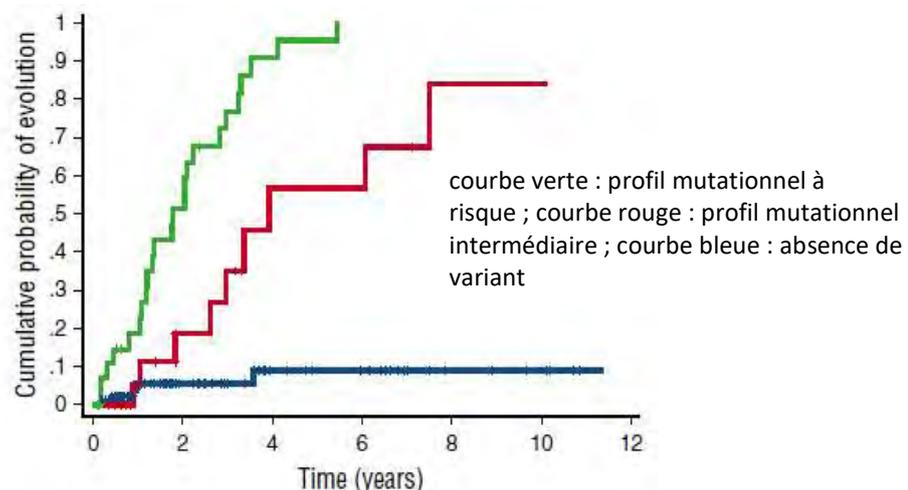


Figure 22 Risque d'évolution du ICUS vers une hémopathie myéloïde en fonction du profil mutationnel¹³

Les VAF de notre étude sont d'environ 36% en moyenne. Cela indique qu'en moyenne 72% des cellules présentent un variant à l'état hétérozygote. Cela est considérable et du même ordre de grandeur que les SMD bas risque (Kwok et al.). Cependant, il est difficile de comparer ces VAF avec ce qui est indiqué dans la littérature pour émettre des hypothèses. Les principales études sur le sujet diffèrent toutes dans la manière d'analyser l'ADN :

- Notre étude : ADN à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse ;
- Jasiwal et al.³⁶ : ADN à partir du sang total périphérique ;
- Kwok et al.⁹ : ADN à partir des cellules de la moelle ;

- Hansen et al. ²³ : ADN à partir de cellules de la moelle osseuse ou des PNN du sang périphérique ;
- Malcovati et al. ¹³: ADN à partir des PNN du sang périphérique.

En termes de VAF, les études faites sur moelle et celles sur ADN ne sont pas comparables car il est évident que les VAF dans la moelle osseuse sont globalement plus élevées. Comme il a été dit que la VAF conditionne l'évolution, notre étude ne peut être comparée aux travaux faits sur sang dans ce domaine.

- Des variants détectés dans la moelle osseuse ne le seront peut-être pas dans le sang.
- Notre étude retrouve les VAF décrites dans la littérature à partir de prélèvements de moelle osseuse. Malheureusement, ces études ne sont pas celles qui sont les plus pertinentes en termes d'évolution dans le temps. On ne peut donc confirmer Jaiswal et al. ³⁶ et Malcovati et al.¹³ qui indiquent qu'une VAF élevée est corrélée au risque de progression. Cependant, on peut tout à fait le concevoir aussi à partir d'un prélèvement de moelle.

4.4 Age et variant

Dans notre étude seul l'âge est significativement corrélé avec la présence de mutation. 20% de nos patients sont mutés et en moyenne nos patients mutés ont 83 ans alors que les non mutés ont 66 ans. 2 publications sur 3 ayant étudié la présence de variants chez les patients ICUS mettent aussi en évidence une différence d'âge significative entre les patients mutés et les non mutés.

PATIENT ICUS	HANSEN		KWOK		MALCOVATI	
	Muté	Non muté	Muté	Non muté	Muté	Non muté
Age (années)	70	70	75	66	68	53
Fréquence	62%	38%	28%	72%	36%	64%

Tableau 24 Comparatif des études ayant évalué la présence de variants chez les ICUS.

On remarque que la fréquence de variant chez les ICUS varie grandement selon les études ainsi que l'âge des populations étudiées. Notre étude présente la fréquence la plus faible compte tenu des critères plus larges d'inclusion au niveau des cytopénies (critères français et non OMS). En prenant uniquement les critères OMS, nous aurions également une fréquence de mutation de 27%. Hansen suggère aussi que la différence de fréquence parmi les populations ICUS étudiées est sûrement due aux critères d'inclusion. Leurs critères d'inclusion sont probablement très stricts compte tenu du fait qu'ils ont inclus seulement 60 patients entre 2008 et 2015 au sein du service d'hématologie de l'hôpital de Copenhague.

Cette notion de fréquence de variant associée à l'âge est très importante puisqu'il existe une hématopoïèse clonale liée à l'âge. Vers 80 ans, dans la population générale, sans hémopathie ou antécédents d'hémopathie, environ 10-15% de la population présente un variant détectable dans le sang classiquement retrouvé dans les hémopathies (Figure 23). Dans l'ensemble, notre étude et les travaux de la littérature retrouvent des fréquences supérieures au même âge MAIS le travail de Jaiswal a été réalisé dans le sang. Ces fréquences retrouvées n'auraient elles pas été supérieures si de l'ADN issu de moelle osseuse avait été utilisé ? Seule une étude comparative entre profil mutationnel sang versus moelle pourrait le confirmer. Cela semble possible compte tenu du fait que l'expérience a montré que certains variants sont parfois retrouvés dans la moelle et absents du sang du même patient.

On ne peut donc pas formellement sur notre étude prouver que les ICUS ont plus de risque d'être mutés que la population générale compte tenu de l'hématopoïèse clonale liée à l'âge même si on peut tout de même le penser car :

- L'étude de Malcovati faite sur sang indique un taux de 36% de variants à une moyenne d'âge de 68 ans chez les ICUS alors que l'hématopoïèse clonale est à moins de 10% à cet âge là.
- Aussi dans l'hématopoïèse clonale liée à l'âge, seuls 8% des patients mutés ont 2 variants ou plus alors que plus de 50% des ICUS mutés ont 2 variants ou plus.

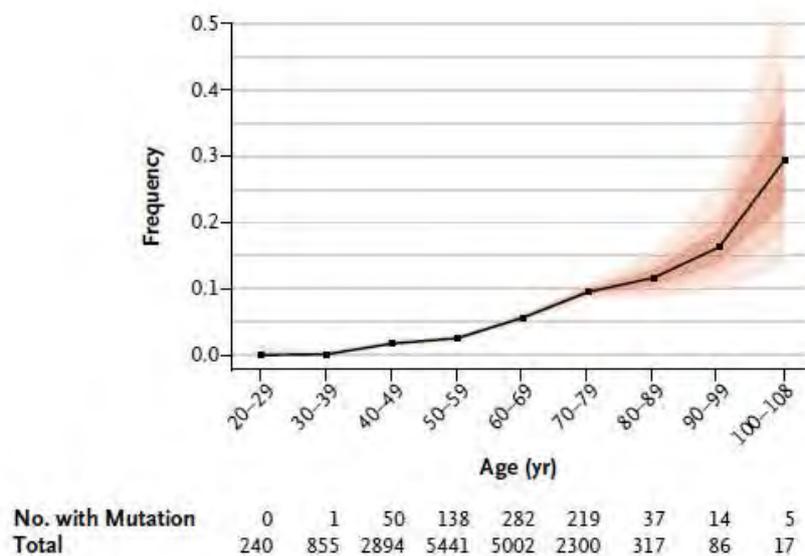


Figure 23 Fréquence de l'hématopoïèse clonale en fonction de l'âge

On peut donc supposer que le risque de présenter des variants chez un patient ICUS est probablement plus élevé que le risque lié à l'hématopoïèse clonale liée à l'âge et peut donc être intéressant à rechercher.

4.5 Aspect médico-économique

4.5.1 Aspect économique

Selon la grille du référent des actes innovants hors nomenclature (RIHN), l'analyse NGS est facturée BHN 8170, soit environ 2200 euros. Pour information un caryotype est facturé B800, soit 216 euros, et la lecture d'un myélogramme B100 soit 27 euros. Ainsi, il est à l'heure actuelle nécessaire de réfléchir à la réalisation d'une telle analyse et surtout nécessaire de réfléchir à l'impact que le résultat aura pour la prise en charge du patient.

4.5.2 Prise en charge clinique

L'intérêt majeur de la détermination de la présence ou non d'une hématopoïèse clonale est la précision du cadre nosographique. Le but final est d'améliorer la prise en charge du patient avec un éventuel accès à un traitement adapté.

Comme indiqué par plusieurs études citées dans ce travail, le risque de progression vers une hémopathie étant plus élevé chez le patient CCUS, il est intéressant de suivre ces patients de façon rapprochée. A l'inverse, dans l'état actuel des connaissances, l'absence de détection de variant peut inciter le clinicien à ne plus privilégier une étiologie hématologique aux cytopénies et donc investiguer dans une autre direction.

L'anémie étant la cytopénie la plus représentée dans cette étude, mieux la caractériser est un gain de chance pour le patient. Différentes études ont montré l'impact négatif d'une anémie même modérée chez le patient de plus de 65 ans. Celle-ci entraîne une baisse de forme physique⁴¹, un nombre de chutes plus important⁴², une altération des fonctions cognitives⁴³, un nombre augmenté d'hospitalisations et de mortalité⁴⁴. La détection d'un argument de clonalité chez un patient présentant une anémie peut selon le contexte le rendre éligible à recevoir un agent stimulant de l'érythropoïèse⁸. Cette thérapie présente l'avantage d'être parfaitement supportable pour cette catégorie de patient. Dans notre étude, cela est le cas pour les patients USPLN 64607 et 66435. Egalement, l'intérêt d'une analyse NGS existe chez des patients présentant un tableau de pathologie inflammatoire chronique qui semble bien contrôlée et qui pourtant ont une anémie chronique. L'anémie est-elle due à la pathologie inflammatoire dont le traitement mérite quelques ajustements ou alors à une hématopoïèse clonale sous-jacente ? C'est le cas du patient USPLN 61118 qui présente une anémie chronique malgré le contrôle apparent de sa pathologie rhumatismale inflammatoire chronique. La détection de variant chez ce patient peut apporter un argument d'hématopoïèse clonale et envisager une prise en charge adaptée de l'anémie. Dans le cas de l'absence de détection de variant, la cause inflammatoire est plutôt à privilégier.

De la même façon, la question se pose chez les patients présentant une thrombopénie chronique inexplicée et résistante à la corticothérapie. Est-ce un Purpura Thrombopénique auto Immun (PTI) chronique résistant ou une myélodysplasie sous-jacente ? Cette question a

justifié l'analyse NGS pour 3 patients. L'absence de détection de variant peut être en faveur d'un PTI chronique qui sera alors éligible aux analogues de la thrombopoïétine (TPO) pour l'instant non recommandés dans le traitement des thrombopénies associées aux syndromes myélodysplasiques⁸. En effet, les analogues à la TPO augmentent le nombre de blastes à l'initiation du traitement. Cela semble transitoire mais la prudence est à l'heure actuelle recommandée quant à l'utilisation de ces médicaments dans les thrombopénies associées aux SMD.

Enfin, même s'il n'y a pas eu le cas dans notre étude, la détection de variant chez un patient jeune aux cytopénies inexplicables pourrait éventuellement faire discuter les cliniciens d'une greffe de moelle osseuse en fonction du contexte. Cependant, il est nécessaire de souligner que le contexte clinique du patient prime sur le reste. En effet, une analyse NGS chez une patiente de 62 ans pancytopénique exclue de l'étude car présentant le diagnostic d'anémie réfractaire par excès de blastes type 2, n'a pas mis en évidence de variant sur les gènes étudiés. Malgré tout, cette patiente est rentrée dans le projet d'une allo-greffe de moelle osseuse.

5 Conclusion

Une étude sur l'utilisation du NGS chez 35 patients ICUS a été réalisée au sein du CHU de Toulouse depuis octobre 2016.

Un patient ICUS semblerait avoir légèrement plus de risque de présenter un variant que la population générale. Cela doit être confirmé par la poursuite de l'étude et surtout par une comparaison de l'analyse NGS entre ADN issu du sang et ADN issu de moelle osseuse.

La profondeur d'une cytopénie ICUS ne semble pas liée à la présence de variants à partir du moment où le seuil des critères OMS est franchi. Il semble intéressant de ne rechercher des variants que chez les patients répondant aux cytopénies telles que définies par l'OMS.

Il ne semble pas exister de lien significatif entre le nombre et/ou le type de cytopénies et la présence de variant.

Une dysplasie limite (10-20%) n'est pas liée significativement à la présence de variant et donc ne permet pas à elle seule de poser le diagnostic de myélodysplasie car il n'y a pas d'argument de clonalité détecté. Cela est vrai quel que soit le type de dysplasie observé. Par ailleurs, l'absence de dysplasie et un caryotype normal semblent réduire fortement la probabilité de présenter un variant.

Egalement, à ce jour, la plupart des études qui ont travaillé sur le sujet (dont la nôtre) ont un biais dû à l'âge. Cela implique une conséquence majeure : l'éligibilité à l'analyse NGS chez les patients ICUS doit être extrêmement maîtrisée pour se détacher de l'hématopoïèse clonale liée à l'âge.

En théorie, selon la littérature scientifique récente, la mise en évidence de patient CCUS présente un intérêt tout particulier car ces patients CCUS ont un fort risque d'évoluer vers une hémopathie et que cette condition semble les apparenter à des SMD bas risque. Egalement, la détection ou non de variant permet de préciser le cadre nosographique chez un patient ICUS et aide le clinicien dans sa prise en charge.

Annexes

Les annexes comportent, sous forme de tableaux, les données brutes concernant les patients inclus dans l'étude.

Annexe 1 : Age, sexe et résultats sanguins des patients inclus dans l'étude.

Annexe 2 : Résultats bruts du myélogramme d'inclusion par patient

Annexe 3 : Conclusion du myélogramme d'inclusion, résultats cytogénétiques et NGS par patient

Annexe 4 : Suivi des patients

ANNEXE 1

USPLN Patient	Sexe	Date de Naissance	Date myelogramme	BIOLOGIE SANGUINE REALISEE DANS LE MOIS DU PRELEVEMENT MEDULLAIRE							
				Hb (g/dL)	Plaquettes (G/L)	Neutrophiles (G/L)	CRP (mg/L)	Ferritine (µg/L)	Créatinine (µmol/L)	B9 (ng/mL)	B12 (pg/mL)
64607	F	30-déc.-1932	juin-16	9.2	299	4.1	52	N/A	107	4.4	415
65712	H	21-oct.-1930	août-16	14.9	89	0.7	3	94	75	3.8	494
66435	F	29-sept.-1931	sept.-16	10.7	67	2.2	2.7	N/A	122	8	748
61118	H	2-juil.-1941	févr.-16	13.5	106	1.7	13	181	96	N/A	N/A
43029	H	23-mai-1931	mai-13	11.4	19	4.1		RESULTATS NON DISPONIBLES			
64236	H	26-mai-1937	juil.-16	8.6	49	7.1	93	N/A	100	5.6	914
65467	F	11-juin-1926	août-16	8.2	5	1.3	18	407	72	1.8	583
69594	F	20-févr.-1956	janv.-17	12.8	262	1.1	1.2	N/A	55	5.3	376
63712	F	1-févr.-1940	mai-16	10.1	463	6,0	22	31	67	40	430
64508	H	1-janv.-1929	juin-16	8.3	114	2.4	3.9	490	90	5.7	646
63617	F	2-mai-1957	mai-16	10.4	301	3.5	9	134	100	N/A	N/A
66096	H	26-mai-1933	août-16	12.8	38	1.1	9.6	N/A	100	3.6	384
63151	H	20-avr.-1977	avr.-16	11.1	402	2.7	1.5	278	85	3.7	606
61743	F	23-févr.-1954	févr.-16	10.4	89	0.6	0	224	68	N/A	N/A
65539	H	17-juil.-1979	août-16	14.3	55	8.7	0	N/A	81	N/A	N/A
51870	H	20-mars-1937	nov.-14	11	85	3,0	3	756	204	N/A	N/A
63039	H	29-avr.-1941	avr.-16	10.2	87	2.8	20	70	242	21.8	670
63346	F	31-déc.-1953	mai-16	10.9	277	1.6	8.4	350	78	4	234
63183	H	20-nov.-1949	avr.-16	13.3	34	1.6	0	53	80	N/A	N/A
64167	F	18-nov.-1938	juin-16	8.1	6	2.5	42	1526	57	9.9	>2000
64983	F	8-avr.-1946	juil.-16	7.9	5	0.2	119	119	1758	N/A	392
63266	H	16-oct.-1946	avr.-16	11.7	37	3.3	2	N/A	Dialysé	N/A	N/A
64112	H	28-juin-1939	juin-16	11	111	3.5	0.3	N/A	72	4.26	704
63050	H	14-mars-1942	août-16	15.5	15	3.2	0	N/A	83	N/A	N/A
63660	F	7-nov.-1952	mai-16	12.2	71	2.7	1.9	74	48	N/A	N/A
66743	F	13-mai-1968	sept.-16	14.2	238	1,0	4	222	64	N/A	N/A
67028	F	5-févr.-1951	oct.-16	9.1	206	3,0	36	1147	122	6.3	228
65329	F	29-oct.-1976	juil.-16	10.1	319	4.6	4.3	43	62	N/A	395
65607	H	4-févr.-1931	août-16	11.5	203	2	5	55	51	3	300
67069	H	19-mai-1939	oct.-16	12.2	215	N/A		DEMANDE EXTERIEURE RESULTATS NON DISPONIBLES			
67538	F	30-sept.-1973	oct.-16	11.1	24	0.6	1.9	N/A	64	5.8	239
66341	H	30-juin-1964	sept.-16	15.3	50	3.4	3.9	N/A	60	3.8	470
66031	H	26-août-1949	août-16	10.9	176	4.6	8	112	118	9.55	280
51358	H	29-mai-1955	oct.-15	12.6	111	4.2	0.3	38	99	10	571
69540	H	26-janv.-1968	janv.-17	14.8	43	23.6	10	N/A	96	N/A	N/A

N/A : Résultat non disponible ; F : Femme ; H : Homme

ANNEXE 2

USPLN patient	RESULTATS PRELEVEMENT MEDULLAIRE								
	Grade	Mégacaryoctes	Blastes	DysE <10 %	DysE 10-20%	DysG <10%	DysG 10-20%	DysMK <10%	DysMK 10-20%
64607	2	Inférieur	0	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
65712	2	En rapport	3	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui
66435	2	En rapport	2	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non
61118	3	En rapport	2	non	non	non	non	non	non
43029	3	En rapport	2	non	oui	non	oui	non	non
64236	3	Inférieur	5	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
65467	2	en rapport	1	Oui	non	non	non	non	non
69594	3	Nombreux	1	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
63712	3	Nombreux	1	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
64508	3	Inférieur	2	Non	oui	Non	Non	Non	Oui
63617	3	Très nombreux	3	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non
66096	3	Nombreux	1	Non	Non	Non	Non	Oui	Non
63151	3	Inférieur	2	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non
61743	1	Très rares	4	Non	Non	Non	Non	Non	Non
65539	3	En rapport	2	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non
51870	3	en rapport	3	Oui	non	non	non	non	non
63039	3	En rapport	1	non	oui	non	non	non	oui
63346	3	Supérieur	3	Non	oui	Non	Non	Non	Non
63183	3	En rapport	1	non	non	non	non	non	non
64167	2	Inférieur	1	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
64983	2	Absence	0	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
63266	3	Nombreux	2	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
64112	3	En rapport	1	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
63050	2	En rapport	1	Non	Non	oui	non	Non	Non
63660	3	En rapport	2	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
66743	3	En rapport	3	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non
67028	3	En rapport	2	non	non	oui	non	non	non
65329	3	Nombreux	3	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
65607	4	En rapport	3	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non
67069	3	Nombreux	1	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non
67538	1	Absence	3	Non	Non	Non	Non	Non	Non
66341	2	En rapport	1	Oui	Non	Non	Oui	Non	Non
66031	3	Très nombreux	2	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non
51358	1	en rapport	3	non	oui	non	non	oui	non
69540	3	Très nombreux	1	Non	Non	Non	Oui	Non	Non

DysE : Dysérythroïèse ; DysG : Dysgranulopoièse ; DysMK : Dismégacaryopoièse

ANNEXE 3

USPLN patient	Conclusion myélogramme	Caryotype médullaire	Mutations
64607	Absence d'anomalies morphologiques significatives sur les lignées médullaires. Sidéroblastes type III 7% Coloration de Perls anormale mais insuffisante pour conclure au diagnostic de syndrome myélodysplasique	Normal	DNMT3A : NM_175629.2:c.768_769insC, NP_783328.1:p.T257delinsHCfs, fréquence allélique du variant 24%; SF3B1 : NM_012433.3(SF3B1_v001):c.2098A>G, NM_012433.3(SF3B1_i001):p.(Lys700Glu), fréquence allélique du variant 33% - insertion d'un nucléotide entraînant un décalage de lecture pour DNMT3A
65712	Dysmyélopoïèse modérée mais compatible avec un syndrome myélodysplasique avec dysplasie unilignée (SMD-SLD).	Normal	NM_001127208.2(TET2_v001):c.2872C>T, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Gln958*), VAF 42% - Perte de fonction TET 2
66435	Présence de rares mégacaryocytes monolobés ou à noyaux séparés (non significatif). Présence de quelques granuleux hypogranuleux voire dégranulés (non significatif).	Normal	NM_015338.5(ASXL1_v001):c.3456_3459del; NM_015338.5(ASXL1_i001):p.(His1153Valfs*17), fréquence allélique du variant : 39%. NM_001195427.1(SRSF2_v001):c.284C>A, NM_001195427.1(SRSF2_i001):p.(Pro95His), fréquence allélique du variant : 34%. NM_001127208.2(TET2_v001):c.3356del, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Leu1119Tyrfs*18), fréquence allélique du variant : 35% -perte de fonction ASXL1 et perte de fonction ASXL2
61118	Absence d'argument pour SMD	normal	IDH1: NM_001282386.1:c.394C>T, NP_001269315.1:p.Arg132Cys, VAF : 0,29 ; SRSF2 : NM_001195427.1:c.284C>G, NP_001182356.1:p.P95R, VAF : 0,27; HaloPlex_160615; 245 kb
43029	En faveur d'une CRMD	Normal	NM_175629.2(DNMT3A_v001):c.1290del, NM_175629.2(DNMT3A_i001):p.(Tyr432Thrfs*219), VAF 39% ; NM_001127208.2(TET2_v001):c.2470A>T, NM_001127208.2(TET2_i001):p.(Lys824*), VAF 34% ; NM_024426.4(WT1_v001):c.504C>A, NM_024426.4(WT1_i001):p.(Phe168Leu), VAF 45% ; NM_005089.3(ZRSR2_v001):c.1004_1038dup, NM_005089.3(ZRSR2_i001):p.(Tyr347Profs*?), VAF 35% DNMT3A, TET2 et ZRSR2 perte de fonctions et WT1 ponctuelle

ANNEXE 3 (suite)			
USPLN patient	Conclusion myélogramme	Caryotype médullaire	Mutations
64236	Présence de mégacaryocytes à noyaux séparés et de quelques (anomalies de dénucléation, érythroblastes à cytoplasme feuilltés difficilement quantifiable du fait du faible nombre d'éléments rencontrés. Absence d'anomalies morphologiques au niveau de la lignée granulocytaire.)	Normal	ASXL1 : NM_015338.5:c.1900_1922del; NP_056153.2:p.R634Rfs; VAF : 40%, EZH2 : NM_004456.4:c.1967_1976del; NP_004447.2:p.A656Efs, VAF : 44%; TP53 :NM_001126112.2:c.826G>C; NP_001119584.1:p.A276P; VAF: 45%
65467	Absence d'anomalies cytologiques qualitatives spécifiques	Normal	TET2 : NM_001127208.2:c.2026delC et c.4457C>G, NP_001120680.1:p.Leu676Cysfs et NM_001127208.2:p.Ser1486X, fréquence allélique des variants : 35% et 27%
69594	Absence d'anomalies cytologiques significatives.	Normal	Absence de variant
63712	Dysgranulopoïèse non spécifique insuffisante pour évoquer un syndrome myélodysplasique	Normal	Absence de variant
64508	Absence d'anomalie spécifique	Normal	Absence de variant
63617	Les anomalies cytologiques observées sont trop discrètes pour permettre à elles seules le diagnostic de myélodysplasie	Normal	Absence de variant
66096	Dysmégacaryopoïèse à la limite de la significativité (10%)	Normal	Absence de variant
63151	Absence d'anomalie cytologique significative	Normal	Absence de variant
61743	Lignées myéloïdes effondrées non évaluables morphologiquement. Présence d'un petit contingent de blastes myéloïdes (4%). Parmi les lymphocytes, environ 20% correspondent à des lymphocytes à grains	Normal	Absence de variant
65539	Dysmyélopoïèse très modérée	Normal	Absence de variant
51870	Absence d'anomalie d'orientation	Normal	Absence de variant
63039	Absence d'argument en faveur d'un SMD	-Y	Absence de variant

USPLN patient	Conclusion myélogramme	Caryotype médullaire	Mutations
63346	Dysérythropoïèse significative avec anomalie de dénucléation (non retrouvée par la suite), cytoplasme feuilleté avec ponctuations basophiles. Pas d'anomalie morphologique sur les autres lignées	Normal	Absence de variant
63183	Absence d'anomalies cytologiques spécifiques au niveau des différentes lignées	Non lu	Absence de variant
64167	Arguments cytologiques insuffisants pour évoquer un syndrome myélodysplasique	Normal	Absence de variant
64983	Aplasie médullaire	Normal	Absence de variant
63266	Dysmégacaryopoïèse discrète, à la limite de la significativité (12% des éléments), avec mégacaryocytes à noyaux séparés. Dysérythropoïèse non significative (6%) avec érythroblastes à cytoplasme feuilleté. Absence de signes dysgranulocytaire	46,XY,del(10)(p11p12)<6>/46,XY<14> (del 10p non suffisante)	Absence de variant
64112	Présence de mégacaryocytes à noyaux séparés ou de petite taille dysmorphiques (>10%)	Normal	Absence de variant
63050	Dysgranulopoïèse insuffisante pour conclure au diagnostic du syndrome myélodysplasique.	Normal	Absence de variant
63660	Persistance d'une dyséthropoïèse modérée	Normal	Absence de variant
66743	Absence d'anomalies cytologiques suffisantes	Normal	Absence de variant
67028	Absence d'anomalie morphologique significative des différentes lignées	-X	Absence de variant
65329	Anomalies cytologiques insuffisantes	Normal	Absence de variant
65607	Myélogramme d'interprétation difficile en raison de l'agglutinine froide. - Aspect compatible avec une myélodysplasie de type MDS-SLD mais limite	Normal	Absence de variant
67069	Au niveau de la lignée érythroïde, présence de quelques cytoplasmes feuilletés à la limite de la significativité. (environ 10%). Au niveau de la lignée granulocytaire, présence d'une légère hypercondensation chromatinienne (< 10 %).	-Y	Absence de variant

USPLN patient	Conclusion myélogramme	Caryotype médullaire	Mutations
67538	Absence d'anomalies cytologiques sur les différentes lignées.	Normal	Absence de variant
66341	Diagnostic de myélodysplasie difficile à affirmer sur la seule présence de la dysgranulopoïèse	Normal	Absence de variant
66031	Arguments cytologiques insuffisants pour conclure à un syndrome myélodysplasique	Normal	Absence de variant
51358	Dysgranulopoïèse insuffisante à ce jour pour conclure à un syndrome myélodysplasique	Normal	Absence de variant
69540	Dysgranulopoïèse insuffisante pour affirmer un SMD	Normal	Absence de variant

ANNEXE 4

USPLN patient	Suivi depuis le prélèvement de moelle osseuse d'inclusion	Durée suivi (mois)	Amélioration cytopénie(s)	Explication possible
64607	Mar 2017 : Hb 8,3 g/dL ; Pqt 157 G/L	9	Non	variant
65712	Juin 2017 : Pqt ; 113 G/L ; PNN 0,3G/L	10	Non	variant
66435	Fev 2017 Hb 11,7 g/dL; Pqt 69 G/L	5	Non	variant
61118	Mar 2017 : Hb : 12,2 g/dL ; Pqt 115G/L ; PNN à 0,9G/L. Présence LGL à 18%	13	Non	variant
43029	Dec 2016 : Absence de cytopénie sans traitement	42	Oui	variant
64236	Décédé en juillet 2016 de complications du traitement d'une double néoplasie ORL	N/A	Non	variant
65467	Juin 2017 : Augmentation des plaquettes sous N plate. Caryotype apparition d'une DEL 20q Myélogramme : absence d'anomalie suffisante pour SMD	8	Non	variant
69594	NON	N/A	N/A	Neutropénie chronique
63712	Sep 2016 : Hb 8,5 g/dL/ sous corticoïdes Hb 12g/dL en dec 2016/ puis arret corticoïdes et anémie 9g/dL et CRP remonte en fév 2017	4	Oui	Contrôle PPR
64508	Avr2017 : Hb 9,7 g/dL ; Pqt 65 G/L	10	Non	non
63617	Mar 2017 : Hb 10,5 g/dL ; Pqt 270 G/L	10	Non	non
66096	Mar 2017 : Hb 14 g/dL ; pqt 36 G/L ; PNN 0,4 G/L (apparition neutropénie sous Mabthéra)	8	Non	non
63151	Juil 2017 : numération en ville. Soutien transfusionnel régulier.	15	Non	non
61743	Mai 2017 : Hb 8,8 g/dL ; Pqt 57 G/L, PNN 0,3 G/L	15	Non	non
65539	Juil 2017 : thrombopénie réfractaire ayant nécessité une splénectomie	11	Non	non
51870	Nov 2016 : Hb : 11,5 g/dL et Pqt 73 G/L	24	Non	non
63039	Notion d'AREB 2 non retrouvée mars 2017 : Hb 12,2 g/dL ; Pqt 184 G/L PNN 2,9 G/L	11	Oui	non
63346	Mai 2017 Absence d'argument cytologique suffisant pour évoquer un syndrome myélodysplasique Anémie 11,3, Pqt 157	12	Non	non
63183	Juil 2017. Suivi simple sans évolution	15	Non	Non
64167	Décédé	N/A	Non	Non
64983	Juin 2017 Hb 7,4 g/dL ; Pqt 17 G/L ; PNN 0,5 G/L Présence d'un clone HPN découvert	11	Non	HPN
63266	Mai 2017 Hb : 11,5g/dL ; Pqt 143 G/L	13	Oui	non
64112	Juil 2017 – Aggravation thrombopénie (selon courrier, numération de ville)	13	Non	Non
63050	NON	N/A	N/A	N/A
63660	Non	N/A	N/A	N/A

USPLN patient	Suivi depuis le prélèvement de moelle osseuse d'inclusion	Durée suivi (mois)	Amélioration cytopénie(s)	Explication possible
66743	Mai 2017 : Neutropénie toujours présente sur courrier (bilan de ville)	8	Non	non
67028	Fev 2017 : Anémie 8,8g/dL; Pqt 104 G/L; PNN 3,5G/L	4	Non	non
65329	Mai 2017 Hb 10,7g/dL	10	Non	non
65607	Mai 2017 Hb 9,8 g/dL Pqt 160 G/L PNN 1,7 G/L	9	Non	Non
67069	Juil 2017 Hb 12g/dL	9	Non	Non
67538	Amélioration des cytopénies puis rechute de son lupus en Mai 2017 Hb : 10,7 g/dL ; Pqt 77 G/L ; PNN 1,3 G/L. Myélogramme et caryotype sans anomalie.	7	Oui	Contrôle lupus
66341	NON	N/A	N/A	N/A
66031	Sep 2017 ; Hb : 12g/dL	13	Non	Non
51358	Mar 2016 Hb 12g/dL ; Pqt 72 G/L	5	Non	Non
69540	Mai 2017 Pqt 33G/L	5	Non	non

N/A : Non disponible ; Hb : Taux d'hémoglobine ; Pqt : Taux de plaquettes ; PNN : Taux de polynucléaires neutrophiles

Bibliographie

1. Steensma, D. P. Historical perspectives on myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* **36**, 1441–1452 (2012).
2. Bjorkman, S. E. Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow: a study of four cases. *Blood* **11**, 250–259 (1956).
3. Dameshek, W. Sideroblastic Anaemia: Is This a Malignancy? *British Journal of Haematology* **11**, 52–58 (1965).
4. Saarni, M. I. & Linman, J. W. Preleukemia. The hematologic syndrome preceding acute leukemia. *Am. J. Med.* **55**, 38–48 (1973).
5. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* **51**, 189–199 (1982).
6. Yunis, J. J., Bloomfield, C. D. & Ensrud, K. All Patients with Acute Nonlymphocytic Leukemia May Have a Chromosomal Defect. *New England Journal of Medicine* **305**, 135–139 (1981).
7. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* blood-2016-03-643544 (2016). doi:10.1182/blood-2016-03-643544
8. Fenaux, P. Consensus français sur les syndromes melodysplasiques (SMD) et la leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic, classifications, traitement. in (2015).
9. Kwok, B. *et al.* MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood* **126**, 2355–2361 (2015).
10. James W. Vardiman, S. H. S. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* (2008).

11. Ezkurdia, I. *et al.* Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5866–5878 (2014).
12. Guralnik, J. M. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* **104**, 2263–2268 (2004).
13. Malcovati, L. *et al.* Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood* **129**, 3371–3378 (2017).
14. Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616–3627 (2013).
15. Cargo, C. A. *et al.* Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. *Blood* **126**, 2362–2365 (2015).
16. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
17. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Lecture critique de l'hémogramme : Valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques. (1997).
18. Cazzola, M., Della Porta, M. G. & Malcovati, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* **122**, 4021–4034 (2013).
19. Glauser, T. A. *et al.* Current pathology practices in and barriers to MDS diagnosis. *Leuk. Res.* **37**, 1656–1661 (2013).
20. Parmentier, S. *et al.* Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica* **97**, 723–730 (2012).
21. Invernizzi, R., Quaglia, F. & Porta, M. G. D. Importance of Classical Morphology in the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **7**, (2015).

22. Germing, U. *et al.* Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **36**, 727–734 (2012).
23. Hansen, J. W. *et al.* Mutations in idiopathic cytopenia of undetermined significance assist diagnostics and correlate to dysplastic changes. *Am. J. Hematol.* **91**, 1234–1238 (2016).
24. Anderson, M. W. & Schrijver, I. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. *Genes* **1**, 38–69 (2010).
25. Brookes, A. J. The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177–186 (1999).
26. Condit, C. M., Achter, P. J., Lauer, I. & Sefcovic, E. The changing meanings of “mutation:” A contextualized study of public discourse. *Hum. Mutat.* **19**, 69–75 (2002).
27. Chanock, S. Candidate Genes and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the Study of Human Disease. *Dis Markers* **17**, 89–98 (2001).
28. den Dunnen, J. T. *et al.* HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation* **37**, 564–569 (2016).
29. Piel, F. B. *et al.* Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications* **1**, (2010).
30. Needham, C. J., Bradford, J. R., Bulpitt, A. J., Care, M. A. & Westhead, D. R. Predicting the effect of missense mutations on protein function: analysis with Bayesian networks. *BMC Bioinformatics* **7**, 405 (2006).
31. Moura, G. R. *et al.* Species-Specific Codon Context Rules Unveil Non-Neutrality Effects of Synonymous Mutations. *PLOS ONE* **6**, e26817 (2011).
32. Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* **12**, 683–691 (2011).

33. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
34. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **375**, 900–901 (2016).
35. Hajirasouliha, I., Mahmoody, A. & Raphael, B. J. A combinatorial approach for analyzing intra-tumor heterogeneity from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **30**, 78–86 (2014).
36. Jaiswal, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine* **371**, 2488–2498 (2014).
37. Vannucchi, A. M., Pieri, L. & Guglielmelli, P. JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: effects on phenotype, prognosis and change with treatment. *Therapeutic Advances in Hematology* **2**, 21–32 (2011).
38. Sallman, D. A. & Padron, E. Integrating mutation variant allele frequency into clinical practice in myeloid malignancies. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* **9**, 89–95 (2016).
39. Schlenk, R. F. *et al.* Differential impact of allelic ratio and insertion site in *FLT3*-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* **124**, 3441–3449 (2014).
40. Matsuda, A. *et al.* Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification. *Leukemia* **21**, 678–686 (2007).
41. Penninx, B. W. J. H. *et al.* Anemia and decline in physical performance among older persons. *Am. J. Med.* **115**, 104–110 (2003).

42. Penninx, B. W. J. H. *et al.* Late-life anemia is associated with increased risk of recurrent falls. *J Am Geriatr Soc* **53**, 2106–2111 (2005).
43. Hong, C. H. *et al.* Anemia and risk of dementia in older adults: findings from the Health ABC study. *Neurology* **81**, 528–533 (2013).
44. Culleton, B. F. *et al.* Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. *Blood* **107**, 3841–3846 (2006).

**Assessment of the use of next generation sequencing for characterising
cytopenia of undetermined significance**

Toulouse - October 12th,2017

SUMMARY

Many chronic cytopenias remain of undetermined significance because of a lack of morphology and cytogenetic evidence required for the diagnosis of myelodysplastic syndrome. WHO has defined them as ICUS. Using next generation sequencing, the work done at Toulouse Hospital aims at detecting DNA variants frequently observed in myeloid malignancies in ICUS patients. 20% of patients of the current study have a variant. There is no significant relationship between the presence of variant and the type, severity or number of cytopenias nor an existing dysplasia around 10-20%. However, in our study, clonal haematopoiesis is significantly more frequent in older population. Work has to be continued in order to distinguish these results from clonal haematopoiesis related to age.

KEYWORDS: Cytopenias of undetermined significance, ICUS, Next Generation Sequencing, NGS, clonal haematopoiesis

Faculté de pharmacie, 35 chemin des maraichers, 31062 Cedex 9, Toulouse FRANCE

Supervisor: Professor DELABESSE Eric

**Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic
de cytopénie(s) inexplicée(s)**

Toulouse - 12 octobre 2017

RESUME

En 2017, de nombreuses cytopénies chroniques restent de signification indéterminée car les arguments cytologiques et cytogénétiques médullaires sont insuffisants pour poser le diagnostic de syndrome myélodysplasique. Ce sont les ICUS. L'étude réalisée au CHU de Toulouse utilise le séquençage de nouvelle génération afin de mettre en évidence chez les patients ICUS des variants de l'ADN fréquemment retrouvés dans les hémopathies myéloïdes. L'objectif est de mettre en évidence un argument d'hématopoïèse clonale. 20% des patients inclus présentent des variants. Il n'existe pas de lien entre la présence de variants et le type, la profondeur ou le nombre de cytopénies, ni l'existence d'une dysplasie à la limite la significativité. En revanche, la présence de variant semble corrélée à l'âge. Le travail doit être poursuivi afin de faire la distinction avec l'hématopoïèse clonale liée à l'âge.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : Cytopénies de signification indéterminée, ICUS, Séquençage de nouvelle génération, NGS, hématopoïèse clonale

Faculté de pharmacie, 35 chemin des maraichers, 31062 Cedex 9, Toulouse FRANCE

Directeur : Professeur DELABESSE Eric