

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2014

2014 TOU3 2083

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLÔME d'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de BIOLOGIE MÉDICALE

(conformément à l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement par

Yvan TIXADOR

le 09 octobre 2014 à Toulouse

SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES

Mutations de TP53 : impact pronostique et réponse aux agents hypométhylants

Etude sur 65 patients suivis au CHU de Toulouse

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Véronique DE MAS

JURY

Président : Monsieur le Professeur Pierre SIE

1^{er} assesseur : Madame le Professeur Odile BEYNE-RAUZY

2^{ème} assesseur : Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

3^{ème} assesseur : Madame le Docteur Véronique DE MAS

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pierre SIE,

Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Aujourd'hui encore je me rappelle des cours d'hématologie dispensés à la faculté de pharmacie qui avaient déjà retenu toute mon attention. Votre compétence et votre implication dans la formation des internes est un exemple pour tous. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le Professeur Odile BEYNE-RAUZY,

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse. Votre expertise clinique m'a été précieuse pour l'aboutissement de ce travail. Votre disponibilité, votre dynamisme et votre compétence m'auront marqué à jamais. Soyez assurée de ma plus profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Éric DELABESSE,

Vous m'avez fait l'honneur de faire partie de ce jury. Votre aide en statistique aura été fondamentale pour ce travail. Soyez assuré de ma plus profonde gratitude.

A Madame le Docteur Véronique DE MAS,

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Travailler avec vous était aussi agréable qu'enrichissant. Je n'oublierai pas votre gentillesse au quotidien, votre disponibilité et vos précieux conseils qui m'ont guidé tout au long de ce travail. Vous avez éveillé ma curiosité scientifique et pour cela soyez assurée de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur François VERGEZ,

Pour m'avoir aidé à réaliser les statistiques de la thèse. Ta patience aura été précieuse pour mener à bien ce travail. Pour cela, je t'en suis très reconnaissant.

A Madame le Docteur Nais PRADE,

Pour m'avoir aidé à interpréter tous les résultats de mes manip. Ta disponibilité et ton sourire auront rendu ces heures de travail très agréable.

A Magalie, mon épouse. Je te suis reconnaissant pour ton amour, ton soutien indéfectible, ta patience et ta confiance. Merci pour tous ces moments de partage qui n'appartiennent qu'à nous.

A ma famille, ma mère, mon père et ma sœur pour votre patience et votre soutien tout au long de ces longues études. A mes grands-parents, Marie-Pierre (merci pour l'abstract), Jean-Michel, Carole, Mélodie, Théo et Thomas pour votre présence. A mes beaux-parents pour leur accueil chaleureux dans leur famille.

A Guillaume, mon binôme d'internat. Merci pour tous ces moments de joie et de bonne humeur durant nos études. J'espère que cela continuera ainsi longtemps. Merci également pour ton aide sur ce travail.

A Jean, mon beau-frère, eh oui tu viens de prendre perpet !!!!. Merci pour ta gentillesse et ton amitié indéfectible.

A Olivier et Pauline, les exilés montpelliérains !!! Merci pour tous ces moments de partage lors de nos nombreux séjours en couple. J'espère que malgré la distance nous continuerons toujours à nous voir si souvent.

A Pierre-Louis, ta bonne humeur et ta joie de vivre sont un exemple pour moi.

A Sophie, Claire, Etienne, Lauren, Aurélien, Marie Ams, Babou... Mes amis avec qui j'ai passé de très bons moments.

A tous les internes avec qui j'ai fait un petit bout de chemin, JB, Mickael, Laurie, Vincent, Yannick, Christophe, Jessica (ma binôme de thèse !!!!), Anne, Valentine, David, Angèle, Jeff, Caroline, Laura, John, Benoit, Ludo, Brice, Mériem, Marie, Arnaud, Aurélie, Alice-Anne, Dr Bories, Shérazade, Sanaa, Ana, Benjamin, Armand, PY, Gabriel, Thierry et tous les Romains !!!

Soyez vivement remerciés pour tout le soutien que vous m'avez apporté tout au long de l'internat et de la réalisation de la thèse. Merci aussi pour tous ces moments de rigolade à l'internat que je n'oublierai pas.

A l'équipe de biologie moléculaire, Magalie, Sabrina, Virginie... Merci pour votre accompagnement et votre patience lors de mes débuts en biologie moléculaire.

Table des matières

<u>PARTIE 1.</u>	<u>LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES</u>	<u>8</u>
I.	Définition	8
II.	Epidémiologie	8
III.	Etiologie	8
IV.	Physiopathologie.....	10
A.	Hématopoïèse inefficace.....	11
B.	Mutations des gènes somatiques.....	11
C.	Modifications épigénétiques.....	12
D.	Microenvironnement et cellules immunitaires.....	12
V.	Manifestations cliniques des syndromes myélodysplasiques	13
VI.	Diagnostic	14
A.	Analyses biologiques recommandées	14
B.	Le myélogramme.....	16
C.	Autres examens cytologiques.....	18
D.	Caryotype.....	18
E.	Critères de diagnostic des syndromes myélodysplasiques.....	19
VII.	Classifications diagnostiques des SMD	20
VIII.	Classifications pronostiques et critères de réponses	22
A.	Classifications pronostiques.....	22
B.	Critères de réponses	26
C.	Facteurs prédictifs de survie et de réponse chez les sujets traités	30
IX.	Approche thérapeutique	31
A.	Traitement des SMD de faible risque.....	32
B.	Traitement des SMD de haut risque en dehors de l'allogreffe.....	33
C.	Les agents hypométhylants.....	34
<u>PARTIE 2.</u>	<u>MUTATION TP53.....</u>	<u>39</u>
I.	Structure du gène TP53	39
II.	Structure de la protéine TP53	40
III.	Régulation de TP53.....	41
A.	Phosphorylation de TP53	41
B.	Acétylation de TP53	42
C.	Ubiquitination de TP53.....	42
D.	Méthylation de TP53.....	42
E.	Autres modifications	42
F.	Régulation par des Micro-ARNs.....	43
G.	Interaction TP53-MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog)	43
IV.	Les fonctions de TP53	44
A.	Arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN.....	44
B.	Induction de l'apoptose	45
C.	TP53 et autophagie	45
D.	TP53 et métabolisme	46
E.	TP53 et recombinaison.....	46
F.	TP53 et angiogenèse.....	46
V.	Inactivation de TP53 dans les cellules cancéreuses.....	47
A.	Fréquences de mutations TP53.....	47
B.	Types de mutations et d'inactivations	48
VI.	Autres marqueurs moléculaires décrits dans les SMD	52
A.	Fréquences des mutations récurrentes	52
B.	Mutations de SF3B1	53
C.	Mutations de TET2	54
D.	Mutations de DNMT3A	54
E.	Mutations de IDH1/IDH2	55
F.	Mutations d'ASXL1	55
G.	Mutations de EZH2	55
H.	Mutations de RUNX1	56
I.	Autres mutations.....	56
VII.	Impact pronostique des mutations TP53 dans les SMD : revue de la littérature	57

PARTIE 3. ETUDE DE L'IMPACT DES MUTATIONS DE TP53 DANS UNE COHORTE DE 65 PATIENTS ATTEINT DE SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES DE HAUT RISQUE TRAITES PAR AGENTS HYPOMETHYLANTS..... 60

I.	Objectifs de l'étude	60
II.	Matériels et méthodes	61
	A. Population clinique étudiée	61
	B. Screening des mutations de TP53 par technique HRM (High Resolution Melting)	63
	C. Analyses statistiques	70
III.	Résultats	72
	A. Caractéristiques de la cohorte	72
	B. Mutations de TP53	76
	C. Anomalies cytogénétiques	79
	D. Impact des mutations de TP53.....	81
IV.	Discussion	89
	A. Méthode de screening	89
	B. Mutations de TP53 et anomalies cytogénétiques	90
	C. Mutations de TP53 et impact pronostique.....	91
	D. Mutations de TP53 et réponse au traitement.....	92
V.	Conclusion.....	93
	Table des illustrations.....	94
	Table des tableaux.....	95
	Bibliographie.....	96

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AREB-1 : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes de type 1

AREB-2 : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes de type 2

ARN : Acide RiboNucléique

ARS : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes

AZA : Azacitidine

CALGB : Cancer And Leukemia Group B

CCI: Charlson Comorbidity Index

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMF : CytoMétrie en Flux

CR : Réponse Complète

CRDM : Cytopénies Réfractaires avec Dysplasie Multilignée

CRDU : Cytopénies Réfractaires avec Dysplasie Unilignée

DNMT : DNA Methyltransferase

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

EFS : Etablissement Français du Sang

FAB : Franco Américano Britannique

FASAY : Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast

GFM : Groupe Francophone des Myélodysplasies

HCTCI: Hematopoietic stem Cell Transplantation Comorbidity Index

HI : Hematological Improvement

HRM: High Resolution Melting

IARC: International Agency for Research on Cancer

IPSS : International Prognostic Scoring System

IPSS-R : International Prognostic Scoring System Revised

ISCN: International System for human Cytogenetic Nomenclature

IWG: International Working Group

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique

MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Survie globale

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFS : Progression Free Survival

PNN : PolyNucléaire Neutrophile

PR : Réponse Partielle

SD : Maladie Stable

SMD : Syndrome MyéloDysplasique

SMD-I : Syndrome MyéloDysplasique Inclassable

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WPSS : WHO Prognostic Scoring System

Introduction et objectifs

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies myéloïdes malignes touchant le sujet âgé très hétérogènes tant au niveau clinique que biologique. Dans ce contexte, il s'avère nécessaire d'établir un pronostic précis pour la prise en charge de ces patients. Pour les cliniciens, cet élément est déterminant dans le choix d'une stratégie thérapeutique avec un rapport bénéfice-risque favorable pour cette tranche d'âge.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire, associées à la cytogénétique, a permis depuis une dizaine d'année de mettre en évidence de nouvelles mutations impactant le pronostic ou bien le choix thérapeutique. Plusieurs équipes, dont celle de *Bejar et al.*, travaillent à l'heure actuelle pour montrer que certains profils mutationnels seraient associés à une meilleure réponse lors d'un traitement par agent hypométhylant.

Notre étude a porté sur 65 patients diagnostiqués pour un SMD de haut risque entre 2007 et 2013 au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse Purpan et traités par agent hypométhylant. Les objectifs peuvent se résumer ainsi:

- déterminer l'incidence des mutations de TP53 chez les patients atteint de SMD au CHU de Toulouse Purpan;
- confirmer l'association de la mutation de TP53 avec un pronostic plus péjoratif ;
- évaluer s'il existe une corrélation entre ces mutations et la réponse à un traitement par agent hypométhylant.

Partie 1. Les syndromes myélodysplasiques

I. Définition

Les SMD sont des affections clonales des cellules souches multipotentes ou bien myéloïdes. La maladie se caractérise par une hématopoïèse inefficace responsable des cytopénies périphériques et contrastant avec une moelle riche. L'évolution naturelle de cette maladie est la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Elle constitue en cela un véritable état pré-leucémique[1].

II. Epidémiologie

Les SMD prédominent chez le sujet âgé avec une médiane d'âge au diagnostic de 70 ans. Leur incidence est de 4 à 5/100 000 habitants. Il faut noter que dans 15 à 20% des cas, les SMD sont secondaires à l'utilisation d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie. Ils sont plus rarement secondaires à des agents leucémogènes tel que le benzène[2].

En France, il existe des registres nationaux des hémopathies malignes dans certaines régions. Les résultats de ces registres sont parfois publiés comme c'est le cas pour le registre de Basse-Normandie. Les SMD représentent 13% de l'ensemble des hémopathies malignes pour ce registre. Le taux d'incidence standardisé de l'ensemble des SMD sur la population mondiale est de 2,55/100 000 habitants. Chez l'homme, l'incidence est nettement plus élevée avec 3,64/100 000 habitants contre 1,78/100 000 habitants chez la femme ce qui fait un sex ratio à 2,04. L'incidence des SMD augmente avec l'âge avec un taux spécifique de 1,75/100 000 habitants pour la tranche d'âge 50-54 ans, de 24,03/100 000 habitants pour la tranche 70-74 ans et de 37,83/100 000 habitants pour les 75-79 ans[3]. Il faut donc s'attendre à une augmentation de l'incidence des SMD dans les années futures du fait d'un allongement de l'espérance de vie.

III. Etiologie

Les SMD primaires apparaissent en l'absence d'antécédents de chimiothérapie anticancéreuse ou de radiothérapie. L'exposition au benzène à des niveaux supérieurs aux taux recommandés, l'exposition à des produits chimiques agricoles ou des solvants, la présence d'antécédents familiaux de néoplasies du tissu hématopoïétique sont des facteurs favorisants

évoqués. Le tabagisme est un facteur de risque reconnu pour les SMD avec une relation effet-dose[4]. La cause précise d'un SMD n'est connue que dans 15% des cas[1]. Tout ceci explique une augmentation de l'incidence de cette maladie dans la population âgée en raison d'une exposition plus longue et plus importante aux toxiques.

Certaines maladies congénitales telles que la dyskératose congénitale, le syndrome de Shwachman-Diamond, l'anémie de Fanconi et de Blackfan-Diamond sont aussi associées à une augmentation du risque d'apparition de SMD essentiellement pédiatriques. Il faut aussi citer les patients porteurs de la neurofibromatose de type I développant des SMD par absence du gène *NF1*. En l'absence de *NF1*, gène suppresseur de tumeur dans les cellules myéloïdes immatures, la protéine Ras est activée.

En ce qui concerne les SMD secondaires à un traitement notamment cytotoxique (*Tableau I*), il s'agirait de la conséquence d'événements mutationnels induits par ce type de thérapie. Ainsi, dans certains SMD de l'adulte, des variants alléliques de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ont été identifiés. Dans les cellules hématopoïétiques progénitrices, le xénobiotique est métabolisé par une enzyme de phase I puis une enzyme de phase II détoxifie le réactif intermédiaire, qui est excrété. Si la phase II est inhibée, il y a accumulation du réactif intermédiaire toxique. Par exemple, une mutation de la NADP(H) quinone oxydoréductase (NQO1), enzyme impliquée dans le métabolisme du benzène, est liée à une plus grande fréquence de survenue de leucémies chez l'enfant et chez l'adulte. De la même manière, des polymorphismes dans des gènes impliqués dans la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pourraient avoir un effet protecteur ou bien favorisant sur la survenue des SMD. Cependant, dans la plupart des cas, la pathogénèse reste incertaine[1].

Tableau I: Etiologie des SMD secondaires[1]

Chimiothérapie anticancéreuse			Rayonnement
<i>Agents alkylants</i>	<i>Inhibiteur de la topoisomérase II</i>	<i>Analogues de bases puriques</i>	<i>Facteurs environnementaux</i>
Busulfan	Daunorubicine	Fludarabine et assimilés	Tabac
Carboplatine	Doxorubicine		Radiothérapie ionisante
Carmustine	Etoposide		Benzène et autres solvants industriels
Chlorambucil	Mitoxantrone		Produits chimiques agricoles (pesticides, herbicides et fertilisants)
Cisplatine	Razoxane		
Cyclophosphamide			
Dacarbazine			
Lomustine			
Melphalan			

IV. Physiopathologie

Les modèles physiopathologiques actuels menant au SMD reposent sur une pathogénèse en plusieurs étapes. Une première anomalie affecte une cellule souche normale et lui confère un avantage de croissance menant ainsi à la prolifération clonale d'une cellule souche anormale portant des caractéristiques de dysplasie morphologique et d'apoptose excessive. Un ou plusieurs événements secondaires vont altérer le cycle cellulaire, diminuant ainsi l'apoptose et conduisant à la transformation en LAM. On parle de modèle en deux étapes (*two hit hypothesis*). (Figure 1)

On observe ainsi un continuum entre les différentes entités de la maladie : les SMD de faible risque évoluent vers des formes de haut risque après un temps plus ou moins important selon les caractéristiques initiales de la maladie, puis les formes de hauts risques peuvent à leur tour évoluer vers une LAM.

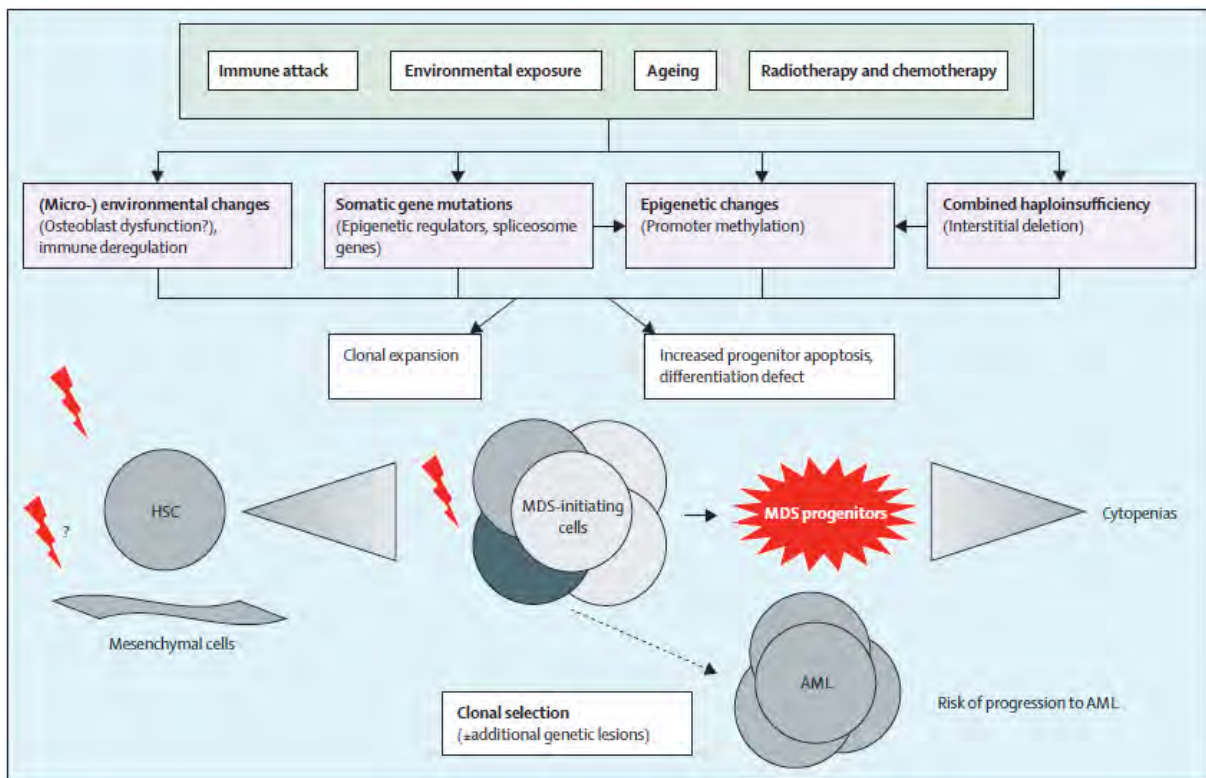


Figure 1 : Physiopathologie des syndromes myélodysplasiques[1]

A. Hématopoïèse inefficace

L'altération de l'hématopoïèse dans les syndromes myélodysplasiques résulte essentiellement de l'augmentation de la susceptibilité à l'apoptose des progéniteurs myéloïdes, ce qui entraîne d'importantes cytopénies périphériques avec une moelle hypercellulaire. Dans un second temps, des phénomènes d'échappement à l'apoptose seront à l'origine de l'évolution vers une LAM [5]. Dans la majorité des cas, l'évolution se fait selon un mode oligoclonal plutôt que monoclonal[6].

L'apoptose des précurseurs myéloïdes peut être liée à des éléments intrinsèques, comme l'altération du gène anti-apoptotique BCL2[7], ou bien à des facteurs extrinsèques comme les signaux de mort cellulaire (Tumour Necrosis Factor, Fas ligand) [8].

B. Mutations des gènes somatiques

L'explosion des techniques de biologie moléculaire a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations récurrentes dans les SMD. Ces mutations interviennent sur des gènes codant pour des facteurs de transcription (*TP53* ou *ETV6*) mais aussi sur des gènes de régulations impliqués dans la méthylation (*DNMT3A*), l'hydroxy-méthylation (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*) ou des modifications des histones (*EZH2*, *UTX*, *ASXL1*). Elles peuvent provoquer un gain de fonction (*IDH1*, *IDH2*) ou bien une perte de fonction (*TET2*, *ASXL1*). Il en résulte une modification globale de l'expression génomique et une augmentation de l'instabilité génomique à l'origine de l'évolution des SMD vers une LAM[9]. L'hyper-méthylation de certains gènes est considérée comme un élément fondamental expliquant la physiopathologie de la maladie[10][11]. Ces mutations ne sont pas spécifiques des SMD et peuvent se rencontrer dans d'autres néoplasies myéloïdes.

Il existe également des mutations récurrentes de certains gènes du splicéosome chez les patients atteints de SMD impliquant *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3A1* ou encore *PRPF40-B*. Contrairement aux autres mutations, celles impliquant la machinerie du splicéosome sont hautement caractéristiques des pathologies avec une composante myélodysplasique[12].

C. Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont particulièrement visibles lors de la progression des SMD ce qui suggère un rôle fondamental dans la physiopathologie de ces maladies. La méthylation aberrante de certains gènes est le mécanisme prépondérant mais aussi le mieux connu. Ces gènes ont des fonctions variées telles que la régulation du cycle cellulaire (*p14, p15, p16, CHK2*), l'apoptose (*p73, survivin, DAPK*), la différenciation (*RAR β , WT1*) et la réparation de l'ADN (*bMLH1*). Il en résulte une instabilité génomique à l'origine de transformation de la pathologie[13].

D. Microenvironnement et cellules immunitaires

Les expérimentations *in vitro* ont montré le rôle crucial du microenvironnement dans l'expression et l'entretien des SMD. Par exemple, la mutation d'un gène des précurseurs des ostéoblastes (*Dicer 1*) a montré une augmentation très importante de l'incidence de dysplasies et de leucémies aiguës dans le modèle animal comparé au groupe où la mutation est absente. La délétion de *Dicer 1* est en fait à l'origine d'une diminution de l'expression de *Sbds* qui est le gène muté dans le syndrome de Shwachman ; syndrome où l'évolution vers un SMD ou une LAM est très fréquente[14]. Les modifications des fonctions du stroma impliquées dans le maintien des îlots hématopoïétiques ont donc un rôle important dans l'altération de la différenciation, dans la prolifération et dans l'apoptose cellulaire.

Le système immunitaire joue également un rôle non négligeable dans les SMD. La majorité des patients montre en effet une augmentation des cellules T régulatrices. Plusieurs sous populations sont impliquées, les Th17 (IL-17 producing T cells) contribuent à l'inefficacité de l'hématopoïèse chez les patients avec un SMD de faible risque[15] alors que les cellules T régulatrices favorisent les mécanismes d'échappement dans les SMD de haut risque[16].

Enfin le mode d'action de certains médicaments utilisés dans les SMD, tel que le lénalidomide ou bien les agents hypométhylants, pourrait impliquer le microenvironnement et des modifications du système immunitaire au-delà de leur action sur les cellules clonales.

V. Manifestations cliniques des syndromes myélodysplasiques

Les manifestations cliniques des SMD sont non spécifiques. Le tableau clinique se résume le plus souvent à la manifestation d'une ou plusieurs cytopénies d'installation progressive. Il n'est pas rare d'observer des patients présentant un taux d'hémoglobine bas (entre 7 et 8 g/dL) qui ont adapté leur mode de vie à leur anémie.

Au niveau plaquettaire, la thrombopénie est le plus souvent modérée mais la thrombopathie peut être aggravée notamment par une prise médicamenteuse comme les anti-aggrégants plaquettaires. Elle se révèle alors avec des saignements anormaux tels que des gingivorragies, des épistaxis ou parfois plus graves comme des saignements digestifs.

La neutropénie peut être symptomatique avec des épisodes infectieux récidivants le plus souvent pulmonaires ou digestifs.

Il existe parfois une splénomégalie palpable mais toujours modérée. Rarement ce sont des manifestations extra-hématologiques qui révèlent la maladie telles que des atteintes cutanées, articulaires ou bien un aspect de chondrocalcinose. En effet, les patients atteints de SMD ont significativement plus de manifestations systémiques que la population générale[17]. Le diagnostic des SMD repose avant tout sur les résultats de l'hémogramme et du myélogramme.

VI. Diagnostic

L'approche diagnostique des SMD repose sur la distinction entre des cytopénies d'origine réactionnelle et des cytopénies d'origine clonale. Elle commence par l'exclusion des causes non malignes. Un interrogatoire précis doit être mené afin de connaître les antécédents du patient en termes de chimiothérapie, de radiothérapie ou bien encore d'exposition professionnelle à des agents leucémogènes tels que le benzène. Un examen clinique complet doit être également réalisé permettant d'évaluer le retentissement de la ou des cytopénies.

A. Analyses biologiques recommandées

Le groupe francophone des myélodysplasies recommande une série d'analyses biologiques à réaliser afin d'aider au diagnostic[2]. Ils permettent entre autres de mettre en évidence des facteurs potentiellement responsable de dysmyélopoïèse comme des carences vitaminiques, des infections (VIH) ou encore une inflammation. Ces recommandations ont été reprise par le groupe « European LeukemiaNet »[18] et sont synthétisées dans le *Tableau II*.

Tableau II : Analyses biologiques recommandées pour le diagnostic des SMD primaires[18]

Catégorie	Test spécifique
Hématologie	Numération formule sanguine avec examen du frottis sanguin Réticulocytes
Biochimie	Bilan vitaminique (B9/B12) Bilan ferrique LDH Bilirubine Haptoglobine CRP Transaminase PAL Albumine Acide urique Créatinine Electrophorèse des protéines sériques β2-microglobuline Bilan thyroïdien Electrophorèse de l'hémoglobine
Virologie	Sérologie HIV, B19 et CMV AgHbs et sérologie Hépatite C chez patient avec soutien transfusionnel
Autres	Recherche d'hémoglobinurie paroxystique nocturne

La numération formule sanguine va confirmer la présence d'une ou plusieurs cytopénies chroniques (supérieure à six mois) ; l'anémie étant la principale cytopénie retrouvée (90% des cas). Celle-ci est macrocytaire ou normocytaire et normochrome. La mesure du nombre de réticulocytes peut être informative. Un nombre diminué indique une anémie arégénérative d'origine centrale ce qui est en faveur d'un SMD. Une autre cytopénie est associée dans 50% des cas. Les neutropénies ou thrombopénies isolées sont beaucoup moins fréquentes[19].

L'examen du frottis sanguin peut mettre en évidence des anomalies pouvant orienter le clinicien telles qu'une dégranulation des polynucléaires neutrophiles. Cette anomalie est très spécifique des SMD. Les anomalies nucléaires sont également assez fréquentes avec une condensation de la chromatine et/ou de segmentation des noyaux conduisant à l'existence de formes bilobées, en « bissac » ou monlobées avec un aspect de type pseudo-Pelger-Huët. Les anomalies dans le sang sont toujours moins intenses que dans la moelle. Cela tient au fait que seules les cellules matures accèdent au compartiment sanguin, restreignant la diversité des types cytologiques et donc des anomalies.

La présence de quelques blastes est possible. Ceux-ci doivent être minutieusement recherchés et dénombrés sur un nombre suffisant d'éléments (au moins 200). La présence de corps d'Auer doit également être signalée[20].

La cytologie sanguine a plutôt une valeur d'orientation ; ce n'est qu'après étude cytologique d'un frottis médullaire de qualité que le diagnostic pourra être affirmé.

B. Le myélogramme

L'analyse cytologique du myélogramme est déterminante pour le diagnostic. Cette analyse consiste en un décompte des éléments et une étude qualitative morphologique. Celui-ci doit être effectué selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) sur au moins 500 éléments afin d'apprécier le nombre de blastes le plus précisément possible[20]. En effet, le diagnostic, la classification et le pronostic en dépendent[21][22]. L'OMS définit une lignée comme dysplasique lorsque les anomalies qualitatives cytologiques sont observées sur plus de 10% des cellules de la lignée.

Par définition, le décompte des blastes doit être compris entre 0 et 19%. Au-delà, le diagnostic de LAM doit être porté[19]. Les blastes sont en principe de taille moyenne avec un rapport nucléocytoplasmique élevé. Les contours nucléaires sont souvent ovoïdes avec une chromatine fine et un nucléole visible. Le cytoplasme est basophile, sans archoplasme visible, la présence ou non de fines granulations définissant respectivement les blastes granulaires et agranulaires[23].(Cf. *Figure 2 : Granulocytic lineage*)

La dysmégacaryopoïèse est variable, avec plus fréquemment des anomalies du noyau, même si la taille et le cytoplasme peuvent aussi être anormaux. Pour cela, l'observation d'au moins 30 mégacaryocytes est recommandée [19]. Les micromégacaryocytes doivent être recherchés ; ce sont des cellules de petites tailles pouvant être aussi petit qu'un lymphocyte, avec un noyau à chromatine dense et un cytoplasme peu abondant, souvent entouré de plaquettes. Les mégacaryocytes anormaux peuvent avoir un noyau mono ou hypolobé. Les mégacaryocytes caractéristiques de SMD del(5q) ont un cytoplasme bien délimité, ovoïde et un petit noyau unique excentré, arrondi, à chromatine dense. D'autres encore présentent des noyaux bien séparés, multiples, arrondis à chromatine dense et sans pont de chromatine. On parle de mégacaryocytes en « sac de billes ». (Cf. *Figure 2 : Megakaryocyte lineage*)

Les éléments granuleux et, plus particulièrement, les précurseurs les plus matures sont souvent agranulaires (spécifique) ou hypogranulaires (peu spécifique). Les anomalies du noyau sont

particulièrement significatives, les plus fréquentes étant des anomalies de segmentation du noyau irrégulière ou incomplète se traduisant par des lobes anormaux insuffisamment diminués en taille pour des cellules matures. On peut également observer des polynucléaires neutrophiles au noyau bilobé d'aspect pseudo-Pelger-Huët. Ces anomalies sont souvent associées à une condensation imparfaite de la chromatine avec une alternance de zones très denses et de zones plus claires. (Cf. Figure 2 : Granulocytic lineage)

La lignée érythroïde est généralement hyperplasique dans la moelle. Une dysérythropoïèse est habituellement observée dans la plupart des SMD, surtout marquée en cas d'anémie réfractaire avec sidéroblastes (ARS). Des formes mégaloblastiques sont observées plus ou moins associées à un asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique. Le cytoplasme peut être de coloration hétérogène, traduisant un défaut d'hémoglobinisation, donnant classiquement un aspect feuilleté, vacuolisé ou complètement clair devant faire rechercher la présence de sidéroblastes en couronne après coloration de Perls. Les noyaux peuvent présenter des formes anormales ovoïdes, un contour irrégulier voire une fragmentation nucléaire. Certains érythroblastes sont bi ou multinucléés. (Cf. Figure 2 : Erythroid lineage)

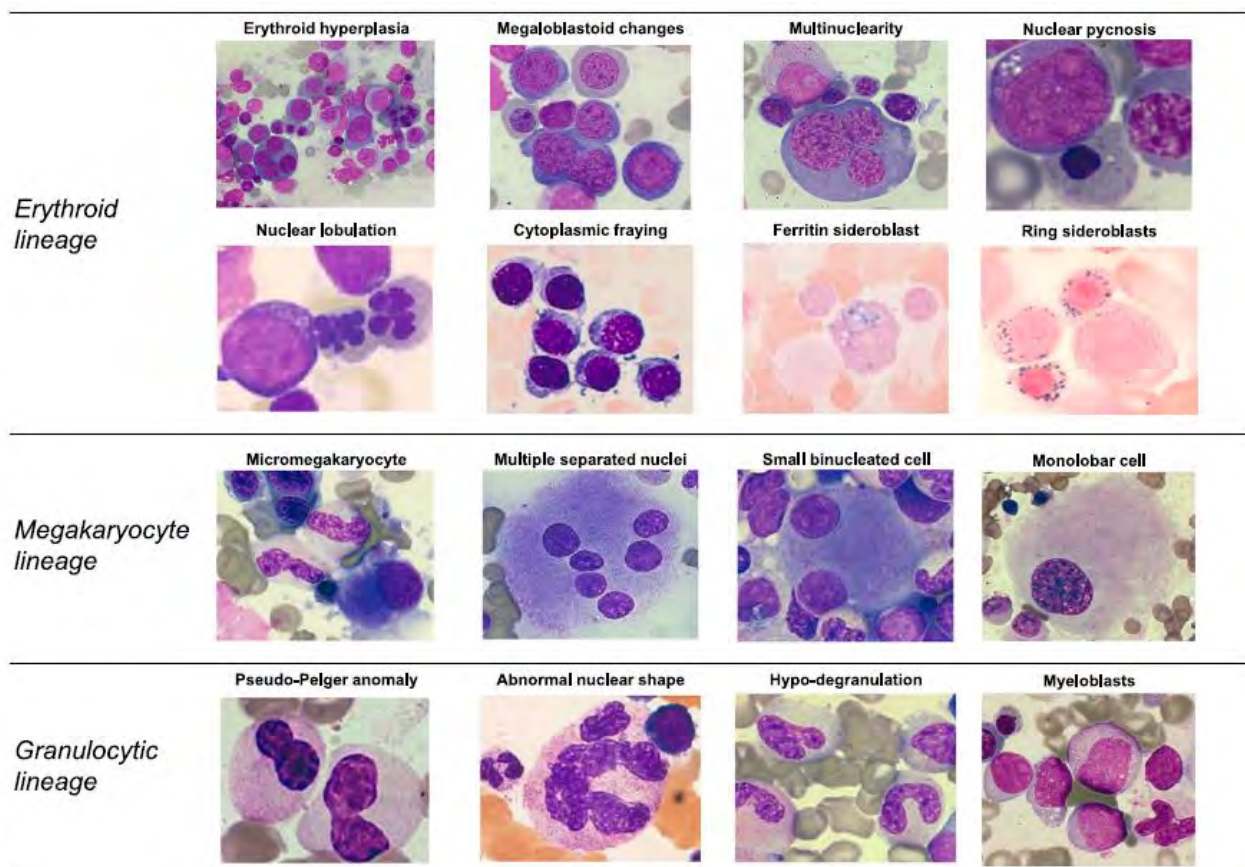


Figure 2 : Anomalies morphologiques observées au cours des SMD selon la lignée[24]

Au total, l'étude cytologique des frottis médullaires s'attachera à évaluer le plus précisément possible le nombre de lignées atteintes et bien entendu le décompte des blastes.

C. Autres examens cytologiques

La coloration de Perls est un examen cytochimique utile au diagnostic des SMD. Elle permet de mettre en évidence la présence de sidéroblastes, c'est-à-dire d'érythroblastes contenant du fer extra-hémique sous forme de granules dans leur cytoplasme. Il existe trois types de sidéroblastes :

- Type I : moins de 5 granules ;
- Type II : plus de 5 granules sans répartition périnucléaire ;
- Type III : plus de 5 granules tous avec une répartition périnucléaire entourant au moins 1/3 du noyau.

Ces derniers sont appelés sidéroblastes en anneau. Leur décompte doit être effectué sur au moins 100 érythroblastes. En l'absence d'excès de blastes, si seule la lignée érythroïde est dysplasique, un excès de sidéroblastes en anneau supérieur au seuil de 15% permet le diagnostic d'ARS[19].

Dans un cinquième des cas, le processus de diagnostic des SMD peut être entravé en raison de moelle pauvre révélant soit une forme hypoplasique soit une myélofibrose associée. Chez le sujet âgé, il peut s'agir d'une involution médullaire et un prélèvement dans un autre territoire permettra d'analyser une moelle de richesse acceptable. Mais en cas d'échec persistant, une biopsie médullaire est alors nécessaire[20].

Enfin la cytométrie en flux (CMF) apparaît essentiellement comme une technique complémentaire. L'OMS préconise son utilisation dans le cas de signes cytologiques frustrés ou bien lorsque le caryotype est normal[19].

D. Caryotype

Des anomalies cytogénétiques sont mises en évidence chez 50% des patients nouvellement diagnostiqués pour un SMD. Ce chiffre monte à 80% pour les myélodysplasies secondaires à une chimiothérapie ou à l'exposition à des agents leucémogènes[25]. Contrairement aux LAM, où dominent des phénomènes de translocation, inversion ou bien encore insertion, les SMD se caractérisent par une perte ou un gain complet ou partiel de chromosomes. L'anomalie la plus

fréquemment observée est la délétion partielle du bras long du chromosome 5 qui définit une entité à part entière au sein des SMD, le syndrome 5q-. L'analyse cytogénétique est d'importance pour l'évaluation pronostique comme le montre le *Tableau III* mais également pour aider au diagnostic dans certains cas difficiles.

Tableau III: Eléments pronostiques selon les anomalies cytogénétiques du score IPSS-R[1]

Catégories cytogénétiques de l'IPSS-R	Proportion des patients (%)	Caryotype	Médiane de survie (année)	Délai d'évolution vers LAM pour 25% des patients (année)
Très bon	4	-Y, del(11q)	5,4	-
Bon	72	normal, -Y, del(5q), del(20q), del(5q) + 1 autre anomalie	4,8	9,4
Intermédiaire	13	del(7q), +8, +19, i(17q), autres anomalies non citées	2,7	2,5
Mauvais	4	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), -7/del(7q) + 1 autre anomalie, caryotype complexe (3 anomalies)	1,5	1,7
Très mauvais	7	caryotype complexe (>3 anomalies)	0,7	0,7

La tendance actuelle est cependant une détermination de plus en plus précise de la valeur pronostique du caryotype. Récemment *Haase et al.* a présenté un nouveau système de stratification pronostique des anomalies cytogénétiques beaucoup plus précis que celui de l'International Prognostic Scoring System (IPSS)[26]. Ces travaux devraient permettre à terme une meilleure évaluation des pronostics des patients.

E. Critères de diagnostic des syndromes myélodysplasiques

Au terme de ces analyses, la notion importante est celle de critère minimum pour affirmer le diagnostic de SMD. La présence d'au moins un critère suivant est suffisante notamment en cas de signes frustrés ou partiels de SMD[27][28]. Devant une ou des cytopénies chroniques (Hb<11 g/dL ; polynucléaire neutrophile <1,5 G/L (PNN) et/ou plaquettes <100 G/L depuis plus de six mois) sans aucune cause retenue, les critères minimaux principaux pour le diagnostic d'une SMD sont :

- Dysplasie franche touchant au moins 10% des cellules d'une ou plusieurs lignées myéloïdes ;
- Un excès de blastes dans la moelle (5 à 19%) ;
- Un caryotype anormal évocateur de SMD.

Les co-critères peu utilisés en pratique, c'est-à-dire des éléments en faveur d'une pathologie myéloïde clonale, sont :

- Un pattern immunophénotypique anormal par CMF ;
- Une population médullaire clonale mise en évidence par toute technique de biologie moléculaire ;
- La diminution significative et persistante de la pousse des progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaire ou granuleux in vitro.

VII. Classifications diagnostiques des SMD

Le but des classifications des hémopathies est de fournir des critères fiables pour le diagnostic et l'assignation dans une entité clinique pertinente.

La multiplicité des syndromes observés a conduit à la création en 1982 d'une classification dite FAB (Franco-Américo-Britannique). Elle proposait une classification en fonction des lignées atteintes par la dysplasie, du pourcentage de blastes dans le sang et du pourcentage de blastes dans la moelle[29].

Aujourd'hui, la catégorisation des patients doit être réalisée selon la classification OMS (*Tableau IV*) introduite en 2001 et revue en 2008[19]. Elle reprend les principes de la classification FAB, mais prend en compte les connaissances cliniques et biologiques récentes pour une meilleure approche pronostique[29]. Les critères pris en compte pour cette classification sont :

- Le nombre de cytopénies périphériques ;
- Le nombre de lignées dysplasiques ;
- Le pourcentage de blastes circulants et médullaires ;
- La présence de sidéroblastes en couronne ;
- La présence de corps d'Auer éventuelle ;
- La présence d'une anomalie cytogénétique particulière.

Cette classification est également un élément pronostic important. La classification cytologique de l'OMS permet de prédire la survie globale et le risque évolutif de transformation dans les différents sous-groupes.

Tableau IV : Caractéristiques sanguines et médullaires dans les SMD selon la classification OMS 2008[19]

Catégories	Caractéristiques sanguines	Caractéristiques médullaires
Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU)	Cytopénie unique ou bicytopénie Absence ou rares blastes (<1%) ¹	Dysplasie unilignée : ≥10% des cellules d'une lignée myéloïde <5% de blastes <15% de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	Anémie Absence de blastes	≥15% de sidéroblastes en couronne Dysplasie de la lignée érythroblastiques uniquement <5% de blastes
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (CRDM)	Cytopénie(s) Absence ou rares blastes (<1%) ² Absence de corps d'Auer Monocytes<1G/L	Dysplasie ≥10% sur ≥2 lignées (Neutrophile et/ou érythroblastique et/ou mégacaryocytaire) <5% de blastes Absence de corps d'Auer +/- 15% de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec excès de blastes de type 1 (AREB-1)	Cytopénie(s) <5% de blastes ² Absence de corps d'Auer Monocytes<1G/L	Dysplasie uni- ou multilignée 5 à 9% de blastes ² Absence de corps d'Auer
Anémie réfractaire avec excès de blastes de type 2 (AREB-2)	Cytopénie(s) 5-19% de blastes Corps d'Auer +/- ³ Monocytes<1G/L	Dysplasie uni- ou multilignée 10 à 19% de blastes Corps d'Auer +/- ³
Syndrome myélodysplasique inclassable (SMD-I)	Cytopénies ≤1% de blaste ²	Dysplasie marquée mais <10% sur une ou plusieurs lignées Présence d'une anomalie cytogénétique considérée comme présomptive du diagnostic d'un SMD <5% blastes
Syndrome myélodysplasique associé à la délétion 5q isolée (Syndrome 5q-)	Anémie Taux de plaquettes normal ou augmenté Absence ou rare blastes (<1%)	Nombre de mégacaryocytes normal ou augmenté avec noyau hypolobé <5% de blastes Anomalie cytogénétique isolée : del(5q) Absence de corps d'Auer

¹ Une bicytopénie peut occasionnellement être observée. Les cas pancytopéniques doivent être classés en SMD-I

² Si le pourcentage de myéloblastes est inférieur à 5%, mais que 2 à 4% de myéloblastes sont retrouvés dans le sang, la pathologie est alors classée en AREB-I. Les cas de CRDU et CRDM avec 1% de myéloblastes dans le sang doivent être classés comme SMD-I

³ Les cas avec corps d'Auer, <5% de myéloblastes dans le sang et <10% de myéloblastes dans la moelle doivent être classés en AREB-2

VIII. Classifications pronostiques et critères de réponses

A. Classifications pronostiques

Le pronostic des patients atteint de SMD est très hétérogène. La stratification du risque chez ces patients est donc fondamentale. Depuis 1997, l'IPSS est le score le plus utilisé pour stratifier le risque chez les patients atteints de myélodysplasie. Cependant, la sous-estimation du risque pour les catégories « Bas » et « Intermédiaire-1 » a conduit à la révision du score ce qui a donné naissance à l'International Prognostic Scoring System – Revised (IPSS-R). Ce dernier est de plus en plus adopté par les cliniciens[30].

a) *The International Prognostic Scoring System (IPSS)*

Le score IPSS a été le premier validé et utilisé en clinique de routine en 1997[31]. Il a été déterminé par l'étude de la survie globale de 816 patients atteints de MDS. Il ne prend en compte que 3 critères (proportion de blastes dans la moelle osseuse, anomalies cytogénétiques et le nombre de cytopénies périphériques) et permet de stratifier le pronostic des patients selon 4 catégories (*Tableau V*). La mise en pratique est simple en raison du nombre de critères d'autant plus qu'ils font partie du bilan initial de routine chez un patient atteint de SMD. En revanche, le score IPSS n'a pas été conçu pour être utilisé après le diagnostic initial et surtout après la mise en place de traitement. De plus, il prend en compte le nombre de cytopénies et non pas la profondeur des cytopénies ce qui a pour conséquence de sous-estimer le risque pour certains patients. Enfin, le critère de pourcentage de blastes dans la moelle prend en compte une plage jusqu'à 30% alors qu'il s'agit à partir de 20%, selon les critères de l'OMS, d'une LAM. Le *Tableau VI* présente la capacité du score IPSS à prédire à la fois la survie et le risque de transformation en LAM.

Tableau V: Score clinique IPSS

Critères	IPSS Prognostic Score Value				
	0	0,5	1	1,5	2
Pronostiques					
Cytogénétique	Bon	Intermédiaire	Mauvais		
Blastes (%)	<5	5-10		11-20	21-30
Cytopénies	0/1	2/3			

	Catégories	Score
Groupe cytogénétique :		
Bon : normal, -Y, del(5q), del(20q)	Bas	0
Intermédiaire : autres	Intermédiaire 1	0,5-1,0
Mauvais : Caryotype complexe, anomalies Ch7	Intermédiaire 2	1,5-2,0
Cytopénies : Hb<10g/dL ; Neutro<1800/mm ³ ; Plq<100G	Haut	≥2,5

Tableau VI: Groupes pronostiques du score IPSS

Groupes pronostiques	Faible	Intermédiaire 1	Intermédiaire 2	Elevé
Survie (années)	5,7	3,5	1,2	0,4
Risque de 25% de transformation en LAM	9,4	3,3	1,1	0,2

b) Revised IPSS (IPSS-R)

Le score IPSS a été récemment révisé pour donner naissance au score IPSS-R (Tableau VII). Il a été défini par l'étude de 7012 patients atteints de MDS à travers l'Europe et les Etats-Unis[22]. Il a initialement été évalué chez des patients naïfs de traitement. Cependant, il s'avère en pratique qu'il est utilisable même après l'induction d'un traitement. L'avancée la plus significative dans l'IPSS-R est l'inclusion de nombreuses anomalies cytogénétiques stratifiées en 5 groupes contrairement à l'IPSS qui ne comprend que 3 groupes de risques. Le score prend en compte les cytopénies de manière indépendante mais aussi la profondeur de celle-ci. Ces éléments permettent de définir le risque chez les patients selon 5 groupes. Au total, le score IPSS-R permet une meilleure stratification du risque sans qu'il ne requière de données supplémentaires par rapport à l'IPSS.

Tableau VII : Score clinique IPSS-R

Critères Pronostiques	IPSS R							
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	
Cytogénétique	Très bon		Bon		Int	Mauvais	Très mauvais	
Blastes (%)	≤2		>2-<5		5-10	>10		
Hb (g/dL)	≥10		8-<10		<8			
Pq 10⁹/L	≥100		50-<100		<50			
PNN 10⁹/L	≥0,8		<0,8					
Groupe cytogénétique :							Catégories	Score
Très bon : -Y, del(11q)							Très bas	≤1,5
Bon : normal, -Y, del(5q), del(20q), del(5q) + 1 autre anomalie							Bas	>1,5-3
Intermédiaire : del(7q), +8, +19, i(17q), autres anomalies non citées							Intermédiaire	>3-4,5
Mauvais : -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), -7/del(7q) + 1 autre anomalie, caryotype complexe (3 anomalies)							Haut	>4,5-6
Très Mauvais : caryotype complexe (>3 anomalies)							Très haut	>6

c) WHO-based Prognostic Scoring System (WPSS)

Le score WPSS (*Tableau VIII*) est basé sur la classification de l’OMS, sur des anomalies cytogénétiques ainsi que sur la présence d’une anémie sévère[32]. Ces éléments permettent de stratifier le risque des patients atteints de SMD selon 5 groupes. C’est un score facile d’utilisation en routine et qui ne nécessite pas d’examens spécialisés en dehors du bilan initial. Ce score est validé pour être utilisé à tout moment de la pathologie même après mise en place d’un traitement.

Le *Tableau IX* présente les résultats de l’évaluation du score WPSS sur la cohorte d’apprentissage de Pavia de 426 patients confirmés par la cohorte de validation de 739 patients tirés du registre de Düsseldorf[33].

Tableau VIII: Score clinique WPSS

Critères Pronostiques	WPSS Prognostic Score Value			
	0	1	2	3
Catégories OMS	CRDU, Syndrome 5q-, Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne	CRDM	AREB-1	AREB-2
Cytogénétique	Bon	Intermédiaire	Mauvais	
Anémie profonde	Absente	Présente		
Groupe cytogénétique :			Catégories	Score
Bon : normal, -Y, del(5q), del(20q)			Très bas	0
Intermédiaire : autres			Bas	1
Mauvais : Caryotype complexe, anomalies Ch7			Intermédiaire	2
Cytopénies : Hb<9g/dL chez les Hommes et <8g/dL chez les femmes			Haut	3-4
			Très haut	5-6

Tableau IX: Groupes pronostiques du score WPSS

Groupes pronostiques	Groupe WPSS	Très faible (0)	Faible (1)	Intermédiaire (2)	Elevé (3-4)	Très élevé (5-6)
Survie (mois)	Pavia	103	72	40	21	12
	Düsseldorf	141	66	48	26	9
Risque de transformation en LAM à 2 ans(%)	Pavia	0	11	28	52	79
	Düsseldorf	3	6	21	38	80

d) *Autres classifications pronostiques*

Il existe également d'autres classifications pronostiques qui ne sont pas ou très peu utilisées en pratique clinique. Il s'agit du score LR-PSS qui a été défini pour re-stratifier le risque des patients classés comme étant bas ou intermédiaire-1 avec l'IPSS[34]. Ou bien encore du score MDA-CSS qui prend en compte, contrairement au score IPSS, les patients atteints de leucémie myélo-monocytaire chronique et les patients préalablement traités[35].

B. Critères de réponses

Les syndromes myélodysplasiques présentent une hétérogénéité importante tant sur le plan clinique, que biologique. Cette hétérogénéité entraîne des difficultés dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. En 2000, l'International Working Group (IWG) a proposé les premiers critères standardisés afin d'évaluer la réponse aux traitements proposés. Ces critères prennent en compte la progression de la maladie, l'amélioration hématologique, la réponse cytogénétique et enfin la qualité de vie du patient[36]. Ces propositions ont été validées prospectivement au cours d'études et d'essais cliniques. Cependant, plusieurs limites ont fait surface à l'usage ce qui a conduit à la révision des critères en 2006.

Les critères de l'IWG sont basés sur 4 éléments qui reprennent les objectifs du traitement[37].

a) Modification de la progression de la maladie

Ce critère se base sur des éléments mesurables au niveau périphérique (sang) et au niveau central (moelle osseuse). Des limites précises ont été définies afin de savoir si le patient est en réponse complète (CR), partielle(PR) ou bien si la maladie est en progression. (*Tableau X*)

Tableau X: Critères de réponses du traitement des SMD selon l'International Working Group 2006[37]

Catégories	Critères de réponse
Réponse complète (RC)	<p>Moelle : ≤5% blastes avec maturation normale de toutes les lignées</p> <p>Numération Formule Sanguine :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hb ≥ 11g/dL - Plaquettes ≥ 100G/L - Neutrophiles ≥ 1G/L - Absence de blastes <p>Persistance des signes de dysplasies à signaler</p>
Réponse partielle (RP)	<p>Moelle : diminution des blastes de plus de 50% mais toujours > à 5%</p> <p>Numération Formule Sanguine :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hb ≥ 11g/dL - Plaquettes ≥ 100G/L - Neutrophiles ≥ 1G/L - Absence de blastes <p>Persistance des signes de dysplasies à signaler mais non pertinent</p>
Moelle réponse complète (MCR)	<p>Moelle : ≤5% blastes et diminution des blastes de plus de 50%</p> <p>Numération Formule Sanguine : Noter l'amélioration hématologique</p>
Maladie stable (SD)	Echec dans l'obtention des critères de RP en l'absence de critères de progression depuis plus de 8 semaines
Echec	Décès du patient durant le traitement ou bien progression vers LAM
Rechute après RC ou RP	<p>Au moins un des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Retour au pourcentage de blastes dans la moelle osseuse avant traitement - Diminution ≥ 50% du niveau des PNN ou plaquettes obtenu lors de la réponse - Diminution du taux d'Hémoglobine ≥ 1,5g/dL ou dépendance transfusionnelle
Réponse cytogénétique	<p>Complète : disparition complète des anomalies</p> <p>Partielle : réduction d'au moins 50% des anomalies cytogénétiques</p>
Progression	<p>Moelle osseuse patient avec :</p> <ul style="list-style-type: none"> - moins de 5% de blastes → augmentation des blastes ≥ 50% et blastes > 5% - 5-10% de blastes → augmentation des blastes ≥ 50% et blastes > 10% - 10-20% de blastes → augmentation des blastes ≥ 50% et blastes > 20% <p>Au moins un des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diminution ≥ 50% du niveau des PNN ou plaquettes obtenu lors de la réponse - Diminution du taux d'Hémoglobine ≥ 2g/dL - Dépendance transfusionnelle

b) Réponse cytogénétique

Les critères de l'IWG requièrent au moins 20 métaphases analysables pour exclure ou bien diagnostiquer des anomalies cytogénétiques. De la même manière, selon le guide « the International System for Human Cytogenetic Nomenclature » (ISCN) une anomalie de structure ou bien un chromosome additionnel doit être mis en évidence sur 2 ou plus des métaphases étudiées. Pour une perte de chromosome, ce sont 3 métaphases ou plus qui doivent mettre en évidence l'anomalie. Enfin, dans le cadre précis de la réponse cytogénétique, il convient d'étudier 20 métaphases dans l'idéal mais il s'agit d'une condition non nécessaire[38].

Au final, une réponse cytogénétique majeure se définit comme la disparition complète des anomalies. Une réponse cytogénétique mineure correspond à la réduction de 50% ou plus des anomalies préalablement mises en évidence.

c) Amélioration hématologique

L'amélioration hématologique (HI) est évaluée sur les 3 lignées dans le cas où l'évaluation initiale a montré un niveau d'hémoglobine < 11g/dL (ou bien une dépendance transfusionnelle en culot globulaire), un niveau de plaquettes < 100G/L (ou bien une dépendance transfusionnelle en plaquettes) et un niveau en PNN < 1G/L. Cette évaluation est effectuée chez un patient naïf de traitement et en dehors de tout contexte transfusionnel. Cette réponse doit au moins durer 8 semaines pour être prise en compte. Des critères précis ont été définis pour l'amélioration hématologique. (*Tableau XI*)

Tableau XI: Critères de réponses de l'amélioration hématologique au cours du traitement des SMD selon l'International Working Group 2006[37]

Amélioration hématologique (HI)	Critères de réponse
Hémoglobine (<11g/dL avant traitement)	Augmentation de l'hémoglobine $\geq 1,5$ g/dL Réduction significative du nombre de culots globulaires transfusés; au moins 4 transfusions sur une période de 8 semaines ¹
Plaquettes (<100G/L avant traitement)	Augmentation ≥ 30 G/L des plaquettes pour les patients dont le taux était ≤ 20 G/L Augmentation d'au moins 100% des plaquettes de <20G/L à >20G/L
PNN (<1G/L avant traitement)	Augmentation d'au moins 100% des PNN avec une valeur absolue >0,5G/L
Rechute après HI	Au moins un des éléments suivants : - Diminution de l'hémoglobine $\geq 1,5$ g/dL - Dépendance transfusionnelle - Diminution de 50% du taux de PNN ou de plaquettes obtenus lors de la réponse

¹Seule les transfusions réalisées pour une Hb ≤ 9 g/dL doivent être prise en compte

d) Qualité de vie

La qualité de vie des patients fait partie intégrante de la prise en charge des cancers et notamment chez le sujet âgé. Au cours des SMD, la qualité de vie va dépendre de nombreux facteurs tels que l'état de santé général, le mode de vie et bien sur le retentissement de la maladie. L'incertitude liée à l'évolution de la maladie pèse également sur le moral des patients. C'est l'anémie qui présente le lien le plus étroit avec la qualité de vie tout d'abord parce qu'il s'agit de la cytopénie la plus fréquente dans les SMD mais également à cause de sa prise en charge qui repose initialement sur un soutien transfusionnel. La prise en charge précoce de l'anémie et la limitation des variations de l'hémoglobine sont primordiales pour maintenir une qualité de vie correcte.

Une amélioration de la qualité de vie sous traitement par agent stimulant l'érythropoïèse et par agent hypométhylant a été démontrée au cours d'étude vis-à-vis de la prise en charge par soutien transfusionnel simple[39].

C. Facteurs prédictifs de survie et de réponse chez les sujets traités

a) Liés à la maladie

Les facteurs pronostiques de réponse et de survie globale chez les patients atteints de SMD de haut risque traités par AZA n'ont été étudiés que très récemment. Itzykson et al. ont étudié à travers les 42 centres participant au GFM (Groupe Français des Myélodysplasies), les facteurs pronostiques associés à la survie globale d'une part et la réponse au traitement par AZA chez 282 patients atteints de SMD ou de LAN pauci-blastique[40].

Les facteurs prédictifs péjoratifs indépendants de survie globale mis en évidence sont l'indice de performance ≥ 2 , la présence de blastes circulants, la dépendance transfusionnelle (≥ 4 culots globulaires en 8 semaines) ainsi qu'un caryotype intermédiaire ou défavorable selon l'IPSS.

Les facteurs prédictifs indépendants de moins bonne réponse à l'AZA sont un traitement préalable par de faibles doses d'aracytine, des blastes médullaires $>15\%$ et un caryotype anormal. La présence d'un caryotype complexe chez les patients est associée à une durée de réponse significativement plus courte. Aucuns facteurs non liés à la maladie n'avaient d'impact sur la réponse au traitement.

b) Non liés à la maladie

Les études publiées sur les facteurs prédictifs de survie et de réponse au traitement chez les patients atteints de SMD ne prennent pas en compte les particularités du sujet âgé et notamment l'impact des comorbidités sur le pronostic du patient traité. De la même manière, les scores pronostics précédemment détaillés ne prennent pas en compte celle-ci. Ces comorbidités sont définies par la présence de pathologies pré-existantes non liées au cancer et pouvant influencer de manière compétitive son pronostic. Elles apparaissent comme des facteurs pronostiques indépendantes de survie chez le sujet âgé atteint de cancer[41].

L'analyse des comorbidités est donc importante pour la prise en charge des patients âgés et donc parfaitement adapté au cadre des SMD. Plusieurs échelles de comorbidités ont été développées telles que le Charlson Comorbidity Index (CCI) et le score Cumulative Illness Rating Scale-Geriatric (CIRSG). Ces échelles ont été validées dans la population cancéreuse âgée[42]. D'autres échelles plus spécifiques existent telles que le score Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index (HCTCI)

qui est spécifique du pronostic des patients après allogreffe de moelle osseuse[43]. Par la suite, il a été montré que ce score pouvait être utilisé chez les patients non allogreffés atteints de SMD de faible et de haut risque[44]. Par la suite, un score spécifique des SMD a été développé, le Myelodysplastic Syndrome Comorbidity Index (MDSCI)[45]. Il permet de prédire l'impact pronostique des comorbidités sur l'histoire naturelle des SMD.

Cependant une étude récente réalisée au CHU de Toulouse chez des patients atteints de SMD et de LAM pauciblastiques montre que les comorbidités ont un impact significatif sur le pronostic dans cette population. Le travail souligne que l'évaluation de ces comorbidités devrait être intégrées dans les études évaluant le pronostic des sujets âgés mais aussi être considérées dans le cadre de la décision thérapeutique en association avec les facteurs pronostiques connus liés à l'hémopathie[46].

IX. Approche thérapeutique

Le seul traitement potentiellement curatif actuellement est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, qui pourra être envisagée en fonction de l'âge du patient, et de l'existence d'un donneur apparenté ou non[2].

En dehors de l'allogreffe, l'approche thérapeutique consiste à séparer les patients dits à « haut risque », qui comprennent les patients ayant un score IPSS élevé et intermédiaire II, de ceux dit à « faible risque » associant les patients à risque faible et intermédiaire I selon l'IPSS. Enfin le traitement symptomatique, que ce soit le soutien transfusionnel ou bien l'antibiothérapie à large spectre reste fondamental dans la prise en charge des SMD.

A. Traitement des SMD de faible risque

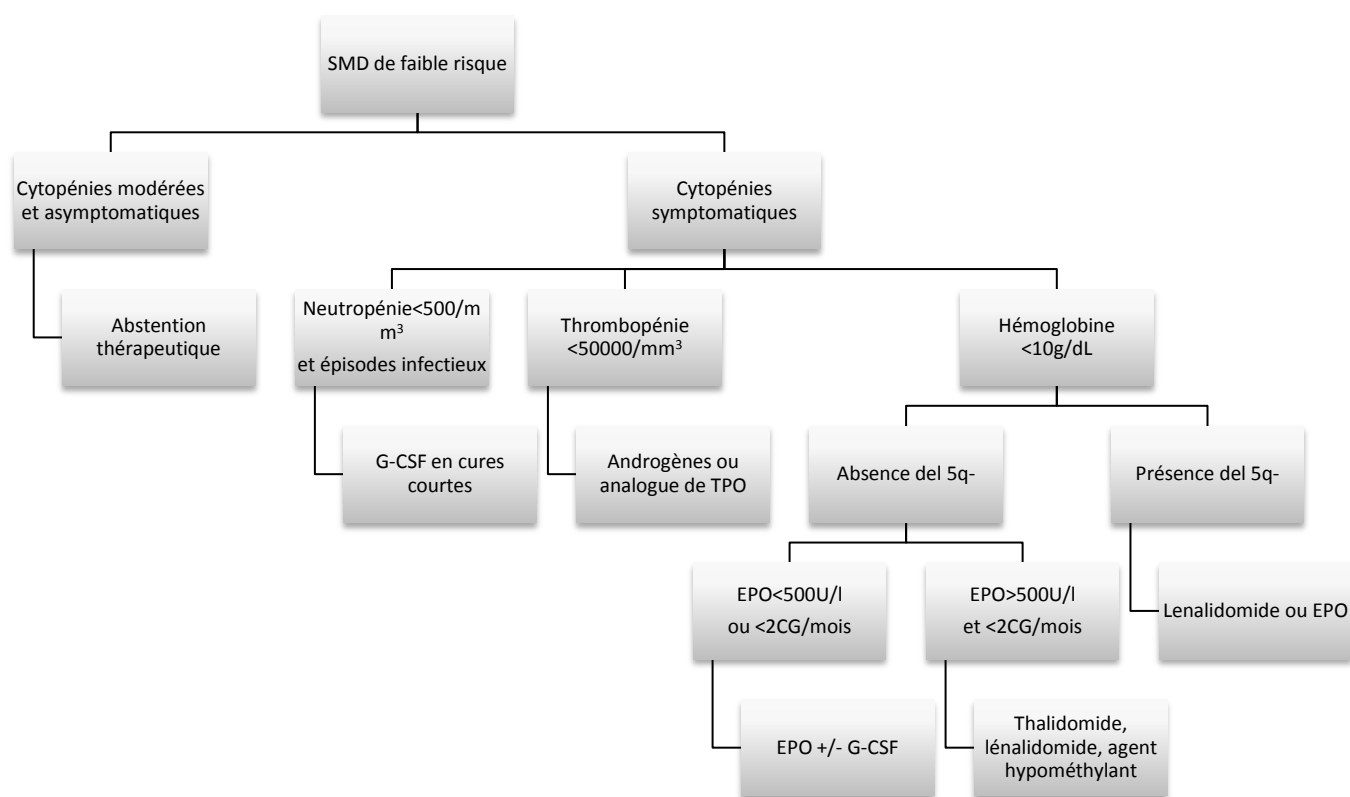


Figure 3 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de faible risque (IPSS faible ou intermédiaire I) selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies[2]

La prise en charge des SMD de faible risque vise avant tout la correction des cytopénies et principalement l'anémie (Figure 3). C'est pour cette raison que l'on propose généralement une abstention thérapeutique quand celles-ci sont modérées et asymptomatiques. Dans le cadre particulier de l'hémoglobine, le traitement est instauré de manière plus rapide afin d'éviter les transfusions synonymes pour le patient d'une dégradation importante de la qualité de vie.

B. Traitement des SMD de haut risque en dehors de l'allogreffe

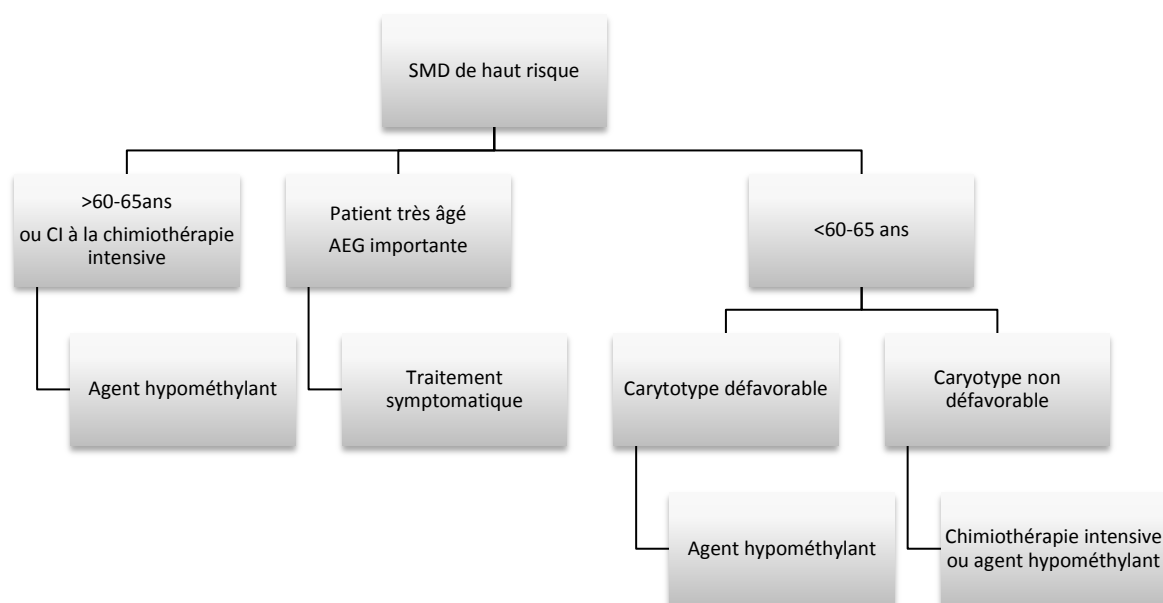


Figure 4 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de haut risque (IPSS élevé ou intermédiaire II) en dehors de l'allogreffe selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies[2]

a) Chimiothérapie intensive

La chimiothérapie intensive correspond à l'association Anthracyclines-Aracytine. Elle permet d'obtenir 40 à 60% de rémission complète mais avec une médiane courte de 10 à 12 mois. Moins de 10% des patients présentent une rémission prolongée. Ces résultats sont observés uniquement pour des patients en dessous de 65 ans. Au-delà, la cytotoxicité est trop importante entraînant de profondes cytopénies.

b) Cytarabine à faible dose

La cytarabine à faible dose est utilisée chez les patients de 60-65 ans jusqu'à 75 ans et permet d'obtenir 15% de RC et 20% de RP. Ce traitement semble inférieur aux agents hypométhylants et est de moins en moins utilisé.

C. Les agents hypométhylants

Il existe deux agents hypométhylants : l'azacitidine (5-azacytosine ; VIDAZA®) (AZA) et la décitabine (2'-deoxy-5-azacytidine ; DACOGEN®). Ces analogues de cytosine sont à l'heure actuelle les molécules les plus abouties dans la classe des thérapies épigénétiques anticancéreuses. Elles constituent la première ligne de traitement dans les SMD à haut risque. Ces analogues possèdent des propriétés cytotoxiques par incorporation à l'acide ribonucléique (ARN) ou l'ADN ainsi que des propriétés hypométhylantes par inhibition de DNMTs (DNA Methyltransférase). La compréhension du métabolisme et des modes d'action permet une meilleure utilisation de ces thérapeutiques.

a) Structure

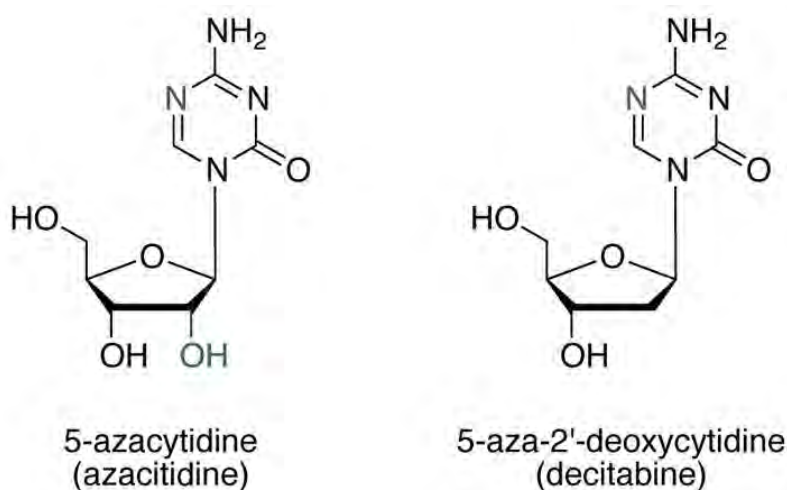


Figure 5 : Structure des analogues nucléosiques de cytidine

L'AZA est un analogue de nucléotide, la cytidine dans laquelle le carbone 5 du cycle pyrimidique est remplacé par un azote. Pour la décitabine, il y a en plus un 2-désoxyribose à la place du ribose (Figure 5).

b) Mécanismes d'action

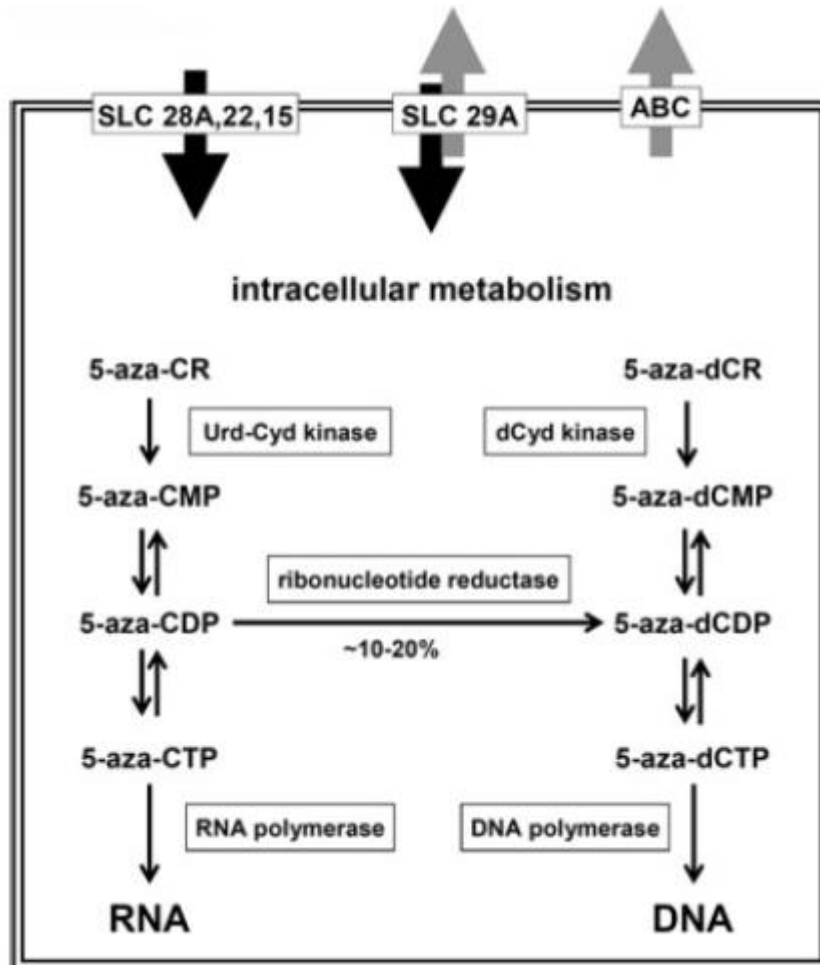


Figure 6 :Transport membranaire et métabolisme intra cellulaire [47]

Activité cytotoxique: il existe quatre protéines impliquées dans le transport transmembranaire des nucléosides et apparentés comme précisé dans la *Figure 6*. Une fois dans le milieu intracellulaire, les nucléosides doivent être phosphorylés afin de pouvoir être incorporés dans l'ARN ou l'ADN. La première étape, qui consiste en une phosphorylation ATP-dépendante, est catalysée par des enzymes spécifiques pour l'AZA et la déocytidine, respectivement l'uridine-cytidine kinase et la déocytidine kinase. Il faut également préciser que 10 à 20% de l'AZA est convertie en déoxyribonucléosides.

Une fois les phosphorylations terminées, les apparentés de nucléotides peuvent devenir des substrats pour la machinerie de réplication de l'ADN ou bien de transcription de l'ARN. Leur incorporation se fait à la place d'une cytosine ce qui entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN

donc une cytotoxicité importante. Au niveau de l'ARN, il y a inhibition de la traduction par désassemblage précoce du ribosome ce qui prévient la synthèse de protéines oncogènes[47].

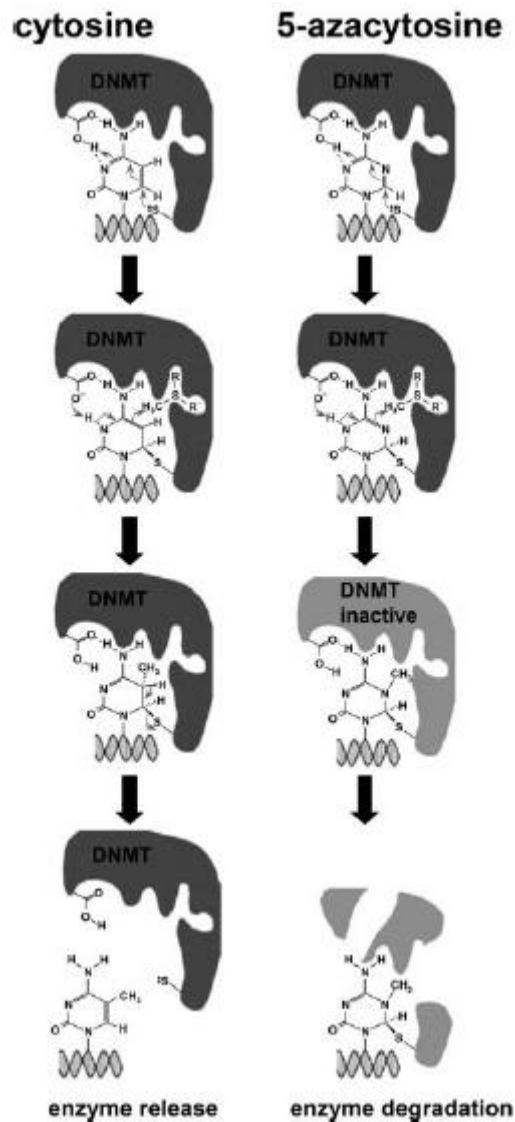


Figure 7 : Mécanisme d'inhibition de l'ADN méthyl-transférase (DNMT)[47]

Inhibition de l'ADN méthyl-transférase (DNMT): Quand les analogues de cytosines sont incorporés à l'ADN, il y a formation de liaisons covalentes avec le DNMT. Cela entraîne une inhibition de l'activité enzymatique avec dégradation de la protéine à l'origine d'une hypométhylation[47] (Figure 7).

c) Résultats

1) Azacitidine

L'étude initiale réalisée par le groupe « Cancer and Leukemia Group B » (CALGB) en 2002 (9221) rapporte une réponse chez 60% des patients, un retard à la progression vers une LAM, une amélioration de la qualité de vie et une prolongation de la survie globale[48]. Dans une étude plus récente portant sur des SMD de haut risque, la médiane de survie des patients traités par azacytidine est de 24,4 mois contre 15 mois dans le groupe contrôle. La progression vers la LAM est retardée et l'on observe une diminution de la dépendance transfusionnelle[49]. L'utilisation de l'AZA a été validée pour une administration sous-cutanée à la posologie de 75 mg/m² pendant 7 jours tous les 28 jours. La dose permet de potentialiser l'action hypométhylante tout en minimisant les effets indésirables. 90% des réponses interviennent après un minimum de 6 cycles de traitement.

2) Décitabine

L'étude initiale d'évaluation de la décitabine rapporte une réponse pour 30% des patients traités contre 7% pour le groupe contrôle. Cependant la décitabine n'améliore pas la survie globale comparé au groupe contrôle[50]. Les recommandations les plus récentes préconisent une posologie de 20mg/m² durant 5 jours toutes les 4 semaines[51].

d) Recommandations pour l'évaluation de l'efficacité de l'azacitidine

L'évaluation de l'efficacité du traitement par AZA doit être réalisée après six cycles au minimum[52]. En effet, contrairement à ce que l'on observe habituellement avec les chimiothérapies, la réponse au traitement par agent hypométhylant n'apparaît qu'après plusieurs cycles de traitement.

Dans l'analyse groupée de 3 études de phase II (8421, 8921 et 9221) réalisée par le groupe d'étude américain CALGB en août 2006, la réponse à l'AZA a été réévaluée selon les nouveaux critères de l'IWG 2006. Il en ressort que la médiane de délai de réponse (RC, RP et amélioration hématologique) a été de 3 cycles. 75% des réponses surviennent au bout de 4 cycles et même plus de 90% une fois le sixième cycle achevé[53][54].

e) Facteurs prédictifs de survie globale et de réponse chez les sujets traités

Les facteurs prédictifs de réponse et de survie chez les patients traités par AZA pour un SMD de haut risque commencent à peine à être connus. En 2010, *Itzykson et al.* ont étudié ces facteurs grâce à une étude rétrospective multicentrique comprenant 282 patients atteints de SMD de haut risque ou de LAM pauci-blastique et traités par AZA[40].

Après analyse, les facteurs prédictifs péjoratifs indépendants de survie sont l'indice de performance ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), la présence de blastes circulants dans le sang, la dépendance transfusionnelle ≥ 4 culots globulaires en 8 semaines et un caryotype intermédiaire ou défavorable (selon le score IPSS). Les facteurs indépendants prédictifs de réponse à l'AZA sont des facteurs liés à la maladie. Des blastes médullaires $>15\%$, un traitement préalable par faibles doses d'aracytine et un caryotype anormal sont des facteurs prédictifs indépendants de moins bonne réponse à l'AZA.

Dans une étude très récente, comprenant 62 patients atteints de SMD et LAM pauci-blastique traités par AZA, seul le statut mutationnel de TP53 est retenu comme facteur pronostique indépendant de survie globale en analyse multivariée. Ce résultat a été confirmé lorsque l'échantillon a été restreint au patient atteint de SMD seulement. L'analyse conclue également sur l'absence de relation entre les mutations de TP53 et le type de réponse observé sous AZA également confirmé par une seconde étude[55].

Partie 2. Mutation TP53

La protéine TP53 a été décrite pour la première fois en 1979. Elle était considérée comme un proto-oncogène de certains sarcomes chez les souris[56]. Ce n'est qu'en 1989 que TP53 a été identifiée comme un gène suppresseur de tumeur suite à la mise en évidence de la perte de son activité dans de nombreuses tumeurs humaines et notamment colorectal[57],[58].

TP53 est ubiquitaire ; elle est activée lorsqu'une cellule subit un stress oncogénique ou génotoxique et peut induire des réponses antiprolifératives comme un arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, l'entrée en sénescence ou bien encore une réparation de l'ADN.

I. Structure du gène TP53

Le gène TP53 (également appelé TRP53) se situe sur le bras court du chromosome 17 en position p13.1 [59] et couvre environ 20kb. Il est composé de 11 exons/10 introns et possède 3 promoteurs[60] ; les deux premiers se trouvent à proximité de l'exon 1 et le troisième dans l'intron 4 (Figure 8). De nombreux isoformes ont été décrits résultant d'un épissage alternatif. Ceux-ci sont supposés moduler l'activité de TP53 et ont des fonctions autonomes ; cependant, leurs rôles restent encore à élucider. L'expression différentielle entre les tissus tumoraux et normaux suggère un rôle de ces isoformes dans la cancérogénèse[61].

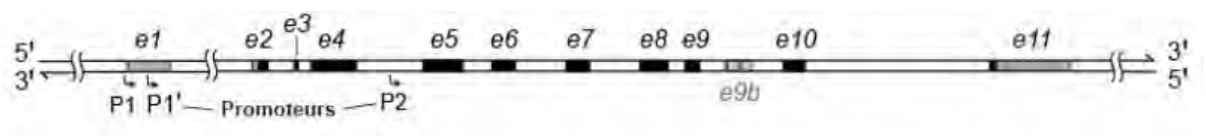


Figure 8 : Structure du gène TP53

II. Structure de la protéine TP53

L'expression de TP53 est constitutive et ubiquitaire. Son organisation en domaines fonctionnels est caractéristique de celle d'un facteur de transcription. La protéine est composée de 393 acides aminés répartis en cinq domaines principaux (Figure 9).



Figure 9 : Structure de la protéine TP53

- Domaine A : région de transactivation nécessaire pour la fonction d'activation transcriptionnelle des gènes cibles et de liaison à Murine Double Minute 2 (MDM2) permettant la régulation de TP53 mais aussi la transcription d'une forme alternative P53/47[62] ;
- Domaine B : région riche en résidus proline nécessaire à la fois à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'induction de l'apoptose par TP53[63] ;
- Domaine C : région centrale interagissant avec l'ADN pour la fixation spécifique de TP53 et permettant l'activation transcriptionnelle nécessaire à la fonction onco-suppressive[64] ;
- Domaine D : région de tétramérisation facilitant la fixation spécifique de TP53 ;
- Domaine E : région servant à la fois à la reconnaissance des dommages causés à l'ADN mais aussi à la régulation transcriptionnelle de TP53[65] ; ce domaine comprend également trois séquences de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) et des séquences d'exportation vers le cytoplasme (NES : Nuclear Export Signal)[66].

La comparaison des séquences protéiques de différentes espèces a montré l'existence de cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution[67]. La majorité de ces régions se situent dans la partie centrale de la protéine. Les mutations du gène TP53 retrouvées dans les tumeurs humaines sont, en majorité, localisées dans ces régions conservées. Ces mutations inhibent la fixation spécifique de TP53 et donc son activité transactivatrice.

III. Régulation de TP53

Dans les cellules subissant un stress, TP53 est surexprimée afin de conduire à l'arrêt du cycle cellulaire ou bien à l'induction de l'apoptose. TP53 est donc hautement régulée au niveau traductionnel essentiellement. Les modifications post-traductionnelles interviennent sur différents domaines de TP53 et sont de natures variées (Figure 10).

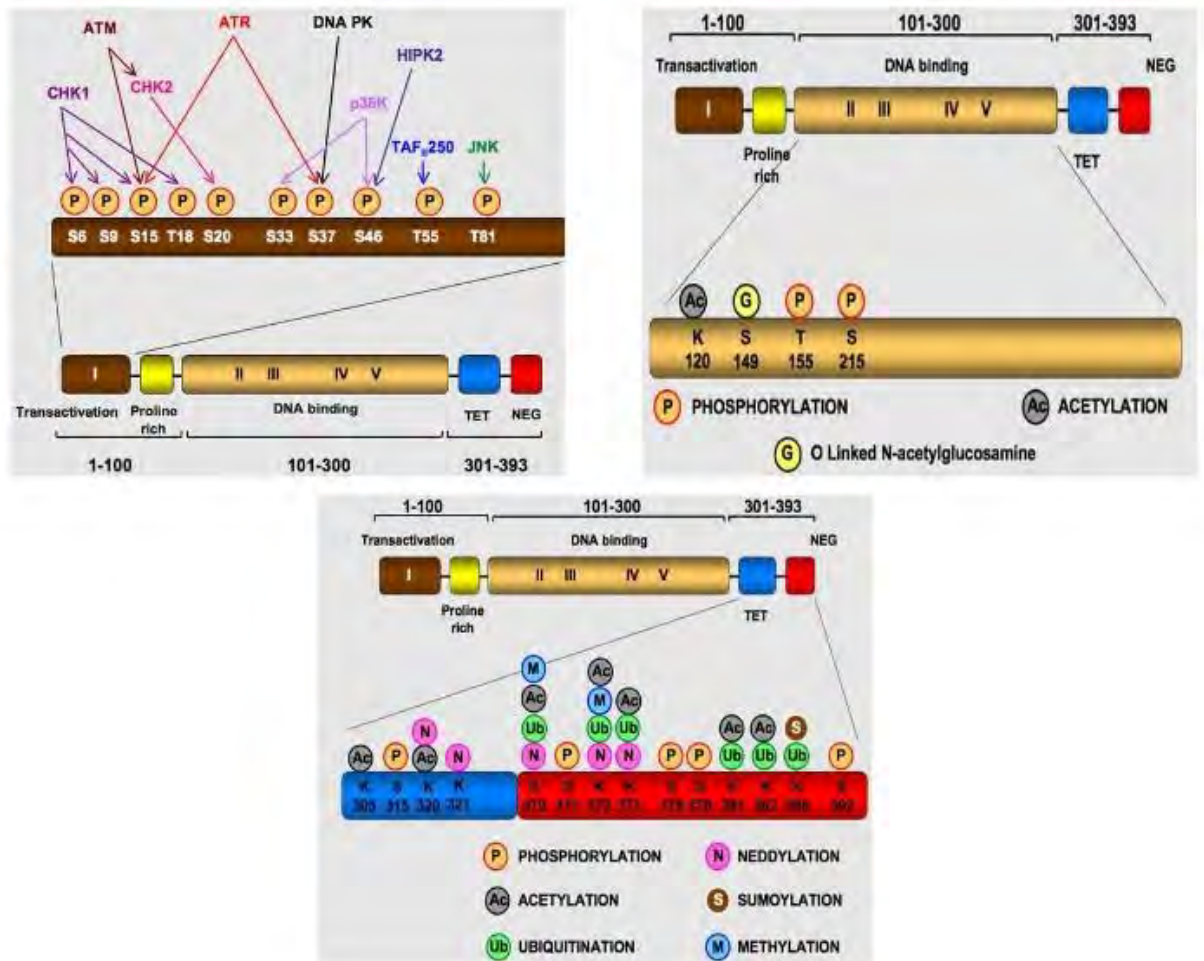


Figure 10 : Modifications post-traductionnelles au niveau des différents domaines de TP53

A. Phosphorylation de TP53

La phosphorylation de TP53 est assurée par de très nombreuses kinases (ATR, CDK1, CHK1, CHK2...). Ces modifications sont à l'origine d'une amélioration de l'efficacité de TP53 en tant que facteur de transcription pour induire, par exemple, l'apoptose cellulaire[68]. Ces phosphorylations permettent par ailleurs une stabilisation de TP53 vis-à-vis de son inhibiteur MDM2[69]. De nouvelles

enzymes responsables d'une phosphorylation de TP53 sont régulièrement décrites. DYRK2, décrite en 2007, est à l'origine d'une phosphorylation sur la sérine 46 de TP53. Cette phosphorylation favorise la transcription de P53AIP1 à l'origine d'une induction de l'apoptose cellulaire[70].

B. Acétylation de TP53

L'altération de l'ADN est à l'origine d'une phosphorylation au niveau N-terminal. Cette phosphorylation permet une augmentation du recrutement de protéines de type histone acétyltransférase CBP/p300 (Creb Binding Protein) favorisant l'acétylation de TP53 au niveau C-terminal. L'acétylation permet d'améliorer l'activité transcriptionnelle liée à des dommages à l'ADN[71]. *Tang et al.* décrivent en 2008 un nouveau site d'acétylation sur la lysine 164. L'acétylation de ce site bloque l'interaction de TP53 avec ces inhibiteurs tels que MDM2 et MDMX[72].

C. Ubiquitination de TP53

La protéine MDM2 par l'intermédiaire de p300/CREB-binding protein(CBP) catalyse la poly-ubiquitination de TP53 ce qui entraîne sa translocation du noyau vers le cytoplasme et son adressage au protéasome[73].

D. Méthylation de TP53

Chuikov et al. rapportent que la protéine SET9 méthyle spécifiquement TP53 au niveau de la lysine 372. TP53 étant une protéine à demie-vie courte, cette méthylation stabilise la protéine et la confine au sein du noyau[74]. Par opposition, SMYD2 méthyle TP53 en lysine 370 ce qui diminue son activité transcriptionnelle[75].

E. Autres modifications

D'autres modifications post-traductionnelles ont été décrites pour TP53 comme des sumoylation ou encore des O-glycosylation.

F. Régulation par des Micro-ARNs

Des micro-ARNs participent à la régulation de TP53. Le premier décrit miR125-b correspond à une séquence hautement conservée dans la partie 3' non traduite. miR-125b diminue la traduction de TP53 endogène, réduit son action transcriptionnelle vis-à-vis des gènes cibles et aurait une action inhibitrice sur des molécules pro-apoptotiques[76].

Un autre micro-ARNs (miR380-5p) a été identifié plus récemment. Il correspond à une séquence hautement conservée toujours en partie 3' non traduite. Il diminue la traduction de TP53 ainsi que ses fonctions apoptotiques[77].

G. Interaction TP53-MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog)

MDM2 joue un rôle fondamental dans la régulation de TP53. Comme nous l'avons déjà vu MDM2 favorise la polyubiquitination de P53 pour son exportation vers le cytoplasme et son adressage au protéasome. Mais celui-ci régule TP53 selon une autre voie. MDM2 se lie de façon spécifique à l'extrémité N-terminal (résidus 17 à 27) de TP53. Cette liaison bloque le domaine de transactivation, inhibe son activité transcriptionnelle et induit sa dégradation[78]. Il existe par ailleurs une boucle d'autorégulation. Le promoteur de MDM2 contient un domaine de liaison à TP53. La transcription de MDM2 est TP53 dépendante[79] (Figure 11).

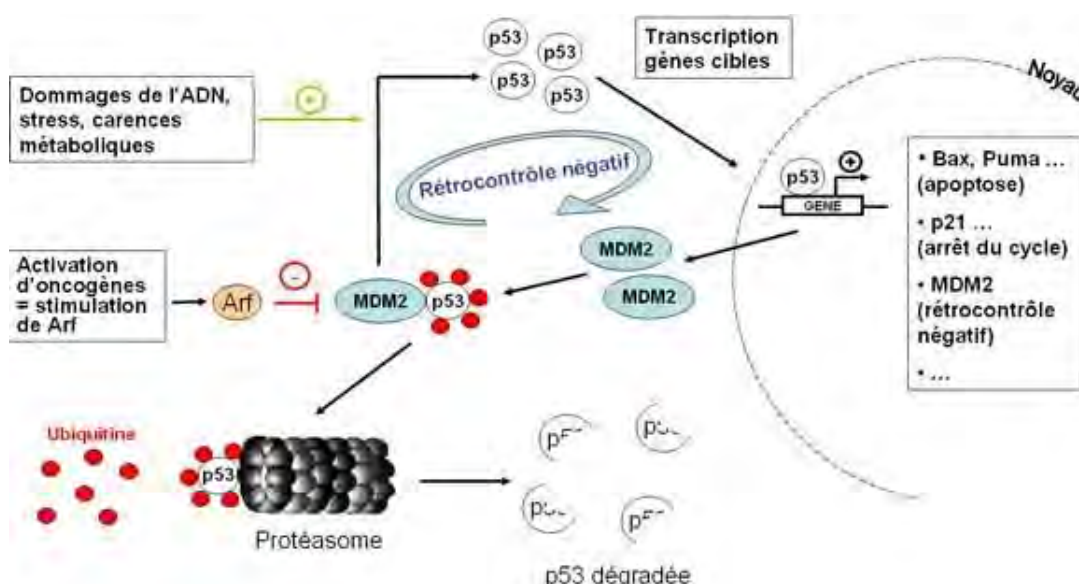


Figure 11 : Régulation de TP53

IV. Les fonctions de TP53

La protéine TP53 active la transcription d'un grand nombre de gènes en se fixant, sous une forme tétramérique, à un élément de réponse présent, soit dans le promoteur, soit dans une séquence intronique de ces gènes. Le nombre de gènes potentiellement transactivés par TP53 est évalué à plusieurs centaines[80].

A. Arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN

Parmi ces gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, la protéine P21 induit l'arrêt du cycle cellulaire au niveau G1 et G2 par l'intermédiaire de TP53 en inhibant les complexes cyclines E/CDK2 et cyclines B/CDK1. CDK 1 est fondamentale pour l'entrée des cellules en phase de mitose[81].

P21 est également impliquée dans la voie de signalisation du suppresseur de tumeur RB. L'induction de P21 entraîne l'inhibition de la cycline E/CDK2 causant l'hypophosphorylation de RB. Celui-ci se lie à l'E2F et inhibe la transcription des gènes du cycle cellulaire contrôlé par E2F[82].

TP53 ainsi que ses gènes cibles ne sont pas uniquement impliqués dans l'arrêt du cycle en phase G1 mais semblent impliqués dans l'ensemble des points de contrôle du cycle cellulaire.

De nombreux travaux montrent que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 après la survenue de lésions génotoxiques est dépendant de TP53. L'élément clef pour cette transition G2/M est le complexe cycline CDK1-cycline B1 qui pénètre dans le noyau au moment de la mitose. Le gène 14-3-3 σ , transactivé par TP53, est capable de séquestrer le complexe CDK1-cycline B1 dans le cytoplasme afin de provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Les cellules dans lesquelles les deux gènes 14-3-3 σ ont été inactivés ne sont plus capables d'induire l'arrêt de la division cellulaire[83].

Un second gène transactivé par TP53, GADD45A, présente un rôle important dans le passage du cycle cellulaire G2/M. Il agit en dissociant CDK2 de la cycline B1 et DDB2 (Damaged-DNA Binding Protein) codant pour la réparation de l'ADN. L'inactivation expérimentale de ce gène chez des cellules murines est à l'origine de nombreuses anomalies telles que des aneuploïdies et autres anomalies chromosomiques. De plus, ces cellules sont incapables de s'arrêter en G2 secondairement à un stress induit par irradiation[84].

B. Induction de l'apoptose

TP53 est également impliqué dans l'induction apoptotique selon deux voies principales. La première correspond à la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs membranaires à « domaine de mort »). Dans celle-ci, ce sont les récepteurs de mort de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) comprenant FAS et les récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5). L'apoptose est activée *via* la caspase 8.

La seconde correspond à la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) (Figure 8). TP53 d'origine nucléaire induit l'expression de protéines telles que PUMA (famille bcl-2) permettant l'activation de TP53 cytosolique dont l'activité est inhibée par Bcl-XL. Cela entraîne l'oligomérisation de Bax et son transport intramitochondrial. Une fois dans la mitochondrie, TP53 se lie à la cyclophiline D et provoque l'oligomérisation de Bax et de Bak. Ces changements provoquent une altération de la membrane mitochondriale et la libération de molécules pro-apoptotiques comme AIF et le cytochrome C. Ce sont ces molécules qui activent la cascade de caspases à l'origine de l'apoptose[85].

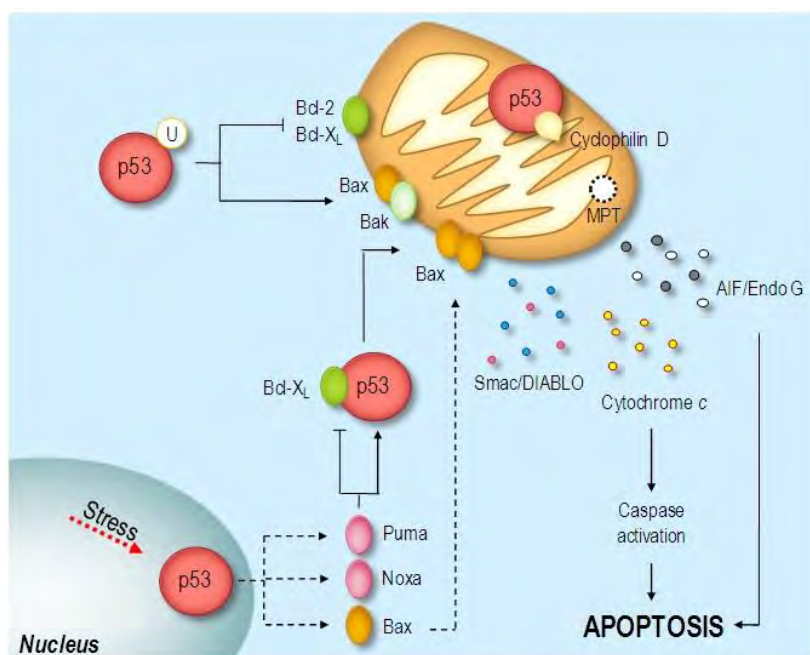


Figure 12 : Voie apoptotique intrinsèque selon Amaral et al.[85]

C. TP53 et autophagie

La protéine TP53 ne contrôle pas uniquement la division cellulaire et l'apoptose. Elle peut aussi agir sur l'autophagie grâce au gène dram (Damage-regulated autophagy modulator); gène

responsable de la synthèse d'une protéine retrouvée au niveau de la membrane des lysosomes et impliquée dans la fusion lysosomes/autophagosomes. Il a été montré que P53 induit l'autophagie selon une voie dram-dépendante. De plus, dram serait également impliqué dans la voie apoptotique médiée par P53[86].

D. TP53 et métabolisme

Il a été identifié une nouvelle cible de TP53, le gène TIGAR (P53-induced glycolysis and apoptosis regulator). L'expression de TIGAR provoque une inhibition de la glycolyse ce qui accroît la concentration intracellulaire de glutathion réduit et diminue la concentration en radicaux oxydants. La protéine TP53 pourrait contribuer à protéger l'ADN contre les agressions de ces radicaux[87].

E. TP53 et recombinaison

RAD51 est une protéine clef dans les phénomènes de recombinaisons, qui, en cas de défaut, favorise l'instabilité génomique. TP53 est capable de se lier à RAD51 entraînant une inhibition de la recombinaison homologue[88].

F. TP53 et angiogenèse

Enfin, TP53 pourrait avoir un rôle dans l'angiogenèse. *Teodoro et al.* ont montré que TP53 favorise la transcription du gène codant pour l'alpha-2 collagene prolyl-4-hydroxylase (P4HAI) à l'origine d'un relargage de fragments de collagène anti-angiogénique (Collagène type IV et XVIII)[89].

V. Inactivation de TP53 dans les cellules cancéreuses

L'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur peut constituer l'un des mécanismes initiateurs de la cancérogénèse. La perte de fonctionnalité de TP53 favorise la prolifération cellulaire et l'instabilité génomique. Il s'agit d'un élément clef durant la transformation maligne.

A. Fréquences de mutations TP53

L'altération du gène TP53 est une des plus fréquentes rencontrée dans les cancers humains. Elle est également responsable du syndrome de Li-Fraumeni qui prédispose tous les patients atteints à un très large spectre de cancers. La *Figure 13* suivante représente la fréquence des mutations de TP53 selon le type de cancer[90].

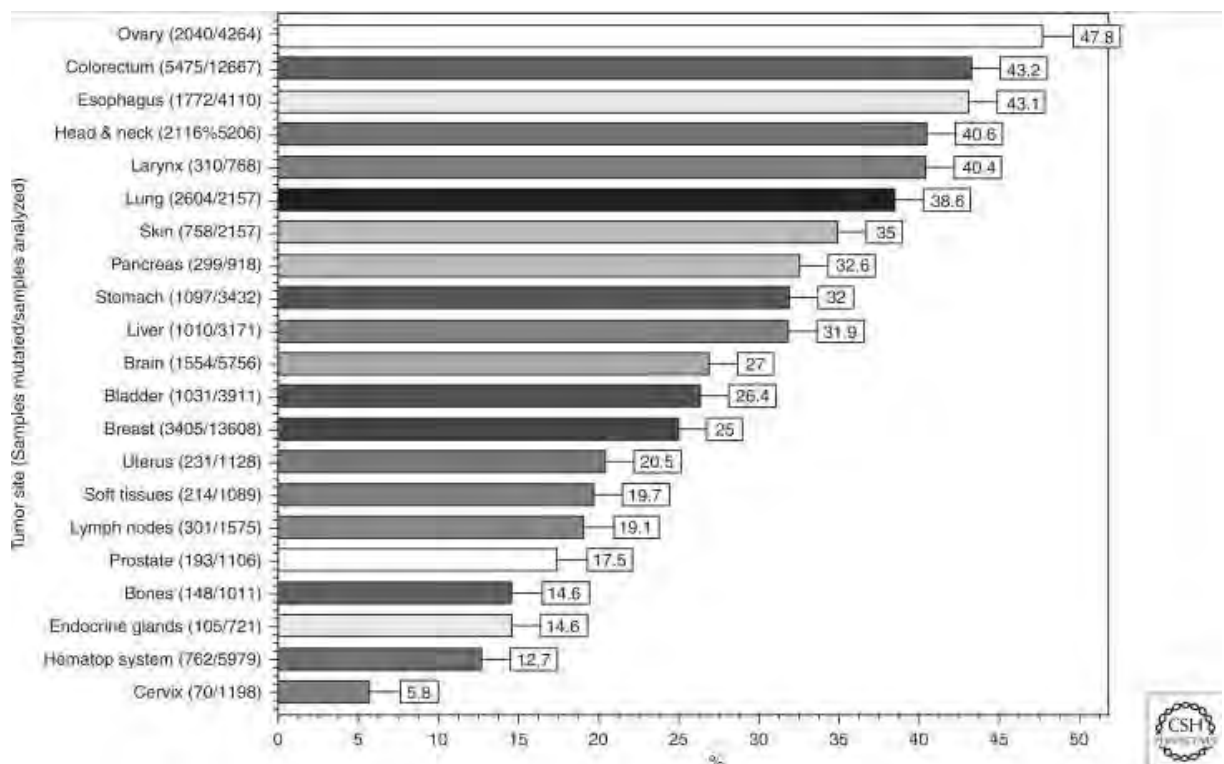


Figure 13 : Fréquences en pourcentage des mutations de TP53 par type de cancer selon Olivier et al.[90]

Dans la leucémie lymphoïde chronique, TP53 est retrouvé muté dans environ 5% des cas. Il constitue un facteur prédictif indépendant de chimiorésistance aux traitements conventionnels à

base d'agents alkylants ou de fludarabine. De plus, les mutations de TP53 sont également un facteur prédictif de la survie globale et la survie sans événement[91].

Dans les LAM *de novo*, on dénombre environ 5 à 10 % de mutations du gène de TP53[92]. Ces anomalies sont beaucoup plus fréquentes dans les LAM secondaires à un traitement par des agents alkylants, des sels de platine ou des inhibiteurs de topoisomérase[93].

Enfin dans les SMD, les anomalies du gène TP53 surviennent en moyenne chez 5 à 15 % des patients[24]. Il convient de distinguer les patients atteints de MDS avec une del(5q) pour lesquelles des mutations sont retrouvées dans 17 % des cas[94].

B. Types de mutations et d'inactivations

a) Inactivation par délétion du gène TP53

La délétion du gène TP53 est un phénomène moins fréquent que les mutations au sens large. Que la délétion affecte un ou deux allèles, il en résulte une inhibition de la formation du tétramère et une diminution de l'expression des gènes cibles.

b) Inactivation par mutations du gène TP53

Plusieurs études portant sur la séquence codante ont montré que la majorité des mutations se situe entre les codons 125 et 300 qui correspondent au domaine de liaison à l'ADN perturbant ainsi la liaison de l'ADN et la transactivation des gènes cibles[95]. La *Figure 14* présente des substitutions de bases selon les différents codons du gène de TP53. D'après la base de données de l'IARC (International Agency for Research in Cancer), version 17, les mutations au niveau des exons 4 à 8 de TP53 comprennent 94% de l'ensemble de mutations somatiques[90]. La *Figure 15* présente la distribution des mutations selon les exon/intron du gène de TP53.

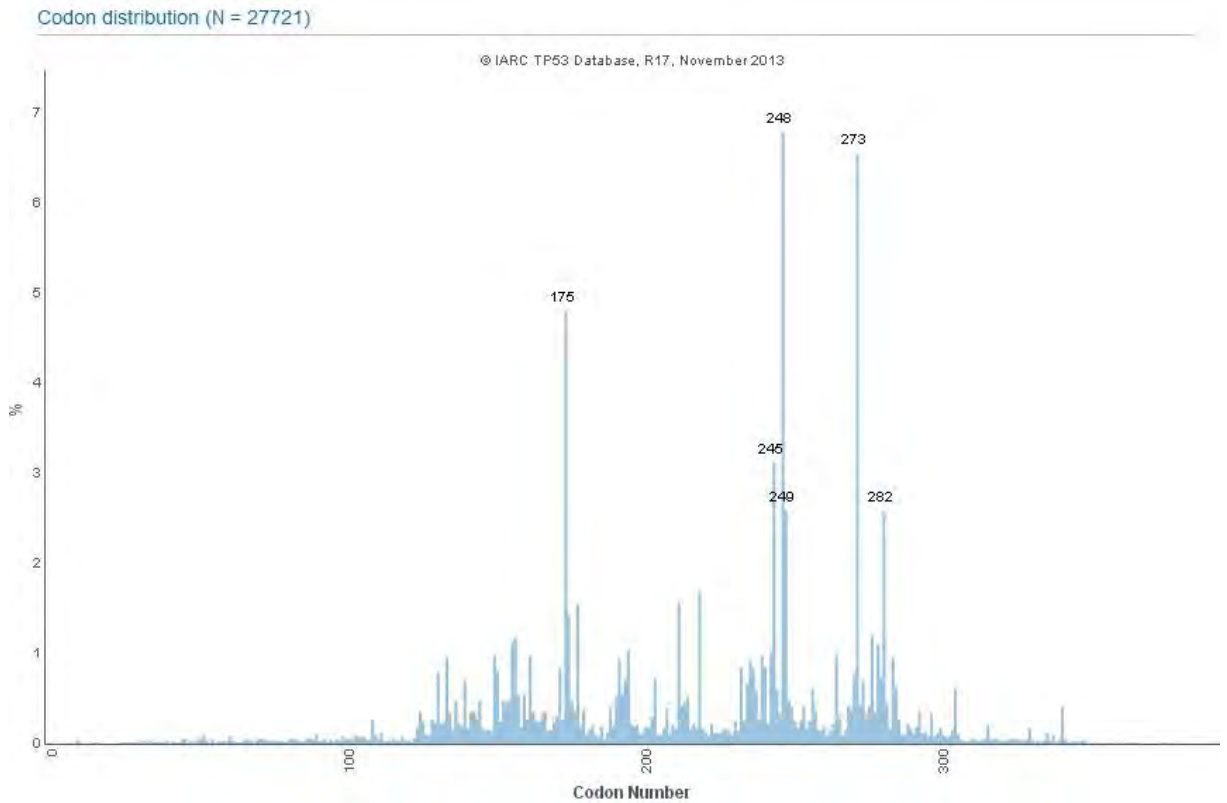


Figure 14 : Fréquences des substitutions de bases selon les différents codons du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013)

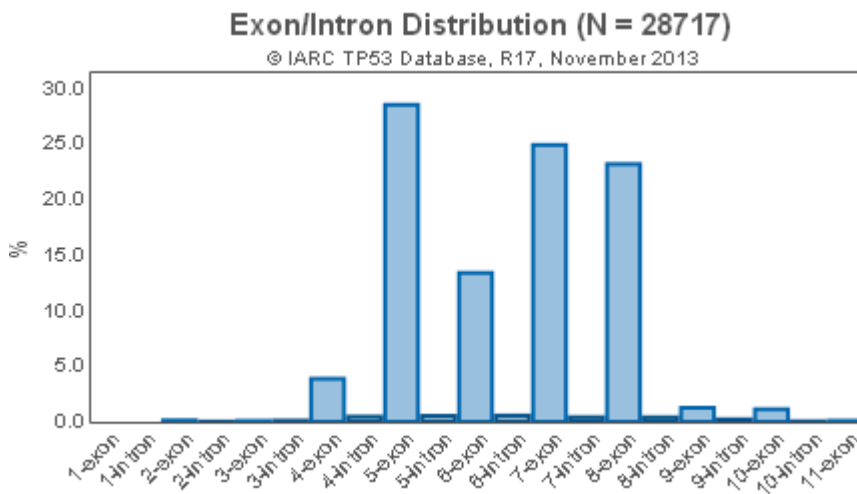


Figure 15 : Distribution des mutations selon les Exon/Intron du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013)

La plupart des mutations de cette région correspondent à des mutations faux-sens (73,4%) à l'origine de la substitution d'un acide aminé par un autre et de l'expression d'une protéine aberrante. Les acides aminés substitués peuvent se répartir en deux catégories :

- un premier comprenant les résidus engagés dans le maintien de la structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN ;
- un second comprenant les résidus en contact direct avec l'ADN.

De très nombreuses mutations différentes ont été décrites dans la littérature. Elles rendent la protéine TP53 inactive comme facteur de transcription, sa capacité de liaison à l'ADN étant abolie de façon totale. La *Figure 16* présente la fréquence du type de mutation affectant le gène TP53.

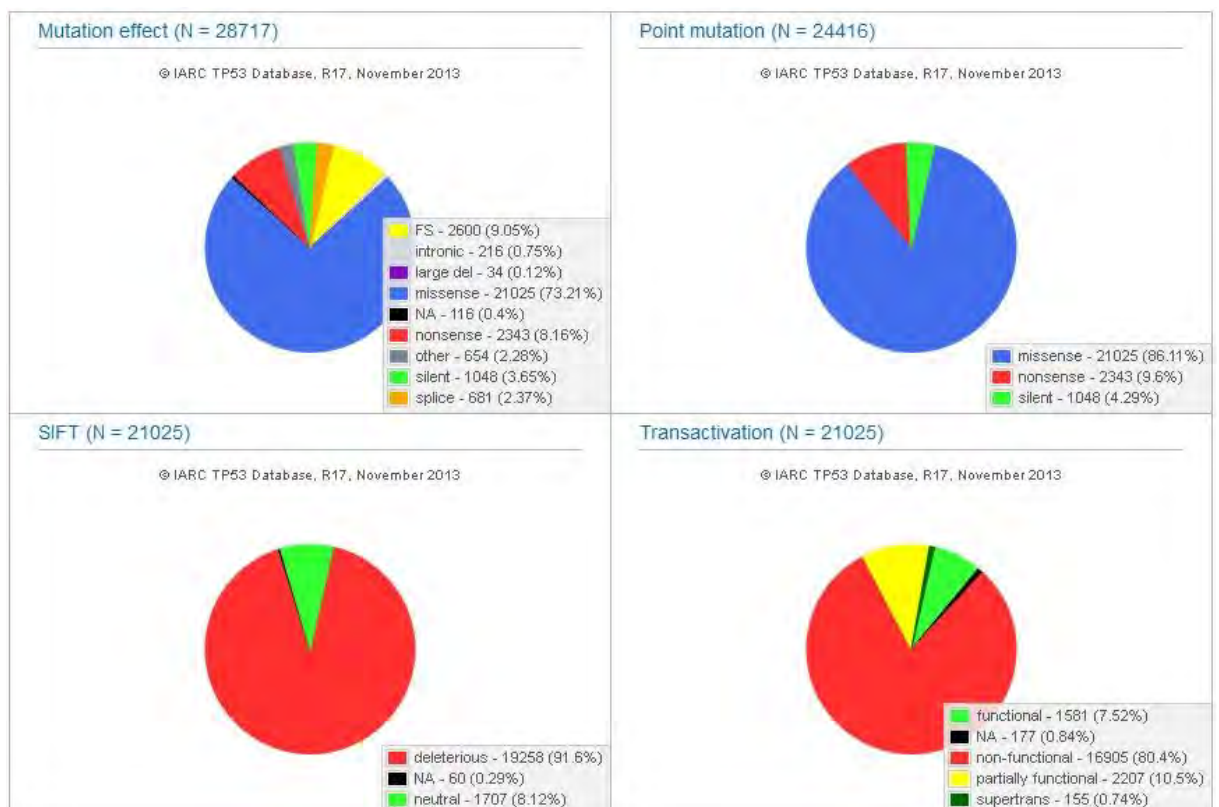


Figure 16 : Effets des mutations du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013)

Au total, lorsque le gène codant pour TP53 subit une mutation, la réponse cellulaire suite à un stress n'est plus optimale. Il n'y a plus d'action de blocage cellulaire ni d'orientation vers l'apoptose. Ce phénomène contribue ainsi à la cancérisation. Il est à noter également que toutes les mutations n'entraînent pas une perte totale d'activité[96].

c) Conséquences de l'altération de l'expression de TP53

Le fait que la présence de la protéine ayant une mutation ne soit pas tout à fait équivalente à la perte de la protéine TP53 s'explique selon deux mécanismes.

Il convient de parler de la place particulière qu'occupe le gène TP53 parmi les gènes suppresseurs de tumeur. D'une manière générale, l'inactivation de ce type de gène (ex :RB1 ou encore BRCA) se comporte selon la théorie du « two-hit theory » (modèle de Knudson) c'est-à-dire que les deux allèles doivent être absents ou mutés pour que la protéine soit non fonctionnelle[97]. L'altération du gène TP53 obéit plutôt à une logique inactivatrice. On parle d'effet de dominance négative des TP53 mutés. Cela correspond à la capacité que possède la protéine TP53 mutée à se lier à TP53 non mutée et à l'inactiver. Comme nous l'avons déjà évoqué TP53 se présente sous la forme d'un complexe homotétramérique. L'association de protéines TP53 mutées avec des protéines TP53 sauvages oblige la protéine à adopter une conformation spatiale mutante non fonctionnelle[98].

Enfin des formes particulières de mutations de TP53 peuvent être à l'origine de mutants avec gain de fonction. Ces derniers acquièrent de nouvelles fonctions normalement absentes. Des gènes réprimés voire même inactivés par TP53 peuvent être transactivés contribuant à la résistance à l'apoptose et à la prolifération cellulaire. Il en résulte une augmentation considérable du potentiel oncogénique des cellules touchées[99].

d) Autres types d'inactivations

TP53 peut être altérée selon d'autres mécanismes :

- Inactivation par altération de l'expression de MDM2 qui est surexprimé et/ou amplifié[100] ;
- Hyperméthylation du promoteur du gène P53 bloquant ainsi la transcription du gène ; l'autre copie étant mutée, délétée ou encore hyperméthylée ;
- La liaison avec certaines protéines virales telle que la protéine $\epsilon 6$ du papillomavirus humain (HPV16 et HPV18) entraîne une destruction rapide de P53 par engagement dans le protéasome[101].

VI. Autres marqueurs moléculaires décrits dans les SMD

D'autres gènes que TP53 présentent des mutations récurrentes dans le cadre des SMD. C'est l'ensemble de ces modifications qui conduisent à l'instabilité génomique et à l'évolution de la pathologie vers une LAM.

A. Fréquences des mutations récurrentes

Le *Tableau XII* décrit les mutations récurrentes des gènes somatiques dans les SMD selon la fonction et la fréquence.

Tableau XII: Mutations récurrentes des gènes somatiques dans les SMD[24]

Gènes et implications	Fréquence des mutations	Pronostic
Spliceosome		
<i>SF3B1</i>	15-30%	Associée à une meilleure survie globale et une diminution du risque d'évolution vers une leucémie
<i>SRSF2</i>	10-20%	Associée à une diminution de la survie globale et une augmentation du risque d'évolution vers une leucémie
<i>U2AF1</i>	<10%	Associée à une augmentation du risque d'évolution vers une leucémie
<i>ZRSR2</i>	<10%	Non définie
Méthylation de l'ADN		
<i>TET2</i>	20-30%	Aucun impact sur la survie globale Associée à une bonne réponse dans le cadre de traitement par agents hypométhylants
<i>DNMT3A</i>	10%	Associée à un pronostic défavorable
<i>IDH1, IDH2</i>	5%	Associée à un pronostic défavorable
Modifications des histones		
<i>ASXL1</i>	15-20%	Associée à un pronostic défavorable
<i>EZH2</i>	5%	Associée à un pronostic défavorable
Réparation de l'ADN		
<i>TP53</i>	5-10%	Associée à une diminution de la survie globale et une augmentation du risque d'évolution vers une leucémie Associée à une mauvaise réponse dans les syndromes 5q- traités par lénalidomide
Transcription		
<i>RUNX1</i>	10%	Associée à un pronostic défavorable
<i>BCOR-L1</i>	<5%	Associée à un pronostic défavorable
Signalisation RAS		
<i>NRAS, KRAS</i>	<5%	Non définie
<i>CBL</i>	<5%	Non définie
<i>NF1</i>	<5%	Non définie

B. Mutations de SF3B1

Le gène SF3B1 code pour un composant majeur d'ARN de la machinerie d'épissage. Cette observation, couplée à la mise en évidence d'autres mutations dans des éléments clés du spliceosome, conforte l'hypothèse de son implication dans la physiopathologie des SMD.

Dans l'étude de *Malcovati et al.*, le gène SF3B1 est muté dans 28,1% des patients atteints de SMD. La présence de la mutation est associée à une meilleure survie globale (90 mois vs 50 mois) et à un risque plus faible d'évolution vers une LAM ; et ceci de manière indépendante du score IPSS[102].

C. Mutations de TET2

La famille TET comporte 3 protéines (TET1, TET2 et TET3) partageant deux domaines hautement conservés. TET1 est formellement impliquée dans les leucémies en tant que partenaire de fusion du gène MLL à l'origine d'hyperméthylation et de modification de phénomènes de régulation épigénétique. Selon la littérature, les mutations de TET2 concernent 19% à 26% des patients atteints de MDS et 50% des patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)[103]. Il s'agit probablement d'un événement précoce dans la physiopathologie de ces maladies.

La signification pronostique des mutations de TET2 n'est pas élucidée d'autant que différentes études viennent se contredire sur le sujet. L'étude la plus récente de *Smith et al.* a identifiée chez 320 patients atteints de MDS 39 mutés. Les analyses statistiques ont montré que la survie globale des patients mutés versus patients non mutés (30 mois vs 36 mois) n'était pas significativement différente et cela même dans le cadre d'analyses multivariées prenant en compte le score IPPS, le type de MDS ou bien encore les résultats du caryotype[104].

Enfin, des études récentes montreraient que les mutations de TET2 peuvent prédire la réponse aux agents hypométhylants[105].

D. Mutations de DNMT3A

Le génome des cellules cancéreuses est caractérisé par une hypométhylation de l'ADN associé à une hyperméthylation des promoteurs de gènes. La diminution de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs explique l'implication du phénomène dans la cancérisation. Qu'il s'agit de LAM ou de SMD, le degré de méthylation de certains motifs du génome est différent comparé à un génome normal. Cela suggère que la modification du degré de méthylation de certains gènes contribue à la progression de ces pathologies. De plus, l'efficacité des agents hypométhylants dans ces pathologies conforte cette hypothèse.

Les principales DNMT qui présentent une activité chez l'homme sont DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. Les deux dernières sont les DNMT principales impliquées dans la méthylation de l'ADN en dehors des phases de réplication ; alors que DNMT1 agit justement lors de ces phases afin de maintenir le niveau de méthylation de l'ADN. Des mutations récurrentes de DNMT3A ont été décrites dans le cadre de LAM *de novo*.

Dans l'étude de *Walter et al.*, 8% des 150 patients ont montré une mutation du gène codant pour DNMT3A. La survie globale de ces patients est significativement plus courte. On observe une médiane de survie de 433 jours pour les patients porteurs de la mutation contre 965 jours pour les autres. De la même manière, la mutation est péjorative pour la survie sans événement[106].

E. Mutations de IDH1/IDH2

L'impact des mutations d'IDH1/IDH2 est décrit dans le cadre des LAM mais peu connu pour celui des SMD. Le gène code pour une isocitrate déshydrogénase impliquée dans l'hydroxyméthylation de l'ADN et la modification des histones.

Selon *Patnaik et al.*, une mutation somatique d'IDH est retrouvée dans 12% des cas (34/277) avec respectivement 26 mutations de IDH2 et 8 mutations de IDH1. L'analyse multivariée ; prenant en compte l'IPSS-R, le caryotype et la dépendance transfusionnelle ; révèle que les mutations d'IDH1 est un facteur prédictif indépendant d'une survie globale inférieure. Par ailleurs, les mutations d'IDH2 n'affectent ni la survie globale ni la survie sans événement[107].

F. Mutations d'ASXL1

Le gène ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1) appartient au groupe ETP (Enhancer of Trithorax and Polycomb) qui code pour l'activation ou la répression des gènes Hox impliqués dans de nombreux processus dont la modification des histones. Dans l'étude de *Thol et al.*, les mutations d'ASXL1 ont été retrouvées dans 20,7% des patients atteints de SMD. Il s'agit donc d'une mutation fréquente qui est associée à une diminution de la survie globale ainsi qu'à un raccourcissement du délai de progression vers une LAM[108].

G. Mutations de EZH2

Le gène EZH2 code pour une histone méthyltransférase du groupe Polycomb (PcG) qui appartient au complexe répresseur Polycomb 2 (PRC2) et induit la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27), la fermeture de la chromatine et l'extinction des gènes. Les mutations d'EZH2, rapportées dans 6 à 12% des cas de SMD, induiraient une modification du renouvellement des cellules souches et auraient un impact défavorable sur le pronostic. Dans l'étude de *Ernst et al.*, la

mutation est retrouvée chez 12% des patients atteints de SMD (LMMC compris) et est associée à un mauvais pronostic comparé aux patients sans mutation[109].

H. Mutations de RUNX1

Le gène RUNX1 code pour une protéine ayant un rôle de modulation de l'activité transcriptionnelle d'autres gènes. Les mutations du gène RUNX1 sont retrouvées dans 7 à 8% des cas des patients atteints de SMD (LMMC compris) et sont généralement associées à une maladie avancée, une thrombopénie profonde et un pronostic défavorable[9].

I. Autres mutations

Il existe d'autres mutations fréquentes dans les SMD telles que *CBL* et *ETV6*. Ces mutations sont associées à une diminution de la survie globale de manière indépendante[110].

VII. Impact pronostique des mutations TP53 dans les SMD : revue de la littérature

L'importance de la mutation de TP53 comme facteur prédictif péjoratif sur la survie globale et la progression de la maladie est clairement établie[95][110][55]. Selon les études dans 20 à 50% des cas, la mutation de TP53 est associée à une perte de l'autre allèle (del 17p)[95][111]. Cette incidence importante suggère la possibilité d'une pression sélective des cellules favorisant l'émergence d'un clone avec inactivation bi-allélique de TP53. D'autre part, il existe des patients pour lesquels TP53 est muté sans del 17p. Le suivi du statut mutationnel de TP53 au cours de la maladie a montré que celle-ci intervenait de manière précoce dans l'histoire de la maladie[95]. Cela indiquerait que l'inactivation mono-allélique de TP53 pourrait être suffisante pour la sélection clonale.

Des travaux beaucoup plus récents ont mis en évidence la présence de mutation de TP53 dans les SMD associés à une del(5q) isolée dans 17% des cas[94]. Ces patients présentent un taux de réponse plus faible au lénalidomide ainsi qu'une survie sans événement plus faible [112].

Le *Tableau XIII* récapitule les études portant sur l'impact pronostique des mutations de TP53 dans différentes cohortes.

Tableau XIII: Principales études sur l'impact des mutations de TP53 sur la survie globale

Etude	<i>Kita-Sasai et al.</i> [113]	<i>Bejar et al.</i> [110]	<i>Austin et al.</i> [95]	<i>Bally et al.</i> [55]
Date de publication	Juin 2001	Juin 2011	Janvier 2013	Mars 2014
Revue	British Journal of Haematology	The New England Journal of Medicine	British Journal of Haematology	Leukemia Research
Titre	International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome	Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes	TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5 and correlate with adverse prognosis	Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine
Patients	SMD	SMD	SMD	SMD et LAM (<30%)
Nombre de patients	118	439	318	62
Méthode de screening pour TP53	Etude des exons 4 à 8 par séquençage	Sequenom (génotypage couplé à la spectrométrie de masse)	Séquençage complet du gène	Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast (FASAY) confirmé par séquençage
Patient muté pour TP53	14% (n=16)	7,5% (n=33)	9% (n=30)	37,1% (n=23)
Patients avec del 17p	NA	8 patients mutés pour TP53 présentent une del 17p (24,2%)	NA	19,4% (n=12) dont 75% (n=9) mutés pour le gène TP53
Survie globale	Facteur péjoratif de survie globale $p < 0,000001$	Facteur indépendant péjoratif de survie globale	Facteur indépendant péjoratif de survie globale HR=3,78 [2,37-6,20] $p < 0,0001$	Facteur indépendant péjoratif de survie globale HR=2,89 [1,38-6,04] ; $p = 0,005$
Réponse au traitement	NA	NA	Pas d'impact sur le type ou la durée de réponse au traitement par AZA	Pas d'impact sur le type ou la durée de réponse au traitement par AZA

La mutation de TP53 est présente chez 5 à 10% des patients atteints de SMD hors syndrome 5q- selon les études. Plus récemment, il a été montré que les altérations de TP53, qu'il s'agisse de la perte d'un allèle ou d'une mutation, étaient présentes dans 70% des cas de LAM à caryotype complexe[114].

Hiroto Kaneko et al. montrait déjà en 1995 que la mutation de TP53 était associée dans 71% des cas à un caryotype complexe et que ces patients présentaient un très mauvais pronostic avec une évolution vers une LAM en 4 mois versus 72 mois pour le groupe non muté[115]. L'étude de *Yuri et al.* en 2001 confirme le mauvais pronostic des patients mutés pour TP53 mais ceci quel que soit le groupe IPSS auquel ils appartiennent[116]. Enfin les études les plus récentes montrent une forte association entre mutation de TP53 et anomalies sur les chromosomes 5 et 17. Elles montrent aussi un pronostic péjoratif indépendant pour les patients mutés[94][95].

Au total, les différentes études montrent que les mutations de TP53 sont fortement associées à des caryotypes complexes ainsi qu'à des anomalies sur le chromosome 5 et 17. Elles s'accordent également sur le fait que la mutation de TP53 est un facteur de mauvais pronostic indépendant. Les patients mutés présentent une survie globale et une survie sans événement inférieure au groupe non muté[24]. Enfin, des travaux récemment publiés montrent que les patients allogreffés porteur d'une mutation TP53 présentent un pronostic plus péjoratif que les patients non mutés[95].

Partie 3. Etude de l'impact des mutations de TP53 dans une cohorte de 65 patients atteint de syndromes myélodysplasiques de haut risque traités par agents hypométhylants

I. Objectifs de l'étude

Il est aujourd'hui admis que les mutations ou les délétions de TP53 dans le cadre des syndromes myélodysplasiques constituent un élément péjoratif dans le pronostic de ces maladies. Le travail porte sur une cohorte de 65 patients atteints de syndrome myélodysplasique de haut risque traités par agents hypométhylants et suivi au CHU de Toulouse entre 2007 et 2013. La recherche de la mutation de TP53 a été confrontée, par l'étude rétrospective des dossiers patients, à un ensemble d'éléments clinico-biologiques afin d'évaluer le pronostic et la réponse au traitement de ces patients.

Les objectifs que nous nous sommes fixés peuvent être résumés ainsi :

- évaluer la prévalence et la distribution des mutations ou des délétions de TP53 chez ces patients;
- confirmer que les mutations de TP53 constituent un facteur pronostic péjoratif indépendant ;
- estimer la valeur prédictive des atteintes de TP53 dans le cadre d'un traitement par agent hypométhylant.

L'objectif plus large est de déterminer si ce type d'analyse apporte des informations supplémentaires sur le pronostic et la prise en charge dans ces pathologies et donc de savoir s'il y a un intérêt à les réaliser dans le bilan pré-thérapeutique.

II. Matériels et méthodes

A. Population clinique étudiée

a) Critères d'inclusion

La liste des patients ayant reçu du Vidaza entre le 01/01/2007 et 01/06/2013 a été récupérée auprès de la pharmacie hospitalière du CHU de Toulouse Purpan. Elle comprenait un total de 344 patients. Ceux traités dans le cadre d'une LMMC ou d'une LAM pauci-blastique n'ont pas été retenus. De plus, les patients pour lesquels le diagnostic initial était un syndrome 5q- avéré ont également été exclus. Un total de 89 patients a ainsi été pré sélectionné.

Le dernier critère d'inclusion correspondait à la disponibilité d'un échantillon d'ADN ou de culot cytogénétique au maximum six mois avant le premier cycle de traitement par agents hypométhylants et ceux afin de connaître le statut mutationnel de TP53 avant traitement. La médiane du délai entre le prélèvement de l'échantillon et la première ligne de traitement est de 43 jours [0-155]. Par la suite, les patients traités dans le cadre d'un SMD de faible risque en échec ont également été exclus afin de rendre la cohorte la plus homogène possible.

Au total, 65 patients suivis pour un SMD de haut risque au CHU de Toulouse ont été sélectionnés dans notre étude.

b) Patients

Nous avons mené une étude rétrospective sur une cohorte de 65 patients traités par agents hypométhylants, essentiellement de l'AZA, dans le cadre d'un SMD de haut risque (score IPSS supérieur ou égal à 1,5) au CHU de Toulouse Purpan entre 2007 et 2013. Les patients ont été suivis jusqu'au 15/08/2014, permettant un minimum de 14 mois de suivi. Ce délai est suffisant pour observer notamment la réponse au traitement puisque plus de 90% des patients répondent après six cycles de traitement soit six mois[53][54].

Les caractéristiques clinico-biologiques de l'ensemble des patients de la cohorte ont été compilés de la manière suivante :

- Données démographiques et cliniques: consultation des comptes rendus d'hospitalisation sur les logiciels ORBIS et FUSION complétée par le dossier d'hospitalisation du patient commandé auprès des services de médecine interne et d'hématologie ;
- Score de comorbidité : Les comorbidités ont été relevées à la consultation initiale ainsi qu'au moment de l'initiation du traitement par le médecin en charge du patient. Le recueil de ces éléments s'est fait de manière rétrospective à partir du dossier médical du patient. Les scores de comorbidités utilisés (score de CCI et score HCTCI) ont été calculés pour tous les patients par la même personne, une interne clinicienne en médecine interne.

Tous les diagnostics biologiques de SMD ont été réalisés par le laboratoire d'Hématocytologie du CHU de Toulouse selon la classification de l'OMS 2008[19]. Pour les patients dont le myélogramme était antérieur à ces recommandations (n=5), les comptes rendus ont été revus et la classification modifiée si nécessaire. Les scores pronostiques ont été définis selon l'IPSS[21] et l'IPSS-R[22] au moment de la mise en route du traitement par AZA.

La recherche d'anomalie cytogénétique a été réalisée dans le cadre de la prise en charge initiale des patients selon les recommandations de l'ISCN[38]. Par la suite, nous parlerons de:

- Caryotype normal : patients pour lesquels l'étude cytogénétique n'a révélé aucune anomalie chromosomique clonale ;
- Caryotype complexe : se définit par la présence de 3 anomalies dont au moins une anomalie structurale ;
- Caryotype monosomal : se définit par la présence d'au moins 2 monosomies autosomales ou bien une seule monosomie autosomale mais associée à une anomalie structurale.

La survie globale (OS) est définie par la période en mois entre la date d'initiation du traitement et la date de décès. La survie sans événement (PFS) est définie par la période en mois entre la date d'initiation du traitement et la date de documentation d'une acutisation de la maladie (myélogramme avec blastes \geq 20%).

c) Traitement

Tous les patients ont été traités par de l'AZA selon les recommandations à savoir 75mg/m²/jour en sous-cutané pendant 7 jours tous les 28 jours. Les données concernant une

éventuelle concession posologique n'ont pas été un critère d'exclusion et n'ont pas été recueillies. Les patients ayant reçu des cures de DACOGEN (decitabine) sont peu nombreux (n=3), à chaque fois en raison d'une intolérance à l'AZA. Le nombre de cycle total reçu a tenu compte de ces injections supplémentaires. Tous les patients ont reçu au moins un cycle complet. Les dates et nombres de cycles reçus sont extraits du logiciel de délivrance des chimiothérapies de la pharmacie hospitalière du CHU de Toulouse (Chimio). Ces informations ont été complétées par la consultation des comptes rendus d'hospitalisation notamment dans le cas où la cure n'a pu être effectuée.

Les paramètres biologiques pertinents permettant l'évaluation de la réponse au traitement sont tirés du logiciel MOLIS permettant de consulter notamment les comptes rendus de numération de chaque cycle et de myélogramme d'évaluation de la réponse entre le 4^{ème} et le 6^{ème} cycle. La dépendance et la réponse transfusionnelle ont été évaluées en récupérant ; auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Toulouse, l'historique transfusionnel exhaustif des patients. Seules les transfusions réalisées avec un taux d'hémoglobine <9g/dL ont été prises en compte selon l'IWG[37].

La réponse au traitement a été évaluée après 4 à 6 cycles de traitement selon les critères de l'IWG 2006[37] classant ainsi les patients de la manière suivante : rémission complète (RC), rémission partielle (RP), réponse médullaire complète (RMC) avec ou sans amélioration hématologique (HI), maladie stable (SD) avec ou sans amélioration hématologique (HI), échec et progression. Les patients considérés répondeurs lors de l'évaluation de réponse au traitement sont ceux obtenant une RC, une RP, une RMC ou une SD avec HI. En cas de non évaluation médullaire, le patient a été considéré SD et classé répondeur s'il y avait une HI. Les patients ayant interrompu leur traitement avant évaluation médullaire sont considérés en échec quelle qu'en soit la cause.

Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément aux exigences en vigueur pour l'utilisation des données dans le cadre du registre national du GFM.

B. Screening des mutations de TP53 par technique HRM (High Resolution Melting)

a) Choix de la technique

Différentes méthodes existent en laboratoire pour la recherche de mutation sur un gène. Le choix doit tenir compte essentiellement de la sensibilité de la méthode. En effet, les mutations de TP53 peuvent être présentes en faible proportion dans les cellules leucémiques. De plus, dans le cas

où le second allèle n'est pas délété, l'ADN muté représente une faible fraction de l'ADN analysé. La technique HRM propose ainsi un très bon seuil de détection, de l'ordre de 5% de l'ADN muté présent dans l'échantillon. Elle offre également l'avantage d'être rapide et peu coûteuse[117]. C'est une technique de dépistage qui doit être obligatoirement complétée par un séquençage de l'ADN afin de confirmer la mutation et d'en définir le type.

b) Principes de la technique HRM et validation de la méthode

Il s'agit d'une technique rapide qui repose sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel d'une courte séquence d'ADN permettant de détecter des variations de séquence des nucléotides.

Cette analyse est réalisée en tube fermé. Ceci permet de diminuer le risque de contamination et le temps d'analyse. Elle consiste à introduire un composé fluorescent qui va s'intercaler entre les paires de base d'un ADN double brin pendant son amplification. (*Figure 17*)

Les amplicons de PCR obtenus sont soumis à une dénaturation par élévation progressive de la température au cours de laquelle la variation de fluorescence est mesurée. Le composé fluorescent est libéré lors de l'ouverture des brins d'ADN. On obtient ainsi une courbe de fusion en fonction de la température (T_m). Cette température, qui dépend de la quantité de GC des amplicons, est spécifique de chaque fragment d'ADN. Si la séquence d'ADN analysée comporte des variants, des mutations, des délétions, ou des insertions, la signature lumineuse change révélant l'existence d'un autre profil[118][119]. Un produit d'amplification ayant un ou plusieurs mésappariements (hétéroduplex) sera dénaturé à une température plus basse qu'un produit d'amplification sans mésappariement (homoduplex) : cette différence est analysée en comparant les profils de fusion obtenus.

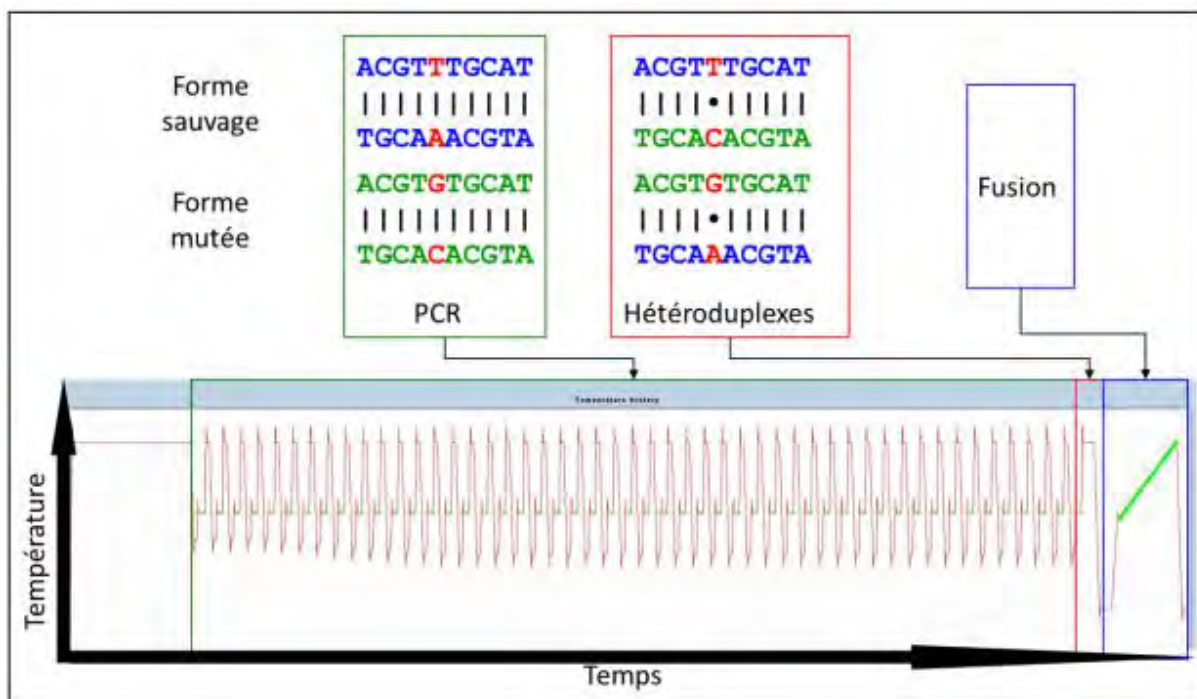


Figure 17 : Principe de la technique HRM.

La technique HRM a été réalisée sur le LightCycler LC 480 de Roche. Le « Master Mix » fourni par Roche utilise une ADN polymérase FastStart Taq. Cette ADN polymérase augmente la sensibilité et la spécificité de la réaction PCR en réduisant la formation de produits d'amplification non spécifiques. Cette enzyme est active seulement à haute température, les amorces ne pouvant se lier de manière non spécifique. L'intercalant fluorescent permet la détection de variations de séquences et particulièrement les mutations hétérozygotes, par l'aspect de la courbe de fusion. Les variants d'ADN hétérozygotes formant des hétéroduplex incompatibles peuvent être nettement distingués des variants homozygotes en raison de leur comportement différent à la fusion. De plus à une concentration élevée, l'intercalant sature complètement l'ADN double brin et n'affecte pas la PCR. Dans ces conditions, le moindre changement d'un nucléotide entraîne une modification dans la courbe de fusion.

c) Extraction de l'ADN à partir des culots cytogénétiques

L'extraction est réalisée à partir des cellules mononucléées de la moelle osseuse préalablement isolées par gradient de densité et conservées en culot sec congelé à -80°C. Le kit utilisé est le Promega Wizard Genomic DNA purification kit. Le principe général de l'extraction est basé sur 4 étapes que nous ne détaillerons pas ici :

- 1) Lyse des cellules ;
- 2) Protéolyse ;
- 3) Déprotéinisation ;
- 4) Isolement et purification de l'ADN génomique.

d) Protocole technique

1) Préparation du mélange de la PCR

L'ADN utilisé pour la PCR a été dilué dans de l'eau pour obtenir une concentration finale comprise entre 10 et 30 ng/L. Un volume de 2µL d'ADN ainsi obtenu est additionné à 8µL du mélange PCR qui contient :

- 0,2µL de chaque amorce F et R à 10µM ;
- 1,2 µL de MgCL₂ à 25 mM ;
- 5 µL de LC480 HRM Master MIX à 1X qui contient le tampon, l'enzyme, les nucléotides sous forme de dNTP, l'ADN polymérase FastStart Taq et l'intercalant fluorescent ;
- 1,4µL d'eau pour ajuster le volume final de la réaction.

2) Etapes de la PCR

1) Une phase de pré-incubation à 95°C permettant l'activation de l'ADN polymérase et la dénaturation de l'ADN.

2) Une phase d'amplification de la cible comprenant 50 cycles :

- 95°C pendant 15 secondes ;
- 63°C pendant 15 secondes ;
- 72°C pendant 25 secondes.

3) Une phase de fusion des amplicons, avec une chute brutale de la température, pour favoriser la formation des hétéroduplex comprenant un cycle, avec acquisition des données :

- 95°C pendant 1 minute ;
- 40°C pendant 1 minute ;
- 70°C pendant 5 secondes puis une augmentation lente et progressive de la température jusqu'à 95°C conduisant à la dénaturation progressive du produit PCR.

4) Une phase de refroidissement à 40°C pendant 30 secondes.

3) Choix des amorces

Les amorces utilisées pour le criblage des différents mutants sur les 5 exons étudiés sont issues de l'article Seth et al[120]. La séquence amplifiée est de 120 à 150 paires de base. Plus l'amplicon est court, meilleure sera la différenciation des échantillons présentant une variation de séquences car selon la notice fournisseur, au-delà de 500 pb, la sensibilité de la détection des variants diminue.

L'étude a été réalisée pour les exons 4 à 8. En effet, d'après la base de données de l'IARC (International Agency for Research in Cancer), version 13, les mutations au niveau des exons 4 à 8 de TP53 comprennent 94% de l'ensemble de mutations somatiques[90]. Les amorces utilisées pour ce travail sont :

- Pour le criblage des mutants TP53 Exon 4, le couple TP53 : F3+R22 ;
 - TP53_X04_F3 CTGCACCAGCAGCTCCTACA
 - TP53_X04_R22 CAGGCATTGAAGTCTCATGGAA

- Pour le criblage des mutants TP53 Exon 5, le couple TP53 : F12+R2 ;
 - TP53_X05_F12 CAACTCTGTCTCCTTCCTCCTCCTAC
 - TP53_X05_R22 GTCGTCTCTCCAGCCCCAGC

- Pour le criblage des mutants TP53 Exon 6, le couple TP53 : F1+R1 ;
 - TP53_X06_F1 CCTCTGATTCCTCACTGATTGC
 - TP53_X06_R1 CTTAACCCTCCTCCCAGAG

- Pour le criblage des mutants TP53 Exon 7, le couple TP53 : F5+R5 ;
 - TP53_X07_F1 TTGGGCCTGTGTTATCTCCT
 - TP53_X07_R1 TGGCAAGTGGCTCCTGAC

- Pour le criblage des mutants TP53 Exon 8, le couple TP53 : F1+R1.
 - TP53_X08_F1 TTGCTTCTCTTTTCCTATCCTGA
 - TP53_X08_R1 GCTTCTTGTCTGCTTGCTT

4) Réalisation de la technique

Les 65 échantillons étudiés sont testés en double pour chaque exon. Chaque plaque contient un témoin négatif issu d'un pool d'ADN non mutés (PBL), un témoin positif pour chaque exon ; préalablement validé par séquençage ; ainsi que de l'eau comme témoin de contamination de la PCR (autre témoin négatif).

5) Analyses des amplicons

Les amplicons sont ensuite analysés et évalués sur LightCycler 480 Gene Scanning Software. L'analyse des courbes de fusion se déroule en deux étapes : la première étape est la normalisation. Il s'agit de mettre les signaux pré-fusion à 100% de fluorescence et les signaux post-fusion à 0%, en essayant d'obtenir deux groupes de courbes mutées et non mutées. Dans le cas où il y a un hétéroduplex, la dénaturation se produit plus tôt ce qui explique une diminution de fluorescence à température plus basse (*Figure 18*). En pratique, les mutations homozygotes sont également détectables en raison d'une température de dénaturation différente de l'allèle non muté.

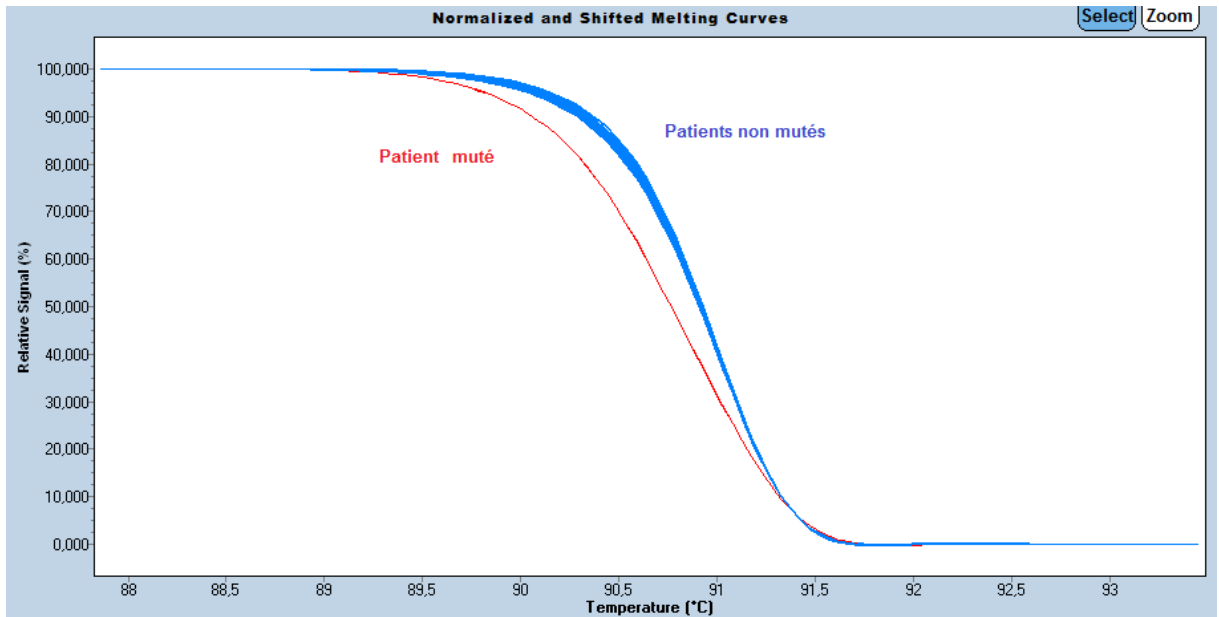


Figure 18 : Analyse des courbes de fusion en HRM sur LIGHTCycler 480

La deuxième étape, appelée « difference plot », consiste en une dérivée de la courbe de fusion en définissant comme ligne de base le témoin non muté (=PBL). Cela permet de mettre en évidence facilement les échantillons positifs en HRM (Figure 19).

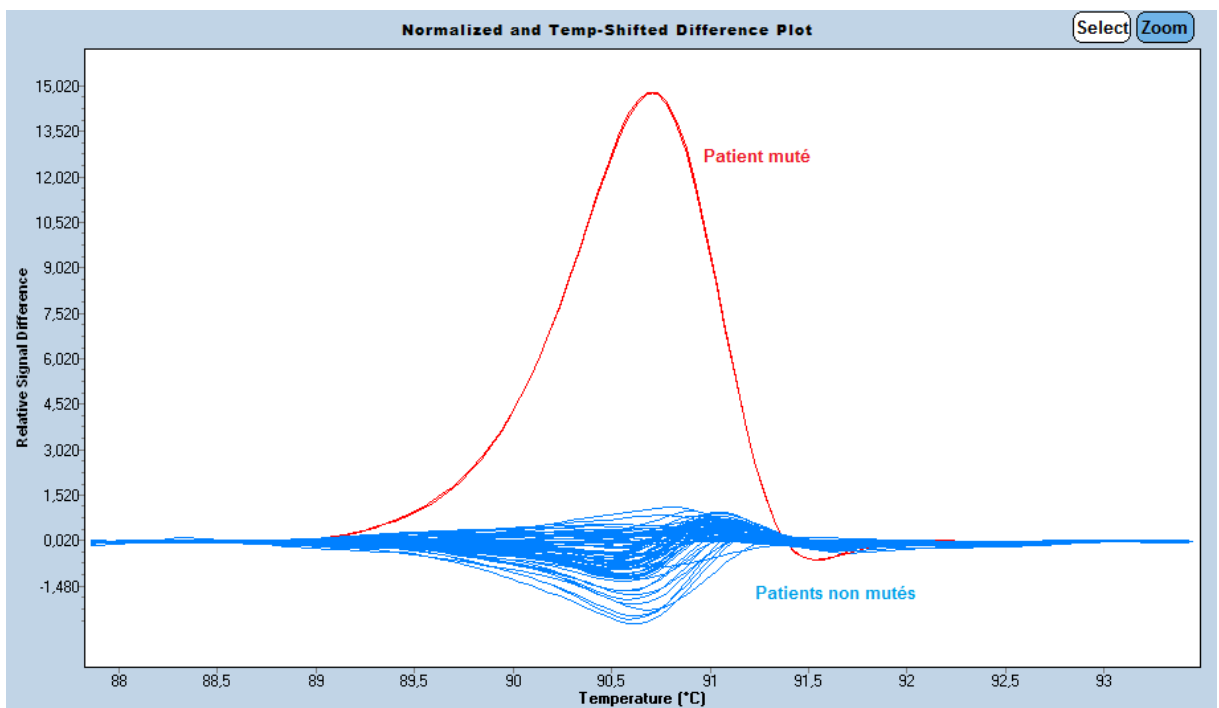


Figure 19 : Analyse des courbes de fusion en HRM sur LIGHTCycler 480 « difference plot »

e) *Confirmation des mutations par séquençage*

Les produits de PCR des variants détectés positifs par HRM sont ensuite séquencés pour confirmer la présence d'une mutation. Le séquençage a été sous-traité à la société Genoscreen et celui-ci a été réalisé selon la méthode de Sanger.

Les différents électrophorégrammes obtenus sont alignés avec la séquence de référence du gène TP53 publié sur la base de données de PubMed grâce au logiciel Mutation Surveyor. Dans le cas d'une mutation homozygote, on observe des bases modifiées par rapport à la séquence de référence. Pour les mutations hétérozygotes, on observe une superposition de deux bases sur la même position comme on peut l'observer sur la *Figure 20*.

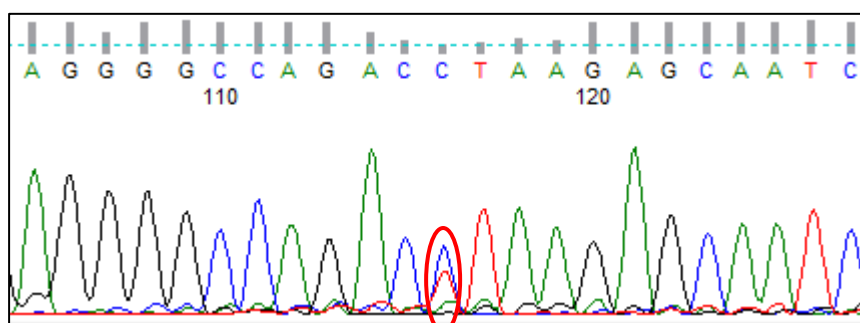


Figure 20 : Exemple d'un électrophorégramme avec une mutation ponctuelle hétérozygote

La variation retrouvée est confrontée au code génétique pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'une mutation silencieuse et aux bases de données dbSNP pour écarter tout polymorphisme. Dans le cas où la mutation est avérée, celle-ci est comparée aux bases de données COSMIC pour voir si elle a déjà été décrite.

C. **Analyses statistiques**

Les variables numériques sont décrites par la médiane ainsi que les valeurs extrêmes. Pour la comparaison de données qualitatives, nous avons utilisé le test exact de Fisher, le test du Chi2 ne pouvant être utilisé du fait de l'existence fréquente de cases trop faibles. La comparaison de la répartition des variables numériques entre les groupes est réalisée en utilisant un test de Mann et Whitney (U-test).

Une analyse de la survie a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier. La date d'origine est la date de première injection d'AZA. Les patients sont censurés à la date de perte de vue. Les

analyses univariées ont été réalisées avec la méthode du log-rank pour les variables qualitatives et par la méthode de Cox pour les variables quantitatives. A l'issue de l'analyse univariée, les variables ont été considérées pertinentes pour un $p < 0,2$. La construction du modèle multivarié a été réalisée selon le modèle de Cox avec calcul des risques proportionnels (Hazard Ratio, HR) en tenant compte de l'ensemble des variables. La sélection descendante du modèle a été faite en utilisant les polynômes fractionnaires pour modéliser les variables continues afin de tenir compte d'un effet potentiellement non linéaire. A l'issue de l'analyse multivariée, les variables avec $p < 0,05$ sont retenues comme significatives.

La recherche de facteurs prédictifs de réponse au traitement a également été effectuée par une régression selon le modèle de Cox.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel STATA®, version 13.

III. Résultats

A. Caractéristiques de la cohorte

Entre janvier 2007 et septembre 2013, 65 patients suivis au CHU de Toulouse Purpan ont été inclus de manière rétrospective dans notre étude. Ils ont été traités par AZA pour un SMD de haut risque (IPSS \geq 1,5).

La moyenne d'âge de l'ensemble des patients à l'initiation du traitement est de 72,7 ans (médiane à 73,7 ans). Elle était de 72 ans au diagnostic (médiane à 72,6 ans). La cohorte comprend 41 hommes pour 24 femmes ce qui correspond à un sexe ratio H/F de 1,7.

La *Figure 21* présente la répartition des catégories de SMD au moment du diagnostic. Pour 5 patients, le myélogramme a été réalisé avant les recommandations de l'OMS pour la classification des SMD[19]. Les résultats ont donc été repris afin que la méthodologie au diagnostic soit la même pour l'ensemble des patients de la cohorte. Au moment du diagnostic, 3 patients présentaient une ARS (3,75%), 4 patients une CRDM (5%), 5 patients une MDS-I (6,25%), 23 patients une AREB-1 (28,75%) et 30 patients une AREB-2 (37,50%).

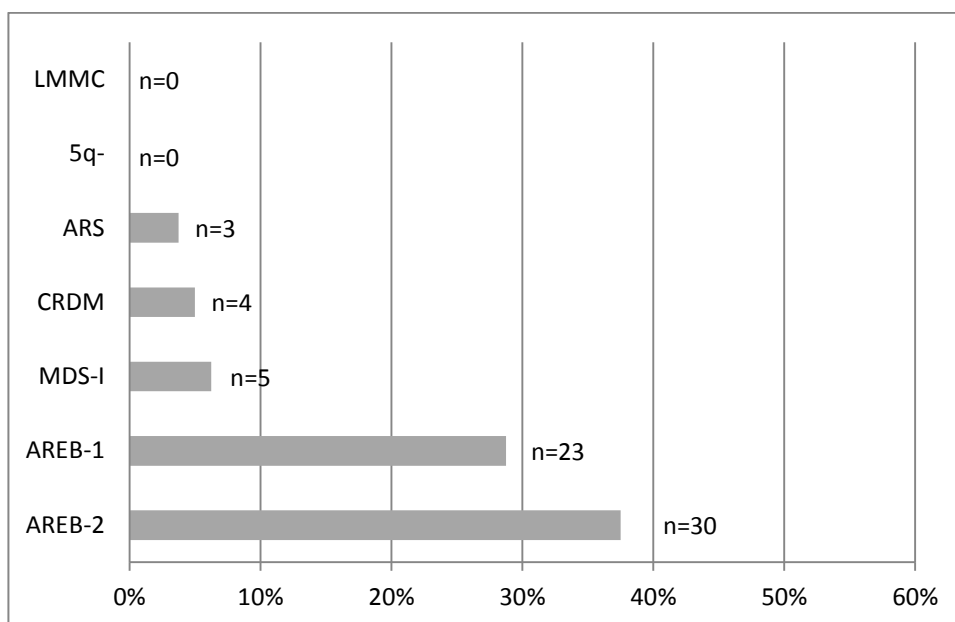


Figure 21: Répartition des catégories de SMD selon l'OMS au diagnostic

Au moment de la mise en place du traitement, les patients se répartissent dans les catégories de SMD de la façon suivante, 1 seul patient avec une ARS (1,25%), 2 patients avec une MDS-I (2,50%), 4 patients avec une CRDM (5%), 12 patients avec une AREB-1 (15%) et 46 patients avec une AREB-2 (57,50%) (Figure 22).

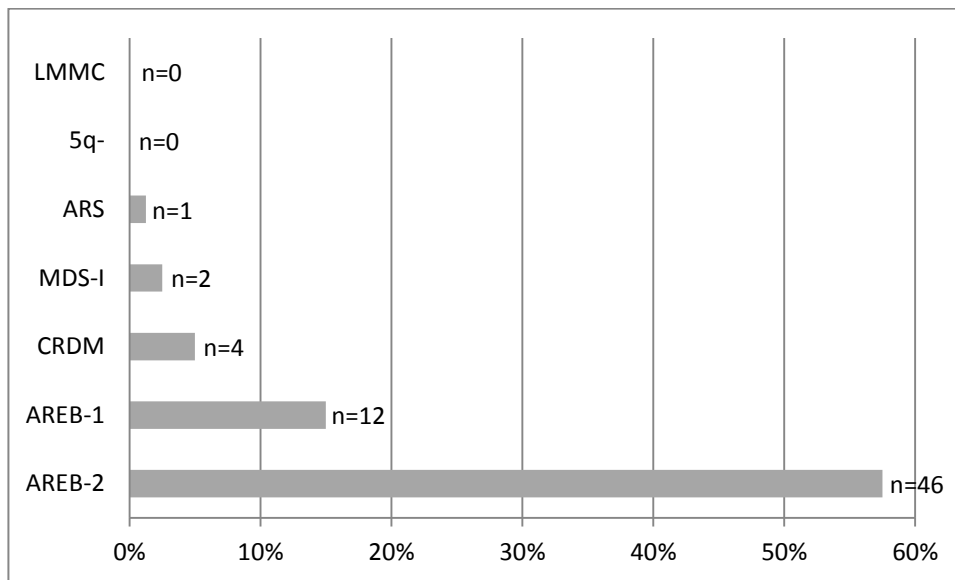


Figure 22: Répartition des catégories de SMD selon l'OMS au début du traitement par agents hypométhylants

Entre le diagnostic initial et la mise en place du traitement, 18 patients ont vu leur pathologie et donc leur classification évoluer. Dans 16 cas (88,9%), ceux-ci ont été reclassés en AREB-2. Au total, dans plus de 70% des cas, les patients ont été traités par agents hypométhylants dans le cadre d'une AREB-1 ou d'une AREB-2 de haut risque. L'IPSS est intermédiaire-2 pour 47 patients (72,3%), haut pour 14 patients (21,5%) et non calculable pour 4 patients (6,2%) mais avec un score IPSS au moins $\geq 1,5$. Enfin, il est important de noter que pour 16 patients de la cohorte (24,6%), il s'agissait d'un SMD secondaire à un premier traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie.

Les caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte sont résumées dans le *Tableau XIV*.

Tableau XIV: Tableau descriptif récapitulatif de la cohorte entière (n=65)

	Nombre de patients (n) ou médiane	Pourcentage ou intervalle
Age	73,7	47-87,9
Sexe ratio H/F	1,7 (41 hommes / 24 femme=24)	
Diagnostic selon OMS au traitement		
ARS	1	1,25
MDS-I	2	2,5
CRDM	4	5
AREB-1	12	15
AREB-2	46	57,5
MDS		
Primaire	49	75,4
Secondaire	16	24,6
Risque Cytogénétique selon IPSS		
Favorable	21	32,3
Intermédiaire	12	18,5
Défavorable	31	47,7
NR	1	1,5
IPSS		
Intermédiaire-2	47	72,3
Haut	14	21,5
NR	4	6,2
IPSS-R		
Intermédiaire	11	16,9
Haut	25	38,5
Très haut	25	38,5
NR	4	6,2
Dépendance transfusionnelle¹/Numération		
≥4 CGR/8 semaines	28	43,1
PNN<1G/L	31	47,7
Plaquettes<100G/L	43	66,2
Blastes médullaire		
Moyenne % blastes dans la moelle	10	0 – 18
≥15%	13	20
Présence de blastes circulants		
Oui	27	41,5
Non	38	58,5
Score CCI		
Score=0	25	38,5
Score=1	18	27,7
Score≥2	19	29,2
NR	3	4,6
Score HCTCI		
Score=0	18	27,7
Score=1	13	20
Score≥2	31	47,7
NR	3	4,6

¹ Selon Itzykson[40]

Les 65 patients de la cohorte ont été traités par AZA selon les recommandations à savoir 75mg/m²/jour en sous-cutané pendant 7 jours tous les 28 jours. Les données concernant une éventuelle concession posologique et les raisons de cette concession n'ont pas été recueillies. D'après la littérature, il ne s'agit pas d'un élément significatif pouvant modifier la réponse au traitement[40].

La médiane du nombre de cycles reçus est de 8 [1-69 cycles]. Seuls 3 patients ont reçu des cures de DACOGEN® (décitabine), à chaque fois en raison d'une intolérance à l'AZA. Pour six patients, le nombre précis de cycles reçus n'est pas connu. Dans ces conditions, le résultat a été censuré. Cependant, ces patients ont reçu au moins six cycles et la réponse a parfaitement pu être évaluée.

Le délai médian entre le diagnostic de la maladie (date du premier myélogramme) et l'initiation du traitement (premier jour du cycle) est de 2,1 mois [0,2-68,2 mois] avec des extrêmes allant de moins d'un mois à plus de 5 ans. Cette disparité s'explique par l'existence préalable d'un SMD de faible risque.

Après l'administration de 4 à 6 cycles, le nombre de répondeurs est de 35 patients (53,8%) avec 14 RC (21,5%), 1 RP (1,5%), 8 RMC (12,3%) dont 1 avec amélioration hématologique (sans obtention des conditions de RC), 11 patients SD avec HI (17%) et un patient sans évaluation médullaire mais avec HI (1,5%). Pour les patients considérés non répondeurs (46,2%), 20 patients sont en échec (30,8%), 7 SD sans HI (10,8%) et 3 en progression (4,6%). Pour deux patients, la réponse médullaire n'a pu être évaluée en raison de myélogrammes non interprétables (hémodilution) et ce malgré plusieurs prélèvements. Etant donné l'absence de soutien transfusionnel durant le traitement et une amélioration hématologique avérée, ces patients ont été considérés comme répondeurs et classés « maladie stable avec HI ».

Les caractéristiques du traitement et de la réponse de la cohorte sont résumées dans le *Tableau XV*.

Tableau XV: Description des caractéristiques du traitement et de la réponse sous AZA selon les critères IWG 2006 (n=65)

	Nombre de patients (n) ou médiane	Pourcentage ou intervalle
Traitement par AZA		
<i>Nombre de cycles reçus</i>	8	1 – 69
<i>Arrêt précoce du traitement (< 4 cycles)</i>	13	20
<i>Délai entre diagnostic et traitement (mois)</i>	2,1	0,2 – 68,2
Type de réponse après le sixième cycle		
<i>RC</i>	14	21,5
<i>RP</i>	1	1,5
<i>RMC</i>	8	12,3
<i>SD avec HI</i>	12	18,5
<i>SD sans HI</i>	7	10,8
<i>Echec</i>	20	30,8
<i>Progression</i>	3	4,6
Réponse globale au traitement		
<i>CR+RP+RMC+SD avec HI</i>	35	53,8

Rémission Complète (RC), Rémission Partielle (RP), Réponse Médullaire Complète (RMC) avec ou sans Amélioration Hématologique (HI), Maladie Stable (SD) avec ou sans Amélioration Hématologique (HI)

B. Mutations de TP53

La recherche des mutations de TP53 a été réalisée par HRM pour l'ensemble des patients de la cohorte à partir d'un échantillon médullaire prélevé avant la mise en route du traitement. Les patients positifs en HRM ont vu leurs mutations confirmées par séquençage.

Nous avons ainsi détecté et confirmé au total 10 mutations de TP53 chez 9 patients de la cohorte (13,8%). En effet, un des patients présentent une mutation différente sur chacun des allèles de TP53. La majorité de ces mutations (70%) sont localisées sur le domaine de liaison à l'ADN (exon 5 à 8). La recherche des mutations sur les exons 9 et 10 n'a pas été réalisée en raison d'un taux de mutations de ces exons très rare selon la littérature[94][95][113].

La *Figure 23* compare le nombre de mutations et le type de mutations en fonction de l'exon étudié. On constate que la majorité des mutations sont des mutations faux-sens (55%) dont 80% sont localisées sur le domaine de liaison à l'ADN (exon 5 à 8).

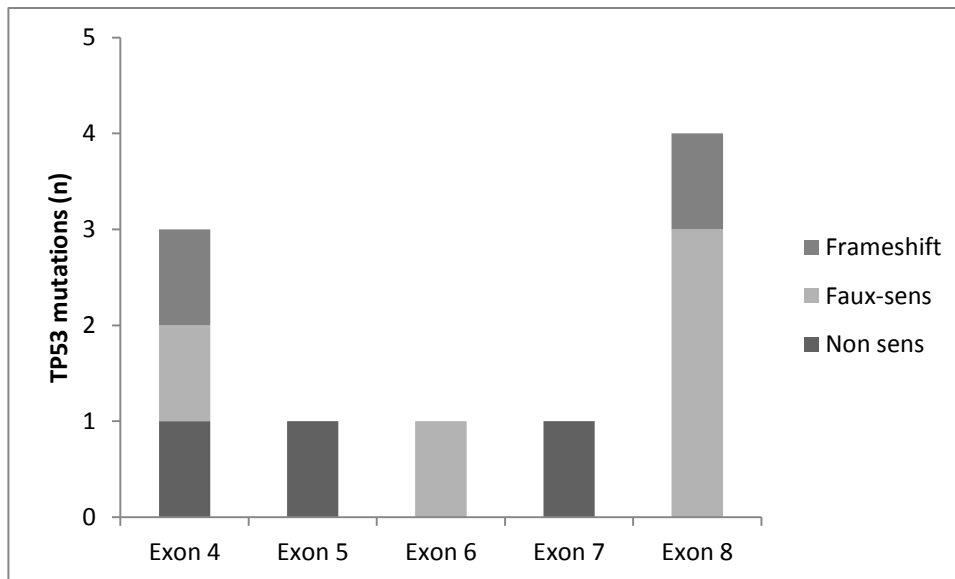


Figure 23 : Incidence des mutations de TP53 en fonction de l'exon étudié

La mutation concernant le patient p18 n'a pas été rapportée dans ce diagramme puisqu'il s'agit d'une variation du site d'épissage. Par la suite, ce patient a été considéré comme muté pour le gène TP53.

Le type de mutation pour TP53, l'exon concerné, les conséquences sur la protéine ainsi que la nomenclature internationale pour chaque patient sont résumés dans le *Tableau XVI*.

Tableau XVI: Résultats de la recherche de mutations de TP53 sur la cohorte entière (n=65)

ID	Exon	Changement d'acide aminé	Type de mutation	Del 17p	Nomenclature	Numéro COSMIC	
1	p10	4	R110H	Faux-sens	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.329G>A NM_000546.5(TP53_i001):p.(Arg110His)	COSM46115
2	p44	4	Q104*	Non-sens	Oui	NM_000546.5(TP53_v001):c.310C>T NM_000546.5(TP53_i001):p.(Gln104*)	COSM10886
3	p66	4	S106A fs*17	Frameshift	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.315del NM_000546.5(TP53_i001):p.(Ser106Alafs*17)	COSM46201
4	p66	5	C141*	Non-sens	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.423C>A NM_000546.5(TP53_i001):p.(Cys141*)	COSM44611
5	p18	6	Variation site d'épissage	Variation site d'épissage	Non	NG_017013.2(TP53_v004) :c.560-1G>A	COSM43753
6	p27	7	D228*	Non-sens	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.681dup NM_000546.5(TP53_i001):p.(Asp228*)	COSM69213
7	p38	8	R273H	Faux-sens	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.818G>A NM_000546.5(TP53_i001):p.(Arg273His)	COSM10660
8	p47	8	V272M	Faux-sens	Oui	NM_000546.5(TP53_v001):c.814G>A NM_000546.5(TP53_i001):p.(Val272Met)	COSM10891
9	p61	8	R273H	Faux-sens	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.818G>A NM_000546.5(TP53_i001):p.(Arg273His)	COSM10660
10	p26	8	P278L fs*67	Frameshift	Non	NM_000546.5(TP53_v001):c.833del NM_000546.5(TP53_i001):p.(Pro278Leufs*67)	COSM45178

C. Anomalies cytogénétiques

Les analyses de cytogénétique détaillées ici ont été réalisées dans le cadre de la prise en charge initiale du patient par le laboratoire de cytogénétique du CHU de Toulouse selon les recommandations de l'ISCN[38]. Le caryotype complet avant traitement est disponible pour 63 des 65 patients de la cohorte.

Les résultats montrent tout d'abord qu'un caryotype complexe est retrouvé chez 8 patients mutés pour TP53 (88,9%) contre 11 chez les patients non mutés (20,4%) ($p < 0,001$). Un caryotype monosomal est également observé chez 4 patients mutés (44,4%) contre seulement 6 chez les patients non mutés (11,1%) ($p = 0,029$).

Les anomalies du chromosome 5 sont récurrentes chez les patients mutés avec 7 patients (77,8%) contre seulement 9 pour TP53 WT (16,7%) ($p < 0,001$).

Le *Tableau XVII* présente les résultats des caryotypes en fonction du statut mutationnel de TP53.

Tableau XVII : Caractéristiques du caryotype en fonction du statut mutationnel de TP53

	TP53 mutated (n=9)	TP53 WT (n=54)	<i>p value</i>
Caryotype Complexe			
<i>Oui</i>	8	11	$p < 0,001$
<i>Non</i>	1	43	
Caryotype Monosomal			
<i>Oui</i>	4	6	$p = 0,029$
<i>Non</i>	5	48	
Del17p			
<i>Oui</i>	2	6	$p = 0,320$
<i>Non</i>	7	48	
Anomalies chromosome 5			
<i>Oui</i>	7	9	$p < 0,001$
<i>Non</i>	2	45	
Del5q			
<i>Oui</i>	4	6	$p = 0,029$
<i>Non</i>	5	48	
Anomalies chromosome 7			
<i>Oui</i>	4	13	$p = 0,236$
<i>Non</i>	5	41	

Le *Tableau XVIII* présente les résultats du caryotype des patients mutés pour TP53.

Tableau XVIII: Récapitulatif du caryotype des patients mutés pour TP53

Patient	TP53 mutation	Caryotype
P10	R110H	46,XY,del(5)(q22q32),del(7)(q11)<3>/46,sl,del(20)(q11)<6>/46,XY<11>
P44	Q104*	47,X,- Y,+1,der(3)t(3;17)(q26;q11),del(5)(q14q33),+11,der(17)del(17)(p11)t(?3;17)(q26;q11)<6>/47, sl, der(1)t(1;18)(q11;?p11),der(18)del(18)(p11)del(18)(q11)<cp9>
P65	S106A fs*17 C141*	44,XX,-5,del(7)(q21q36),-11,add(13)(p11),-18,der(19)t(18;19)(q11;q13),+r<13> / 44,idem,- 17,+mar or +del(17)(p11)<6>
P18	Variation site d'épissage	Caryotype très complexe avec remaniements des chromosomes 3,5,6,10,12,15,13,21,16,22,14,10 et 11, générant notamment un 5q- et une trisomie 3q. A noter un jumping du 21q.
P27	D228*	5,XY,add(11)(p11)hsr(11),-13,add(14)(q31) <6> 46,sl,+mar <6> / 46,sl,-add(11)(p11),+r(11)x2 <8> 49,sdl1,+9,+r(11),+mar <2>
P38	R273H	44,XY,der(3)(15qter->15q21::3p13->3q11::?:6q15->6qter),del(5)(q23q32),-6,- 15,add(18)(q12)<13>/47,sl,+22,+2mar<cp3>/46,XY<1>
P47	V272M	49,XY,der(5;17)(p10;q10),del(7)(q?21q?35),+8,-13,-18,+?19,+4 mar<5>/46,XY<1>
P61	R273H	46,XX,del(5)(q13q33)<7> / 48,sl,i(1)(p10),+i(1)(q10),+8<2> / 46,XX<11>
P26	P278L fs*67	46,XY,-2,?dup(2)(q22q32),-5,?ins(10;?)(q11;?),+11,+mar(?der2p) <10> 44,idem,-7,- 11,add(11)(p11),add(16)(q22),add(20)(p11) <4> 46,XY <6>

D. Impact des mutations de TP53

a) Caractéristiques des patients selon le statut mutationnel de TP53

L'âge médian des patients mutés TP53 est de 68,5 ans contre 74,5 ans pour les patients non mutés. On observe que la médiane de survie globale est significativement inférieure pour les patients mutés ($p=0,0909$).

Les caractéristiques des patients de la cohorte selon le statut mutationnel de TP53 sont résumées dans le *Tableau XIX*.

Tableau XIX: Caractéristiques de la cohorte selon le statut mutationnel de TP53

	TP53 mutated (n=9)	TP53 WT (n=54)	<i>p value</i>
<i>N</i>	9	56	
<i>Age médian</i>	68,5	74,5	0,2706
Sexe			
<i>Homme</i>	7	34	0,466
<i>Femme</i>	2	22	
Diagnostic selon OMS			
<i>ARS/CRDM/MDS-I/AREB-1</i>	2	17	1,000
<i>AREB-2</i>	7	39	
MDS			
<i>Primaire</i>	7	42	1,000
<i>Secondaire</i>	2	14	
Blaste médullaire			
<i>Médiane en %</i>	10 (0-18)	12 (0-18)	0,74
IPSS			
<i>Int-2</i>	6	41	0,416
<i>High</i>	3	11	
Type de réponse selon IWG 2006			
<i>Bon répondeur</i>	4	31	0,722
<i>Mauvais répondeur</i>	5	25	
Traitement par AZA			
<i>Médiane nb de cycles</i>	5 (1-26)	8 (1-69)	0,3057
Dépendance transfusionnelle¹			
<i>≥4 CGR</i>	5	23	0,483
<i><4 CGR</i>	4	33	
Médiane survie globale			
<i>OS en mois</i>	6 (0,2-30)	16 (0,5-61)	0,0909
Survie sans événement			
<i>PFS en mois</i>	12 (1-25)	13 (3-47)	0,3902
Score de Charlson			
<i>Score=0</i>	5	20	0,774
<i>Score=1-2</i>	3	26	
<i>Score>2</i>	1	7	
Score HCTCI			
<i>Score=0</i>	4	14	0,601
<i>Score=1-2</i>	3	20	
<i>Score>2</i>	2	19	

¹ Selon Itzykson[40]

b) Facteurs prédictifs de survie globale

Le suivi des patients de la cohorte a été arrêté au 15/08/14. L'analyse de survie a été réalisée jusqu'à la survenue d'un des événements d'intérêt suivants : décès, perte de vue, allogreffe et date de dernière nouvelle pour les patients vivants. Les patients allogreffés ont en effet été censurés à la date de l'allogreffe puisqu'il s'agit du seul traitement curatif modifiant l'histoire naturelle de la maladie.

A l'issue de cette période de suivi, 46 patients sont décédés (70,8%), 9 patients sont vivants (13,8%) et nous sommes sans nouvelles pour 10 patients (15,4%). La plupart des décès sont liés à la pathologie hématologique (40 patients pour 46 décès soit 87%). Dans 72,1% des cas, il existe une acutisation en LAM au moment du décès. Seulement 3 patients (7%) sont décédés à cause d'une décompensation de comorbidité.

Les causes de décès dans la cohorte sont résumées dans le *Tableau XX*.

Tableau XX: Causes de décès des patients (n=65)

	Nombre de patients (n) ou médiane	Pourcentage ou intervalle
Statut aux dernières nouvelles		
<i>Vivants</i>	9	13,8
<i>Décédés</i>	46	69,2
<i>Perdu de vue</i>	11	16,9
Cause de décès (46 patients)		
<i>Infection</i>	27	58,7
<i>Hémorragie</i>	4	8,7
<i>Transformation/Progression</i>	9	19,6
<i>Comorbidité</i>	3	6,5
<i>GVH</i>	2	4,3
<i>Inconnu</i>	1	2,2

La survie médiane de l'ensemble des patients est de 15,4 mois [0,2-61,1].

En analyse univariée, les variables pronostiques associées à une moins bonne survie au risque de 20% sont le sexe (homme) ($p=0,17$), la présence de blastes circulants ($p<0,0001$), le taux de plaquettes $<100\text{G/L}$ ($p=0,024$), la présence d'un caryotype complexe ($p=0,0038$), un SMD secondaire ($p=0,083$), le type de réponse ($p=0,0006$) et enfin la présence d'une mutation de TP53 ($p=0,0035$)

En analyse multivariée, les facteurs indépendants prédictifs de moins bonne survie sont la présence de blastes circulants ($\text{HR}=6,57$ [2,80-15,42] ; $p<0,0001$) et d'une mutation de TP53 ($\text{HR}=5,79$ [2,23-15,06] ; $p<0,0001$). Un taux de plaquettes $\geq 100\text{G/L}$ ($\text{HR}=0,26$ [0,11-0,61] ; $p=0,002$) et

l'obtention d'une réponse au traitement chez le patient (HR=0,32 [0,15-0,72] ; p=0,006) est prédictif d'une meilleure survie.

Les résultats statistiques des facteurs prédictifs de survie globale sont présentés dans le *Tableau XXI*.

Tableau XXI: Facteurs prédictifs de survie globale

Cohorte entière (n=65)				
	Analyse univariée		Analyse multivariée (n=56)	
	<i>Survie médiane (jours)</i>	<i>p value</i>	<i>HR [IC95%]</i>	<i>p value</i>
Age				
>70 ans	573	0,58		0,057
≤70 ans	502			
Sexe				
Homme	502	0,17		>0,1
Femme	573			
Blastes circulants				
Oui	282	<0,0001	6,57 [2,80-15,42]	<0,0001
Non	928	***		
Plaquettes				
≥100 G/L	942	0,024	0,26 [0,11-0,61]	0,002
<100G/L	502	*		
Dépendance transfusionnelle¹				
Oui	502	0,51		>0,1
Non	561			
Caryotype complexe				
Oui	282	0,0038		0,083
Non	573	**		
SMD I ou II				
Oui	435	0,083		>0,1
Non	614			
Type de réponse				
Mauvais répondeur	282	0,0006	0,32 [0,15-0,72]	0,006
Bon répondeur	614	**		
Mutation TP53				
Oui	173	0,0035	5,79 [2,23-15,06]	<0,0001
Non	564			
Score HCTCI				
Score=0	935	0,30		0,099
Score=1-2	564			
Score>2	397			

¹ Selon Itzykson[40]

La Figure 24 et 25 présente respectivement les courbes de Kaplan-Meier des facteurs prédictifs indépendants de survie globale et de survie sans progression.

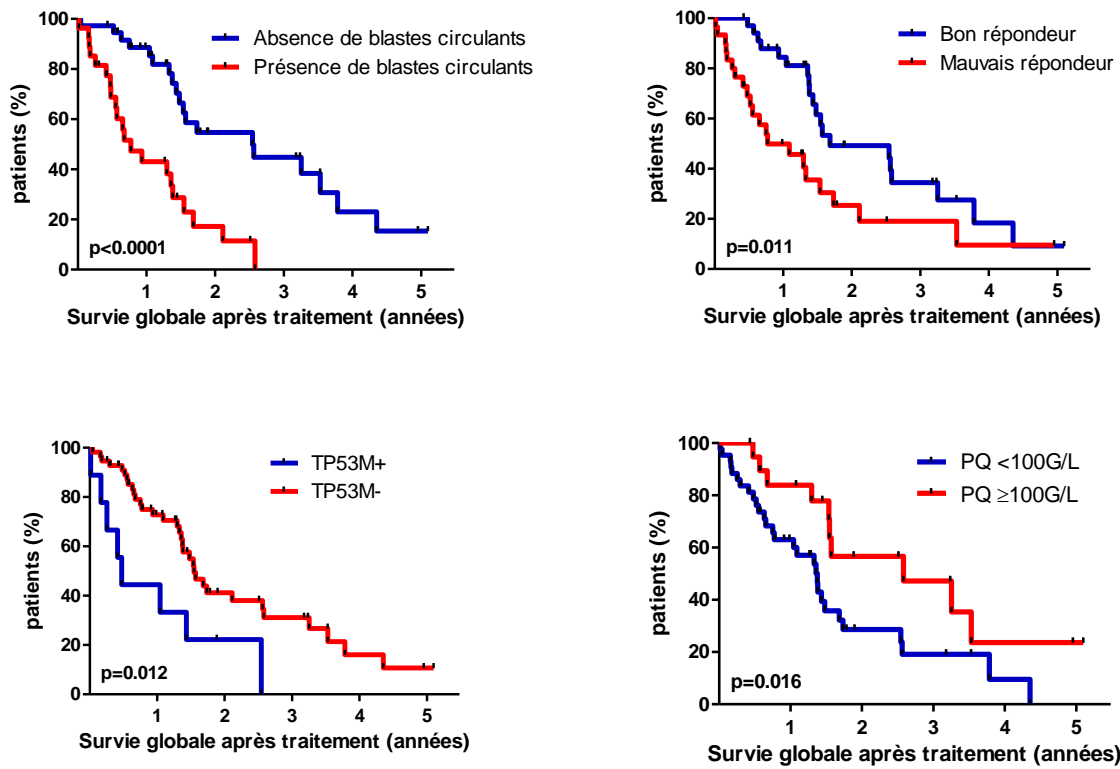


Figure 24 : Facteurs prédictifs indépendants de survie globale

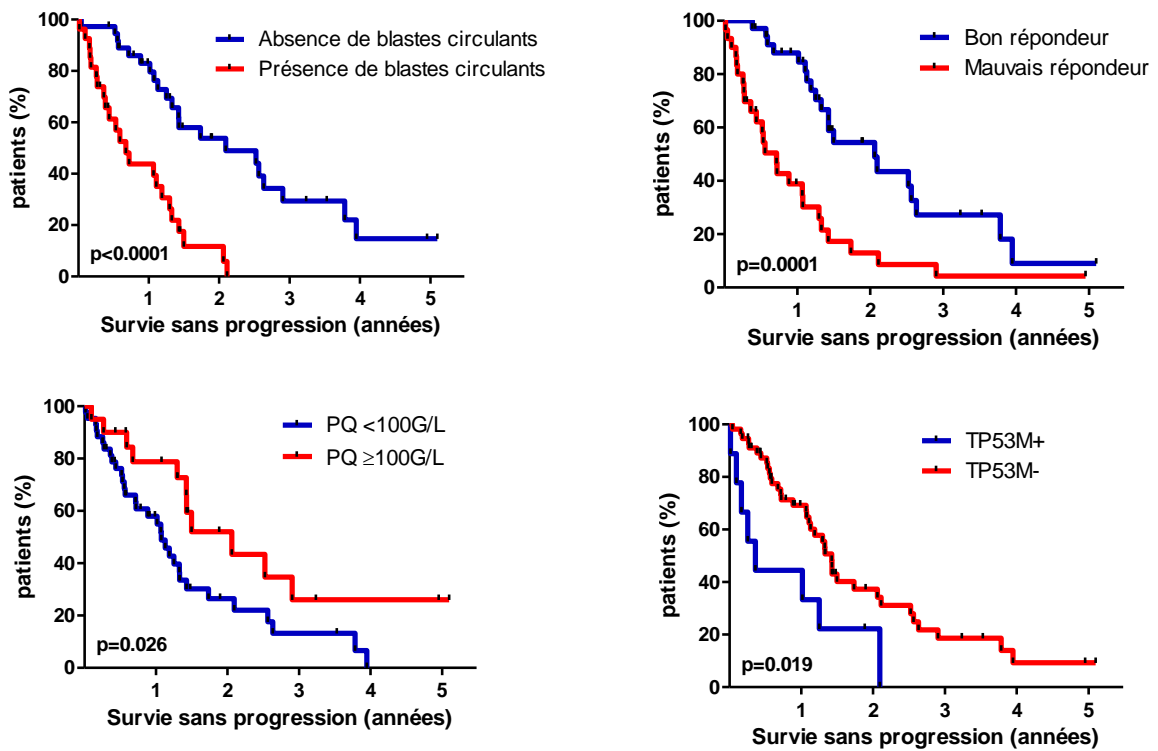


Figure 25: Facteurs prédictifs indépendants de survie sans progression

La Figure 26 présente la survie globale des patients selon le score IPSS et IPSS-R.

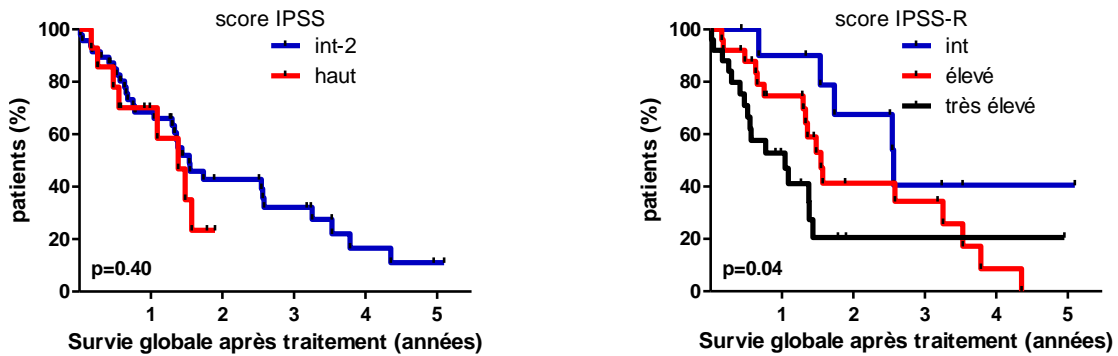


Figure 26: Survie globale selon le score IPSS et IPSS-R

c) Réponse au traitement par agent hypométhylant

En termes de réponse au traitement, nous avons observé 35 patients répondeurs (53,8%) selon les critères préalablement définis avec 14 RC (21,5%), 1 RP (1,5%), 8 RMC (12,3%) dont 1 avec amélioration hématologique (sans obtention des conditions de RC), 11 patients SD avec HI (17%) et un patient sans évaluation médullaire mais avec HI (1,5%). Pour les 30 patients considérés non répondeurs (46,2%), 20 patients sont en échec (30,8%), 7 SD sans HI (10,8%) et 3 en progression (4,6%).

En analyse univariée, les variables associées à une meilleure réponse au traitement au risque 20% sont l'âge en début de traitement ≤ 70 ans ($p=0,089$), l'absence de blastes circulants ($p=0,084$), le caractère primaire du SMD ($p=0,046$) et le score HCTCI ($p=0,19$).

En analyse multivariée, l'unique facteur indépendant prédictif d'une meilleure réponse au traitement par AZA au risque 5% est le caractère primaire du SMD (OR=0,21 [0,047-0,91] ; $p=0,037$).

Les résultats statistiques des facteurs prédictifs de réponse au traitement sont présentés dans leur ensemble dans le *Tableau XXII*.

Tableau XXII: Facteurs prédictifs de réponse au traitement

Cohorte entière (n=65)					
	Analyse univariée			Analyse multivariée (n=56)	
	Répondeur	Non Répondeur	p value	OR	p value
Age					
>70 ans	21	20	0,089		>0,1
≤70 ans	14	10			
Sexe					
Homme	24	17	0,44		0,089
Femme	11	13			
Blastes circulants					
Oui	11	16	0,084		0,093
Non	24	14			
Plaquettes					
≥100 G/L	13	7	0,28		>0,1
<100G/L	21	22			
Dépendance transfusionnelle¹					
Oui	13	15	0,33		>0,1
Non	22	15			
Caryotype complexe					
Oui	8	11	0,41		>0,1
Non	25	19			
SMD I ou II					
Primaire	30	19	0,046	0,21 [0,047-0,91]	0,037
Secondaire	5	11	*		
Mutation TP53					
Oui	4	5	0,72		>0,1
Non	31	25			
Score HCTCI					
Score=0	11	7	0,19		>0,1
Score=1-2	9	4			
Score>2	13	18			

¹ Selon Itzykson[40]

IV. Discussion

Notre étude a permis d'évaluer l'impact pronostique et la réponse au traitement des mutations de TP53 dans une population homogène de patients atteints de SMD de haut risque ($\geq 1,5$) et traités par AZA.

A. Méthode de screening

Il existe de nombreuses méthodes employées pour la détection des mutations de TP53 telles que la chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante (DHPLC ou SSCA) ou encore le clonage de l'ADNc issu de l'échantillon tumoral dans des cellules de levures modifiées. La méthode HRM a été choisie tout d'abord parce qu'il s'agit d'une technique simple, rapide et peu coûteuse à mettre en œuvre. Elle nous a permis de réaliser un screening rapide de l'ensemble de nos patients avant de confirmer la présence de la mutation par séquençage. La méthodologie ainsi que le design des amorces pour l'ensemble des exons étudiés sont parfaitement décrits et validés dans la littérature[120][121]. Les recommandations ont été suivies avec notamment la mise en œuvre sur chacune de nos manipulations d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif.

De plus, selon Krypuy *et al.*, il s'agit d'une technique dont le seuil de détection a été validé pour chaque exon jusqu'à 5% de séquences mutées dans un échantillon. Dans ce même article, la méthode HRM a été confrontée à une méthode classique de séquençage. Elle a montré une très bonne sensibilité et spécificité [121].

Cependant, dans notre travail, la recherche des mutations de TP53 a été réalisée sur les exons 4 à 8. Les exons 9 et 10 n'ont pas été étudiés en raison d'un taux de mutations très faible selon la littérature[94][95][113]. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité qu'un de nos patients WT soit muté sur ces exons.

Enfin, il est difficile avec cette méthode de connaître parfaitement le retentissement de la mutation sur l'activité transcriptionnelle de TP53. Cependant la majorité des mutations retrouvées chez nos patients (80%) se situent sur le domaine de liaison à l'ADN (exon 5 à 8) ce qui suggère une altération importante des fonctions de TP53 [96].

B. Mutations de TP53 et anomalies cytogénétiques

Dans notre cohorte, nous retrouvons une prévalence de mutations de TP53 de 13,8%. Ce résultat est légèrement supérieur à ce qui est décrit dans les études où la prévalence est plutôt comprise entre 5 et 10% dans le cas où seuls les SMD sont pris en compte[95][110]. Cette prévalence monte à 37,1% dans l'étude de Bally et al. où les patients atteints de LAM pauciblastiques sont inclus[55]. Etant donné que notre cohorte se compose de SMD de haut risque uniquement, on peut comprendre que la prévalence soit légèrement plus élevée car il s'agit de patients dont l'histoire naturelle de la maladie est plus avancée.

Les résultats de cytogénétique montrent tout d'abord qu'un caryotype complexe est retrouvé chez 8 patients mutés pour TP53 (88,9%) contre 11 chez les patients non mutés (20,4%) ($p < 0,001$). Ces résultats confirment l'association fréquente d'un caryotype complexe chez les patients mutés pour TP53 comme indiqué dans la littérature[94][122]. Dans nos résultats, il n'y a pas d'association avec un caryotype monosomal.

Des anomalies du chromosome 5 sont fréquemment associées à des altérations du gène TP53 d'après les données de littérature[94]. Nous avons une anomalie chez 7 (77,8%) patients mutés pour TP53 contre 9 (16,7%) patients non mutés. Seules les anomalies sur le chromosome 5 sont fortement associées à une mutation de TP53 dans notre étude ($p < 0,001$). De plus, la Del5q paraît significativement associée au statut mutationnel de TP53 ($p = 0,029$). Ce résultat était attendu puisque dans le cas des syndromes 5q-, les anomalies de TP53 sont plus fréquemment retrouvées[94][122]. Ces patients présentent par ailleurs un taux de réponse plus faible au lénalidomide ainsi qu'une survie sans événement plus faible[112].

Enfin, il est à noter que dans 22,2% des cas, la mutation de TP53 est associée à une Del 17p ce qui est inférieur à ce qui est décrit dans la littérature. Celle-ci rapporte une association jusqu'à 50% mais dans le cadre des LAM et des SMD[94][95][111][122]. Ces résultats peuvent s'expliquer par la sélection des patients : SMD de haut risque uniquement. Ces éléments pourraient confirmer que l'inactivation mono-allélique de TP53 favorise l'émergence d'un clone avec inactivation bi-allélique de TP53.

C. Mutations de TP53 et impact pronostique

La survie médiane globale de notre cohorte traitée par AZA est de 15,4 mois ce qui est quasi identique à l'étude d'Itzykson *et al.* menée chez 282 patients d'âge médian ou l'on retrouve une médiane de 13,5 mois[40]. Ce résultat est confirmé dans l'étude récente de Bally *et al.* Dans laquelle il est retrouvé une médiane de survie globale de 15,6 mois chez 62 patients d'âge médian de 71 ans[55]. Ce résultat est par contre inférieur à celui observé dans l'étude AZA-001 qui retrouve une survie de 24,5 mois dans le bras azacitidine[49]. Cette différence s'explique par l'inclusion de patients plus âgés (âge médian de 73,7 ans versus 69 ans dans AZA-001) ainsi que par une fréquence accrue de patients ayant une cytogénétique défavorable (47,7% dans notre cohorte contre 28% dans AZA-001). La différence de survie ne peut être attribuée aux modalités de traitement car pour les quatre études le nombre médian de cycles est similaire avec 6 cycles (Itzykson *et al.*), 8 cycles (notre étude et Bally *et al.*) et 9 cycles (AZA-001).

Dans notre travail, les facteurs indépendants prédictifs de moins bonne survie sont la présence de blastes circulants et d'une mutation de TP53. Un taux de plaquettes $\geq 100\text{G/L}$ et l'obtention d'une réponse au traitement sont prédictifs d'une meilleure survie globale. En revanche la dépendance transfusionnelle et le risque cytogénétique selon IPSS ne sont pas des facteurs prédictifs dans notre étude contrairement à celle de Itzykson *et al.*[40]. Par contre, l'étude de Bally *et al.* retrouve également en analyse multivariée que le statut mutationnel de TP53 est un facteur prédictif indépendant de moins bonne survie ($p=0,005$)[55].

Si l'on regarde les causes de décès chez nos patients, celles-ci sont majoritairement dues à la maladie hématologique. Seulement 3 de nos patients dont un muté sont décédés d'une décompensation en lien avec une comorbidité. Il s'agissait en l'occurrence d'un trouble du rythme cardiaque. Il a été démontré que dans le cas de SMD de haut risque la cause de décès est principalement liée à la maladie hématologique[123]. Par ailleurs, l'évaluation des comorbidités dans notre cohorte avec le score de Charlson ou bien le score HCTCI ne montre pas de différence significative entre le groupe non muté pour TP53 et le groupe muté.

Les résultats de notre travail montrent que le statut mutationnel de TP53 constitue, avec la présence de blastes circulants, un facteur prédictif indépendant péjoratif de survie globale. Le risque cytogénétique n'apparaît plus comme un facteur prédictif prépondérant dans le cas où les patients sont traités par AZA.

Enfin TP53 apparaît également comme un facteur prédictif péjoratif de survie sans progression ($p=0,019$).

D. Mutations de TP53 et réponse au traitement

La réponse globale au traitement (RC, RP, RMC et HI) dans notre travail est de 53,8%. Ce résultat est comparable aux autres études avec respectivement 43% dans l'étude de Itzykson *et al.*, 48% dans l'étude de Bally *et al.* et 29% de réponses médullaires associées à 49% de réponses hématologiques dans l'étude AZA-001.

Il n'a pas été démontré à l'heure actuelle que les mutations de TP53 auraient un impact sur la réponse à un traitement par AZA[55][95][110]. Notre étude confirme ces données bibliographiques ce qui suggère que le mécanisme d'action de l'AZA est indépendant de cette voie. Par ailleurs, il a été démontré que les mutations de p53 étaient associées à une moins bonne réponse chez les patients porteurs d'un 5q- traités par lénalidomide [94] et chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique traités par rituximab et chlorambucil[91].

Kulasekararaj *et al.* a mis en évidence que la réponse au traitement des patients mutés pour TP53 était significativement plus courte quel que soit le type de réponse[95]. Cet élément n'a pas été relevé dans notre travail. Etant donné que les patients mutés sont souvent associés à des caryotypes complexes, on peut supposer que ces nombreuses altérations génomiques favorisent l'évolution vers une LAM et donc une réponse plus courte au traitement.

Enfin une autre étude récente a montré que l'AZA n'était pas capable d'éliminer le contingent résiduel de cellules souches malignes[125]. L'association avec d'autres thérapeutiques ciblant ce contingent pourrait permettre de prolonger la réponse à ce traitement.

V. Conclusion

Durant ces dernières années, le nombre de patients atteints par un SMD a considérablement augmenté. De nombreux scores ont été développés afin de stratifier le risque chez les patients et ainsi de leur proposer la stratégie thérapeutique la plus adaptée. La possibilité pour le clinicien d'avoir à sa disposition de nouveaux outils lui permettant de prédire la réponse au traitement est un enjeu important durant les prochaines années afin de minimiser les échecs au traitement.

Dans ce travail, nous avons montré que les altérations de TP53 constituaient un facteur pronostique indépendant péjoratif de survie globale chez les patients atteints de SMD de haut risque (IPSS \geq 1,5) traités par AZA. Aucune relation n'a cependant été établie avec la réponse au traitement.

A l'heure actuelle de très nombreuses mutations touchant les SMD ont été décrites dont certaines auraient un impact sur la réponse au traitement, par exemple TET2. Il serait ainsi intéressant de réaliser un screening plus large des altérations moléculaires afin de dégager des profils mutationnels précis permettant de prédire le pronostic et la réponse au traitement des patients. La disponibilité prochaine de technologie de séquençage massive (puce à ADN) pour un coût raisonnable permettrait l'intégration de ces analyses dans le bilan pré-thérapeutique des patients afin de guider au mieux le clinicien dans sa prise en charge.

Table des illustrations

Figure 1 : Physiopathologie des syndromes myélodysplasiques	10
Figure 2 : Anomalies morphologiques observées au cours des SMD selon la lignée.....	17
Figure 3 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de faible risque (IPSS faible ou intermédiaire I) selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies	32
Figure 4 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de haut risque (IPSS élevé ou intermédiaire II) en dehors de l'allogreffe selon le GFM	33
Figure 5 : Structure des analogues nucléosiques de cytidine	34
Figure 6 : Transport membranaire et métabolisme intra cellulaire.....	35
Figure 7 : Mécanisme d'inhibition de l'ADN méthyl-transférase (DNMT)	36
Figure 8 : Structure du gène TP53	39
Figure 9 : Structure de la protéine TP53	40
Figure 10 : Modifications post-traductionnelles au niveau des différents domaines de TP53	41
Figure 11 : Régulation de TP53.....	43
Figure 12 : Voie apoptotique intrinsèque selon Amaral et al.	45
Figure 13 : Fréquences en pourcentage des mutations de TP53 par type de cancer selon Olivier et al.....	47
Figure 14 : Fréquences des substitutions de bases selon les différents codons du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013).....	49
Figure 15 : Distribution des mutations selon les Exon/Intron du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013).....	49
Figure 16 : Effets des mutations du gène de TP53. Données issues de l'IARC TP53 database, version R17 (Novembre 2013).....	50
Figure 17 : Principe de la technique HRM.	65
Figure 18 : Analyse des courbes de fusion en HRM sur LIGHTCycler 480	69
Figure 19 : Analyse des courbes de fusion en HRM sur LIGHTCycler 480 « difference plot » .	69
Figure 20 : Exemple d'un électrophorégramme avec une mutation ponctuelle hétérozygote	70
Figure 21 : Répartition des catégories de SMD selon l'OMS au diagnostic	72
Figure 22 : Répartition des catégories de SMD selon l'OMS au début du traitement par agents hypométhylants.....	73
Figure 23 : Incidence des mutations de TP53 en fonction de l'exon étudié	77
Figure 24 : Facteurs prédictifs indépendants de survie globale.....	86
Figure 25 : Facteurs prédictifs indépendants de survie sans progression	86
Figure 26 : Survie globale selon le score IPSS et IPSS-R	87

Table des tableaux

Tableau I : Etiologie des SMD secondaires.....	9
Tableau II : Analyses biologiques recommandées pour le diagnostic des SMD primaires	15
Tableau III : Eléments pronostiques selon les anomalies cytogénétiques du score IPSS-R.....	19
Tableau IV : Caractéristiques sanguines et médullaires dans les SMD selon la classification OMS 2008	21
Tableau V : Score clinique IPSS	23
Tableau VI : Groupes pronostiques du score IPSS	23
Tableau VII : Score clinique IPSS-R.....	24
Tableau VIII : Score clinique WPSS.....	25
Tableau IX : Groupes pronostiques du score WPSS.....	25
Tableau X : Critères de réponses du traitement des SMD selon l'International Working Group 2006.....	27
Tableau XI : Critères de réponses de l'amélioration hématologique au cours du traitement des SMD selon l'International Working Group 2006.....	29
Tableau XII : Mutations récurrentes des gènes somatiques dans les SMD	53
Tableau XIII : Principales études sur l'impact des mutations de TP53 sur la survie globale ...	58
Tableau XIV : Tableau descriptif récapitulatif de la cohorte entière (n=65).....	74
Tableau XV : Description des caractéristiques du traitement et de la réponse sous AZA selon les critères IWG 2006 (n=65)	76
Tableau XVI : Résultats de la recherche de mutations de TP53 sur la cohorte entière.....	78
Tableau XVII : Caractéristiques du caryotype en fonction du statut mutationnel de TP53	79
Tableau XVIII : récapitulatif du caryotype des patients mutés pour TP53	80
Tableau XIX : Caractéristiques de la cohorte selon le statut mutationnel de TP53.....	82
Tableau XX : Causes de décès des patients (n=65)	83
Tableau XXI : Facteurs prédictifs de survie globale	85
Tableau XXII : Facteurs prédictifs de réponse au traitement	88

Bibliographie

- [1] L. Adès, R. Itzykson, et P. Fenaux, « Myelodysplastic syndromes », *The Lancet*, vol. 383, p. 2239-2252, mars 2014.
- [2] L. Ades, M. Fontenay, S. Raynaud, V. Eclache, C. Rose, C. Gardin, A. Guerci-Bresler, B. Varet, J. Cahn, E. Gyan, L. Bardiaux, G. Socié, E. Raffoux, O. Beyne-Rauzy, et P. Fenaux, « Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD): Diagnostic, Classifications, Traitement ». Groupe Francophone des Myélodysplasies, juill-2008.
- [3] X. Troussard, M. Malet, V. Duchenet, D. Mouchel, S. Chéze, et A. Collignon, « Épidémiologie des syndromes myélodysplasiques (SMD) et des syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs (SMD/SMP): Expérience du Registre régional des hémopathies malignes de Basse-Normandie », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2009, n° 413, p. 25-29, juin 2009.
- [4] H. Tong, C. Hu, X. Yin, M. Yu, J. Yang, et J. Jin, « A Meta-Analysis of the Relationship between Cigarette Smoking and Incidence of Myelodysplastic Syndromes », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, p. e67537, 2013.
- [5] A. Raza et N. Galili, « The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, n° 12, p. 849-859, déc. 2012.
- [6] M. J. Walter, D. Shen, L. Ding, J. Shao, D. C. Koboldt, K. Chen, D. E. Larson, M. D. McLellan, D. Dooling, R. Abbott, R. Fulton, V. Magrini, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, M. O'Laughlin, X. Fan, M. Grillo, S. Witowski, S. Heath, J. L. Frater, W. Eades, M. Tomasson, P. Westervelt, J. F. DiPersio, D. C. Link, E. R. Mardis, T. J. Ley, R. K. Wilson, et T. A. Graubert, « Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 12, p. 1090-1098, mars 2012.
- [7] J. E. Parker, G. J. Mufti, F. Rasool, A. Mijovic, S. Devereux, et A. Pagliuca, « The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS », *Blood*, vol. 96, n° 12, p. 3932-3938, déc. 2000.
- [8] D. Y. Zang, R. G. Goodwin, M. R. Loken, E. Bryant, et H. J. Deeg, « Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis », *Blood*, vol. 98, n° 10, p. 3058-3065, nov. 2001.
- [9] R. Bejar, K. E. Stevenson, B. A. Caughey, O. Abdel-Wahab, D. P. Steensma, N. Galili, A. Raza, H. Kantarjian, R. L. Levine, D. Neuberg, G. Garcia-Manero, et B. L. Ebert, « Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 27, p. 3376-3382, sept. 2012.
- [10] Y. Jiang, A. Dunbar, L. P. Gondek, S. Mohan, M. Rataul, C. O'Keefe, M. Sekeres, Y. Sauntharajah, et J. P. Maciejewski, « Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML », *Blood*, vol. 113, n° 6, p. 1315-1325, févr. 2009.
- [11] J.-P. J. Issa, « The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease », *Blood*, vol. 121, n° 19, p. 3811-3817, mai 2013.
- [12] K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.-K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koeffler, L.-Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, et S. Ogawa, « Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia », *Nature*, vol. 478, n° 7367, p. 64-69, oct. 2011.
- [13] H. Khan, C. Vale, T. Bhagat, et A. Verma, « Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes », *Semin. Hematol.*, vol. 50, n° 1, p. 16-37, janv. 2013.
- [14] M. H. G. P. Raaijmakers, S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merckenschlager, C. Lin, J. M. Rommens, et D. T. Scadden, « Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia », *Nature*, vol. 464, n° 7290, p. 852-857, avr. 2010.

- [15] S. Y. Kordasti, B. Afzali, Z. Lim, W. Ingram, J. Hayden, L. Barber, K. Matthews, R. Chelliah, B. Guinn, G. Lombardi, F. Farzaneh, et G. J. Mufti, « IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome », *Br. J. Haematol.*, vol. 145, n° 1, p. 64-72, avr. 2009.
- [16] S. Y. Kordasti, W. Ingram, J. Hayden, D. Darling, L. Barber, B. Afzali, G. Lombardi, M. W. Wlodarski, J. P. Maciejewski, F. Farzaneh, et G. J. Mufti, « CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS) », *Blood*, vol. 110, n° 3, p. 847-850, août 2007.
- [17] S. Berthier, N. Magy, H. Gil, M. Becker Schneider, D. A. Vuitton, et J. L. Dupond, « Myélodysplasies et maladies systémiques. Une association non fortuite », *Rev. Médecine Interne*, vol. 22, n° 5, p. 428-432, mai 2001.
- [18] L. Malcovati, E. Hellström-Lindberg, D. Bowen, L. Adès, J. Cermak, C. Del Cañizo, M. G. Della Porta, P. Fenaux, N. Gattermann, U. Germing, J. H. Jansen, M. Mittelman, G. Mufti, U. Platzbecker, G. F. Sanz, D. Selleslag, M. Skov-Holm, R. Stauder, A. Symeonidis, A. A. van de Loosdrecht, T. de Witte, M. Cazzola, et European Leukemia Net, « Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet », *Blood*, vol. 122, n° 17, p. 2943-2964, oct. 2013.
- [19] S. Swerdlow, « The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications ». 2008.
- [20] M. G. Della Porta, E. Travaglino, E. Boveri, M. Ponzoni, L. Malcovati, E. Papaemmanuil, G. M. Rigolin, C. Pascutto, G. Croci, U. Gianelli, R. Milani, I. Ambaglio, C. Elena, M. Ubezio, M. C. Da Via', E. Bono, D. Pietra, F. Quaglia, R. Bastia, V. Ferretti, A. Cuneo, E. Morra, P. J. Campbell, A. Orazi, R. Invernizzi, et M. Cazzola, « Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes », *Leukemia*, mai 2014.
- [21] P. Greenberg, C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti, et J. Bennett, « International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 89, n° 6, p. 2079-2088, mars 1997.
- [22] P. L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Solé, J. M. Bennett, D. Bowen, P. Fenaux, F. Dreyfus, H. Kantarjian, A. Kuendgen, A. Levis, L. Malcovati, M. Cazzola, J. Cermak, C. Fonatsch, M. M. Le Beau, M. L. Slovak, O. Krieger, M. Luebbert, J. Maciejewski, S. M. Magalhaes, Y. Miyazaki, M. Pfeilstöcker, M. Sekeres, W. R. Sperr, R. Stauder, S. Tauro, P. Valent, T. Vallespi, A. A. van de Loosdrecht, U. Germing, et D. Haase, « Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 120, n° 12, p. 2454-2465, sept. 2012.
- [23] G. J. Mufti, J. M. Bennett, J. Goasguen, B. J. Bain, I. Baumann, R. Brunning, M. Cazzola, P. Fenaux, U. Germing, E. Hellström-Lindberg, I. Jinnai, A. Manabe, A. Matsuda, C. M. Niemeyer, G. Sanz, M. Tomonaga, T. Vallespi, A. Yoshimi, et International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome, « Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts », *Haematologica*, vol. 93, n° 11, p. 1712-1717, nov. 2008.
- [24] M. Cazzola, M. G. Della Porta, et L. Malcovati, « The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance », *Blood*, vol. 122, n° 25, p. 4021-4034, déc. 2013.
- [25] D. Haase, U. Germing, J. Schanz, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, B. Hildebrandt, A. Kundgen, M. Lübbert, R. Kunzmann, A. A. N. Giagounidis, C. Aul, L. Trümper, O. Krieger, R. Stauder, T. H. Müller, F. Wimazal, P. Valent, C. Fonatsch, et C. Steidl, « New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients », *Blood*, vol. 110, n° 13, p. 4385-4395, déc. 2007.
- [26] J. S. D. Haase, « 12 Updated cytogenetic risk features in MDS – present state », *Leuk. Res. - LEUK RES*, vol. 33, 2009.

- [27] D. P. Steensma, « The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? », *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, p. 645-655, 2009.
- [28] P. Valent, H.-P. Horny, J. M. Bennett, C. Fonatsch, U. Germing, P. Greenberg, T. Haferlach, D. Haase, H.-J. Kolb, O. Krieger, M. Loken, A. van de Loosdrecht, K. Ogata, A. Orfao, M. Pfeilstöcker, B. Rüter, W. R. Sperr, R. Stauder, et D. A. Wells, « Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference », *Leuk. Res.*, vol. 31, n° 6, p. 727-736, juin 2007.
- [29] J. Vardiman, « The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond », *Leuk. Res.*, vol. 36, n° 12, p. 1453-1458, déc. 2012.
- [30] R. Bejar, « Prognostic models in myelodysplastic syndromes », *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2013, p. 504-510, 2013.
- [31] P. Greenberg, C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti, et J. Bennett, « International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 89, n° 6, p. 2079-2088, mars 1997.
- [32] L. Malcovati, M. G. Della Porta, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, K. Nachtkamp, E. Travaglino, R. Invernizzi, C. Pascutto, M. Lazzarino, U. Germing, et M. Cazzola, « Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) », *Haematologica*, vol. 96, n° 10, p. 1433-1440, oct. 2011.
- [33] L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, M. G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, A. Giagounidis, B. Hildebrandt, P. Bernasconi, S. Knipp, C. Strupp, M. Lazzarino, C. Aul, et M. Cazzola, « Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 25, n° 23, p. 3503-3510, août 2007.
- [34] G. Garcia-Manero, J. Shan, S. Faderl, J. Cortes, F. Ravandi, G. Borthakur, W. G. Wierda, S. Pierce, E. Estey, J. Liu, X. Huang, et H. Kantarjian, « A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome », *Leukemia*, vol. 22, n° 3, p. 538-543, mars 2008.
- [35] H. Kantarjian, S. O'Brien, F. Ravandi, J. Cortes, J. Shan, J. M. Bennett, A. List, P. Fenaux, G. Sanz, J.-P. Issa, E. J. Freireich, et G. Garcia-Manero, « Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System », *Cancer*, vol. 113, n° 6, p. 1351-1361, sept. 2008.
- [36] B. D. Cheson, J. M. Bennett, H. Kantarjian, A. Pinto, C. A. Schiffer, S. D. Nimer, B. Löwenberg, M. Beran, T. M. de Witte, R. M. Stone, M. Mittelman, G. F. Sanz, P. W. Wijermans, S. Gore, P. L. Greenberg, et World Health Organization(WHO) international working group, « Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 96, n° 12, p. 3671-3674, déc. 2000.
- [37] B. D. Cheson, P. L. Greenberg, J. M. Bennett, B. Löwenberg, P. W. Wijermans, S. D. Nimer, A. Pinto, M. Beran, T. M. de Witte, R. M. Stone, M. Mittelman, G. F. Sanz, S. D. Gore, C. A. Schiffer, et H. Kantarjian, « Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia », *Blood*, vol. 108, n° 2, p. 419-425, juill. 2006.
- [38] J. Schanz, H. Tüchler, F. Solé, M. Mallo, E. Luño, J. Cervera, I. Granada, B. Hildebrandt, M. L. Slovak, K. Ohyashiki, C. Steidl, C. Fonatsch, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, P. Valent, A. Giagounidis, C. Aul, M. Lübbert, R. Stauder, O. Krieger, G. Garcia-Manero, S. Faderl, S. Pierce, M. M. Le Beau, J. M. Bennett, P. Greenberg, U. Germing, et D. Haase, « New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 8, p. 820-829, mars 2012.

- [39] A. B. Kornblith, J. E. Herndon 2nd, L. R. Silverman, E. P. Demakos, R. Odchimar-Reissig, J. F. Holland, B. L. Powell, C. DeCastro, J. Ellerton, R. A. Larson, C. A. Schiffer, et J. C. Holland, « Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 10, p. 2441-2452, mai 2002.
- [40] R. Itzykson, S. Thépot, B. Quesnel, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, P. Turlure, N. Vey, C. Recher, C. Dartigeas, L. Legros, J. Delaunay, C. Salanoubat, S. Visanica, A. Stamatoullas, F. Isnard, A. Marfaing-Koka, S. de Botton, Y. Chelghoum, A.-L. Taksin, I. Plantier, S. Ame, S. Boehrer, C. Gardin, C. L. Beach, L. Adès, P. Fenaux, et on behalf of the G. F. des M. (gfm), « Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine », *Blood*, vol. 117, n° 2, p. 403-411, janv. 2011.
- [41] U. Wedding, B. Röhrig, A. Klippstein, L. Pientka, et K. Höffken, « Age, severe comorbidity and functional impairment independently contribute to poor survival in cancer patients », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 133, n° 12, p. 945-950, déc. 2007.
- [42] M. Extermann, « Measurement and impact of comorbidity in older cancer patients », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 35, n° 3, p. 181-200, sept. 2000.
- [43] M. L. Sorrow, M. B. Maris, R. Storb, F. Baron, B. M. Sandmaier, D. G. Maloney, et B. Storer, « Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT », *Blood*, vol. 106, n° 8, p. 2912-2919, oct. 2005.
- [44] E. Zipperer, D. Pelz, K. Nachtkamp, A. Kuendgen, C. Strupp, N. Gattermann, R. Haas, et U. Germing, « The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome », *Haematologica*, vol. 94, n° 5, p. 729-732, mai 2009.
- [45] M. G. Della Porta, L. Malcovati, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, E. Zipperer, E. Travaglino, R. Invernizzi, C. Pascutto, M. Lazzarino, U. Germing, et M. Cazzola, « Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome », *Haematologica*, vol. 96, n° 3, p. 441-449, mars 2011.
- [46] D. Brechemier, « Impact des comorbidités sur le pronostic des patients âgés de plus de 75 ans traités par azacitidine pour myélodysplasie de haut risque ou leucémie aiguë myéloblastique », UPS Toulouse III, 2014.
- [47] C. Stresemann et F. Lyko, « Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine », *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 123, n° 1, p. 8-13, juill. 2008.
- [48] L. R. Silverman, E. P. Demakos, B. L. Peterson, A. B. Kornblith, J. C. Holland, R. Odchimar-Reissig, R. M. Stone, D. Nelson, B. L. Powell, C. M. DeCastro, J. Ellerton, R. A. Larson, C. A. Schiffer, et J. F. Holland, « Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 10, p. 2429-2440, mai 2002.
- [49] P. Fenaux, G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, R. Schoch, N. Gattermann, G. Sanz, A. List, S. D. Gore, J. F. Seymour, J. M. Bennett, J. Byrd, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. Beach, L. R. Silverman, et International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group, « Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study », *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 3, p. 223-232, mars 2009.
- [50] H. Kantarjian, J.-P. J. Issa, C. S. Rosenfeld, J. M. Bennett, M. Albitar, J. DiPersio, V. Klimek, J. Slack, C. de Castro, F. Ravandi, R. Helmer 3rd, L. Shen, S. D. Nimer, R. Leavitt, A. Raza, et H. Saba, « Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study », *Cancer*, vol. 106, n° 8, p. 1794-1803, avr. 2006.
- [51] H. Kantarjian, Y. Oki, G. Garcia-Manero, X. Huang, S. O'Brien, J. Cortes, S. Faderl, C. Bueso-Ramos, F. Ravandi, Z. Estrov, A. Ferrajoli, W. Wierda, J. Shan, J. Davis, F. Giles, H. I. Saba, et J.-P. J. Issa, « Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk

- myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia », *Blood*, vol. 109, n° 1, p. 52-57, janv. 2007.
- [52] A. Guerci-Bresler, L. Ades, E. Gyan, M. Mohty, L. Legros, F. Isnard, S. Ame, A. Stamatoullas, B. Quesnel, C. Rose, O. Beyne-Rauzy, C. Recher, N. Vey, F. Dreyfus, et P. Fenaux, « Recommandations pour l'utilisation de l'azacitidine dans le traitement des syndromes myélodysplasiques de risque intermédiaire-2 ou élevé ». Groupe Francophone des Myélodysplasies, févr-2010.
- [53] L. R. Silverman, D. R. McKenzie, B. L. Peterson, J. F. Holland, J. T. Backstrom, C. L. Beach, R. A. Larson, et Cancer and Leukemia Group B, « Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 24, n° 24, p. 3895-3903, août 2006.
- [54] L. R. Silverman, P. Fenaux, G. J. Mufti, V. Santini, E. Hellström-Lindberg, N. Gattermann, G. Sanz, A. F. List, S. D. Gore, et J. F. Seymour, « Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes », *Cancer*, vol. 117, n° 12, p. 2697-2702, juin 2011.
- [55] C. Bally, L. Adès, A. Renneville, M. Sebert, V. Eclache, C. Preudhomme, M.-J. Mozziconacci, H. de The, J. Lehmann-Che, et P. Fenaux, « Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine », *Leuk. Res.*, vol. 38, n° 7, p. 751-755, juill. 2014.
- [56] A. B. DeLeo, G. Jay, E. Appella, G. C. Dubois, L. W. Law, et L. J. Old, « Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, n° 5, p. 2420-2424, mai 1979.
- [57] J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, et P. Devilee, « Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types », *Nature*, vol. 342, n° 6250, p. 705-708, déc. 1989.
- [58] K. H. Vousden et D. P. Lane, « p53 in health and disease », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, n° 4, p. 275-283, avr. 2007.
- [59] S. Benchimol, P. Lamb, L. V. Crawford, D. Sheer, T. B. Shows, G. A. Bruns, et J. Peacock, « Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17 », *Somat. Cell Mol. Genet.*, vol. 11, n° 5, p. 505-510, sept. 1985.
- [60] D. Reisman, M. Greenberg, et V. Rotter, « Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, n° 14, p. 5146-5150, juill. 1988.
- [61] V. Marcel et P. Hainaut, « p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 66, n° 3, p. 391-406, févr. 2009.
- [62] Y. Yin, C. W. Stephen, M. G. Luciani, et R. Fåhræus, « p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products », *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, n° 6, p. 462-467, juin 2002.
- [63] C. Venot, M. Maratrat, C. Dureuil, E. Conseiller, L. Bracco, et L. Debussche, « The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression », *EMBO J.*, vol. 17, n° 16, p. 4668-4679, août 1998.
- [64] T. Tokino, S. Thiagalingam, W. S. el-Deiry, T. Waldman, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein, « p53 tagged sites from human genomic DNA », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 3, n° 9, p. 1537-1542, sept. 1994.
- [65] J.-C. Bourdon, K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D. P. Xirodimas, M. K. Saville, et D. P. Lane, « p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity », *Genes Dev.*, vol. 19, n° 18, p. 2122-2137, sept. 2005.
- [66] C. V. Dang et W. M. Lee, « Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins », *J. Biol. Chem.*, vol. 264, n° 30, p. 18019-18023, oct. 1989.

- [67] T. Soussi et P. May, « Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look », *J. Mol. Biol.*, vol. 260, n° 5, p. 623-637, août 1996.
- [68] K. Oda, H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura, et Y. Taya, « p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53 », *Cell*, vol. 102, n° 6, p. 849-862, sept. 2000.
- [69] S. Y. Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, et C. Prives, « DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2 », *Cell*, vol. 91, n° 3, p. 325-334, oct. 1997.
- [70] N. Taira, K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki, et K. Yoshida, « DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage », *Mol. Cell*, vol. 25, n° 5, p. 725-738, mars 2007.
- [71] P. F. Lambert, F. Kashanchi, M. F. Radonovich, R. Shiekhhattar, et J. N. Brady, « Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 49, p. 33048-33053, déc. 1998.
- [72] Y. Tang, W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, et W. Gu, « Acetylation is indispensable for p53 activation », *Cell*, vol. 133, n° 4, p. 612-626, mai 2008.
- [73] S. R. Grossman, M. E. Deato, C. Brignone, H. M. Chan, A. L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, et D. M. Livingston, « Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300 », *Science*, vol. 300, n° 5617, p. 342-344, avr. 2003.
- [74] S. Chuikov, J. K. Kurash, J. R. Wilson, B. Xiao, N. Justin, G. S. Ivanov, K. McKinney, P. Tempst, C. Prives, S. J. Gamblin, N. A. Barlev, et D. Reinberg, « Regulation of p53 activity through lysine methylation », *Nature*, vol. 432, n° 7015, p. 353-360, nov. 2004.
- [75] J. Huang, L. Perez-Burgos, B. J. Placek, R. Sengupta, M. Richter, J. A. Dorsey, S. Kubicek, S. Opravil, T. Jenuwein, et S. L. Berger, « Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation », *Nature*, vol. 444, n° 7119, p. 629-632, nov. 2006.
- [76] M. T. N. Le, C. Teh, N. Shyh-Chang, H. Xie, B. Zhou, V. Korzh, H. F. Lodish, et B. Lim, « MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53 », *Genes Dev.*, vol. 23, n° 7, p. 862-876, avr. 2009.
- [77] A. Swarbrick, S. L. Woods, A. Shaw, A. Balakrishnan, Y. Phua, A. Nguyen, Y. Chanthery, L. Lim, L. J. Ashton, R. L. Judson, N. Huskey, R. Belloch, M. Haber, M. D. Norris, P. Lengyel, C. S. Hackett, T. Preiss, A. Chetcuti, C. S. Sullivan, E. G. Marcusson, W. Weiss, N. L'Etoile, et A. Goga, « miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 10, p. 1134-1140, oct. 2010.
- [78] J. Chen, V. Marechal, et A. J. Levine, « Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, n° 7, p. 4107-4114, juill. 1993.
- [79] T. Juven, Y. Barak, A. Zauberman, D. L. George, et M. Oren, « Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene », *Oncogene*, vol. 8, n° 12, p. 3411-3416, déc. 1993.
- [80] D. Menendez, A. Inga, et M. A. Resnick, « The expanding universe of p53 targets », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 10, p. 724-737, oct. 2009.
- [81] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, et R. W. Craig, « Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage », *Cancer Res.*, vol. 51, n° 23 Pt 1, p. 6304-6311, déc. 1991.
- [82] C. L. Stewart, A. M. Soria, et P. A. Hamel, « Integration of the pRB and p53 cell cycle control pathways », *J. Neurooncol.*, vol. 51, n° 3, p. 183-204, févr. 2001.
- [83] P. G. Hemmati, G. Normand, B. Gillissen, J. Wendt, B. Dörken, et P. T. Daniel, « Cooperative effect of p21Cip1/WAF-1 and 14-3-3sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14ARF », *Oncogene*, vol. 27, n° 53, p. 6707-6719, déc. 2008.
- [84] Q. Zhan, « Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage », *Mutat. Res.*, vol. 569, n° 1-2, p. 133-143, janv. 2005.
- [85] J. D. Amaral, J. M. Xavier, C. J. Steer, et C. M. Rodrigues, « The Role of p53 in Apoptosis », *Discov. Med.*, vol. 9, n° 45, p. 145-152, févr. 2010.

- [86] D. Crighton, S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P. R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook, et K. M. Ryan, « DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis », *Cell*, vol. 126, n° 1, p. 121-134, juill. 2006.
- [87] K. Bensaad, A. Tsuruta, M. A. Selak, M. N. C. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb, et K. H. Vousden, « TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis », *Cell*, vol. 126, n° 1, p. 107-120, juill. 2006.
- [88] D. Schild et C. Wiese, « Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability », *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, n° 4, p. 1061-1070, mars 2010.
- [89] J. G. Teodoro, A. E. Parker, X. Zhu, et M. R. Green, « p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase », *Science*, vol. 313, n° 5789, p. 968-971, août 2006.
- [90] M. Olivier, M. Hollstein, et P. Hainaut, « TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, n° 1, p. a001008-a001008, nov. 2009.
- [91] D. Rossi, M. Cerri, C. Deambrogi, E. Sozzi, S. Cresta, S. Rasi, L. De Paoli, V. Spina, V. Gattei, D. Capello, F. Forconi, F. Lauria, et G. Gaidano, « The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 15, n° 3, p. 995-1004, févr. 2009.
- [92] P. Fenaux, C. Preudhomme, I. Quiquandon, P. Jonveaux, J. L. Lai, M. Vanrumbeke, M. H. Loucheux-Lefebvre, F. Bauters, R. Berger, et J. P. Kerckaert, « Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia », *Br. J. Haematol.*, vol. 80, n° 2, p. 178-183, févr. 1992.
- [93] D. H. Christiansen, M. K. Andersen, et J. Pedersen-Bjergaard, « Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 19, n° 5, p. 1405-1413, mars 2001.
- [94] A. Sebaa, L. Ades, F. Baran-Marzack, M.-J. Mozziconacci, D. Penther, S. Dobbelstein, A. Stamatoullas, C. Récher, T. Prebet, S. Moulessehou, P. Fenaux, et V. Eclache, « Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion », *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 51, n° 12, p. 1086-1092, déc. 2012.
- [95] A. G. Kulasekararaj, A. E. Smith, S. A. Mian, A. M. Mohamedali, P. Krishnamurthy, N. C. Lea, J. Gäken, C. Pennaneach, R. Ireland, B. Czepulkowski, S. Pomplun, J. C. Marsh, et G. J. Mufti, « TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis », *Br. J. Haematol.*, vol. 160, n° 5, p. 660-672, mars 2013.
- [96] J. Malcikova, B. Tichy, J. Damborsky, J. Kabathova, M. Trbusek, J. Mayer, et S. Pospisilova, « Analysis of the DNA-binding activity of p53 mutants using functional protein microarrays and its relationship to transcriptional activation », *Biol. Chem.*, vol. 391, n° 2-3, p. 197-205, mars 2010.
- [97] A. G. Knudson Jr, « Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 68, n° 4, p. 820-823, avr. 1971.
- [98] J. Milner et E. A. Medcalf, « Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation », *Cell*, vol. 65, n° 5, p. 765-774, mai 1991.
- [99] K. P. Olive, D. A. Tuveson, Z. C. Ruhe, B. Yin, N. A. Willis, R. T. Bronson, D. Crowley, et T. Jacks, « Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome », *Cell*, vol. 119, n° 6, p. 847-860, déc. 2004.
- [100] J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein, « Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53 », *Nature*, vol. 362, n° 6423, p. 857-860, avr. 1993.

- [101] K. Münger, M. Scheffner, J. M. Huibregtse, et P. M. Howley, « Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products », *Cancer Surv.*, vol. 12, p. 197-217, 1992.
- [102] L. Malcovati, E. Papaemmanuil, D. T. Bowen, J. Boulton, M. G. Della Porta, C. Pascutto, E. Travaglino, M. J. Groves, A. L. Godfrey, I. Ambaglio, A. Galli, M. C. Da Vià, S. Conte, S. Tauro, N. Keenan, A. Hyslop, J. Hinton, L. J. Mudie, J. S. Wainscoat, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, E. Hellström-Lindberg, M. Cazzola, et Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium and of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative, « Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms », *Blood*, vol. 118, n° 24, p. 6239-6246, déc. 2011.
- [103] S. M. C. Langemeijer, R. P. Kuiper, M. Berends, R. Knops, M. G. Aslanyan, M. Massop, E. Stevens-Linders, P. van Hoogen, A. G. van Kessel, R. A. P. Raymakers, E. J. Kamping, G. E. Verhoef, E. Verburch, A. Hagemeijer, P. Vandenberghe, T. de Witte, B. A. van der Reijden, et J. H. Jansen, « Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes », *Nat. Genet.*, vol. 41, n° 7, p. 838-842, juill. 2009.
- [104] A. E. Smith, A. M. Mohamedali, A. Kulasekararaj, Z. Lim, J. Gäken, N. C. Lea, B. Przychodzen, S. A. Mian, E. E. Nasser, C. Shooter, N. B. Westwood, C. Strupp, N. Gattermann, J. P. Maciejewski, U. Germing, et G. J. Mufti, « Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value », *Blood*, vol. 116, n° 19, p. 3923-3932, nov. 2010.
- [105] R. Itzykson, O. Kosmider, T. Cluzeau, V. Mansat-De Mas, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, B. Quesnel, N. Vey, V. Gelsi-Boyer, S. Raynaud, C. Preudhomme, L. Adès, P. Fenaux, M. Fontenay, et Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM), « Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias », *Leukemia*, vol. 25, n° 7, p. 1147-1152, juill. 2011.
- [106] M. J. Walter, L. Ding, D. Shen, J. Shao, M. Grillo, M. McLellan, R. Fulton, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, M. O'Laughlin, C. Kandoth, J. Baty, P. Westervelt, J. F. DiPersio, E. R. Mardis, R. K. Wilson, T. J. Ley, et T. A. Graubert, « Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes », *Leukemia*, vol. 25, n° 7, p. 1153-1158, juill. 2011.
- [107] M. M. Patnaik, C. A. Hanson, J. M. Hodnefield, T. L. Lasho, C. M. Finke, R. A. Knudson, R. P. Ketterling, A. Pardanani, et A. Tefferi, « Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients », *Leukemia*, vol. 26, n° 1, p. 101-105, janv. 2012.
- [108] F. Thol, I. Friesen, F. Damm, H. Yun, E. M. Weissinger, J. Krauter, K. Wagner, A. Chaturvedi, A. Sharma, M. Wichmann, G. Göhring, C. Schumann, G. Bug, O. Ottmann, W.-K. Hofmann, B. Schlegelberger, M. Heuser, et A. Ganser, « Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 18, p. 2499-2506, juin 2011.
- [109] T. Ernst, A. J. Chase, J. Score, C. E. Hidalgo-Curtis, C. Bryant, A. V. Jones, K. Waghorn, K. Zoi, F. M. Ross, A. Reiter, A. Hochhaus, H. G. Drexler, A. Duncombe, F. Cervantes, D. Oscier, J. Boulton, F. H. Grand, et N. C. P. Cross, « Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders », *Nat. Genet.*, vol. 42, n° 8, p. 722-726, août 2010.
- [110] R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R. L. Levine, D. Neuberg, et B. L. Ebert, « Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes », *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, n° 26, p. 2496-2506, juin 2011.
- [111] V. Soenen, C. Preudhomme, C. Roumier, A. Daudignon, J. L. Laï, et P. Fenaux, « 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ », *Blood*, vol. 91, n° 3, p. 1008-1015, févr. 1998.
- [112] M. Jädersten, L. Saft, A. Smith, A. Kulasekararaj, S. Pomplun, G. Göhring, A. Hedlund, R. Hast, B. Schlegelberger, A. Porwit, E. Hellström-Lindberg, et G. J. Mufti, « TP53 mutations in low-risk

- myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 15, p. 1971-1979, mai 2011.
- [113] Y. Kita-Sasai, S. Horiike, S. Misawa, H. Kaneko, M. Kobayashi, M. Nakao, H. Nakagawa, H. Fujii, et M. Taniwaki, « International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome », *Br. J. Haematol.*, vol. 115, n° 2, p. 309-312, nov. 2001.
- [114] F. G. Rücker, R. F. Schlenk, L. Bullinger, S. Kayser, V. Teleanu, H. Kett, M. Habdank, C.-M. Kugler, K. Holzmann, V. I. Gaidzik, P. Paschka, G. Held, M. von Lilienfeld-Toal, M. Lübbert, S. Fröhling, T. Zenz, J. Krauter, B. Schlegelberger, A. Ganser, P. Lichter, K. Döhner, et H. Döhner, « TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome », *Blood*, vol. 119, n° 9, p. 2114-2121, mars 2012.
- [115] H. Kaneko, S. Misawa, S. Horiike, H. Nakai, et K. Kashima, « TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities », *Blood*, vol. 85, n° 8, p. 2189-2193, avr. 1995.
- [116] Y. Kita-Sasai, S. Horiike, S. Misawa, H. Kaneko, M. Kobayashi, M. Nakao, H. Nakagawa, H. Fujii, et M. Taniwaki, « International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome », *Br. J. Haematol.*, vol. 115, n° 2, p. 309-312, nov. 2001.
- [117] M. Krypuy, A. A. Ahmed, D. Etemadmoghadam, S. J. Hyland, Australian Ovarian Cancer Study Group, A. DeFazio, S. B. Fox, J. D. Brenton, D. D. Bowtell, et A. Dobrovic, « High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8 », *BMC Cancer*, vol. 7, p. 168, 2007.
- [118] C. T. Wittwer, « High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations », *Hum. Mutat.*, vol. 30, n° 6, p. 857-859, juin 2009.
- [119] C. F. Taylor, « Mutation scanning using high-resolution melting », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 37, n° Pt 2, p. 433-437, avr. 2009.
- [120] R. Seth, J. Keeley, G. Abu-Ali, S. Crook, D. Jackson, et M. Ilyas, « The putative tumour modifier gene ATP5A1 is not mutated in human colorectal cancer cell lines but expression levels correlate with TP53 mutations and chromosomal instability », *J. Clin. Pathol.*, vol. 62, n° 7, p. 598-603, juill. 2009.
- [121] M. Krypuy, A. A. Ahmed, D. Etemadmoghadam, S. J. Hyland, Australian Ovarian Cancer Study Group, A. DeFazio, S. B. Fox, J. D. Brenton, D. D. Bowtell, et A. Dobrovic, « High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8 », *BMC Cancer*, vol. 7, p. 168, 2007.
- [122] E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Malcovati, S. Tauro, G. Gundem, P. Van Loo, C. J. Yoon, P. Ellis, D. C. Wedge, A. Pellagatti, A. Shlien, M. J. Groves, S. A. Forbes, K. Raine, J. Hinton, L. J. Mudie, S. McLaren, C. Hardy, C. Latimer, M. G. Della Porta, S. O'Meara, I. Ambaglio, A. Galli, A. P. Butler, G. Walldin, J. W. Teague, L. Quek, A. Sternberg, C. Gambacorti-Passerini, N. C. P. Cross, A. R. Green, J. Boulwood, P. Vyas, E. Hellstrom-Lindberg, D. Bowen, M. Cazzola, M. R. Stratton, P. J. Campbell, et Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium, « Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 122, n° 22, p. 3616-3627; quiz 3699, nov. 2013.
- [123] M. G. Della Porta, L. Malcovati, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, E. Zipperer, E. Travaglino, R. Invernizzi, C. Pascutto, M. Lazzarino, U. Germing, et M. Cazzola, « Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome », *Haematologica*, vol. 96, n° 3, p. 441-449, mars 2011.
- [124] D. Rossi, H. Khiabani, V. Spina, C. Ciardullo, A. Brusca, R. Famà, S. Rasi, S. Monti, C. Deambrogi, L. De Paoli, J. Wang, V. Gattei, A. Guarini, R. Foà, R. Rabadan, et G. Gaidano, « Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia », *Blood*, vol. 123, n° 14, p. 2139-2147, avr. 2014.

[125] Y. Sauntharajah, « Key clinical observations after 5-azacytidine and decitabine treatment of myelodysplastic syndromes suggest practical solutions for better outcomes », *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2013, p. 511-521, 2013.

SYNDROME MYELODYSPLASIQUE Mutations de TP53
Impact pronostique et réponse aux agents hypométhylants
Etude sur 65 patients suivis au CHU de Toulouse

Résumé

Les myélodysplasies (SMD) sont des maladies touchant essentiellement le sujet âgé et évoluant rapidement vers une leucémie aiguë myéloblastique (LAM). Le pronostic des SMD reste largement basé sur l'International Prognostic Scoring System (IPSS) mais d'autres facteurs pronostiques méritent d'être pris en compte tels que les mutations géniques. L'objectif de notre travail est d'évaluer l'impact pronostique et la réponse au traitement des patients mutés pour le gène TP53. Nous avons ainsi inclus rétrospectivement 65 patients suivis au CHU de Toulouse pour un SMD de haut risque traité par azacitidine (AZA). Le screening des patients pour TP53 a été réalisé par High Resolution Melting (HRM) et confirmé par séquençage sur des échantillons médullaires prélevés préalablement à la mise en route du traitement.

Les facteurs prédictifs de moins bonne survie identifiés sont la présence de blastes circulants (HR=6,57 [2,80-15,42]) et d'une mutation de TP53 (HR=5,79 [2,23-15,06]). La réponse au traitement (HR=0,32 [0,15-0,72]) et un taux de plaquettes \geq 100G/L sont prédictifs d'une meilleure survie. Cependant, aucun facteur de réponse au traitement n'a pu être mis en évidence dans notre travail. Un screening des mutations pour l'ensemble des gènes d'intérêt des patients permettrait peut-être de définir des profils mutationnels associés à une meilleure réponse au traitement.

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are diseases that mainly affect the old subject and rapidly progress to acute myeloid leukemia (AML). The prognosis of MDS is largely based on the International Prognostic Scoring System (IPSS), but other prognostic factors should be taken into account such as gene mutations. Our study aim was to evaluate the prognostic impact and response to treatment in mutated patients for TP53 gene. We have retrospectively included 65 patients from the University Hospital of Toulouse treated for a high-risk MDS with azacitidine (AZA). Screening patients for TP53 was performed by High Resolution Melting (HRM) and confirmed by sequencing on bone marrow samples prior to initiation of treatment.

Prognostic factors of poorer survival identified are the presence of circulating blasts (HR = 6.57 [2.80 to 15.42]) and a TP53 mutation (HR = 5.79 [2.23 to 15, 06]). Response to therapy (HR = 0.32 [0.15 to 0.72]) and a rate of plaquettes \geq 100G/L are predictive of improved survival. However, none factors of response to treatment could be demonstrated in our work. A screening of mutations for all genes of interest of patients would perhaps highlight mutational profiles associated with better treatment response.

Discipline administrative : Pharmacie – Biologie médicale

Mots-clés : myélodysplasie - mutation TP53 - azacitidine - pronostic - réponse au traitement

Intitulé et adresse du Laboratoire

Laboratoire d'Hématologie -CHU de Toulouse – Hôpital Purpan
330, av. de Gde-Bretagne, TSA40031
31059 Toulouse Cedex 9, France

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Véronique DE MAS
