

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2013

THESE N°

IMPACT PRONOSTIQUE DES MUTATIONS RECURRENTES DES GENES DU
SPLICEOSOME DANS LES SYNDROMES MYELODYSPLASIQUES

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 21 Février 2013

par

Jasmine CHAUZEIX

née le 26/05/1984, à LIMOGES

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOUT Président
M. le Professeur Eric DELABESSE..... Juge, Directeur de thèse
Mme le Professeur Odile BEYNE-RAUZY Juge
M. le Professeur Pierre SIE Juge
M. le Professeur Jean FEUILLARD Membre invité
Mme le Docteur Véronique DE MAS..... Membre invité



DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert (jusqu'au 8/10/2012)	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique (jusqu'au 28/02/2013)	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ODART Nicole (surnombre à compter du 19.12.2011)	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

**ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

IMBERT Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
-----------------------	-----------------------------------

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Jean-Louis BENEYTOU de me faire l'honneur de présider ce jury. Je le remercie également pour m'avoir accueillie il y a déjà quelques années dans son laboratoire pour l'un de mes premiers stages de recherche qui fut une excellente expérience pour moi.

Je remercie le Professeur Eric DELABESSE pour m'avoir proposé ce sujet original, ainsi que pour son accueil au sein du laboratoire. Je le remercie également pour ses explications et conseils tout au long de ce travail.

Je remercie le Docteur Véronique DE MAS pour son accompagnement dans ce projet, son aide dans le choix des patients et leur classification. Je la remercie particulièrement pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie le Professeur Odile BEYNE-RAUZY pour tout le travail et l'aide apportés à cette étude. Ses qualités professionnelles et humaines forcent l'admiration.

Je remercie le Professeur Jean FEUILLARD pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que pour la confiance qu'il m'accorde.

Je remercie le Professeur Pierre SIE de me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Je le remercie également pour son enseignement et sa participation à ma formation professionnelle.

Je remercie le Docteur Naïs PRADE pour son aide au cours de ce projet, pour sa patience et sa sympathie.

Je remercie le Docteur Franck TRIMOREAU pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa grande pédagogie, pour m'avoir donné le goût de la cytologie.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire d'hématologie de Toulouse, et plus particulièrement Cynthia, Magalie, Marie, Sébastien et Virginie.

Je remercie l'ensemble des biologistes, techniciens, ainsi que l'ensemble du personnel des services de Biochimie, Hématologie, Bactériologie-Virologie et Parasitologie de Limoges, des laboratoires d'Hématologie de Bordeaux et d'Immunologie de Toulouse pour leur participation active à ma formation professionnelle.

Je remercie mes parents pour leurs conseils, leur écoute, leur patience et leur soutien indéfectible.

Je remercie mon frère, Roland et ma belle-sœur Carole, pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie mes grands-parents, à qui je pourrai enfin dire que j'ai fini mes études (ou presque !).

Je remercie l'ensemble de ma famille pour le soutien qu'elle m'a témoigné.

Je remercie mes amis Delphine, Stéphanie, Caroline, Marion, Philippe, Marie, Hélène D, Sandrine, Valentin, Marc, Fabrice, Béatrice, Céline, Hélène C, Josseline, Sandra L, Alex.

Je remercie mes cointernes Laure G, Sandra R, Violaine, Yamen, Tanguy, Mélodie, Guillaume O, Fanny, Céline, Jennifer, Ana, Aurélie, Jean-Philippe, Rithy, Armelle, Vincent, Marie, Arnaud Ca, Arnaud Cr, Suzanne, David, Jessica, Valentine, Anne, Olivier, Audrey, Pierre, Gaëlle, Camille, Clarisse, Antoine, Richard, Doreya, Florence, Guillaume C, Anne-Sophie, Laure Y, Isabelle V, Thomas, Yasmine, Véronique... ainsi que les autres internes qui m'ont témoigné leur sympathie (Sébastien pour le covoiturage et nos discussions particulièrement optimistes sur la biologie, Vincent dont la thèse me sert fréquemment, Florence P pour sa sympathie et sa grande générosité, Max qui sera toujours un peu comme un

interne, Naël pour avoir rôlé avec moi dans le bureau/cagibi des internes). Mon internat n'aurait pas été le même sans vous et j'espère avoir de vos nouvelles régulièrement.

SOMMAIRE

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

Les syndromes myélodysplasiques

1. DEFINITION
2. EPIDEMIOLOGIE
3. ETIOLOGIES
4. CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE
5. EXAMEN CLINIQUE
6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
 - 6.1 Numération-Formule sanguine
 - 6.2 Autres anomalies biologiques
 - 6.3 Myélogramme
 - 6.4 Critères cytologiques de dysplasie
 - 6.5 Cytochimie
7. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL
8. CLASSIFICATION DES SMD
 - 8.1 Classification FAB
 - 8.2 Classification OMS
 - 8.3 Caryotype
 - 8.4 Facteurs pronostiques
9. TRAITEMENT
 - 9.1 Traitement symptomatique
 - 9.2 Traitement à visée curative
 - 9.3 Chimiothérapie

Les mutations récurrentes observées dans les gènes du spliceosome

1. INTRODUCTION
2. LE SPLICEOSOME
3. MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES
4. MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC)

Objectifs

Matériels et méthodes

1. ECHANTILLONS ET PATIENTS
2. EXTRACTION D'ADN
3. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES
4. MÉTHODE HIGH-RESOLUTION MELTING (HRM)
5. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE
6. PURIFICATION DES PRODUITS DE PCR
7. SEQUENÇAGE
8. STATISTIQUES

Résultats

1. PATIENTS
 - 1.1 SMD sans excès de sidéroblastes en couronne avéré
 - 1.2 SMD avec excès de sidéroblastes en couronne
 - 1.3 LMMC
2. SF3B1
 - 2.1 Mutations de l'exon 14 du gène SF3B1
 - 2.2 Mutations de l'exon 15 du gène SF3B1
 - 2.3 Synthèse des mutations de SF3B1
3. U2AF1
 - 3.1 Mutations de l'exon 2 du gène U2AF1
 - 3.2 Mutations de l'exon 6 du gène U2AF1
 - 3.3 Synthèse des mutations de U2AF1
4. SRSF2
 - 4.1 Mise au point de la méthode HRM
 - 4.2 Résultats
5. BILAN DES MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME RECHERCHEES
 - 5.1 SMD sans excès de sidéroblastes en couronne
 - 5.2 SMD avec excès de sidéroblastes en couronne
 - 5.3 LMMC
 - 5.4 Fréquence des mutations en fonction des catégories IPSS et IPSS-r
 - 5.5 Etude de l'association entre mutation d'un des gènes étudiés et caryotype
 - 5.6 Analyses de survie

Discussion

Conclusion

Annexes

Bibliographie

Table des matières

Table des illustrations

Table des tableaux

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

ALIP : Localisation Anormale de Précurseurs Immatures

AR : Anémie Réfractaire

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

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

AREB-F : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes avec myéloFibrose

ARS : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne

BPS : Branch Point Sequence

CD : Cluster of Differentiation

CRDU : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Unilignée

CRDM : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée

CRDM-RS : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée et présence de Sidéroblastes en couronne

EGR1 : Early Growth Response 1

EPO : Erythropoïétine

FAB : Franco-Américano-Britannique

FISH : Fluorescence in situ Hybridization

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFM : Groupe Français des Myélodysplasies

GPA : Glycophorine A

HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

HRM : High Resolution Melting

Idic : iso dicentrique

IGVH : séquence variable des chaînes Lourdes des immunoglobulines

IPSS : International Prognosis Scoring System

IPSS-r : revised International Prognosis Scoring System

IWCLL : International Workshop for Chronic Lymphocytic Leukemia

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique

LR-PSS : Lower Risk Prognosis Scoring System

MBL : Monoclonal B Lymphocytosis

NaCl : Chlorure de sodium

NMD : Non sense mediated m-RNA Decay

NR : Neutropénie Réfractaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Acide Périodique de Schiff

PCR : Polymerase Chain Reaction

RC : Rémission Complète

RRM : RNA Recognition Motif

RS : Ring Sideroblast (ou sidéroblaste en couronne)

SDS : Sodium DodécylSulfate

SMD : Syndrome MyéloDysplasique

SMD-F : Syndrome MyéloDysplasique avec myéloFibrose

SMD-I : Syndrome MyéloDysplasique Inclassable

SMD-RS : Syndrome MyéloDysplasique avec excès de Ring Sideroblasts (ou sidéroblastes en couronne)

SMP : Syndrome MyéloProlifératif

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SnRNP : Small nuclear RiboNucleoProtein

SPARC : Secreted Protein Acidic Rich in Cystein

T-AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes en cours de Transformation

TE : Tampon Tris EDTA

TLB : Triton Lysis Buffer

TR : Thrombopénie Réfractaire

TSH : Thyroid Stimulating Hormone ou Thyreostimuline

UHM : U2AF Homologous Motif

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience acquise Humaine

WPSS : WHO classification based Prognosis Scoring System

LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES

1. DEFINITION

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies myéloïdes malignes. Il s'agit d'un groupe de pathologies extrêmement hétérogènes aux niveaux clinique et biologique [1].

Ces pathologies sont caractérisées par la différenciation et la maturation anormale de cellules souches hématopoïétiques, se traduisant par une hématopoïèse inefficace, entraînant une ou plusieurs cytopénies diversement associées, et un risque leucémogène accru [1].

Ces maladies sont associées à une augmentation de l'apoptose qui contribue aux cytopénies [2].

2. EPIDEMIOLOGIE

Il s'agit de pathologies du sujet âgé. Les SMD ont une incidence de 3 à 5 cas pour 100 000. Cette incidence augmente avec l'âge (20 cas pour 100 000 chez les sujets de plus de 70 ans). La médiane d'âge est de 70 ans [1].

Ces pathologies touchent préférentiellement l'homme.

10 à 20 % des SMD sont secondaires à un traitement cytotoxique, la plupart étant des anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB).

3. ETIOLOGIES

Les SMD primaires apparaissent en l'absence d'histoire de chimiothérapie anticancéreuse ou de radiothérapie. L'exposition au benzène à des niveaux supérieurs aux taux recommandés, le tabagisme, 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 [2].

Certaines maladies congénitales telles que l'anémie de Fanconi, la dyskératose congénitale, et les syndromes de Shwachmann-Diamond et de Diamond-Blackfan sont aussi associées à une augmentation du risque d'apparition de SMD.

En ce qui concerne les SMD secondaires à un traitement cytotoxique, il s'agirait de la conséquence d'événements mutationnels induits par ce type de thérapie. Certains sujets auraient une prédisposition liée à la présence de gènes qui affectent le métabolisme des médicaments, ou de la machinerie de réparation de l'ADN. Cependant, dans la plupart des cas, la pathogénèse reste incertaine. Les médicaments fréquemment incriminés sont les agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide, chlorambucil, busulphan, carboplatine, mitomycine C...), les rayonnements ionisants, les inhibiteurs de topoisomérase II (étoposide, ténoposide, doxorubicine, daunorubicine...), les poisons du fuseau (vincristine, vinblastine, vindesine, paclitaxel, docetaxel), les antimétabolites (thiopurines, mycophénolate, fludarabine). D'autres traitements ont été suspectés comme potentiellement incriminés (hydroxyurée, radioisotopes, L-asparaginase et les facteurs de croissance hématopoïétique) [1] [2].

4. CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE

Dans 90 % des cas, les signes révélateurs reflètent l'anémie. Pour les autres cas, il peut s'agir de troubles hémorragiques liés à une thrombopénie profonde, ou de troubles infectieux liés à une neutropénie [1].

Chez plus de 50 % des patients, l'anémie est associée à une autre cytopénie.

5. EXAMEN CLINIQUE

Il est généralement normal, ou en rapport avec les cytopénies et l'insuffisance médullaire [1]:

- Anémie : pâleur, essoufflement...
- Thrombopénie : purpura au niveau des membres inférieurs, présence de bulles hémorragiques (cavité buccale)...
- Neutropénie : infections.

L'interrogatoire recherche un retentissement des cytopénies, ainsi que l'ancienneté de celles-ci, des agents étiologiques (chimiothérapies, exposition au benzène...), des signes de maladies dysimmunitaires associées particulièrement fréquentes dans les SMD (arthropathie, polychondrite, vascularite...) [3].

6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Les SMD demeurent parmi les hémopathies myéloïdes les plus difficiles à diagnostiquer.

6.1 Numération-Formule sanguine

La numération formule sanguine va révéler une ou des cytopénies. L'examen du frottis peut révéler des signes de dysplasie (dégranulation de la lignée granuleuse, formes pseudo-Pelger par exemple) [1].

L'anémie est la principale cytopénie retrouvée (90 % des cas). Celle-ci est macrocytaire ou normocytaire, normochrome. De très rares formes microcytaires ont été décrites, pouvant s'expliquer par une délétion acquise du gène alpha-thalassémie. L'examen du frottis peut révéler des macrocytes ou des hématies présentant des ponctuations basophiles [1].

La mesure du nombre de réticulocytes est également importante en cas d'anémie : en cas de SMD, celui-ci sera diminué, indiquant une origine centrale.

Une autre cytopénie, en général modérée peut être associée dans 50 % des cas (neutropénie de 0,7 à 1 G/L, et thrombopénie, généralement supérieure à 50 G/L) [1].

Neutropénie et thrombopénie peuvent aussi apparaître isolément.

Une thrombocytose peut également être observée dans certains SMD à caryotype particulier (type del(5q)), ou dans certaines anémies sidéroblastiques [1].

Quelques blastes peuvent parfois être retrouvés dans le sang. Certains peuvent comporter des corps d'Auer.

6.2 Autres anomalies biologiques

Les dosages des vitamines B12 et folates doivent être réalisés pour éliminer une carence [1].

Le dosage de l'érythropoïétine (EPO) dans certains SMD constituait un facteur pronostique de la réponse au traitement, mais n'est aujourd'hui plus réalisé de façon systématique (recommandations du GFM) [3].

Un bilan ferrique, inflammatoire, thyroïdien (dosage de la TSH) et d'hémolyse, et les sérologies VIH, VHB, VHC sont réalisés afin d'éliminer des causes additionnelles d'anémie. Des stigmates d'hémolyse intramédullaire peuvent être retrouvés.

Le phénotypage érythrocytaire est indiqué en cas de traitement substitutif (transfusions).

Le typage HLA peut être réalisé chez les patients de moins de 65 ans, en cas d'indication à une greffe de moelle osseuse.

La biopsie ostéo-médullaire n'est pas nécessaire au diagnostic des SMD, excepté en cas d'aspiration médullaire impossible, rendant ininterprétable le myélogramme, ou en cas d'hypocellularité afin d'éliminer une aplasie médullaire ou une myélofibrose, de mettre en évidence des foyers de cellules immatures de type ALIP (pour localisation anormale de précurseurs immatures) à valeur pronostique, ou de réaliser un immunomarquage pour fournir des renseignements diagnostiques et pronostiques [3].

6.3 Myélogramme

Le myélogramme est indispensable au diagnostic. Il permet d'éliminer d'autres causes de cytopénies (carences en vitamines B12 et folates, toxicité médicamenteuse, leucémie aiguë...).

La moelle est généralement de densité augmentée ou normale, et met en évidence des anomalies morphologiques d'une ou plusieurs lignées, élément essentiel du diagnostic positif, et un nombre de blastes variable [2].

A noter qu'il existe des SMD à moelle hypoplasique.

6.4 Critères cytologiques de dysplasie

Au niveau cytologique, les SMD sont caractérisés par une maturation quantitativement insuffisante, entraînant une ou plusieurs cytopénies, et une morphologie anormale des lignées myéloïdes : de la lignée mégacaryocytaire (dysmégacaryopoïèse), érythroblastique (dysérythro-poïèse), granuleuse (dysgranulopoïèse). Les différentes anomalies morphologiques ont une valeur diagnostique variable : la dysérythro-poïèse a une valeur diagnostique faible, alors que la dysgranulopoïèse et la dysmégacaryopoïèse ont une valeur diagnostique plus importante. A noter que certaines dystrophies peuvent être prédictives d'anomalies cytogénétiques (exemple de mégacaryocytes à noyau hypolobé associés à l'anomalie cytogénétique de type del(5q) ou encore la présence de polynucléaires à noyau hypolobé et l'anomalie cytogénétique de type del(17p)) [2].

L'évaluation du degré de dysplasie peut être difficile car fortement dépendante de la qualité des étalements et des colorations des frottis médullaires (par exemple, la présence d'une dégranulation de la lignée neutrophile en cas de coloration de mauvaise qualité) [2].

Il est important avant d'avancer le diagnostic de SMD de prendre en compte le contexte clinique et la prise antérieure de médicaments. De plus, la classification d'un SMD ne doit pas être modifiée lorsque le patient est en cours de traitement par facteurs de croissance, y compris par EPO. La présence de cytopénie sans dysplasie ne doit pas être interprétée comme SMD, sauf en cas de présence de certaines anomalies cytogénétiques (voir tableau 2) [2].

La persistance de cytopénie sans dysplasie, et en l'absence d'anomalie cytogénétique spécifique considérée comme présomptive de SMD, doit être classée comme cytopénie idiopathique de signification indéterminée ; les patients concernés doivent être suivis régulièrement au niveau hématologique et cytogénétique [2].

D'après la classification OMS [2], pour déterminer le pourcentage de blastes, il est nécessaire de compter 500 cellules pour un frottis médullaire, et 200 leucocytes pour un frottis sanguin. Chez les patients présentant des cytopénies importantes, il peut être nécessaire de réaliser une technique de concentration avant frottis.

Les caractéristiques de la dysplasie sont pertinentes pour distinguer les différents types de SMD.

L'OMS décrit les manifestations morphologiques de la dysplasie en fonction des lignées comme suit :

- dysérythropoïèse :

- au niveau nucléaire :

- Bourgeonnement nucléaire

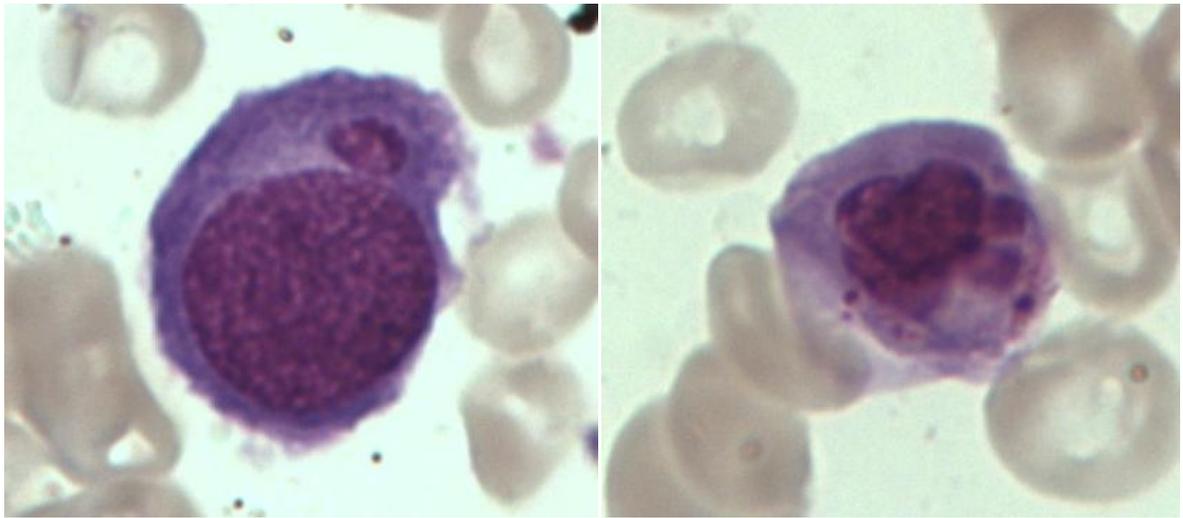


Illustration 1 : Erythroblastes avec bourgeonnement nucléaire (Objectif x100).

Pont internucléaire

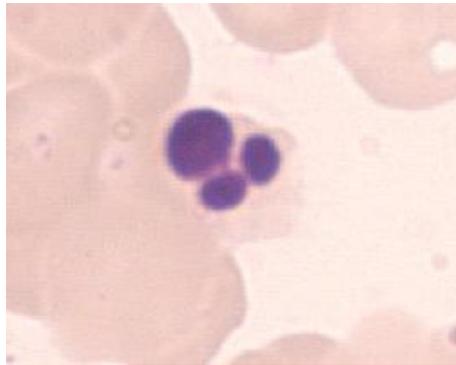


Illustration 2 : Erythroblaste avec pont internucléaire (Objectif x100).

Multinucléarité

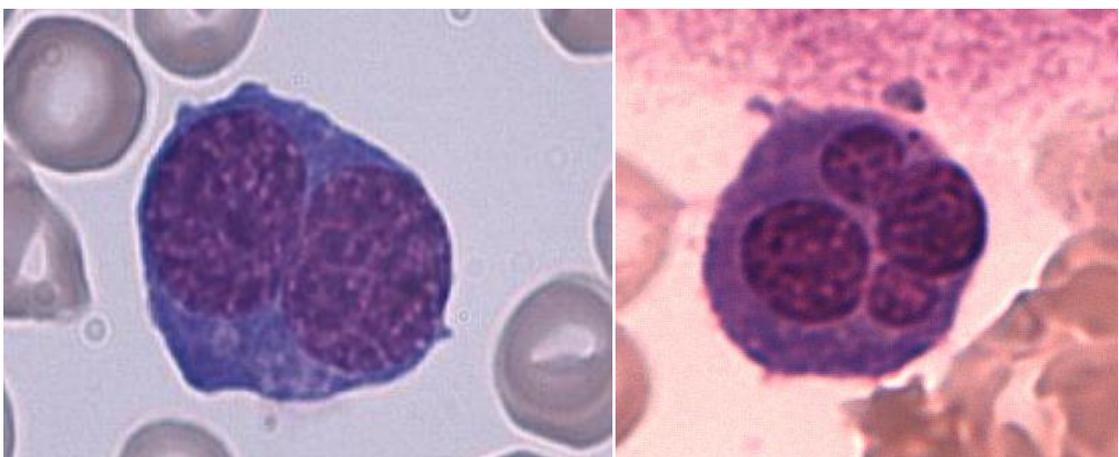


Illustration 3 : Erythroblaste binucléé et érythroblaste multinucléé (Objectif x100).

Noyau fragmenté



Illustration 4 : Erythroblaste à noyau fragmenté et bourgeonnement nucléaire (Objectif x100).

Changements de type mégaloblastique

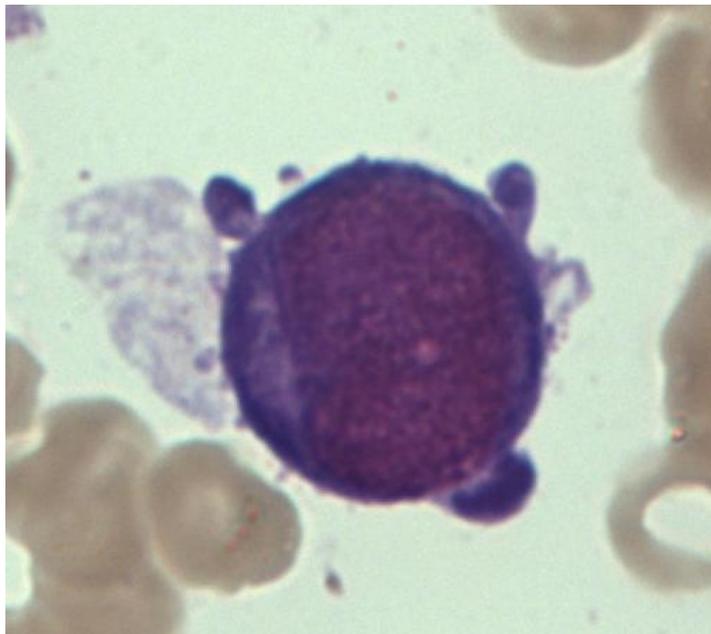


Illustration 5 : Erythroblaste à chromatine perlée (Objectif x100).

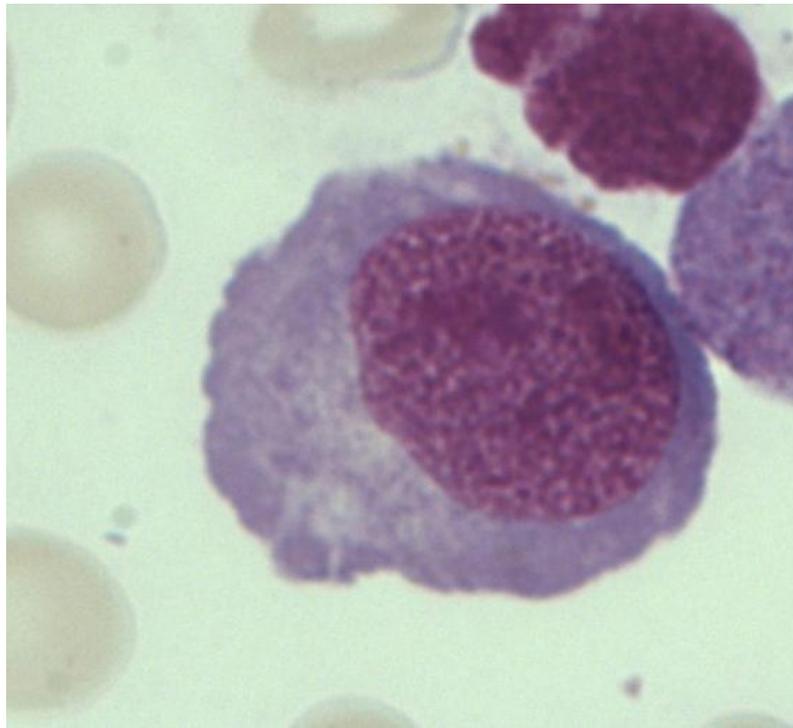


Illustration 6 : Asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique (Objectif x100).

- au niveau cytoplasmique :

Sidéroblastes en couronne

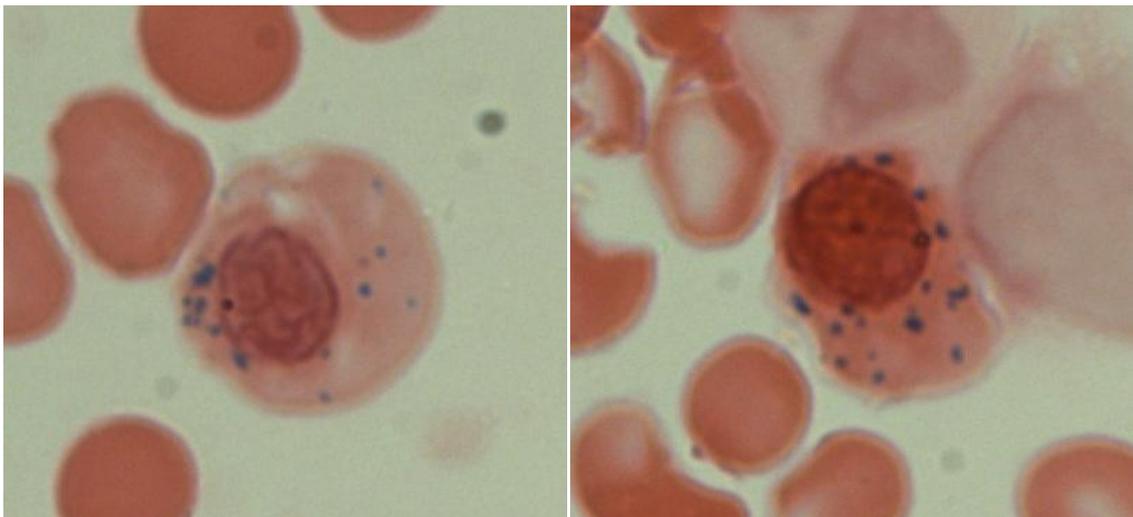


Illustration 7 : Sidéroblastes en couronne (coloration de Perls) (Objectif x100).

Vacuolisation

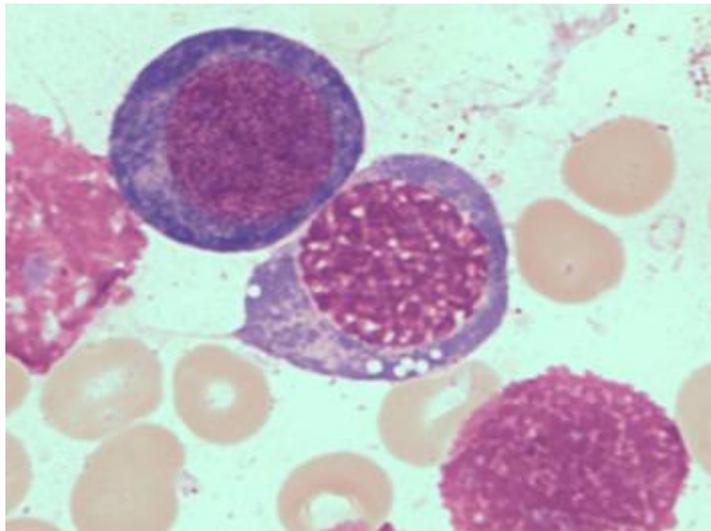


Illustration 8 : Erythroblaste avec vacuolisation du cytoplasme (Objectif x100).

Positivité à l'acide périodique de Schiff (ou P.A.S. qui colore en rouge vif les polysaccharides, les lipoprotéines et les lipofuschines, avec contre-coloration par la fuschine ; cette coloration n'est pas utilisée au laboratoire d'hématologie).

Il existe d'autres signes de dysérythropoïèse hors OMS :

Perte de la forme ronde du noyau

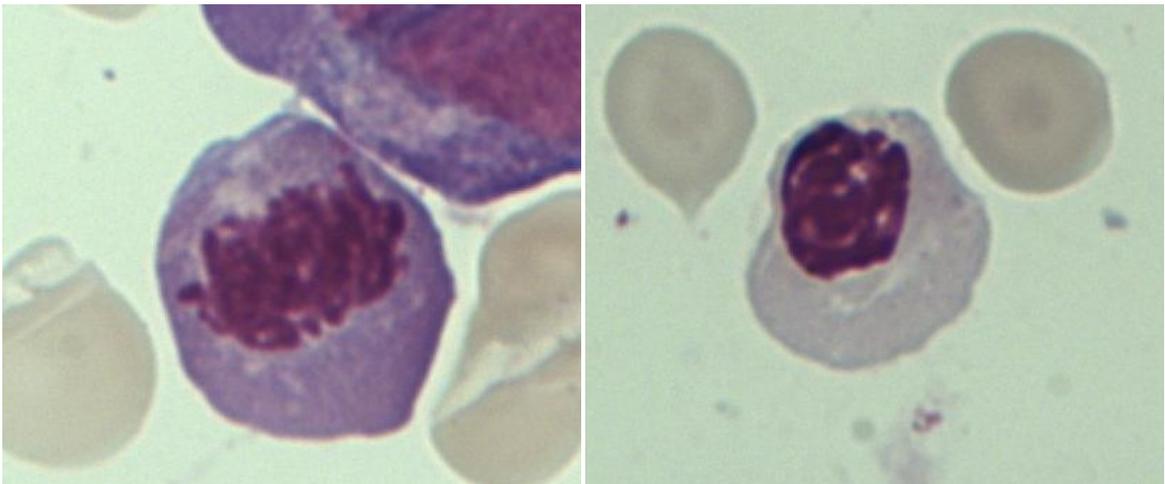


Illustration 9 : Perte de la forme ronde du noyau d'érythroblastes (Objectif x100).

Plages cytoplasmiques de deshémoglobinisation

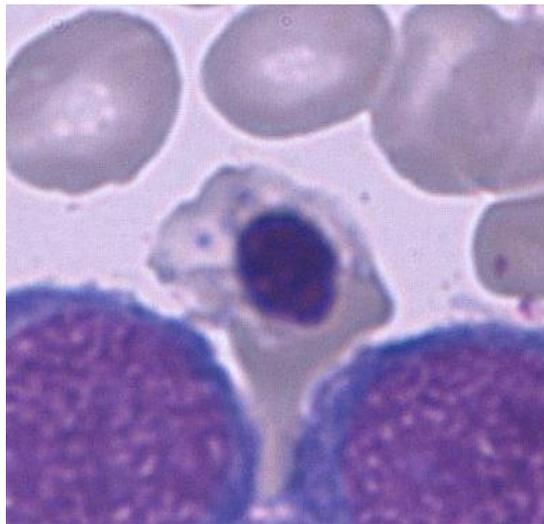
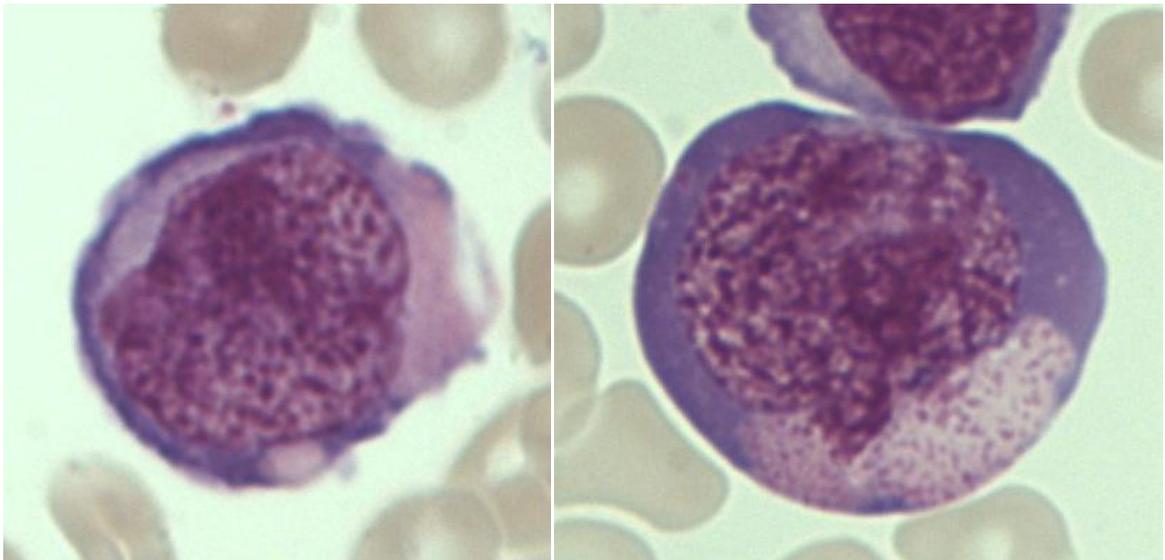


Illustration 10 : Erythroblastes avec plages cytoplasmiques de deshémoglobinisation (Objectif x100).

Hématies et érythroblastes à ponctuations basophiles

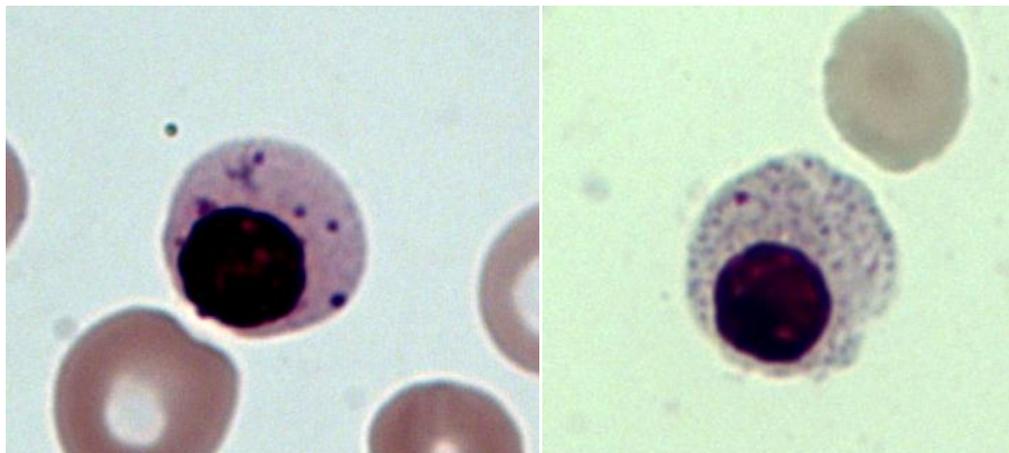


Illustration 11 : Erythroblastes avec ponctuations basophiles (Objectif x100).

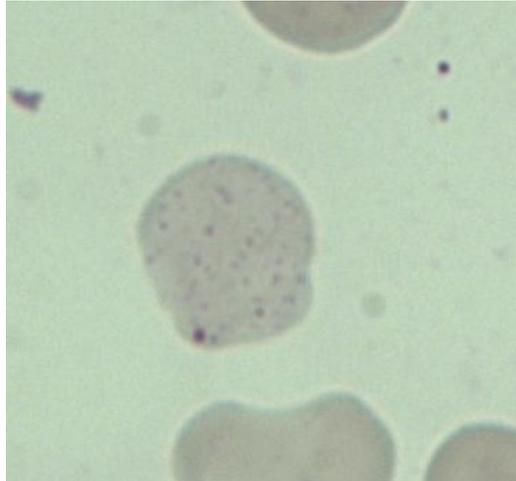


Illustration 12 : Hématie avec ponctuations basophiles (Objectif x100).

Cytoplasme feuilleté

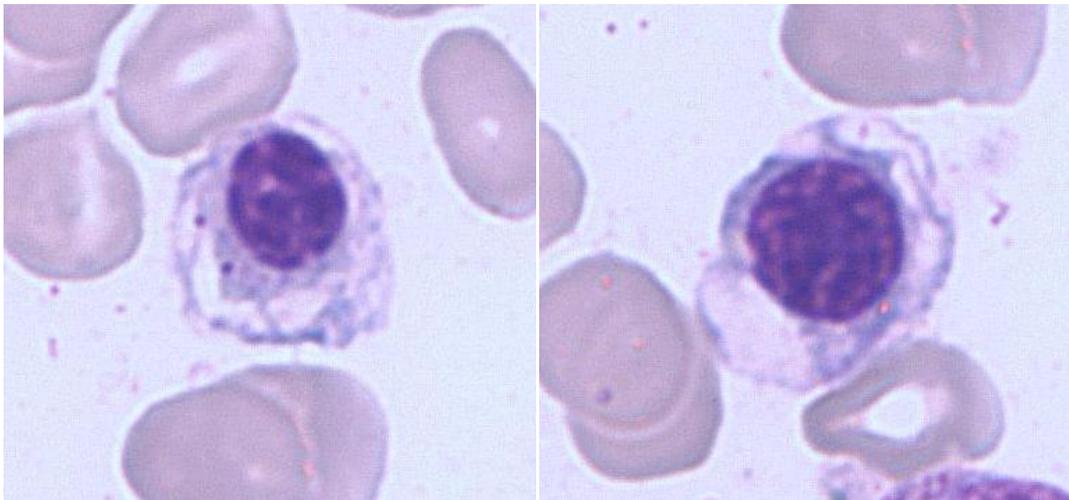


Illustration 13 : Erythroblastes à cytoplasme feuilleté (Objectif x100).

- Dysgranulopoïèse :

Petite ou grande taille

Hypolobulation nucléaire (pseudo-Pelger-Huët)



Illustration 14 : Polynucléaire pelgerisé (Objectif x100).

Hypersegmentation irrégulière



Illustration 15 : Polynucléaires à noyau hypersegmenté (Objectif x100).

Hypogranulation voire agranulation



Illustration 16 : Polynucléaire hyposegmenté et dégranulé (Objectif x100).

Granules de pseudo Chediak-Higashi

Corps d'Auer

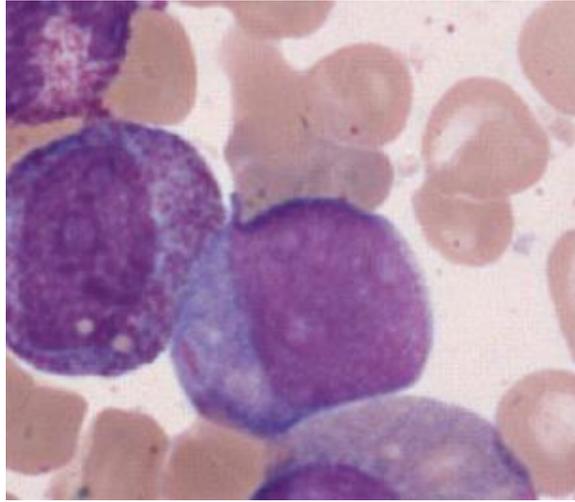


Illustration 17 : Corps d'Auer dans un myéloblaste (Objectif x100).

- Dismégacaryopoïèse :

Micromégacaryocytes

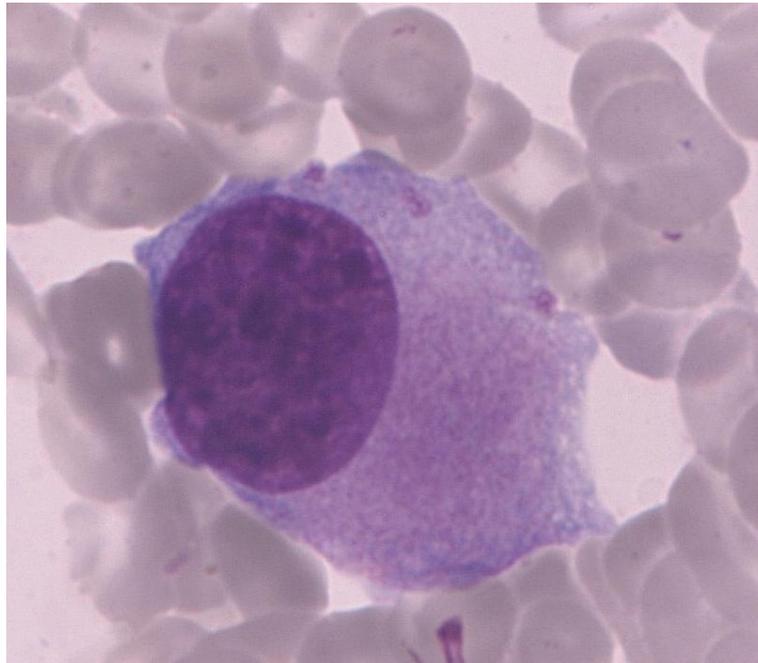


Illustration 18 : Mégacaryocyte de petite taille (Objectif x100).

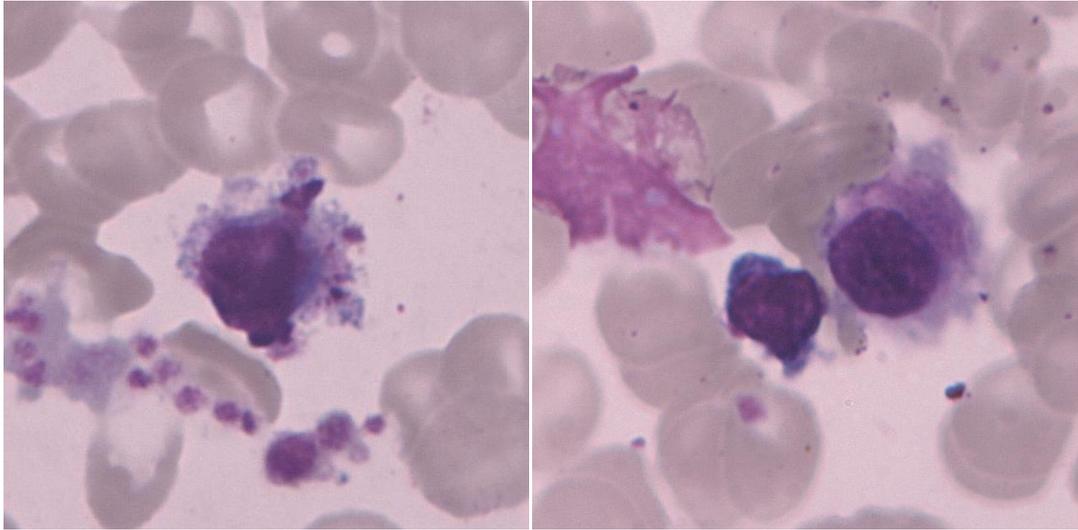


Illustration 19 : Micromégacaryocytes (Objectif x100)

Hypolobulation nucléaire

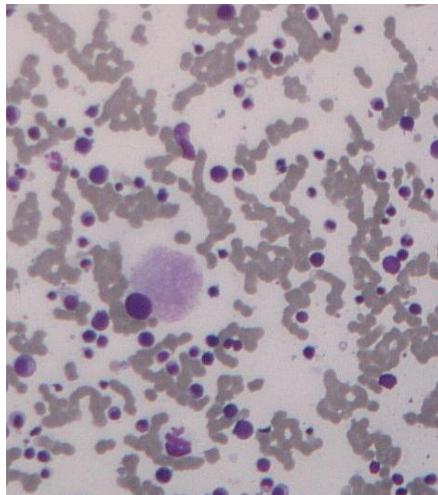


Illustration 20 : Mégacaryocyte monolobé (type 5q-) (Objectif x10).

Multinucléation

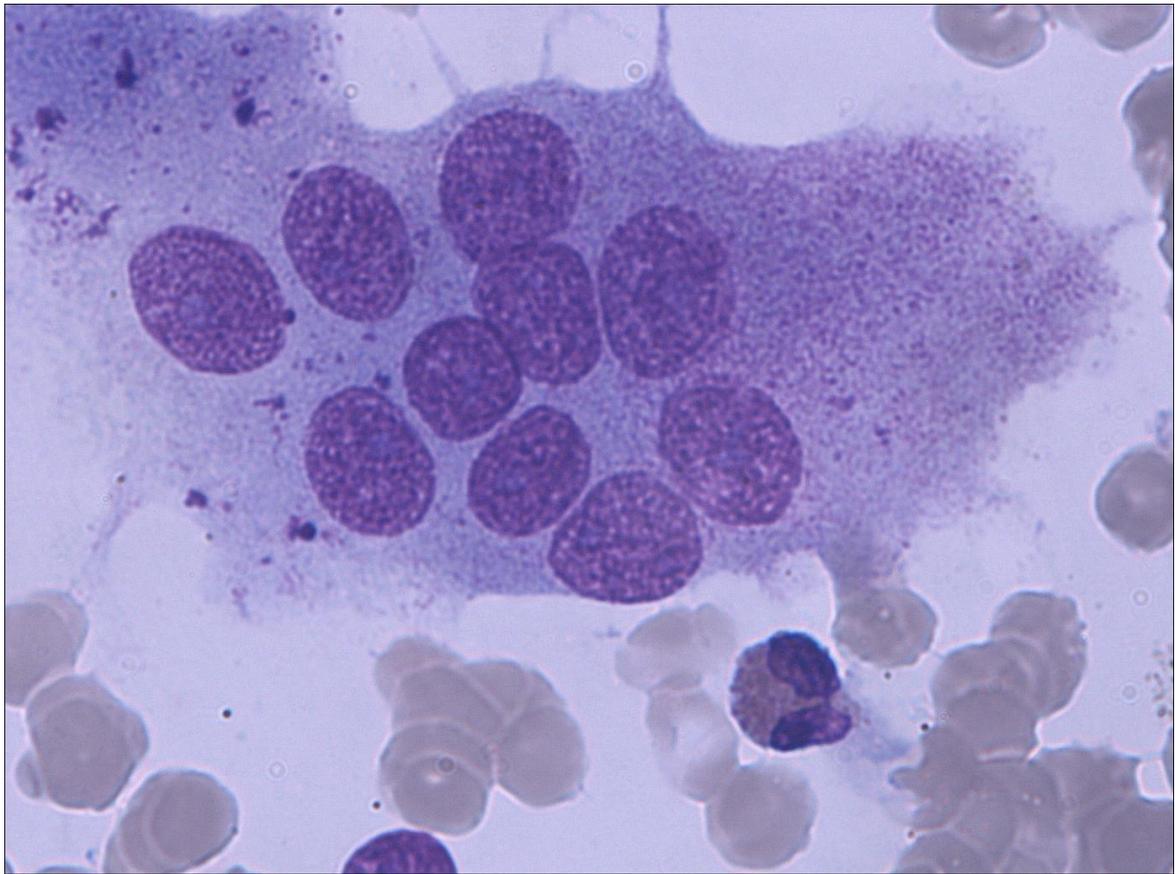


Illustration 21 : Mégacaryocyte multinucléé (Objectif x100).

NB : l'OMS décrit le mégacaryocyte normal comme uninucléé, à noyau lobé.

Le Groupe Français des Myélodysplasies a proposé une grille de quantification de la dysmyélopoïèse. Proposée dans les années 90 par G. Flandrin, cette grille a été revue et simplifiée. Pour une étude correcte des critères cytologiques à partir de la moelle, il est recommandé d'examiner au moins 30 mégacaryocytes, 200 cellules de la lignée érythroblastique et 200 cellules de la lignée granuleuse. Le compte de blastes doit être effectué sur 500 cellules. 10 % des cellules d'une lignée doivent présenter des anomalies morphologiques pour que la lignée soit considérée de manière significative comme dysplasique. A partir de 50% des cellules atteintes, on parle de forte dysplasie.

Lignée mégacaryocytaire	Absente/Présente		
Dysmégacaryopoïèse			
Micromégacaryocytes	0	1	2
Mégacaryocytes bi-, tri- ou multinucléés (noyaux séparés)	0	1	2
Mégacaryocytes hypolobés (type 5q- et autres)	0	1	2
Anomalies cytoplasmiques (tous types : vacuoles, coloration, etc... Préciser en commentaire)	0	1	2
Dysmégacaryopoïèse > 10 % (si aucune des anomalies ci-dessus > 10 %)	0	1	2
Lignée érythroblastique	Absente/Présente		
Dysérythropoïèse			
Anomalies nucléaires (irrégularités, multinucléarité, gigantisme)	0	1	2
Anomalies cytoplasmiques (défaut d'hémoglobination,...)	0	1	2
Macroérythroblastes – mégaloblastes	0	1	2
Sidéroblastes en couronne > 15 %	0	1	2
Dysérythropoïèse > 10 % (si aucune anomalie ci-dessus > 10 %)	0	1	2
Lignée granuleuse	Absente/Présente		
Dysgranulopoïèse/Anomalies nucléaires			
Défaut de segmentation (tous types : pseudo Pelger, bissac ou autre hyposegmentation)	0	1	2
Condensation anormale de la chromatine	0	1	2
Autres anomalies nucléaires (tous autres types dont binucléarité, à préciser en commentaire)	0	1	2
Dysgranulopoïèse/Anomalies cytoplasmiques			
Hypogranularité – agranulaire (grains faiblement ou non visibles)	0	1	2
Hypergranularité (granulations azurophiles)	0	1	2
Persistance de la basophilie (corps de Döhle, etc...)	0	1	2
Corps d'Auer	Absence/Présence		
Autres anomalies cytoplasmiques (tous autres types, dont vacuoles, grains type Chediak-Higashi, ou autres (à préciser en commentaire)	0	1	2
Dysmyélopoïèse sur d'autres cellules : éosinophiles, basophiles, mastocytes, monocytes,...	0	1	2
Dysgranulopoïèse > 10 % (si aucune des anomalies ci-dessus > 10 %)	0	1	2
<i>Etude d'au moins 30 mégacaryocytes, 200 érythroblastes, 200 éléments de la lignée granuleuse</i>			
<i>0 : < 10 % ; 1 : > 10 % ; 2 : > 50 %</i>			

Tableau 1 : Grille de quantification de la dysplasie proposée par le GFM.

6.5 Cytochimie

La coloration de Perls est une coloration au ferrocyanure de potassium qui entraîne en milieu acide la formation d'un précipité de ferrocyanure ferrique de couleur bleu-vert en présence de fer. Cette coloration permet la mise en évidence de la présence de fer dans les mitochondries sous la forme de ponctuations bleu-vert au niveau périnucléaire des érythroblastes [4] [5].

Cette coloration permet la mise en évidence de sidéroblastes classés en 3 types :

- le sidéroblaste de type I : présence de 1 à 4 grains ;

- le sidéroblaste de type II : présence de plus de 5 grains sur moins d'un tiers du périmètre nucléaire ;

- le sidéroblaste de type III ou sidéroblaste en couronne : présence de plus de 5 grains répartis sur plus d'un tiers du périmètre nucléaire.

7. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Le diagnostic des SMD reste l'un des plus difficiles, dans la mesure où la présence d'une dysplasie peut exister dans d'autres circonstances non clonales. Contrairement à une dysmyélopoïèse permanente et « réfractaire » aux traitements, des causes souvent secondaires sont à évoquer [2].

La cause la plus fréquente de dysplasie et responsable d'une ou plusieurs cytopénies est la carence en vitamine B12/folates, ou encore une chimiothérapie interférant avec le métabolisme des folates (méthotrexate...) [1] [2]: dans ce cas, la dysplasie est assez caractéristique au niveau de la dysgranulopoïèse avec des signes « mégalo-blastiques », c'est-à-dire des cellules de grande taille (caractéristique particulièrement visible sur les métamyélocytes). On retrouve alors des polynucléaires neutrophiles à noyau hypersegmenté, des métamyélocytes de grande taille avec un noyau allongé à chromatine fine (noyau rubané). Il n'y a pas de dégranulation. La lignée érythroblastique est hyperplasique, avec prédominance des formes immatures (proérythroblastes et érythroblastes basophiles), donnant un aspect de « moelle bleue » à faible grossissement. Les érythroblastes sont de taille augmentée à chromatine « perlée ». Il n'y a pas d'excès de blastes.

D'autres causes de dysmyélopoïèse sont à éliminer : l'exposition à des métaux lourds tels que l'arsenic, les infections virales (notamment Parvovirus B19 et l'érythroblastopénie), l'anémie aplasique, l'anémie congénitale dysérythropoïétique, certains immunosuppresseurs (mycophénolate), mais aussi les chimiothérapies anticancéreuses et les facteurs de croissance granulocytaire.

Ces causes non clonales de dysmyélopoïèse ont en commun leur réversibilité. L'évaluation d'une dysplasie doit tenir compte de la clinique et des thérapeutiques avant de poser un diagnostic de syndrome myélodysplasique. Dans les formes peu spécifiques, il est recommandé de contrôler le caractère chronique de la dysplasie avec un deuxième myélogramme à 3 mois d'intervalle.

8. CLASSIFICATION 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.

8.1 Classification FAB

En 1976, le groupe Franco-Américano-Britannique (FAB) publie une classification concernant les LAM, mais également les SMD : cette publication reprend les données de 150 patients atteints de SMD et LAM, et met en évidence le fait que tous les patients atteints de SMD ne transforment pas en LAM, mais décèdent de complications liées à l'insuffisance médullaire. Avant cette classification, les SMD étaient généralement classés comme état pré-leucémique uniquement, sans distinction. Le groupe FAB parle alors de "désordres dysmyélopoïétiques" [6].

En 1982, la classification FAB reprend ces données et a commencé à classer les SMD en différentes entités. La classification FAB a permis d'étudier aux niveaux cytologique, génétique et clinique les SMD, et ainsi de progresser sur la connaissance et la prise en charge de ces pathologies.

Elle propose des recommandations concernant l'évaluation des SMD en fonction des lignées atteintes par la dysplasie et du pourcentage de blastes dans le sang et la moelle osseuse.

L'efficacité de cette classification a par la suite été testée et validée par différents groupes et elle est ainsi devenue la référence pour le diagnostic et le pronostic des SMD.

Au départ, la classification FAB ne décrivait que 2 classes : l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) et la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Par la suite, 3 autres classes ont été ajoutées : l'anémie réfractaire (AR), anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS), et l'anémie réfractaire avec excès de blastes en cours de transformation (T-AREB).

Catégorie	Dysplasie	% de blastes médullaires	% de blastes sanguins
Anémie réfractaire (AR)	Erythroblastique	< 5	< 1
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	Erythroblastique	< 5	< 1
Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB)	Au moins 2 lignées	5-20	< 5
Anémie réfractaire avec excès de blastes en cours de transformation (T-AREB)	Généralement au moins 2 lignées	21-30	≥ 5
Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC)	Variable ; Monocytes ≥ 1G/L	< 20	

Tableau 2 : Classification FAB des SMD.

8.2 Classification OMS

En 1997, au sein de l'OMS, les hématologues et hématopathologistes ont été concertés pour établir une classification des néoplasies hématopoïétiques et lymphoïdes. Elle reprend les principes de la classification FAB, mais prend en compte les connaissances cliniques et biologiques récentes pour une meilleure approche pronostique [6].

La classification OMS représente un consensus sur les SMD. Introduite en 2001, elle a été revue en 2008, intégrant les données les plus récentes.

Les critères pris en compte par la classification OMS 2008 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 éventuelle de corps d'Auer ;
- la présence d'une anomalie cytogénétique particulière.

Les seuils de cytopénies retenus par la classification OMS 2008 sont ceux recommandés par l'IPSS (International Prognosis Scoring System) :

- hémoglobine < 10 g/dL ;
- polynucléaires neutrophiles < 1,8 G/L ;
- plaquettes < 100 G/L.

Les critères majeurs restent les critères cytologiques et/ou cytogénétiques pour le diagnostic des SMD, y compris lorsque les cytopénies restent peu marquées.

Il faut noter qu'il n'y a pas forcément de concordance entre la cytopénie et la lignée dysplasique.

Il est possible d'observer dans les SMD une augmentation du nombre de blastes dans le sang et/ou dans la moelle osseuse, mais ces taux doivent rester inférieurs à 20 %, seuil à partir duquel la pathologie doit être classée en leucémie aiguë, bien qu'un pourcentage de blastes supérieur à 20 % ne représente pas un critère absolu pour traiter les patients comme pour une leucémie aiguë : la décision de traitement comme SMD ou LAM prend en compte différents critères tels que l'âge, les antécédents de SMD, l'évaluation clinique globale, la vitesse de progression (à noter que ces critères sont les mêmes pour les patients avec 30 % de blastes) [2].

Maladie	Caractéristiques sanguines	Caractéristiques médullaires
Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU) : Anémie réfractaire (AR) Neutropénie réfractaire (NR) Thrombopénie réfractaire (TR)	Cytopénie unique ou bicytopénie ¹ Absence ou rares blastes (<1 %)²	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 érythroblastique uniquement < 5 % de blastes
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée	Cytopénie(s) Absence ou rares blastes (< 1 %)² Pas de corps d'Auer Monocytes < 1 G/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 blastes² Absence de corps d'Auer Monocytes < 1 G/L	Dysplasie uni- ou multilignée 5 à 9 % de blastes² Absence de corps d'Auer
Anémie réfractaire avec excès de blastes de type 2 (AREB-2)	Cytopénie(s) 5 à 19 % de blastes +/- présence de corps d'Auer² Monocytes < 1 G/L	Dysplasie uni- ou multilignée 10 à 19 % de blastes +/- présence corps d'Auer²
Syndrome myélodysplasique inclassable (SMD-I)	Cytopénies ≤ 1 % de blastes²	Dysplasie marquée mais < 10 % 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 rares blastes (≤ 1 %)	Nombre de mégacaryocytes normal à 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 sans cytopénie 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-1. 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 et < 5 % de myéloblastes dans le sang et < 10 % de myéloblastes dans la moelle doivent être classés en ARFB-2.

Tableau 3 : Caractéristiques sanguines et médullaires dans les SMD selon la classification OMS 2008 [2].

8.2.1 Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU)

Cette catégorie regroupe les SMD suivants :

- anémie réfractaire ;
- neutropénie réfractaire ;
- thrombopénie réfractaire.

Bien que l'Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne (ARS) soit aussi caractérisée par une dysplasie unilignée, cette pathologie est considérée comme une entité à part [2].

Les bicytopénies réfractaires peuvent être incluses dans cette catégorie si une seule lignée est dysplasique.

En cas de pancytopénie réfractaire avec une seule lignée dysplasique, il est alors recommandé de classer la pathologie en SMD inclassable.

Dans la majorité des cas, la lignée dysplasique correspond au type de cytopénie (par exemple anémie avec dysplasie érythroblastique...), mais parfois, des discordances peuvent être observées.

La présence de blastes dans le sang permet d'exclure le diagnostic de CRDU :

- si le pourcentage de blastes dans le sang reste $< 1\%$, on parle de CRDU ;
- si le pourcentage de blastes est de 1% dans le sang, avec $< 5\%$ de blastes dans la moelle sur 2 évaluations, la pathologie devrait être classée comme SMD-I ;
- si le pourcentage de blastes dans le sang est de 2 à 4% , avec $> 5\%$ de blastes dans la moelle, la pathologie doit être classée comme AREB-1.

Les patients concernés par ces dernières caractéristiques sont rares et nécessitent un suivi régulier pour surveiller l'évolution du pourcentage de blastes.

Les CRDU représentent 10 à 20% des SMD. L'âge médian est de $65-70$ ans et le sex-ratio est de 1 .

La grande majorité des CRDU sont des anémies réfractaires. Les cas de neutropénie réfractaire et de thrombopénie réfractaire sont rares. Aussi, leur diagnostic doit être réalisé avec grande précaution.

Les symptômes retrouvés sont liés aux cytopénies.

Dans le cas de l'anémie réfractaire, les hématies sont généralement normochromes, normocytaires ou macrocytaires. En général, on retrouve une anisochromie ou un dimorphisme avec une population d'hématies hypochromes. L'anisocytose et la poïkylocytose sont plus ou moins marquées. Les comptes de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes sont généralement normaux qualitativement et quantitativement, bien qu'un certain degré soit de neutropénie, soit de thrombopénie puisse exister. La moelle osseuse est généralement hyperplasique à cause de l'augmentation du nombre de précurseurs érythroïdes,

mais peut être de densité normale ou hypoplasique. Les précurseurs érythroïdes médullaires peuvent être diminués ou nettement augmentés. La dysérythropoïèse est variable (de légère à modérée) : elle se manifeste principalement par des altérations nucléaires à type de bourgeonnement ou de pont internucléaire, caryorrhexis, multinucléarité, et anomalie de type mégaloïde ; les altérations cytoplasmiques comprennent la vacuolisation. Les sidéroblastes en couronne peuvent être présents mais à un pourcentage inférieur à 15 %. Les lignées mégacaryocytaire et granuleuse peuvent présenter de la dysplasie mais restant minime (< 10 % pour chaque lignée) [2].

La neutropénie réfractaire est caractérisée par une lignée granuleuse dysplasique de manière significative (> 10 % des cellules de la lignée sont dysplasiques dans le sang ou la moelle). Les principales caractéristiques de la dysplasie sont une hypolobulation nucléaire ou une hypogranularité. Les neutropénies secondaires à la prise de médicaments, à une exposition toxique, à une infection, auto-immunes ou autre doivent être exclues [2].

La thrombopénie réfractaire est caractérisée par la présence de dysplasie significative au niveau des mégacaryocytes : hypolobulation, binucléarité ou multinucléarité, micromégacaryocyte sont les critères les plus fiables et reproductibles. Le nombre de mégacaryocytes peut être augmenté ou diminué. La distinction avec une thrombopénie auto-immune peut être très difficile cliniquement et morphologiquement. L'apport de la cytogénétique peut être très intéressant dans cette distinction.

Les anomalies cytogénétiques sont observées dans plus de 50 % des cas d'anémie réfractaire. Plusieurs anomalies cytogénétiques clonales peuvent être observées et donc utiles pour établir le diagnostic d'anémie réfractaire. Ces anomalies ne sont pas spécifiques, mais les plus fréquemment associées aux anémies réfractaires sont la délétion du bras long du chromosome 20 (del(20q)), la trisomie 8, et des anomalies des chromosomes 5 et/ou 7. Le nombre de cas rapportés de neutropénies réfractaires et de thrombopénies réfractaires est trop faible pour pouvoir tirer des conclusions, bien que la del(20q) a été rapportée dans la thrombopénie réfractaire [2].

L'évolution clinique de ce type de pathologie est prolongée. Une étude rapporte une médiane de survie de 66 mois en cas d'anémie réfractaire et le pourcentage de progression à 5 ans était de 2 % [7]. Dans une autre étude, la médiane de survie chez les patients de plus de 70 ans atteints d'anémie réfractaire, d'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne, et de syndrome 5q- n'était pas significativement différente de celle de la population générale [8]. Environ 90 à 95 % des patients atteints d'anémie réfractaire ont un score IPSS bas ou intermédiaire. Environ 80 à 85 % ont un profil cytogénétique de bon pronostic ou

de pronostic intermédiaire. La plupart des patients atteints de thrombopénie réfractaire ont un score IPSS bas, et 90 % des patients vivent au-delà de 2 ans.

8.2.2 Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)

Il s'agit d'un SMD caractérisé par une anémie, une dysplasie de la lignée érythroblastique et la présence de sidéroblastes en couronne supérieurs à 15 % des érythroblastes médullaires. Les autres lignées cellulaires ne présentent pas de dysplasie significative. Le pourcentage de myéloblastes reste strictement inférieur à 5 % de l'ensemble des cellules nucléées médullaires. Le pourcentage de blastes sanguin est strictement inférieur à 1 %. Les causes secondaires de sidéroblastes en couronne doivent être exclues [2].

Les ARS représentent 3 à 11 % des SMD. La médiane d'âge est de 60 à 73 ans. Le sex ratio est de 1.

Les sidéroblastes en couronne sont des précurseurs érythroïdes présentant une accumulation de fer au niveau des mitochondries. Des défauts primaires de la synthèse de l'hème (par exemple des défauts en δ -aminolévulinate synthétase dans les anémies sidéroblastiques héréditaires liées à l'X) peuvent être exclues du fait de la non diminution dans les ARS en protoporphyrine IX, le produit final de la synthèse des porphyrines. Il n'a pas été retrouvé de mutations acquises dans les gènes impliqués dans la synthèse de l'hème dans les ARS. Un défaut primaire dans le métabolisme du fer est suspecté : ce défaut pourrait être causé par des mutations somatiques ou des délétions dans l'ADN nucléaire ou mitochondrial. Des mutations somatiques ponctuelles dans l'ADN mitochondrial ont été retrouvées au niveau de la moelle osseuse de certains patients atteints d'ARS, mais le lien de causalité reste à établir. Les cellules souches dans les ARS ont une capacité à former des colonies érythroïdes *in vitro* diminuée et présentent des dépôts de fer anormaux à des stades très précoces du développement érythroïde. Cela démontre une anomalie clonale au niveau des cellules souches se manifestant par une anomalie du métabolisme du fer au niveau de la lignée érythroïde, aboutissant à une érythropoïèse inefficace.

La moelle osseuse et le sang sont les principaux sites atteints. Le foie et la rate peuvent montrer des signes de surcharge en fer.

Les symptômes cliniques résultent de l'anémie qui est généralement modérée. Certains patients peuvent avoir une thrombopénie ou une neutropénie associée. Des symptômes de surcharge en fer peuvent apparaître.

Les patients présentent classiquement une anémie normochrome macrocytaire ou normocytaire. Sur le frottis sanguin, une double population d'hématies peut être

observée avec une population majoritaire normochrome, et une population minoritaire hypochrome. Il n'est pas retrouvé de blastes dans le sang. Au myélogramme, on retrouve une lignée érythroblastique hyperplasique avec dysérythropoïèse (lobulation nucléaire et présence de caractéristiques de type mégaloblastoïde). Les lignées mégacaryocytaire et granuleuse ne montrent pas de dysplasie significative (<10 % de formes dysplasiques). Des macrophages chargés en hémossidérine peuvent être observés. Le pourcentage de myéloblastes est inférieur à 5 % des cellules nucléées. Le pourcentage de sidéroblastes mis en évidence après coloration de Perls est d'au moins 15 % des érythroblastes. Les sidéroblastes en couronne sont souvent retrouvés dans d'autres types de SMD : c'est le cas de certaines AREB ou CRDM ; ces patients ont une survie diminuée par rapport aux patients présentant une ARS.

Il existe d'autres causes non néoplasiques de présence de sidéroblastes telles que l'alcool, des toxiques (benzènes, plomb), des médicaments (isoniazide), l'administration de zinc, des déficits en cuivre. Les anémies sidéroblastiques congénitales doivent également être exclues [2].

L'immunophénotypage retrouve des anomalies d'expression au niveau de la lignée érythroblastique.

Des anomalies cytogénétiques clonales sont retrouvées dans 5 à 20 % des ARS, généralement impliquant un seul chromosome.

Environ 1 à 2 % des cas d'ARS évoluent vers une LAM. La survie globale rapportée est de 69 à 108 mois.

8.2.3 Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée

Il s'agit d'une catégorie de SMD dans laquelle on retrouve une ou plusieurs cytopénies et de la dysplasie sur au moins 2 lignées myéloïdes. Le pourcentage de blastes dans le sang est inférieur à 1 % et dans la moelle inférieur à 5 %. Il n'y a pas de corps d'Auer et les monocytes sont inférieurs à 1 G/L dans le sang [2].

Les cas avec dysplasie multilignée et 1 à 4 % de blastes médullaires, sans corps d'Auer, mais 2 à 4 % de blastes dans le sang doivent être classés comme AREB-1.

Les cas jusqu'à 1 % de blastes dans le sang, moins de 5 % de blastes dans la moelle, mais avec présence de corps d'Auer doivent être classés comme AREB-2.

Les cas avec 1 % de blastes dans le sang, moins de 5 % de blastes dans la moelle et sans corps d'Auer doivent être classés comme SMD-I.

Certains cas de CRDM présentent plus de 15 % de sidéroblastes en couronne. Ces cas ne sont pas différenciés dans la classification OMS 2008.

Les CRDM apparaissent en moyenne chez des sujets de 70 ans, avec une légère prédominance chez l'homme. Le pic d'incidence chez l'homme est de 70-74 ans et chez la femme de 75 à 79 ans.

Les CRDM représentent environ 30 % des SMD.

La plupart des patients présentent des signes cliniques en rapport avec les cytopénies.

Concernant le myélogramme, la moelle est généralement hypercellulaire. La dysplasie au niveau des polynucléaires neutrophiles est caractérisée par une hypogranulation et/ou une hyposegmentation, avec condensation marquée de la chromatine (formes pseudo-Pelger-Huët). L'hyposegmentation nucléaire peut apparaître comme 2 lobes nucléaires condensés, connectés par un brin fin de chromatine (forme type « pince-nez »), ou noyau non lobé très condensé. Dans certains cas, une hyperplasie érythroïde peut être retrouvée. [2].

Les anomalies cytogénétiques retrouvées incluent la trisomie 8, la monosomie 7, la del(7q), la monosomie 5, la del(5q) ou la del(20q), ainsi que des caryotypes complexes pouvant être retrouvés chez plus de 50 % des patients avec une CRDM.

L'évolution clinique est variable. La majorité de ces patients ont un score IPSS intermédiaire. La fréquence de transformation en LAM à 2 ans est d'environ 10 %. La médiane de survie globale est d'environ 30 mois. Les patients avec des caryotypes complexes ont une survie similaire aux patients présentant une AREB.

8.2.4 Anémie réfractaire avec excès de blastes

L'AREB est un SMD caractérisé par la présence de 5 à 19 % de myéloblastes dans la moelle osseuse ou 2 à 19 % de blastes dans le sang. Du fait des différences de survie et d'évolution vers une LAM, il existe deux catégories d'AREB : l'AREB-1 définie par 5 à 9 % de blastes dans la moelle osseuse ou 2 à 4 % de blastes dans le sang, et l'AREB-2 caractérisée par 10 à 19 % de blastes dans la moelle osseuse ou 5 à 19 % de blastes dans le sang. La présence corps d'Auer qualifie un cas comme AREB-2, quelque soit le pourcentage de blastes [2].

Cette classe de SMD touche des sujets de plus de 50 ans et représente environ 40 % des SMD.

L'étiologie est inconnue. L'exposition à des toxines environnementales telles que les pesticides, les dérivés du pétrole et certains métaux lourds ainsi que le tabagisme augmentent le risque d'apparition d'AREB.

La plupart des patients présentent initialement des signes cliniques en rapport avec les cytopénies.

On retrouve fréquemment sur le frottis sanguin des anomalies des 3 lignées myéloïdes, telles qu'une aniso-poïkilocytose, des plaquettes géantes ou hypogranulaires, des anomalies de segmentation ou de granulation cytoplasmique des polynucléaires. La présence de blastes circulants est fréquente. La moelle est généralement de densité augmentée. Le degré de dysplasie peut varier. La lignée érythroblastique peut être hyperplasique avec des anomalies de type macrocytose ou mégalo-blastoïde. Les mégacaryocytes ont tendance à être regroupés. Les AREB à moelle hypocellulaire sont plus rares et ne représentent qu'un faible pourcentage des SMD à moelle hypocellulaire (qui sont généralement des CRDU ou des CRDM).

L'immunophénotypage montre une augmentation du nombre de cellules CD34+ et/ou CD117+ ; ces cellules sont CD38+, HLA-DR+, CD13+, CD33+. L'expression asynchrone de marqueurs granulocytaires de maturation (CD15, CD11b, et/ou CD65) est souvent retrouvée au niveau de la population blastique. L'expression aberrante par les blastes du CD7 est retrouvée dans environ 20 % des cas. L'expression du CD56 est retrouvée dans 10 % des cas. L'expression de marqueurs lymphoïdes est rare.

La présence d'anomalies cytogénétique est variable (de 30 à 50 %). Il s'agit de trisomie 8, de monosomie 5, de del(5q), de monosomie 7, de del(7q) et de del(20q). Des caryotypes complexes sont aussi représentés.

Les AREB sont généralement caractérisées par une insuffisance médullaire progressive avec augmentation des cytopénies. Environ 25 % des cas d'AREB-1 et 33 % des cas d'AREB-2 progressent vers une LAM. Les autres patients décèdent des conséquences de l'insuffisance médullaire. La médiane de survie globale est de 16 mois pour les AREB-1 et de 9 mois pour les AREB-2. L'expression du CD7 est associée à un mauvais pronostic. Les patients AREB-2 avec 5 à 19 % de blastes dans le sang ont une médiane de survie de 3 mois (comme pour les LAM secondaires à un SMD). Les cas classés en AREB-2 uniquement sur la présence de corps d'Auer ont un pronostic similaire aux cas d'AREB-2 avec 2 à 4 % de blastes dans le sang (survie globale de 12 mois).

8.2.5 SMD avec délétion isolée du bras long du chromosome 5 ou syndrome 5q-

Les SMD avec del(5q) isolée sont caractérisés par une anémie avec ou sans autre cytopénie et/ou thrombocytose, et comme seule anomalie cytogénétique la

del(5q). Le pourcentage de blastes est inférieur à 5 % dans la moelle et inférieur à 1 % dans le sang. Les corps d'Auer sont absents [2].

Ce type de SMD est plus fréquent chez la femme, avec un âge médian de 67 ans.

Cette del(5q) entraîne la perte d'un gène suppresseur de tumeur : Early Growth Response (*EGR1*) et du gène α -caténine (*CTNNA1*), ainsi que d'autres gènes encore non identifiés en 5q32. Le gène *RPS14* a été proposé comme candidat dans le syndrome 5q-, supposant un défaut de fonction de protéine ribosomique comme à l'origine du syndrome. Le gène codant pour la « secreted protein acidic rich in cystein » (*SPARC*) ou ostéonectine, gène potentiellement suppresseur de tumeur situé en 5q31.3-5q32 a également été proposé.

Les symptômes cliniques sont liés à l'anémie qui est souvent sévère. La thrombocytose est présente chez un tiers à la moitié des patients, alors que la thrombopénie est inhabituelle.

L'anémie est macrocytaire avec des plaquettes normales ou augmentées.

Le myélogramme révèle une moelle de densité augmentée ou normale, et fréquemment une hypoplasie érythroblastique. Les mégacaryocytes sont augmentés en nombre et ont une taille normale à légèrement diminuée avec un noyau hypolobé voire monolobé, caractéristique mais non spécifique du syndrome 5q-. La dysérythropoïèse et dysgranulopoïèse sont peu fréquentes.

La seule anomalie cytogénétique retrouvée est la del(5q). La taille et les points de cassure de cette délétion sont variables, mais cette délétion comprend la région minimale 5q31-5q33. Si une autre anomalie cytogénétique est associée (à l'exception de la perte du Y), la pathologie ne doit pas être classée dans cette catégorie. Il a été rapporté des cas avec mutation *JAK2* V617F concomitante qui doit alors être précisée au diagnostic [2].

La survie globale est de 145 mois, avec une évolution vers une LAM dans moins de 10 % des cas. Les cas avec d'autres anomalies cytogénétiques ou avec un excès de blastes ont un plus mauvais pronostic et sont exclus de cette catégorie.

Le traitement par Lénalidomide (analogue du Thalidomide), a montré de bons résultats dans cette catégorie de SMD, ainsi que dans les SMD avec del(5q) associée à d'autres anomalies cytogénétiques : l'indépendance transfusionnelle a pu être atteinte chez deux tiers des patients, avec disparition du clone anormal.

8.2.6 Syndromes myélodysplasiques inclassables

Les SMD inclassables (SMD-I) sont des SMD pour lesquels il manque certaines caractéristiques pour être classés dans une autre catégorie. Il n'y a pas de

caractéristique morphologique [2]. Trois situations permettent de classer un SMD dans cette catégorie :

- les patients avec les caractéristiques d'une CRDU ou CRDM mais avec 1 % de blastes dans le sang ;
- les SMD avec dysplasie unilignée associés à une pancytopénie (la catégorie CRDU concernant les mono- ou bicytopenies) ;
- les cas avec cytopénie persistante, présentant jusqu'à 1 % de blastes dans le sang et moins de 5 % de blastes médullaires, avec une dysplasie non significative et avec des anomalies cytogénétiques considérées comme présomptives d'un SMD sont classés dans cette catégorie.

Ces patients doivent être suivis pour surveiller une évolution vers une catégorie plus spécifique de SMD.

8.2.7 Syndromes myélodysplasiques atypiques et formes frontières

8.2.7.1 Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (ARS-T)

L'ARS-T associe des caractéristiques des SMD et SMP et est considérée depuis 2001 comme une forme frontière entre SMD et SMP. Dans la classification OMS 2008, elle constitue une entité provisoire appartenant aux formes inclassables de SMD/SMP. Les critères diagnostiques de cette pathologie sont ceux d'une ARS avec dysmégacaryopoïèse, et thrombocytose (plaquettes > 450 G/L) [2].

Critères diagnostiques (OMS 2008)
1) Anémie réfractaire avec dysplasie érythroïde et sidéroblastes en couronne (> 15 %)
2) Plaquettes > 450 G/L
3) Grands mégacaryocytes anormaux
4) Absence de del(5q), t(3;3)(q21q26), inv(3)(q21q26)
Anomalies moléculaires
TET2 muté dans environ 20 % des cas
JAK2 V617F ou MPL W515K/L mutés dans 60-80 % des cas
Anomalies d'expression d'ALS2, ABCB7, CXCR4, CDC2L5 et PSIP15

Tableau 4 : Caractéristiques des ARS-T [2] [9].

8.2.7.2 La leucémie myélomonocytaire chronique

La Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC) est un syndrome frontière entre syndromes myéloprolifératif et myélodysplasique [8].

Les caractéristiques de cette pathologie sont :

- une monocytose sanguine persistante > 1 G/L ;
- l'absence de chromosome Philadelphie ou du gène de fusion *BCR/ABL1*.
- l'absence de réarrangement de *PDGFRA* ou *PDGFRB* (doivent être exclus dans les cas avec hyperéosinophilie)
- moins de 20 % de blastes dans le sang et la moelle (à noter que les promonocytes sont comptés comme des blastes) ;
- la présence de dysplasie sur au moins une lignée myéloïde ; en l'absence de dysplasie, si les autres critères sont respectés et qu'il existe une anomalie cytogénétique clonale, ou si la monocytose persiste depuis au moins 3 mois et que les autres causes de monocytose (telles que infection, inflammation ou néoplasies) ont été exclues.

La LMMC est divisée en deux groupes en fonction du pourcentage de blastes et promonocytes sanguins ou médullaires:

- jusqu'à 9 % de blastes : LMMC-1 ;
- de 10 à 20 % de blastes : LMMC-2.

8.2.7.3 Syndromes myélodysplasiques avec myélofibrose

Environ 10 % des patients atteints d'un SMD présentent un degré variable de fibrose réticulinique [2].

La myélofibrose peut être retrouvée dans les SMD secondaires à une chimiothérapie, les syndromes myéloprolifératifs et en cas de pathologies dyshématopoïétiques réactionnelles (myélopathie liée à l'infection par le VIH).

Du fait d'un manque de consensus concernant le degré de fibrose nécessaire pour caractériser un cas comme SMD avec myélofibrose (SMD-F), il est difficile de déterminer si la myélofibrose est un paramètre pronostic indépendant. Selon l'OMS, la définition d'un SMD-F nécessite la présence d'une fibrose réticulinique diffuse grossière avec ou sans collagénisation concomitante, avec dysplasie touchant au moins 2 lignées cellulaires.

La plupart des SMD-F sont des AREB (AREB-F).

Dans ces cas, le myélogramme ne suffit pas au diagnostic. Une biopsie ostéomédullaire est alors nécessaire.

8.2.7.4 Syndromes myélodysplasiques avec clone HPN (Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne)

L'HPN est une maladie causée par une mutation au niveau d'une cellule souche du gène *Pig-A*, entraînant la perte d'un groupement de protéines membranaires, notamment les CD55 et CD59, permettant le diagnostic par cytométrie en flux [10].

Elle est caractérisée par une hémolyse intra-vasculaire, des thromboses veineuses et une aplasie médullaire.

Les hématies vont présenter une hypersensibilité au complément par perte du CD59 qui inhibe l'effet de la voie terminale du complément. Les patients présentent une expansion oligoclonale de cellules T cytotoxiques, intervenant dans la survenue de l'aplasie médullaire [11].

Le traitement est avant tout symptomatique (transfusion de culots globulaires, allogreffe de cellules souches). Il existe aujourd'hui un anticorps monoclonal dirigé contre la fraction C5 du complément : l'eculizumab ou Soliris®.

Un clone HPN peut être mis en évidence chez des sujets sains, ainsi que dans plusieurs types d'hémopathies, y compris dans les SMD.

Les cytopénies sont les manifestations les plus fréquentes des SMD et certaines formes hypoplasiques sont indifférenciables des aplasies médullaires : c'est le cas dans environ 20 % des SMD (formes hypoplasiques avec caryotype normal et dysmyélopoïèse discrète).

Des clones HPN sont retrouvés dans environ 20 % des SMD, avec une association particulière avec les SMD avec signes d'insuffisance médullaire, soit les formes de faible de risque : le pronostic de l'association SMD-HPN est relativement favorable, mais reste controversé au sein des formes de SMD de faible risque [11].

La mise en évidence d'un clone HPN avec un SMD ne modifie pas significativement la prise en charge et ne constitue pas une indication à un traitement par eculizumab.

8.2.8 Syndromes myélodysplasiques de l'enfant

Les SMD chez l'enfant sont peu fréquents, représentant moins de 5 % des néoplasies hématopoïétiques chez les sujets de moins de 14 ans. Les SMD *de novo* ou primaires doivent être distingués des formes secondaires à une insuffisance médullaire congénitale ou acquise, ou à une chimiothérapie. Les SMD associés au syndrome de Down, qui représentent 20 à 25 % des cas de SMD chez l'enfant sont regroupés dans une entité à part : les leucémies myéloïdes liées au syndrome de Down [2].

8.3 Caryotype

La cytogénétique tient une place prépondérante dans l'évaluation des myélodysplasies au niveau du pronostic. Il existe des corrélations entre anomalies cytogénétiques, cytologie et clinique [2].

Des anomalies cytogénétiques clonales sont observées dans environ 50 % des cas de SMD.

Les SMD associés à une délétion du bras long du chromosome 5 (del(5q)) isolée apparaissent de manière primitive chez les femmes et sont caractérisés par la présence de mégacaryocytes hypolobés voire non lobés, une anémie réfractaire macrocytaire, un taux de plaquettes normal ou augmenté, et une évolution clinique favorable. Ce type de pathologie est maintenant reconnu comme une entité à part dans la classification OMS.

L'apparition d'une perte du bras court du chromosome 17 (del(17p)) est associée à des SMD ou des LAM avec des anomalies de type pseudo-Pelger-Huët et des neutrophiles vacuolés. Cette anomalie est caractérisée par des mutations de *TP53* et un mauvais pronostic. Elle est plus fréquente dans les SMD secondaires [2].

Les caryotypes complexes (au moins 3 anomalies) impliquent typiquement les chromosomes 5 (monosomie ou del(5q)) et/ou 7 (monosomie 7 ou del(7q)), et sont généralement associés à une évolution clinique défavorable.

De nombreuses autres anomalies cytogénétiques sont associées à des caractéristiques morphologiques :

- del(20q) isolée et implication des lignées érythroblastiques et mégacaryocytaires ;
- inv(3)(q21q26.2) et mégacaryocytes augmentés et anormaux (SMD et LAM).

Certaines anomalies cytogénétiques clonales ne sont pas des critères définitifs de SMD en l'absence de signes cytologiques de dysplasie : c'est le cas de la trisomie 8, de la perte du chromosome Y ou de la del(20q) comme seule anomalie. Les autres anomalies décrites dans le tableau 5 associées à une cytopénie persistante mais sans signe morphologique de dysplasie sont considérées comme critère présomptif de SMD. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet d'augmenter la sensibilité dans la détection de ces anomalies récurrentes, mais également dans le suivi des patients. La FISH peut avoir un intérêt également après plusieurs échecs de caryotypes, pour rechercher les anomalies de mauvais pronostic (anomalies du chromosome 7) ou de bon pronostic (del(5q) en cas d'anomalie cytologique évocatrice) [2].

Anomalie	SMD	t-SMD
Non équilibrée		
Trisomie 8*	10 %	
Monosomie 7 ou del(7q)	10 %	50 %
Monosomie 5 ou del(5q)	10 %	40%
del(20q)*	5-8 %	
-Y*	5 %	
i(17q) ou t(17p)	3-5 %	
Monosomie 13 ou del(13q)	3 %	
del(11q)	3 %	
del(12p) ou t(12p)	3 %	
del(9q)	1-2 %	
idic(X)(q13)	1-2 %	
Equilibrée		
t(11;16)(q23;p13.3)		3 %
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2 %
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1 %	
t(2;11)(p21;q23)	1 %	
inv(3)(q21;q26.2)	1 %	
t(6;9)(p23;q34)	1 %	
*La présence de ces anomalies comme seule anomalie cytogénétique, en l'absence de critère cytologique de dysplasie, n'est pas considérée comme critère définitif de SMD. Dans le cas de cytopénies persistantes d'origine indéterminée, les autres anomalies de ce tableau sont considérées comme critère présomptif de SMD en l'absence de caractéristique morphologique définitive.		

Tableau 5 : Anomalies chromosomiques récurrentes et leurs fréquences dans les SMD au diagnostic selon l'OMS [2].

Aujourd'hui, la cytogénétique est intégrée à part entière dans les scores pronostiques utilisés pour la décision thérapeutique des patients.

8.4 Facteurs pronostiques

8.4.1 Introduction

Le pronostic des patients atteint de SMD est très hétérogène, d'où le besoin d'établir des critères pronostiques afin d'établir un score permettant de mieux stratifier les différents patients et d'adapter la thérapeutique. De nombreux systèmes existent, les plus connus étant les systèmes IPSS (International Prognosis Scoring System) et WPSS (WHO classification-based Prognosis Scoring System).

8.4.2 Scores IPSS et IPSS révisé

L'IPSS (International Prognosis Scoring System) est le plus utilisé. Ce système, en place depuis 1997, prend en compte le pourcentage de blastes, le nombre de cytopénies et la cytogénétique. Il s'agit d'un système très reproductible et simple d'utilisation, mais ayant des limites, notamment concernant les patients avec un score pronostique faible [12].

Etabli à partir de l'étude de données européennes, américaines et japonaises, le score IPSS prend en compte le nombre de cytopénies, le pourcentage de blastes et les anomalies cytogénétiques. Il permet de distinguer 4 catégories de risque. Ce score est devenu la référence, utilisé en clinique pour la décision thérapeutique, ainsi qu'en recherche pour établir des groupes de patients homogènes au cours d'études cliniques. Il est limité aux SMD au moment du diagnostic, non traités préalablement et ne concerne pas les syndromes frontières entre myéloprolifératif et myélodysplasique.

Score	0	0,5	1	1,5	2
Pourcentage de blastes médullaires	0-4	5-10	-	11-20	21-29
Nombre de cytopénies ¹	0-1	2-3	-	-	-
Groupe cytogénétique de risque	Bas	Intermédiaire	Haut	-	-
Groupe de risque	Score				
Bas risque	0				
Risque intermédiaire 1	0,5-1				
Risque intermédiaire 2	1,5-2				
Haut risque	≥ 2,5				
¹ Plaquettes < 100 G/L ; Hémoglobine < 10 g/dL ; Polynucléaires Neutrophiles < 1,8 G/L					

Tableau 6 : Score IPSS

Risque bas	Risque intermédiaire	Risque haut
Normal -Y del(5q) del(20q)	Autres anomalies	Caryotype complexe Anomalies du chromosome 7

Tableau 7 : Anomalies chromosomiques prises en compte pour les scores IPSS et WPSS

Récemment, de nouveaux groupes cytogénétiques ont été définis. L'impact de variables additionnelles a été étudié sur des cohortes importantes de patients. De cette étude a été créé l'IPSS révisé (ou IPSSr) [13]. Ce nouveau score identifie 5 classes de risque. Le pourcentage de blastes prend une place toute particulière, spécialement en cas de faibles pourcentages (nouvelles classes de 0 à 2 % et de 3 à 4 % de blastes), impliquant une bonne reproductibilité inter-laboratoire dans ce compte. A l'inverse, il n'a pas été montré d'impact pronostique du pourcentage de blastes entre 11 et 30 %. De plus, il semble que l'importance des cytopénies plutôt que leur nombre soit d'importance pronostique. Concernant les catégories cytogénétiques, les anomalies du chromosome 7 ont été retirées du groupe très mauvais pronostic et sont intégrées aux groupes de pronostic intermédiaire (del(7q)) et mauvais (monosomie 7). Seuls les caryotypes complexes de plus de 3 anomalies sont classés dans la catégorie de très mauvais pronostic.

Il a été montré que le score IPSS-r permet une meilleure évaluation pronostique concernant la survie globale et le risque d'évolution vers une LAM par rapport au score IPSS, notamment pour les groupes intermédiaires 1 et 2 selon le score IPSS.

Catégorie cytogénétique	Très bon	Bon	Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
Anomalies cytogénétiques	-Y del(11q)	Normal del(5q) del(12p) del(20q) 2 anomalies cytogénétiques incluant la del(5q)	del(7q) Trisomie 8 Trisomie 19 i(17q) Autre anomalie isolée ou deux clones indépendants ou double anomalie (sans anomalie du 7)	-7 inv(3), t(3q), del(3q) Double anomalie incluant -7/del(7q) Complexe : 3 anomalies	Anomalies complexes > 3

Tableau 8 : Anomalies chromosomiques prises en compte pour le score IPSS-r.

Valeur pronostique	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogénétique	Très bon		Bon		Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
% de blastes médullaires	≤ 2		>2 et ≤ 5		5-10 %	> 10 %	
Hémoglobine	≥ 10		≥ 8 et < 10	< 8			
Plaquettes	≥ 100	≥ 50 et < 100	< 50				
Leucocytes	≥ 0,8	< 0,8					
Catégorie de risque	Score						
Très bas	≤ 1,5						
Bas	De 2 à 3						
Intermédiaire	De 3,5 à 4,5						
Haut	De 5 à 6						
Très haut	≥ 6,5						

Tableau 9 : Variables prises en compte dans l'établissement du score IPSS-r et catégories de risque

8.4.3 Score WPSS

Ce score donne un poids plus important à la cytogénétique. Il prend en compte la dépendance transfusionnelle et non les cytopénies, et s'intéresse à la catégorie de SMD selon l'OMS plutôt qu'au pourcentage de blastes. Ainsi la dysplasie multilignée a ici un intérêt dans le pronostic. Cinq catégories de risques sont identifiées selon le score WPSS. L'avantage de ce score est son utilisation à n'importe quel temps de la maladie, et pas uniquement au diagnostic, avant traitement. Le score WPSS pour un même patient peut donc être redéfini au cours de la pathologie, sans pour autant avoir de valeur dynamique [12].

Score	0	1	2	3
Type de SMD selon l’OMS	AR/ARS/5q-	CRDM/CRDM-RS	AREB-1	AREB-2
Caryotype	Bas	Intermédiaire	Haut	-
Transfusion ¹	non	oui	-	-
Groupes de risque	Score			
Très bas risque	0			
Bas risque	1			
Risque intermédiaire	2			
Haut risque	3-4			
Très haut risque	5-6			
¹ Besoin transfusionnel : au moins 1 transfusion toutes les 8 semaines pendant une période d’au moins 3 mois.				

Tableau 10 : Score WPSS

9. TRAITEMENT

9.1 Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique, visant à pallier aux cytopénies repose sur l’administration d’érythropoïétine (EPO) ou de culots érythrocytaires, et l’utilisation d’antibiothérapie à large spectre en cas d’infection suite à une neutropénie [3].

Dans les SMD de faible grade, lorsque les cytopénies restent modérées et asymptomatiques, l’abstention thérapeutique est de mise.

Lorsque l’anémie est symptomatique, il est recommandé d’instaurer un traitement par EPO pour maintenir un taux d’hémoglobine supérieur à 10-11 g/dL et de prévenir le recours aux transfusions de culots érythrocytaires. Le taux d’EPO sérique doit être inférieur à 500 UI/L, autrement la réponse au traitement est généralement faible. L’addition de G-CSF permet une meilleure efficacité du traitement par EPO. Par ailleurs, l’efficacité du G-CSF dans le traitement de la neutropénie n’est pas démontrée : il permet de corriger la neutropénie dans 2/3 des cas, mais son effet sur la diminution du risque infectieux n’a pas été démontré.

Un traitement chélateur du fer permet de lutter contre la surcharge en fer chez les patients régulièrement transfusés.

Les transfusions plaquettaires doivent être limitées aux thrombopénies profondes (plaquettes < 10 G/L) ou en cas de symptomatologie hémorragique.

9.2 Traitement à visée curative

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 [3].

9.3 Chimiothérapie

9.3.1 Cytarabine

Chez les patients à risque élevé ou intermédiaire-2, la chimiothérapie intensive permet d'obtenir 40 à 60 % de rémission complète (RC, soit normalisation de l'hémogramme et du myélogramme sur plusieurs prélèvements) d'une médiane de 10 à 12 mois, avec peu de RC très prolongée. Ces chiffres sont valables pour des patients âgés jusqu'à 60 à 65 ans [3].

La cytarabine 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 réponse partielle (résultats diminués en cas d'anomalie cytogénétique, et particulièrement en cas de caryotype complexe) [3].

9.3.2 Lénalidomide

Le lénalidomide (REVLIMID) est devenu le traitement de référence des patients atteints de SMD avec délétion du bras long du chromosome 5 isolée. Il s'agit d'un dérivé de la thalidomide. Chez ces patients avec un score IPSS faible ou intermédiaire-1, le pourcentage de réponse au traitement est de 65 % concernant l'anémie [3].

9.3.3 Agents déméthylants

La 5-azacytidine (VIDAZA) et la décitabine (DACOGEN) sont des agents hypométhylants. Ils sont utilisés chez les patients atteints de SMD de risque intermédiaire-2 ou élevé, non éligibles pour une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec un état général correct [3]. Il a été prouvé que le VIDAZA permet d'obtenir un bénéfice sur la survie chez ce type de patients.

LES MUTATIONS RECURRENTES OBSERVEES DANS LES GENES DU SPLICEOSOME

1. INTRODUCTION

De nouvelles techniques d'analyse du génome, plus résolutive que la cytogénétique, ont permis la mise en évidence d'anomalies génétiques dans les SMD : des anomalies épigénétiques et des gènes du spliceosome.

Les modifications épigénétiques conditionnent la structure de la chromatine et l'expression des gènes. Il s'agit de modifications chimiques responsables de l'état de transcription des gènes. Il existe deux mécanismes principaux de régulation épigénétique : la méthylation de l'ADN et la modification des histones. La méthylation de l'ADN s'effectue au niveau des îlots CpG, c'est-à-dire des Cytosines en amont d'une Guanine : cela entraîne une inhibition de la transcription.

Des anomalies de la méthylation ont été mises en évidence dans les SMD, entraînant la répression de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes régulateurs du cycle cellulaire, de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et de gènes de l'apoptose [14].

Une hyperméthylation aberrante dans les SMD est associée à un mauvais pronostic [14].

Des modifications des histones permettent également une régulation de l'expression des gènes par acétylation/désacétylation au niveau de lysines, favorisant l'expression des gènes, ou méthylation/déméthylation au niveau de lysines ou d'arginine, inhibant l'expression des gènes [14].

Des anomalies dans les gènes impliqués dans la modification de l'ADN (*TET2*) et des histones (*ASXL1* et *EZH2*) ont été mises en évidence, mais la pathogénèse reste encore inconnue [14].

Gènes	Fréquence	Fonction probable	Valeur pronostique
<i>TET2</i>	20-25 %	Conversion 5MC en 5HMC	Favorable ?
<i>EZH2</i>	6 %	Méthylation H3K27	Défavorable
<i>ASXL1</i>	10 %	Cofacteur du récepteur RAR	Défavorable
<i>DNMT3</i>	8 %	Méthylation de l'ADN	Défavorable
<i>IDH1/IDH2</i>	5-10 %	Nécessaire au cycle de Krebs pour la formation de l' α -kétooglutarate	Défavorable
<i>UTX</i>	2-5 %	Méthylation H3K27	Non définie
Nras/Kras	10-15 %	Signal de transduction	Plutôt défavorable
<i>TP53</i>	5-10 %	Réparation ADN, apoptose, régulation du cycle cellulaire	Défavorable
<i>RUNX1/AML1</i>	10-15 %	Facteur de transcription	Défavorable
<i>NPM1</i>	5 %	Transport nucléaire, fonction p53, facteur de transcription	Non définie
<i>JAK2</i>	2-5 %	Tyrosine kinase, signal de transduction intracellulaire	Favorable ?
<i>FLT3</i>	2-5 %	Récepteur de facteur de croissance	Non définie
<i>CEBPα</i>	1-4 %	Facteur de transcription	Non définie
<i>EVI1</i>	2 %	Facteur de transcription	Non définie

Tableau 11 : Impact pronostique des mutations retrouvées dans les SMD selon [15]

De nombreuses mutations ont été retrouvées dans les SMD, impliquant les gènes *RAS*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *c-CBL*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2* et *EZH2*. Cependant, ces mutations n'expliquent pas entièrement la pathogénèse des SMD : ces anomalies sont retrouvées dans d'autres pathologies, et dans environ 20 % des SMD, aucune anomalie génétique n'est retrouvée.

Des mutations récurrentes dans les gènes du spliceosome ont également été mises en évidence.

Ainsi, une étude publiée en Octobre 2011 [16] rapporte les résultats du séquençage de l'ensemble des exons en comparaison avec de l'ADN normal chez 29 patients atteints de SMD. : il a été mis en évidence 268 mutations somatiques non synonymes, comprenant celles de gènes cibles identifiés dans les SMD (12,3 % des mutations retrouvées). Des mutations récurrentes de gènes non connus ont été mises en évidence. Parmi les gènes, plusieurs font partie de la même voie : *U2AF1* (aussi connu sous le nom de *U2AF35*), *ZRSR2* et *SRSF2*. Ils sont impliqués dans la machinerie d'épissage des ARN (épissosome ou spliceosome). A noter que 3 autres gènes faisant partie de cette machinerie ont été retrouvés mutés de manière non récurrente (*SF3A1*, *SF3B1* et *PRPF40B*). Des mutations de ces 6

gènes étaient mises en évidence chez 16 des 29 patients, de manière mutuellement exclusive.

2. LE SPLICEOSOME

Le spliceosome désigne la machinerie cellulaire qui élimine les introns des ARN, voire parfois certains exons en cas d'épissage alternatif. Il s'agit d'une étape de maturation des ARN, consistant en l'association de protéines à des ribonucléoprotéines, formant un complexe qui rapproche des séquences spécifiques de part et d'autres des exons, permettant leur soudure avec excision des introns.

L'épissage de l'ARN est réalisé par un recrutement, un réarrangement et/ou un désengagement bien ordonné d'un ensemble de complexes de snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein : U1, U2 et soit U4/5/6, soit U11/12) et d'un certain nombre de protéines [16]. On parle de complexes majeur (type U2) et mineur (type U12).

L'épissage de l'ARN est initié par le recrutement de U1snRNP à l'extrémité 5' SS (pour splicing site) (voir [illustration 22](#)). Puis SF1 et U2AF65, la sous-unité la plus importante du facteur auxiliaire de U2 (U2AF), se fixent respectivement au niveau de la séquence du point de branchement (BPS, séquence consensuelle centrée sur un A, située au niveau de l'intron) et de la séquence poly-pyrimidine. La plus petite sous-unité de U2AF1 (U2AF35) se fixe au dinucléotide AG au niveau 3'SS. U2AF35 interagit avec U2AF65 et une protéine riche en sérines et arginines telle que SRSF2. Ces interactions constituent le complexe E (pour Early) du spliceosome [16] [17].

ZRSR2 interagit avec U2AF et des protéines riches en sérines et arginines pour accomplir ses fonctions essentielles dans l'épissage de l'ARN.

U2snRNP reconnaît ensuite la séquence 3'SS et est recruté avec SF3A1 et SF3B1 pour générer le complexe A.

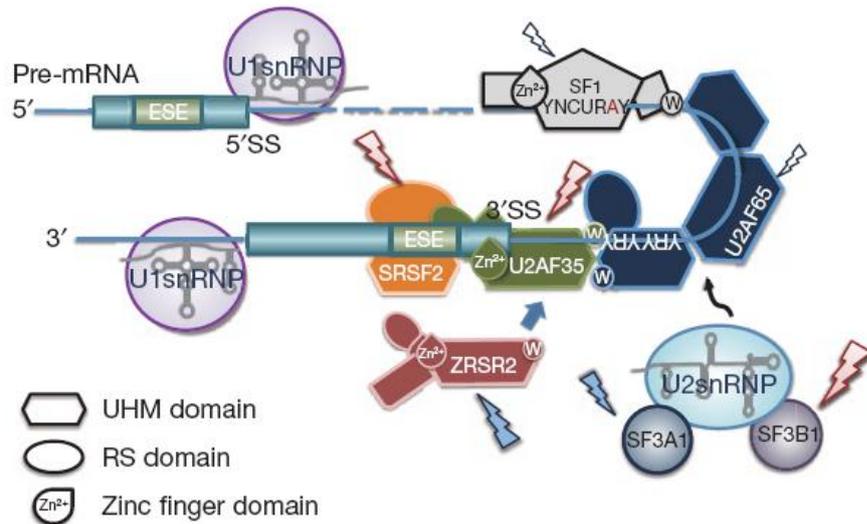


Illustration 22 : Composants du spliceosome (complexe E/A) et mutations retrouvées dans les SMD (signifiées par les éclairs) selon [16]

Les snRNP U4 et U6 s'associent avec le complexe A. U5 se fixe à l'extrémité 5' de l'ARN. L'ensemble forme le complexe C, permettant le rapprochement de deux exons. Des réactions de transestérification ont ensuite lieu : l'une permet la liaison de la séquence 5'SS au BPS, l'autre associe les deux exons mis en continuité grâce à U5. L'ARN intronique et les sn-RNP-U4 et U6 sont dégradés.

Les gènes codant pour des protéines du spliceosome décrits comme mutés dans les SMD sont impliqués dans le complexe E (*U2AF1*, *SRSF2* et *ZRSR2*) ou agissent de concert, avec des fonctions dans l'épissage encore incomplètement comprises (*SF3A1*, *SF3B1* et *PRPF40-B*). L'ensemble de ces gènes code pour des protéines impliquées dans les phases initiales de l'épissage (mis à part *PRPF40-B* dont les fonctions restent mal connues).

3. MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES

Partant du constat qu'il existe des mutations récurrentes de certains gènes du spliceosome chez les patients atteints de SMD, un grand nombre de patients a été testé pour les 6 gènes mis en évidence (*U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3B1*, *SF3A1*, *PRPF40-B*) ainsi que pour 3 autres gènes impliqués dans cette voie : *SF1*, *U2AF65* et *SRSF1* [16].

Parmi 582 patients atteints de pathologies myéloïdes, 209 présentaient des mutations de ces gènes (219 mutations détectées). Les 4 gènes principaux impliqués étaient *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2*, représentant 195 mutations.

Ces mutations sont hautement spécifiques des pathologies comportant une composante myélodysplasique : elles sont retrouvées dans 84,9 % des SMD avec sidéroblastes en couronne, 43,9 % des SMD sans sidéroblastes en couronne, 54,5 % des LMMC et 25,8 % des LAM secondaires à une chimiothérapie ou à un SMD.

En revanche, ces mutations sont relativement plus rares dans les LAM *de novo* (6,6 %) et les syndromes myéloprolifératifs (9,4 %).

Ces mutations sont mutuellement exclusives (voir [illustration 23b](#)), suggérant un impact sur la machinerie de l'épissage et potentiellement la pathogénèse des SMD.

Le type de gène muté varie en fonction des SMD (voir [illustration 23a](#)). *SF3B1* est muté dans la majorité des SMD avec présence de sidéroblastes en couronne : 82,6 % des ARS et 76 % des CRDM-RS et avec des fréquences beaucoup moins importantes dans les autres types de SMD (6,5 % des SMD sans sidéroblastes en couronne) et les autres néoplasies myéloïdes (4,5 % dans les LMMC, 4,8 % dans les LAM secondaires à un SMD, 2,6 % dans les LAM *de novo*, 0 % dans les syndromes myéloprolifératifs). Avec une association aussi importante avec la présence de sidéroblastes en couronne dans les SMD, un rôle dans la pathogénèse de ce type de pathologie est fortement suspecté. Les mutations du gène *SRSF2* sont quant à elles plutôt associées à la LMMC (28,4 %).

Ces différentes mutations, bien qu'impliquant des gènes des complexes E/A du spliceosome, pourraient avoir des impacts cellulaires différents et entraîner des pathologies plus ou moins discrètes. En effet, des études ont déjà montré que *SRSF2* est impliqué dans la régulation de la stabilité de l'ADN, des mutations de ce gène entraînant une instabilité génétique. Ainsi, en cas de mutation de *SRSF2*, un nombre significativement plus élevé de gènes mutés est retrouvé en comparaison avec les cas avec mutation de *U2AF1* [16].

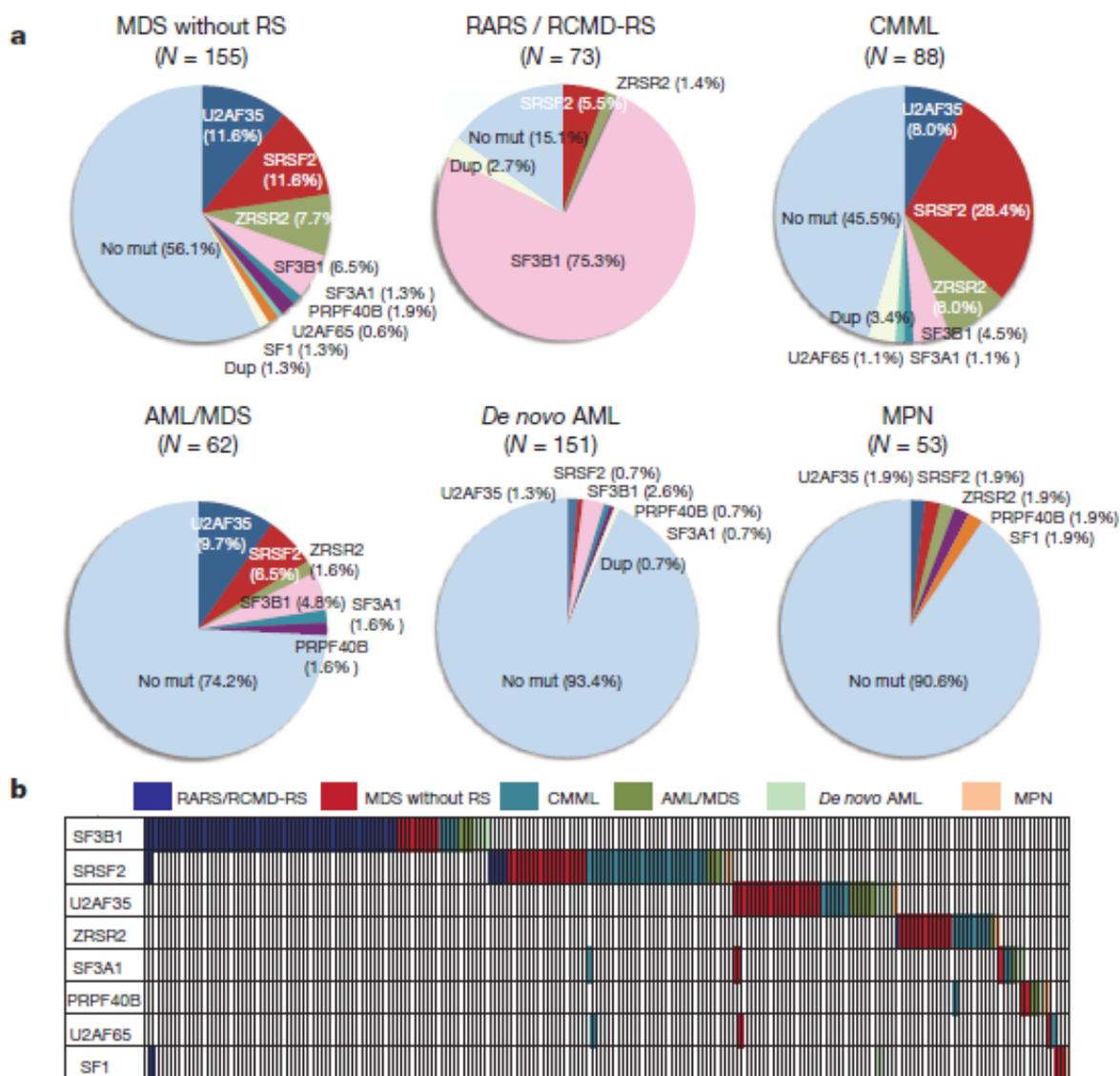


Illustration 23 : Fréquence des mutations des gènes du spliceosome en fonction du type de pathologie myéloïde (a), et répartition des mutations par patient en fonction du gène muté et de la pathologie (b) selon [16].

Concernant *U2AF1*, les mutations retrouvées touchent deux acides aminés hautement conservés (S34 et Q157) situés au niveau des motifs en doigt de zinc entourant le motif homologue U2AF (UHM).

Les mutations de *SRSF2* apparaissent au niveau P95, une région située entre le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) et un domaine riche en arginine et sérine.

Concernant *SF3B1*, la majorité des mutations touchaient la position K700 (mutation K700E systématiquement), et avec une moindre fréquence les acides aminés K666, R625, H662 et E622.

Le caractère récurrent de ces mutations au niveau des mêmes acides aminés est en faveur du caractère « gain de fonction » de ces mutations.

En revanche, pour *ZRSR2*, les 23 mutations identifiées étaient assez éparpillées sur l'ensemble de la région codante.

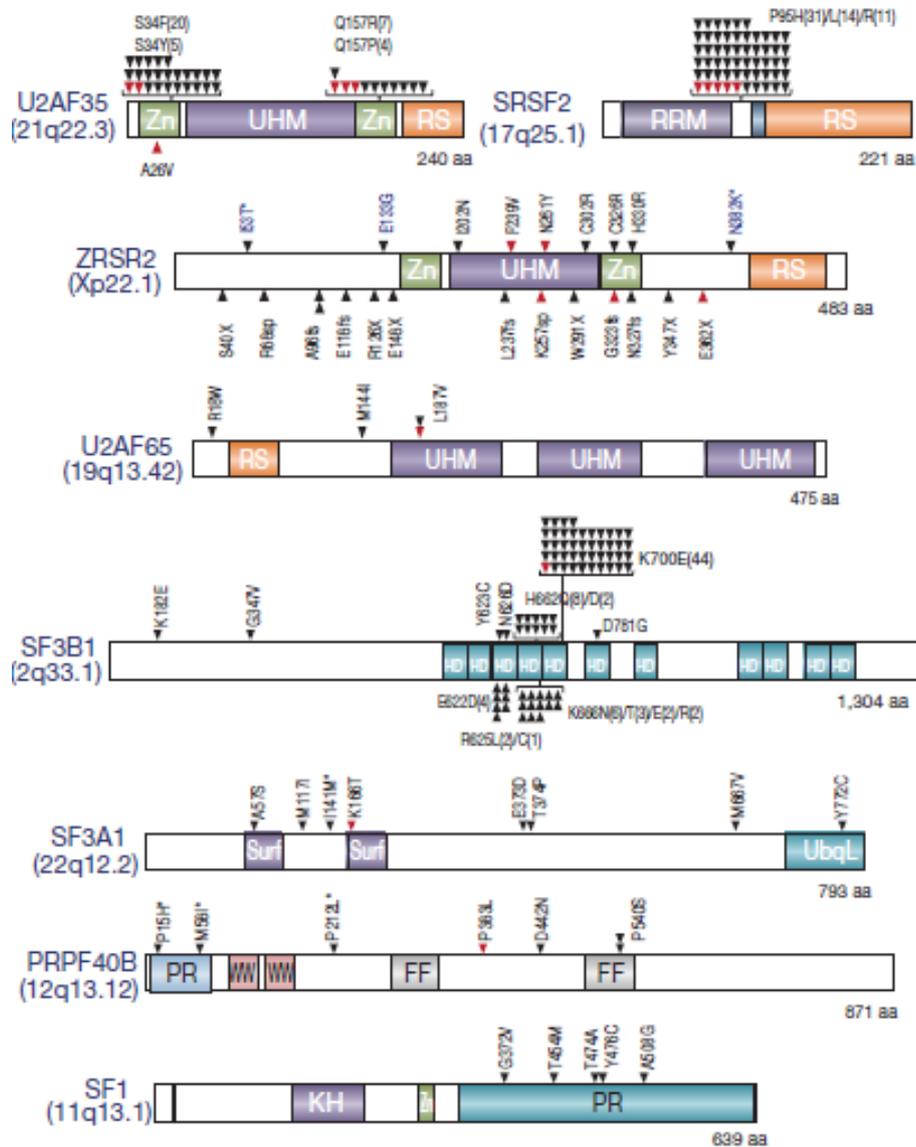


Illustration 24 : Mutations du spliceosome selon [16] (chaque flèche correspondant à un cas muté).

Comme les mutations retrouvées dans les SMD touchent essentiellement des gènes impliqués dans les complexes E/A de la machinerie de l'épissage, la conséquence logique de ces mutations serait une mauvaise reconnaissance en 3'SS et ainsi la production d'ARN messagers épissés de façon aberrante. Ainsi l'effet de ces mutations sur la voie NMD (Non-mediated mRNA Decay) a été étudié

[16]. La voie NMD est une régulation post-transcriptionnelle de reconnaissance et d'élimination des transcrits dont la traduction s'est terminée prématurément. Ceci a été étudié avec des mutants pour *U2AF1* : une augmentation du nombre de transcrits anormaux contenant des portions introniques non épissées a été mise en évidence. Cependant le lien entre les mutations des gènes du spliceosome et le développement des SMD reste peu clair. En effet, il a été montré qu'une mutation de *U2AF1* entraînait une augmentation de l'apoptose au lieu de conférer un avantage prolifératif, permettant la sélection du clone. Cependant, les SMD sont caractérisés par la présence de cytopénies avec augmentation de l'apoptose et non une prolifération cellulaire. Le rôle de ces mutations reste encore à déterminer, d'autant que ces gènes sont impliqués dans d'autres fonctions que l'épissage, telles que la stabilité génétique.

4. MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC)

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est caractérisée par la présence de petits lymphocytes B matures monomorphes, ronds à légèrement irréguliers au niveau du sang, de la moelle, de la rate et des ganglions [2]. Classiquement, le diagnostic de cette pathologie est basé sur l'établissement du score de Matutes établi à partir de l'expression de marqueurs de surface particuliers : CD5+, CD23+, FMC7-, CD79b/CD22 faible et expression des immunoglobulines de surface diminuée. Le compte de lymphocytes clonaux doit être supérieur ou égal à 5G/L [2].

L'évolution de cette pathologie est hétérogène. Certaines caractéristiques génétiques sont associées au pronostic : la délétion 17p (perte de TP53, associée à une résistance à la fludarabine), la délétion 11q, le statut hypermuté des séquences variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGVH) par exemple sont associées à un mauvais pronostic.

Une étude a mis en évidence des mutations récurrentes dans cette pathologie [18]. A partir de 91 patients, 4 gènes connus ont été retrouvés, mais également d'autres candidats, dont *SF3B1*, qui est le deuxième gène le plus fréquemment muté (après *TP53*) avec une fréquence de 15 %. La mutation K700E de *SF3B1* est associée à un statut non muté des IGVH, mais de manière non exclusive, suggérant que cette mutation serait un facteur pronostique indépendant. Elle est également associée à un besoin d'instauration de traitement plus précoce, indépendamment d'autres facteurs. De plus, cette étude met en évidence une activité aberrante du spliceosome, avec un rapport ARNm non épissé/épissé augmenté spécifiquement en cas de mutation de *SF3B1*.

Une autre étude met en évidence la fréquence importante d'une mutation de *SF3B1* parmi des patients atteints de LLC avec chimiorésistance à la fludarabine [19]. Parmi 59 patients, 17 % présentaient une mutation de *SF3B1*, alors que ces mutations seraient plus rares chez les patients au diagnostic (17 patients mutés sur 301 testés soit 5%, bien inférieure aux fréquences avancées par Wang et al.). Sur les 17 patients mutés au diagnostic, 5 se sont révélés réfractaires au traitement par la fludarabine (soit 29 %).

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de vérifier les fréquences importantes des mutations des gènes du spliceosome retrouvées dans la littérature, et de déterminer leur intérêt pronostique, dans la mesure où des études contradictoires ont été publiées.

Pour cela, il faut mettre au point des techniques de biologie moléculaire permettant de détecter des mutations de manière sensible. La confirmation de la présence de ces mutations est ensuite réalisée par technique de séquençage.

L'objectif à terme est de déterminer si ce type d'analyse apporte des informations supplémentaires sur le pronostic dans ces pathologies et peut être intégré à des scores pronostiques déterminant la prise en charge des patients. Le but est de pouvoir intégrer le dépistage de ces marqueurs en routine au laboratoire de biologie médicale.

MATERIELS ET METHODES

1. ECHANTILLONS ET PATIENTS

Les cellules mononucléées médullaires séparées sur gradient de densité, sont congelées et conservées dans des conditions optimales avant extraction de l'ADN.

Les échantillons d'ADN utilisés pour ce travail font partie de la banque d'ADN conservée au laboratoire à -20 °C.

Pour valider notre méthode, il faut trouver des témoins positifs pour chaque exon étudié. Il a été démontré que le gène *SF3B1* est associé à une augmentation du nombre de sidéroblastes en couronne, alors que *SRSF2* est fréquemment muté dans les Leucémies MyéloMonocytaires Chroniques (LMMC). Nous avons d'abord pris une liste de patients connus pour anémie sidéroblastique et pour lesquels des échantillons de moelle osseuse congelés étaient disponibles au laboratoire, en privilégiant le 1^{er} échantillon disponible pour chaque patient.

Dans un deuxième temps, une liste de patients atteints de LMMC a été établie : il s'agissait de patients pour lesquels des échantillons étaient disponibles au laboratoire.

Dans un troisième temps, une liste de patients atteints de SMD sans excès de RS, avec un caryotype anormal, et échantillon au moment du diagnostic disponible au laboratoire a été établie.

2. EXTRACTION D'ADN

Toute cellule nucléée renferme dans son noyau l'ADN du génome entier. Le principe général de l'extraction repose sur 4 étapes :

- Lyse des cellules
- Protéolyse
- Déprotéinisation
- Isolement et purification de l'ADN génomique

L'extraction est réalisée à partir de cellules mononucléées de la moelle osseuse préalablement isolées par gradient de densité et conservées en culot sec à -80 °C.

La méthode utilisée pour cette étude est une technique saline. Pour cette technique, le kit DNeasy blood and tissue (Qiagen) a été utilisé.

3. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

Le dosage des acides nucléiques est réalisé à partir de l'appareil Nanodrop ND-1000.

La concentration est obtenue grâce au logiciel ND-1000 V3.1.0, ainsi que le ratio des densités optiques 260/280 nm.

4. MÉTHODE HIGH-RESOLUTION MELTING (HRM)

Les analyses HRM permettent la détection de mutations hétérozygotes par dissociation préférentielle des hétéroduplexes comportant une mutation ou un polymorphisme par chauffage et perte de fluorescence liée à la dissociation d'un fluorochrome spécifique de l'ADN double brin. L'analyse comporte 3 étapes :

- une amplification par PCR, permettant la génération spécifique de l'amplicon en quantité suffisante ;

- la formation d'hétéroduplexes par dénaturation prolongée et refroidissement rapide ;

- la fusion qui consiste à augmenter la température progressivement, avec acquisition d'une courbe de fusion proprement dite à haute résolution : un agent intercalant, fluorescent seulement en présence d'ADN double brin permet le suivi au cours d'une montée en température progressive du désappariement des ADN double-brin, et ainsi de différencier les amplicons strictement complémentaires des amplicons non appariés en totalité, c'est-à-dire comportant une mutation. Une différence d'une seule base peut-être détectée (voir illustrations 25 à 28).

Les amorces sont conçues au laboratoire et commandées à Eurogentec.

Les amorces sont dessinées de sorte à encadrer les points de mutations récurrentes à étudier, en évitant d'amplifier des polymorphismes. Pour cela, il faut partir des séquences de référence.

Les amorces utilisées répondent aux critères généraux suivants :

- longueur de 17 à 30 nucléotides ;
- composition en G+C inférieure à 67 % ;
- pas d'autocomplémentarité et absence de complémentarité entre les amorces F et R ;
- unicité, c'est-à-dire absence d'autre séquence complémentaire dans le génome ;
- Tm suffisamment élevée (entre 47 et 62°C).

Plusieurs amorces pour chaque gène sont testées :

- SF3B1 X15 F1 : TGAATAGTTGATATATTGAGAGAATCTGGA
- SF3B1 X15 F2 : TCTGGATGATATTGTGTAACCTAGGTAATG
- SF3B1 X15 R1 : AGGAGTTGCTGCTTCAGCCA
- SF3B1 X15 R2 : AGGTAATTGGTGGATTTACCTTTCC
- SF3B1 X14 F1 : GTCTGGCTACTATGATCTCTACCATGA
- SF3B1 X14 F2 : TCTACCATGAGACCTGATATAGATAACATG
- SF3B1 X14 R1 : CTAAGATGTGGCAAGATGGCAC
- SF3B1 X14 R2 : GATGTGGCAAGATGGCACAG
- U2AF1 X02 F1 : ATGCTGCTGACATATTCCATGTG
- U2AF1 X02 F2 : TATTCCATGTGTTTGATATCTTCCCA
- U2AF1 X02 R1 : AAACAAACCTGGCTAAACGTCG
- U2AF1 X02 R2 : CAAACCTGGCTAAACGTCGGT
- U2AF1 X06 F1 : AAGCGTGGATGGCAAGCA
- U2AF1 X06 F2 : GTCTTTTCAGTTTCGCCGTGAG
- U2AF1 X06 R1 : CACGTCACTGGCCACTCCT
- U2AF1 X06 R2 : ACACGGCCCCGAACTGT
- SRSF2 X01 F1 : CCGATGTGGAGGGTATGACCT
- SRSF2 X01 F2 : CTGAGGACGCTATGGATGC
- SRSF2 X01 F3 : GACCGCTACACCAAGGAGTC
- SRSF2 X01 R1 : GGCGGCTGTGGTGTGAGT

- SRSF2 X01 R2 : CCTCAGCCCCGTTTACCT

Les échantillons sont répartis en plaque 96 puits.

Le plan de plaque est préparé de sorte à avoir pour chaque couple d'amorces utilisé un puits pour le témoin positif, un puits pour le témoin négatif (le PBL), un puits pour l'eau comme témoin de non contamination et 2 puits pour les patients ainsi testés en double.

La préparation du mix est réalisée de la façon suivante :

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	N = 1 (µL)
H ₂ O			1,4
LC 480 HRM Master Mix	2X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	1,2
Amorce F	10 µM	0,2 µM	0,2
Amorce R	10 µM	0,2 µM	0,2
Volume du mix			8
ADN	10 ng/µL	2 ng/µL	2

Tableau 12 : Préparation du mix pour HRM

Le programme HRM utilisé est le suivant :

- dénaturation : 95 °C pendant 10 min
- 50 cycles d'amplification :
 - 95 °C pendant 15 sec
 - 63 °C pendant 15 sec
 - 72 °C pendant 25 sec
- Fusion :
 - 95 °C pendant 1 min
 - 40 °C pendant 1 min

70 °C pendant 5 sec

95 °C pendant 1 sec (exception : pour l'exon 1 de *SRSF2*, la fusion est poursuivie jusqu'à 97 °C).

Le passage de 70 °C à 95°C est réalisé à raison de 1°C/sec et l'acquisition est alors continue (25 acquisitions/°C).

- Refroidissement :

4 °C pendant un temps illimité.

Après analyse, les plaques sont conservées à +4 °C.

L'analyse des résultats est réalisée avec le logiciel LightCycler 480 Software release 1.5.0.

Le logiciel permet d'acquérir des courbes d'amplification en temps réel, et des courbes de fusion. Concernant ces dernières, le logiciel permet de réaliser une normalisation des différentes courbes de fusion : cette étape permet d'aligner les signaux obtenus avant (signal à 100 %) et après fusion (signal à 0%) et ainsi de distinguer des profils de fusion différents entre mutés et non mutés (voir [illustrations 26 et 27](#)). Un autre type de courbe appelé « difference plot » analyse les profils de fusion en comparaison au témoin non muté (le PBL) (voir [illustration 28](#))

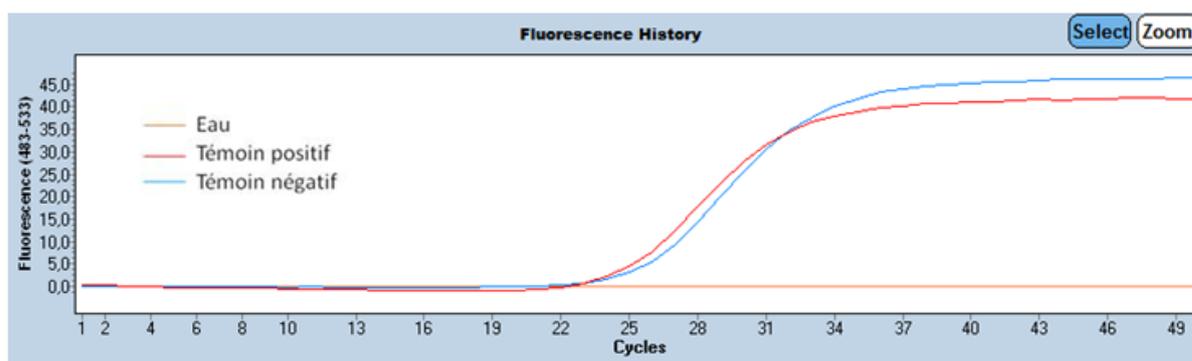


Illustration 25 : Courbes d'amplification

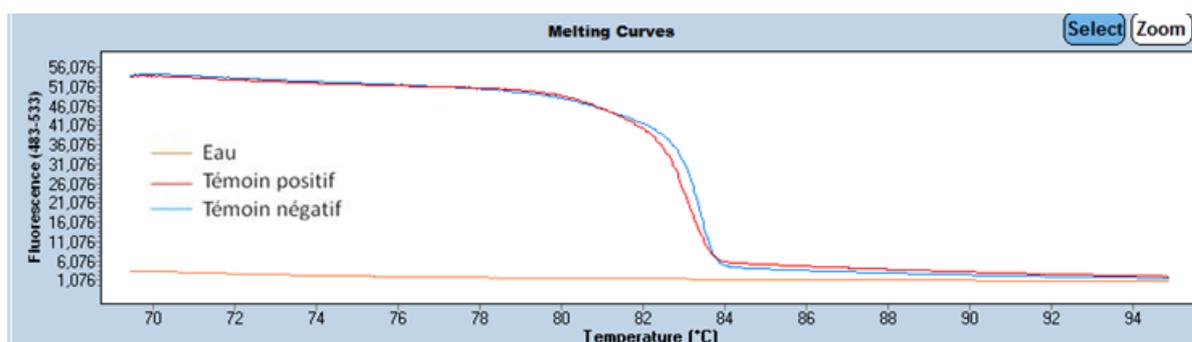


Illustration 26 : Courbes de fusion avant normalisation

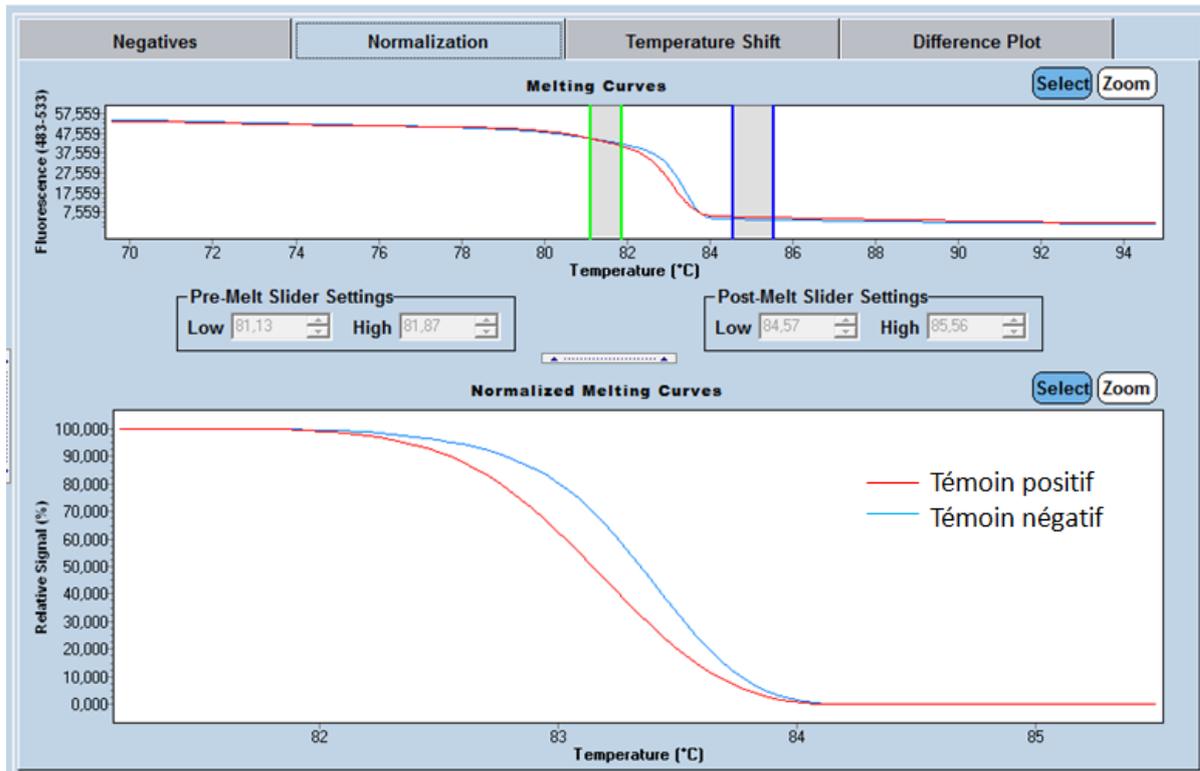


Illustration 27 : Courbes de fusion après normalisation

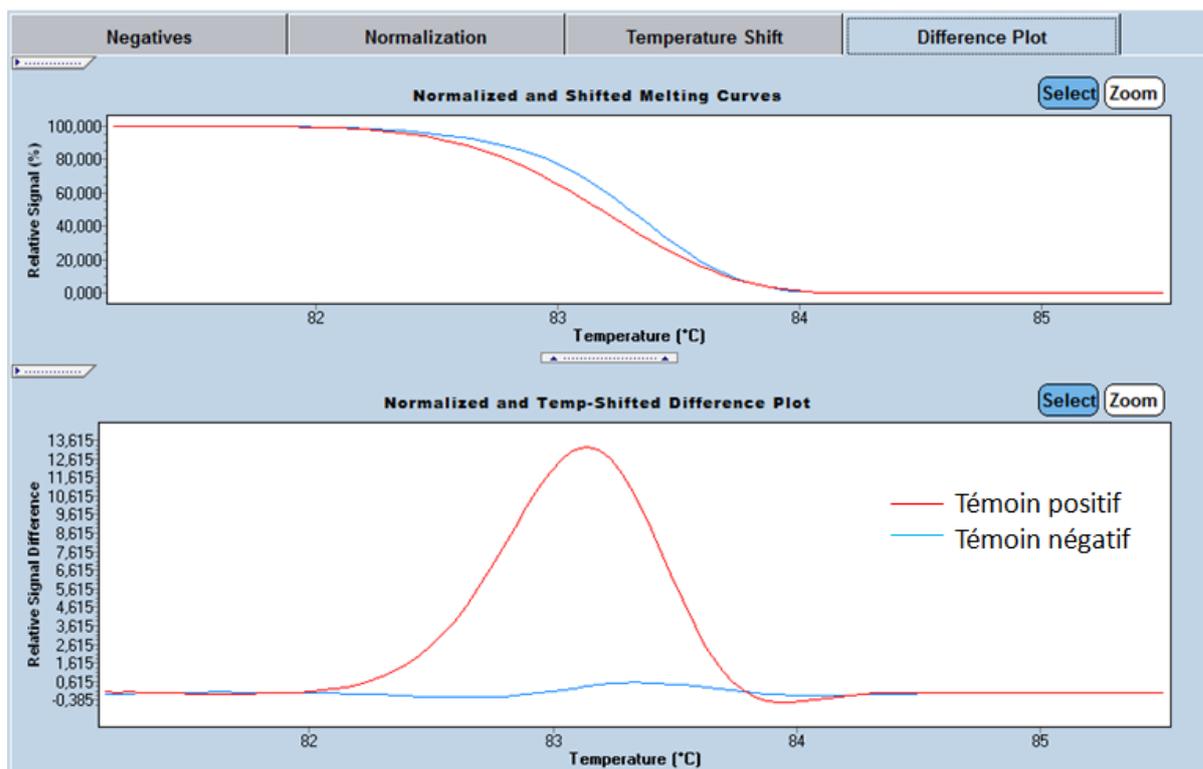


Illustration 28 : Courbes normalisées en fonction du témoin négatif (le PBL).

5. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

Afin de vérifier que les fragments amplifiés par HRM sont bien ceux attendus, une migration en gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium (BET) a été réalisée. Ce gel est révélé sous lampe UV. L'obtention de bandes fluorescentes aux tailles des fragments escomptés et l'absence de bandes non spécifiques permettent la validation de la réaction de PCR.

6. PURIFICATION DES PRODUITS DE PCR

Les patients pour lesquels une mutation est détectée par HRM doivent ensuite être séquencés. Pour cela, l'ADN amplifié par PCR doit être purifié sur colonne pour éliminer les inhibiteurs pouvant interférer avec le séquençage.

Pour cette technique, le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) est utilisé.

Les étapes sont les suivantes :

- Fixation :

5 volumes de Buffer PB sont ajoutés à 1 volume de produit PCR (par exemple, 20 μ L de produit PCR pour 100 μ L de tampon) et déposés sur la colonne.

L'ensemble est centrifugé 1 min à 13000 tours/min (température comprise entre 20 et 25 °C). Le tampon recueilli au fond du tube collecteur est jeté.

- Lavage :

720 μ L de tampon PE sont déposés sur la colonne. L'ensemble est centrifugé 1 min à 13000 tours/min. Le tampon recueilli au fond du tube collecteur est jeté avant une nouvelle centrifugation à 13000 tours/min pendant 1 min.

La colonne est mise sur un tube Eppendorf de 1,5 mL. Le tube collecteur est jeté.

- Elution

30 μ L de tampon EB sont déposés sur la colonne. Après une minute de contact, l'ensemble est centrifugé 1 min à 13000 tours/min.

La colonne est jetée, et l'ADN purifié est dosé selon la méthode précédemment développée.

7. SEQUENÇAGE

Chaque échantillon pour lequel une mutation est détectée par HRM est ensuite séquencé.

La préparation des échantillons est la suivante :

- 10 μ L de produit PCR purifié et dilué à 10 ng/ μ L
- 5 μ L d'amorce à 1,6 pmol/ μ L par réaction.

Les échantillons sont ensuite transmis à la plateforme de séquençage (plateau de génomique Ge-T Purpan).

Le séquençage est réalisé selon la technique Sanger sur Séquenceur 3130XL Applied Biosystems.

Le séquençage de type Sanger est une amplification d'un brin d'ADN avec 90 % de dNTP et 10 % de ddNTP marqués. Lorsque qu'un ddNTP est inséré, la réaction d'amplification s'arrête. Les fragments amplifiés migrent ensuite sur gel de polyacrylamide en fonction de leur taille : il s'agit d'un gel très résolutif qui permet de différencier deux brins d'une base de différence. L'ADN migre jusqu'à une fenêtre de détection où un laser va exciter les molécules fluorescentes. La fluorescence émise est captée par une caméra et analysée par ordinateur.

L'analyse des séquences obtenues est réalisée grâce aux logiciels Finch TV et Sequencher 4.10.1 pour comparaison à une séquence de référence.

8. STATISTIQUES

Les statistiques ont été réalisées à partir des logiciels Excel et Medcalc pour l'établissement des courbes de Kaplan-Meier. Avec l'aide du Professeur Odile Beyne-Rauzy, les informations cliniques ont été recueillies pour 65 patients. Les données de survie sont déterminées par le temps entre la date de l'échantillon et la date de décès ou de dernières nouvelles.

RESULTATS

1. PATIENTS

1.1 SMD sans excès de sidéroblastes en couronne avéré

La liste des patients atteints de syndrome myéodysplasique sans excès de sidéroblastes en couronne avéré comprend 42 patients. Il s'agit de 22 femmes pour 20 hommes. La moyenne d'âge était de 75 ans (de 44 à 92), avec une médiane de 78 ans. Parmi ces patients, 7 sont décédés (un d'hémorragie digestive, un d'acidose métabolique avec nécrose médullaire irréversible, cinq de cause inconnue), 2 ont progressé vers une LAM avant de décéder, 1 a progressé vers une LAM sans décès, 1 vers une LAM et a bénéficié d'une allogreffe puis a rechuté, 1 a progressé vers une AREB1, 1 vers une myélofibrose, 1 vers une LMMC2.

La répartition dans les différentes catégories de SMD est la suivante :

- 4 syndromes 5q-
- 1 AR
- 1 TR
- 9 CRDM
- 11 AREB-1
- 9 AREB-2
- 3 SMD-I
- 3 SMD secondaires
- 1 LAM-6 (ancien SMD secondaire)

Les caryotypes de ces patients étaient les suivants :

- 1 caryotype normal ;
- 5 caryotypes avec del(5q) isolée ;
- 4 caryotypes anormaux de bon pronostic selon le score IPSS ;
- 11 caryotypes anormaux de pronostic intermédiaire selon le score IPSS ;

- 21 caryotypes anormaux de mauvais pronostic selon le score IPSS.

Selon le score IPSS, les patients étaient répartis dans les catégories suivantes :

- 7 de risque faible ;
- 16 de risque intermédiaire-1 ;
- 14 de risque intermédiaire-2 ;
- 5 de risque haut.

Selon le score IPSS-r, les patients seraient classés de la façon suivante :

- 2 de risque très faible ;
- 11 de risque faible ;
- 8 de risque intermédiaire ;
- 11 de risque haut ;
- 10 de risque très haut.

1.2 SMD avec excès de sidéroblastes en couronne

Cette liste de patients atteints de SMD-RS comprend 22 patients répartis dans différentes catégories :

- 10 ARS ;
- 10 CRDM-RS ;
- 2 ARS-T.

Il s'agit de 8 femmes pour 14 hommes. La moyenne d'âge est de 77 ans (de 60 à 85 ans). La médiane des âges est de 81 ans. Parmi ces patients, 3 sont décédés : 1 patient a évolué vers une myélofibrose puis est décédé d'un syndrome de détresse respiratoire aigu, 1 patient est décédé d'hypertension intracrânienne, 1 patient est décédé d'hémorragie digestive. Un patient a transformé une CRDM-RS en AREB-1.

12 patients présentaient un caryotype normal, 3 un caryotype de bon pronostic, 3 un caryotype de risque intermédiaire et 4 un caryotype de mauvais pronostic selon le score IPSS.

Selon le score IPSS, 14 patients étaient classés en catégorie de risque faible, 5 dans le groupe intermédiaire-1 et 3 dans le groupe intermédiaire-2.

Selon le score IPSS-r, 8 patients seraient classés en groupe de très bon pronostic, 9 en catégorie de bon pronostic, 4 en groupe intermédiaire et 1 en catégorie de haut risque.

1.3 LMMC

La liste des patients atteints de LMMC comprend 13 patients (12 LMMC-1 et 1 LMMC-2). Il s'agit de 6 hommes pour 7 femmes. L'âge moyen est de 73 ans (de 58 à 89 ans). La médiane est de 78 ans. Parmi ces patients, 2 sont décédés (syndrome d'activation macrophagique post-réactivation d'une infection par Cytomégalovirus pour l'un, post-acutisation pour l'autre) ; 2 patients ont acutisé et sont stables après chimiothérapie.

Parmi ces patients, 10 présentaient un caryotype normal, 1 patient avec une trisomie 8, 1 patient avec une monosomie 7 et 1 patient avec une trisomie 8 associée à une t(1;7) déséquilibrée générant une del(7q) et une trisomie 1q.

2. SF3B1

2.1 Mutations de l'exon 14 du gène SF3B1

2.1.1 Mise au point de la méthode HRM

Concernant *SF3B1*, il existe essentiellement 5 points de mutation, dont quatre sont situés au niveau de l'exon 14 : il s'agit des mutations E622D, R625L/C, H662Q/D et K666T/E/R.

4 amorces ont été testées (voir [illustration 29](#)). Les 2 amorces sens sont situées en amont des mutations recherchées (amorces SF3B1 X14 F1 en jaune et SF3B1 X14 F2 en orange). Les 2 amorces anti-sens sont situées en aval des mutations recherchées (amorce SF3B1 X14 R1 en vert clair et SF3B1 X14 R2 en vert foncé).

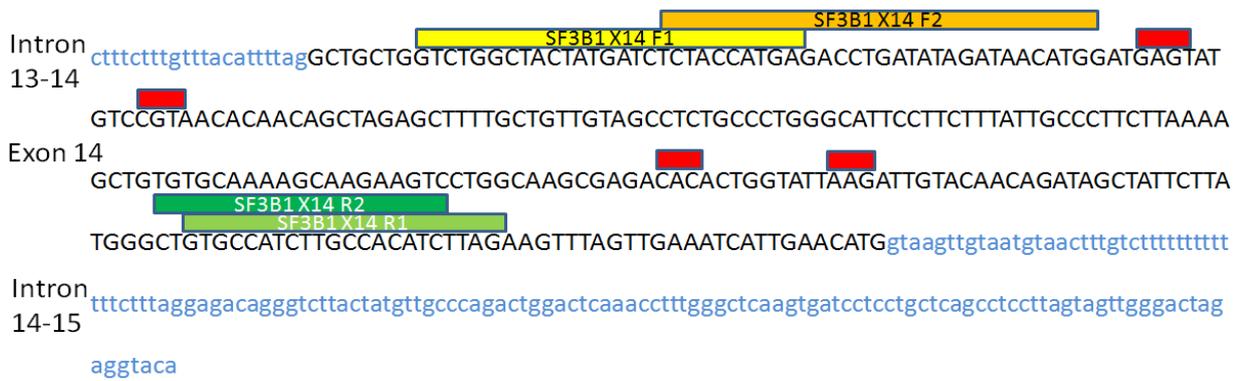


Illustration 29 : Exon 14 de SF3B1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, les points de mutation (E622D, R625L, H662Q/D, K666T/E/R) à mettre en évidence.

Les tests ont été réalisés avec le PBL qui est le contrôle négatif. Dans ces tests préliminaires, nous ne disposons pas de témoin positif : il faudra détecter des témoins positifs dans des tests ultérieurs pour valider la méthode.

2.1.1.1 Tests avec les amorces SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R1

Après amplification avec le couple d'amorce SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R1, on observe une courbe d'amplification satisfaisante avec une courbe exponentielle croissante débutant entre 25 et 28 cycles d'amplification (voir illustration 30a).

Par ailleurs, les courbes d'amplification correspondant à l'eau mettent en évidence une amplification tardive avec les deux tests, pouvant témoigner soit de la présence de contamination, soit d'une amplification non spécifique (autocomplémentarité).

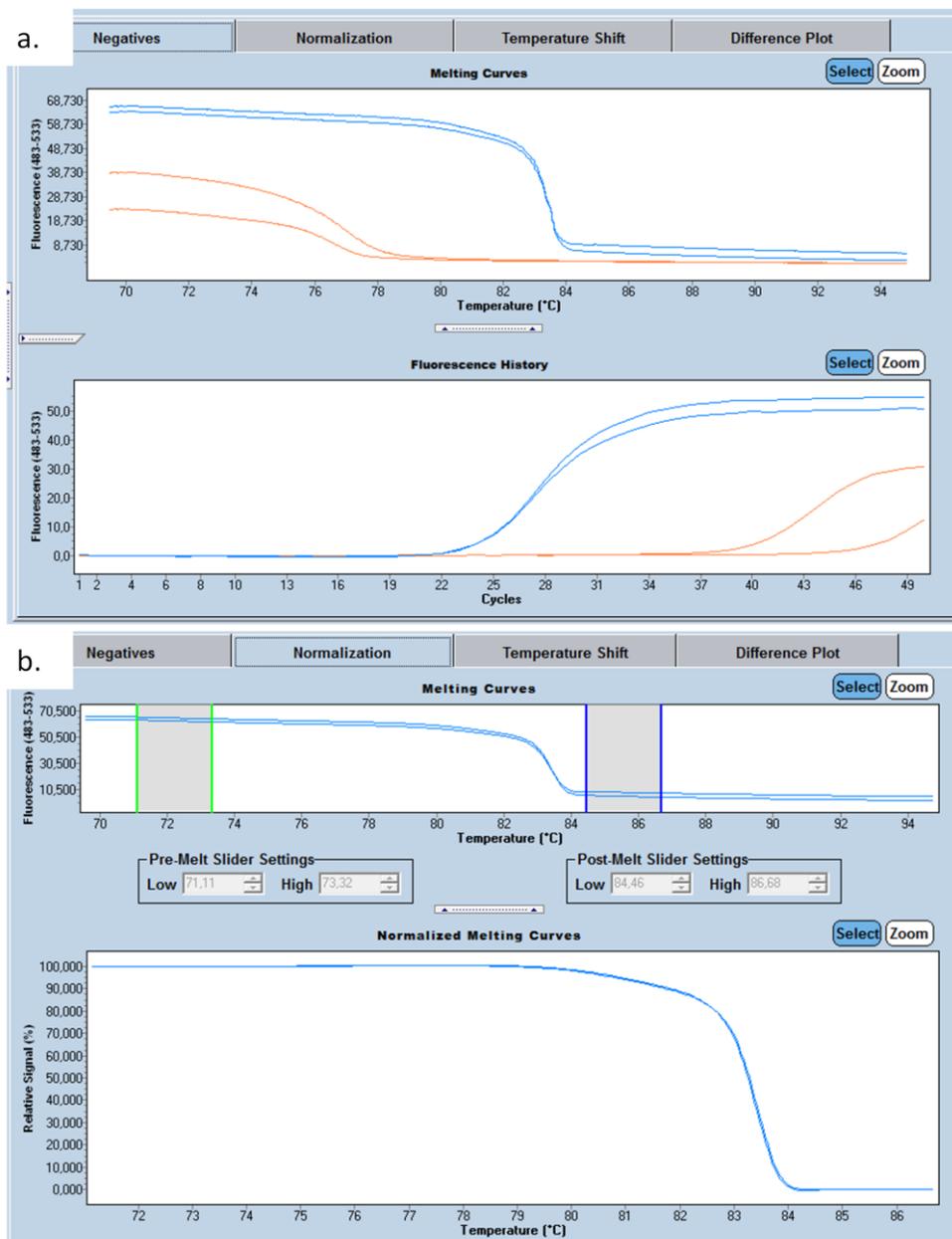


Illustration 30 : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F1 et SF3B1 X14 R1 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.

Concernant la courbe de fusion, on observe une courbe satisfaisante de type exponentielle décroissante avec un seul point d'inflexion, situé à une température convenable d'environ 83-84 °C (voir [illustration 30b](#)).

2.1.1.2 Tests avec les amorces SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R2

Après amplification avec le couple d'amorce SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R2, on observe une courbe d'amplification satisfaisante avec une courbe exponentielle croissante débutant entre 25 et 28 cycles d'amplification (voir [illustration 31a](#)).

De plus, les courbes d'amplification correspondant à l'eau restent bien plates, montrant d'une part l'absence de contamination et d'autre part l'absence d'amplification non spécifique (autocomplémentarité).

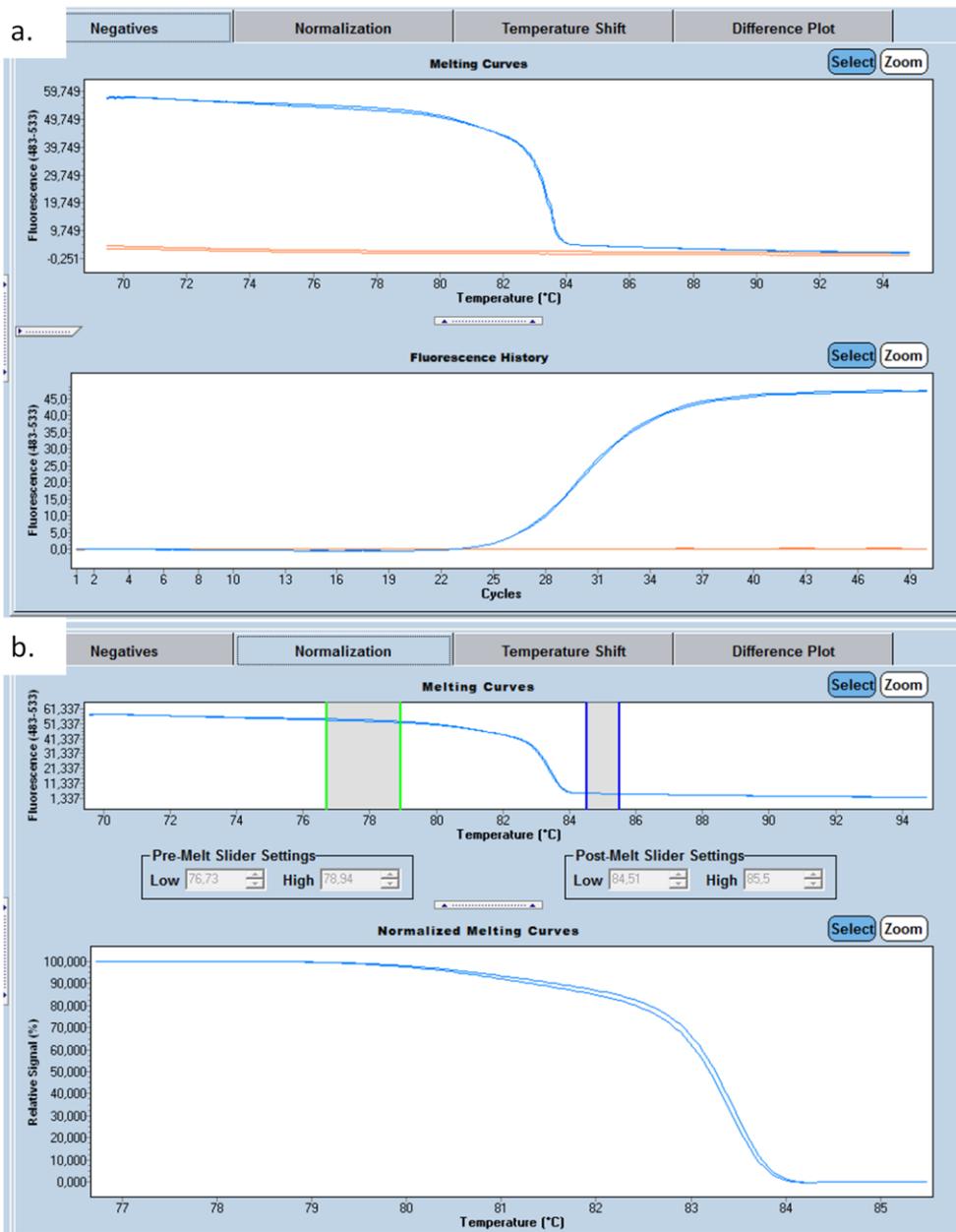


Illustration 31 : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F1 et SF3B1 X14 R2 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.

Concernant la courbe de fusion, on observe une courbe satisfaisante de type exponentielle décroissante avec un seul point d'inflexion, situé à une température convenable d'environ 83-84 °C (voir [illustration 31b](#)).

2.1.1.3 Tests avec les amorces SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R1

Après amplification avec le couple d'amorce SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R1, on observe une courbe d'amplification satisfaisante avec une courbe exponentielle croissante débutant plus tardivement, entre 28 et 31 cycles d'amplification (voir [illustration 32a](#)).

Par ailleurs, les courbes d'amplification correspondant à l'eau restent bien plates, montrant d'une part l'absence de contamination et d'autre part l'absence d'amplification non spécifique (autocomplémentarité).

Concernant la courbe de fusion, on observe une courbe satisfaisante de type exponentielle décroissante avec un seul point d'inflexion, situé à une température convenable d'environ 83-84 °C (voir [illustration 32b](#)).

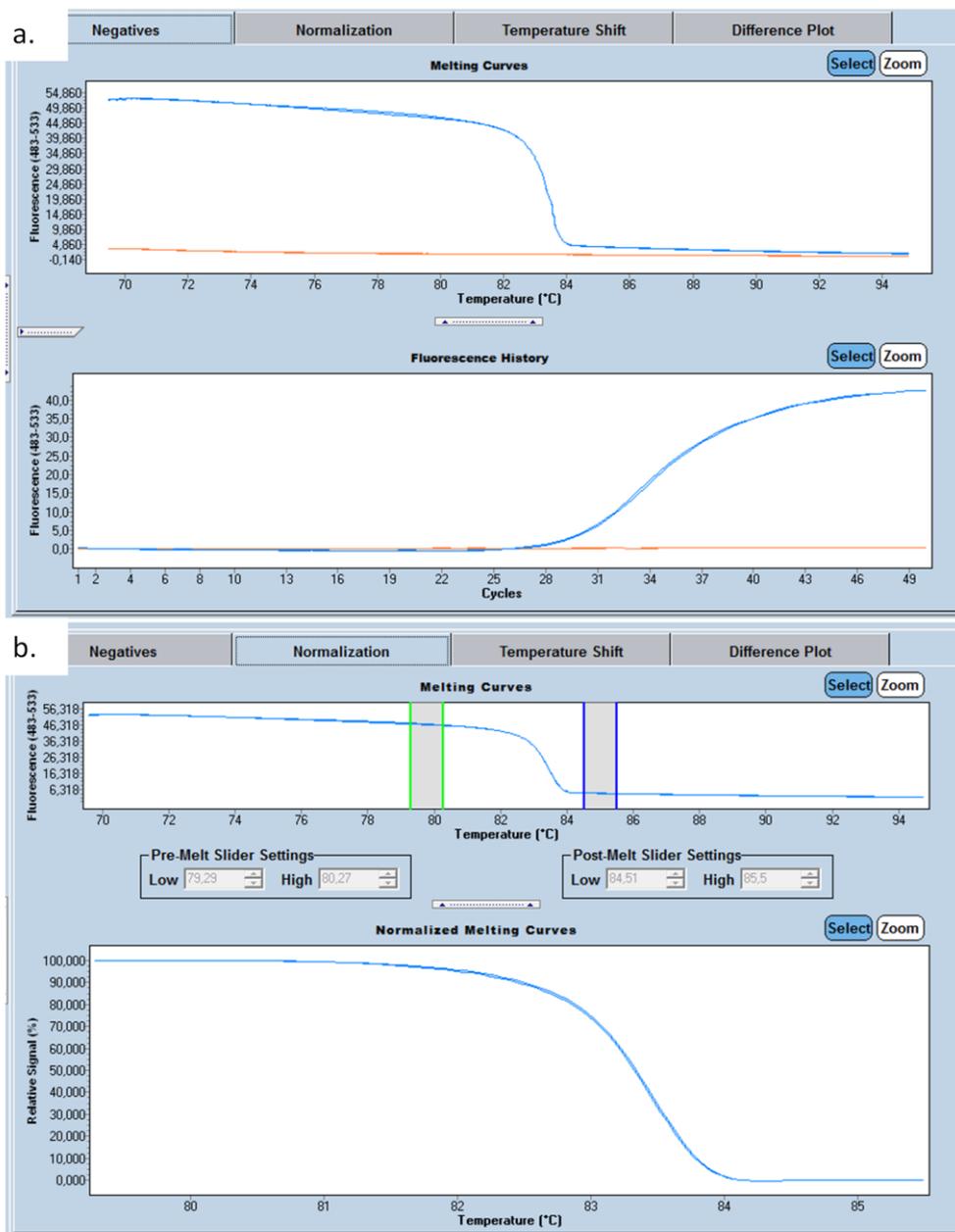


Illustration 32 : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F2 et SF3B1 X14 R1 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.

2.1.1.4 Tests avec les amorces SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R2

Après amplification avec le couple d'amorce SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R2, on observe une courbe d'amplification satisfaisante avec une courbe exponentielle croissante débutant également plus tardivement, entre 28 et 31 cycles d'amplification (voir [illustration 33a](#)).

De plus, les courbes d'amplification correspondant à l'eau restent bien plates, montrant d'une part l'absence de contamination et d'autre part l'absence d'amplification non spécifique (autocomplémentarité).

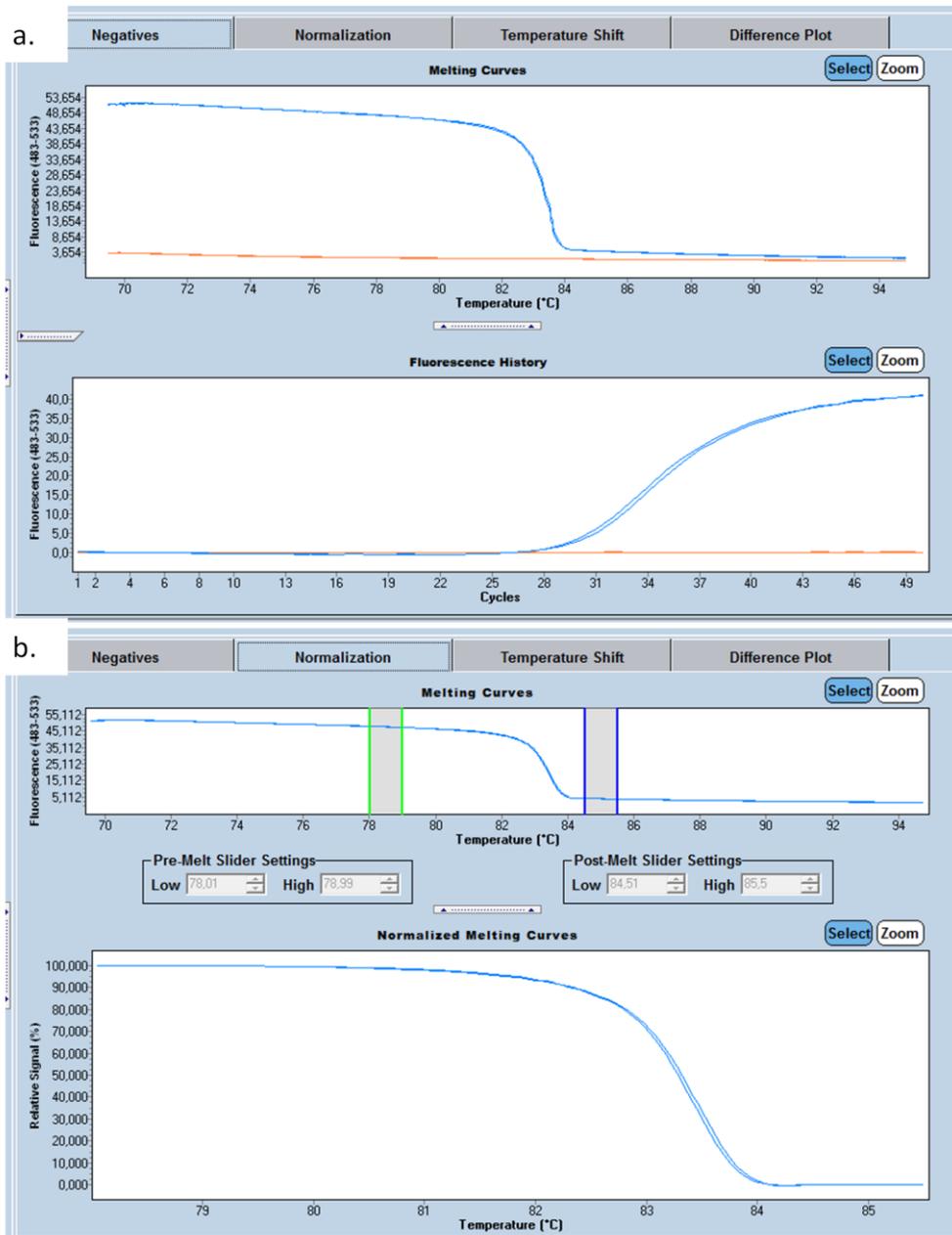


Illustration 33 : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F2 et SF3B1 X14 R2 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.

Concernant la courbe de fusion, on observe une courbe satisfaisante de type exponentielle décroissante avec un seul point d'inflexion, situé à une température convenable d'environ 83-84 °C (voir [illustration 33b](#)).

2.1.1.5 Conclusion

Le couple d'amorces choisi pour l'amplification de l'exon 14 du gène SF3B1 est SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R2. En effet, les résultats montraient une courbe d'amplification débutant avant 30 cycles, l'absence d'amplification de l'eau et une courbe de fusion de type exponentielle négative avec un seul point d'inflexion.

Afin de vérifier que ce couple d'amorces amplifie bien uniquement le fragment attendu, une électrophorèse en gel d'agarose a été réalisée. La taille attendue du fragment correspondant était de 235 pb, sans produit de PCR non spécifique (voir [illustration 34](#)).

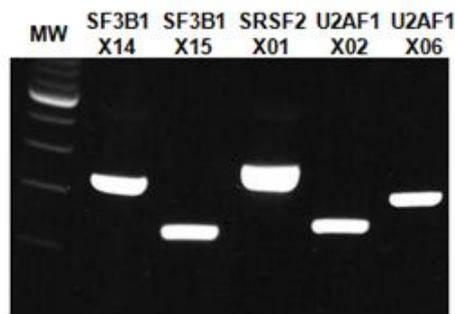


Illustration 34 : Résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec les couples d'amorces sélectionnés pour chaque exon. MW = Poids moléculaire ; X15 = exon 15 de SF3B1 ; X14 = exon 14 de SF3B1 ; X01 = exon 1 de SRSF2 ; X02 = exon 2 de U2AF1 ; X06 = exon 6 de U2AF1.

Afin de confirmer la validité du couple d'amorces choisi, il convient de mettre en évidence des mutations par méthode HRM. D'après les publications, les mutations du gène *SF3B1* sont particulièrement fréquentes chez les patients atteints de SMD-RS. C'est pourquoi une liste de patients atteints de SMD-RS a été testée.

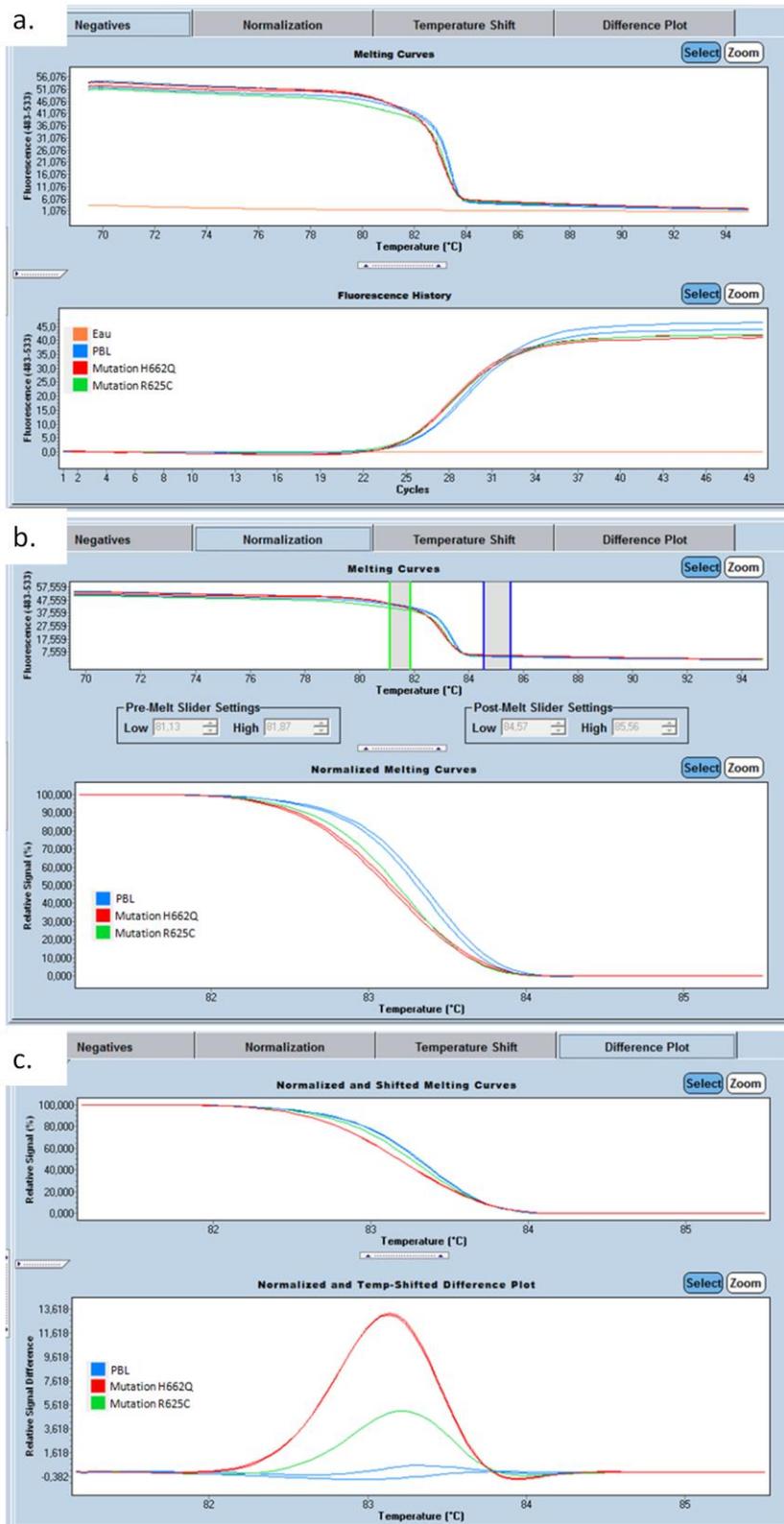


Illustration 35 : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD-RS et présentant des mutations au niveau de l'exon 14 du gène SF3B1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation H662Q, en vert un patient présentant la mutation R625C). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.

Deux types de mutations de l'exon 14 du gène *SF3B1* ont ainsi été mises en évidence : il s'agit des mutations H662Q et R625C. Elles sont détectées par HRM (voir [illustration 35](#)). Ces mutations ont ensuite été vérifiées par séquençage (voir [illustrations 36 et 37](#))

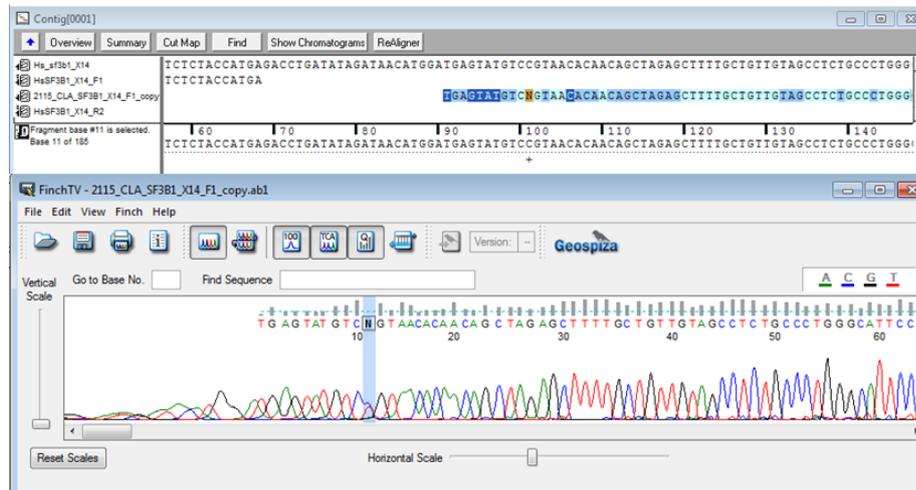


Illustration 36 : Mise en évidence de la mutation R625C par séquençage.

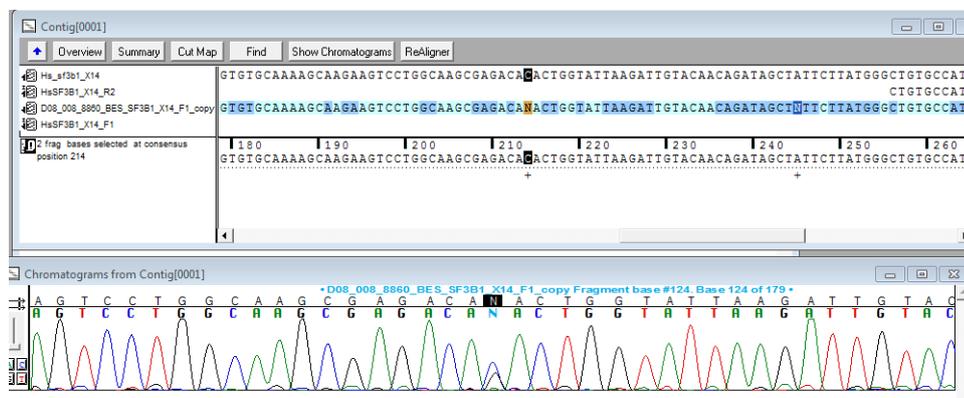


Illustration 37 : Mise en évidence de la mutation H662Q par séquençage.

Par ailleurs les deux autres types de mutation attendus ont été mis en évidence au cours d'expériences chez des patients atteints de LLC. L'ensemble de ces résultats permet de valider le couple d'amorces SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R2 pour la mise en évidence des mutations récurrentes de l'exon 14 du gène *SF3B1*.

2.1.2 Résultats

Parmi l'ensemble des patients testés, 3 patients présentent une mutation au niveau de l'exon 14 du gène *SF3B1* (2 mutations H662Q, 1 mutation R625C). Il s'agit de patients atteints de SMD-RS (2 ARS-T et 1 CRDM-RS).

2.2 Mutations de l'exon 15 du gène SF3B1

2.2.1 Mise au point de la méthode HRM

Concernant *SF3B1*, il existe essentiellement 5 points de mutation, dont l'un est le plus fréquent : il s'agit de la mutation K700E. Située au niveau de l'exon 15 du gène *SF3B1*, 4 amorces ont été testées (voir [illustration 38](#)). Les 2 amorces sens sont situées au niveau de l'intron 14-15 (amorces SF3B1 X15 F1 en jaune et SF3B1 X15 F2 en orange). Les 2 amorces anti-sens sont situées pour l'une au niveau de l'exon 15 (amorce SF3B1 X15 R1 en vert clair) et pour l'autre au niveau de la jonction exon 15-intron 15-16 (amorce SF3B1 X15 R2 en vert foncé).

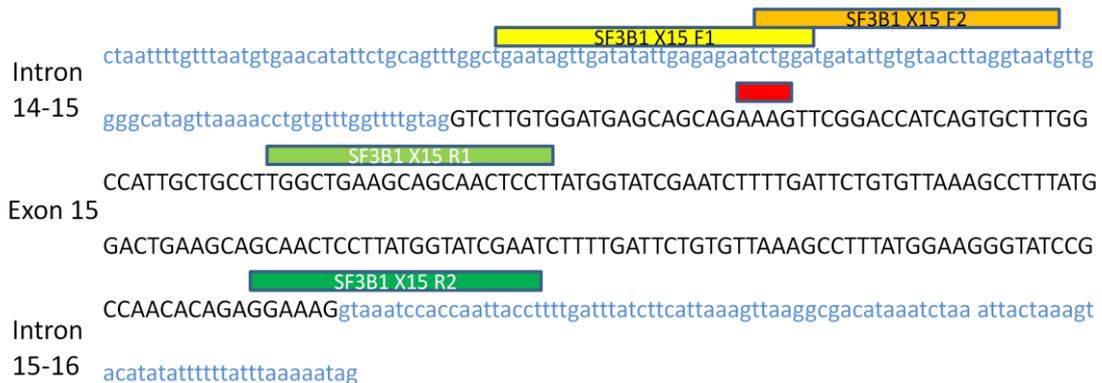


Illustration 38 : Exon 15 de *SF3B1* et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation K700E à mettre en évidence.

Les couples d'amorces ont été testés de la même façon que pour l'exon 14 de *SF3B1*. La sélection du meilleur couple d'amorces est réalisée selon les mêmes critères et a permis de choisir la combinaison SF3B1 X15 F1-SF3B1 X15 R2.

Selon la littérature, la mutation K700E est fréquemment retrouvée chez les patients atteints de SMD-RS. C'est pourquoi une liste de patients atteints de SMD-RS a été testée.

La mutation K700E a ainsi rapidement pu être mise en évidence par méthode HRM (voir [illustration 39](#)), avec confirmation par séquençage (voir [illustration 40](#)), permettant de valider le couple d'amorces choisi.

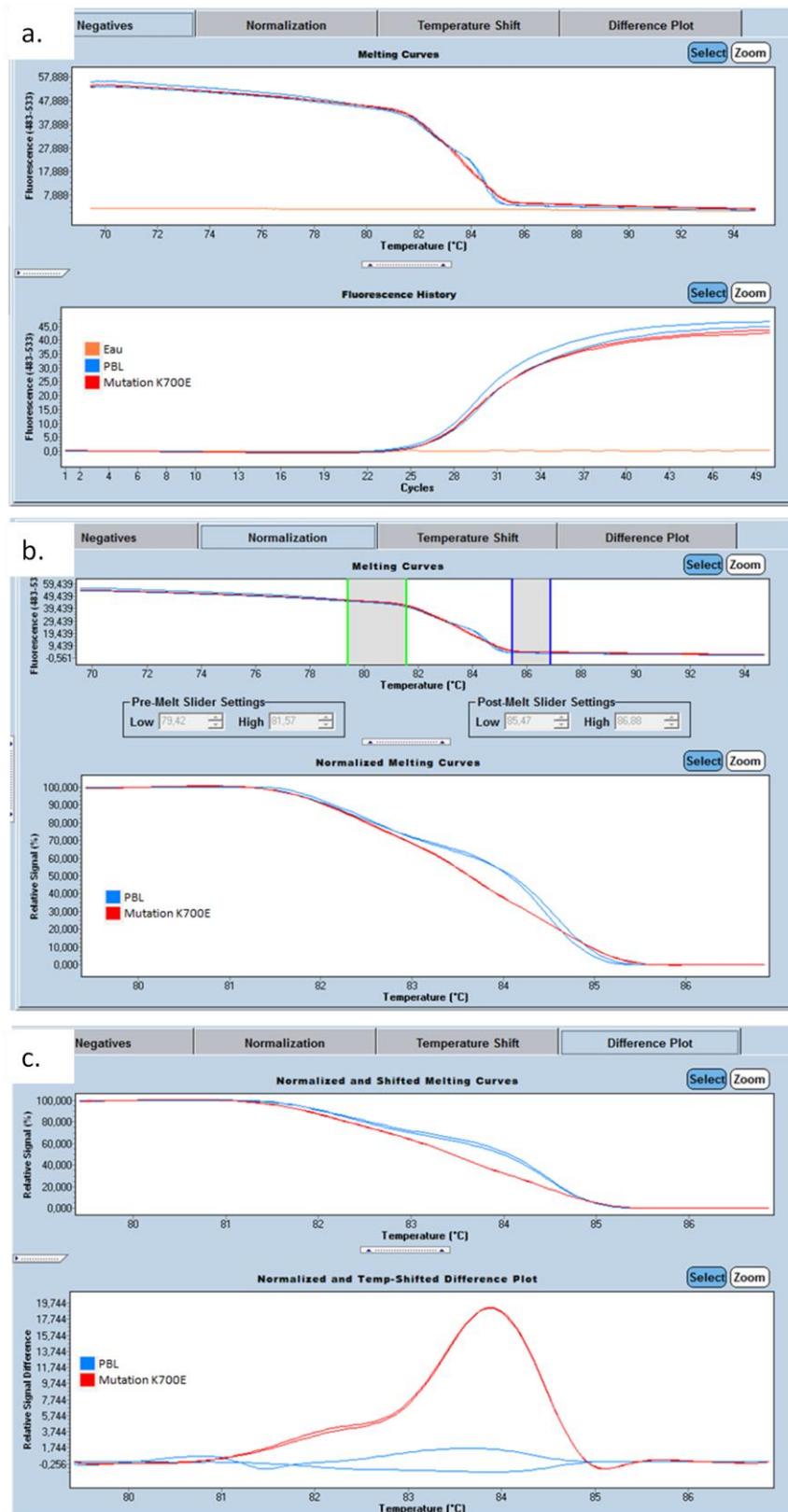


Illustration 39 : a. Courbes d'amplification et de fusion (en haut) d'un patient atteint de SMD-RS et présentant la mutation K700E au niveau de l'exon 15 du gène SF3B1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation K700E). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées

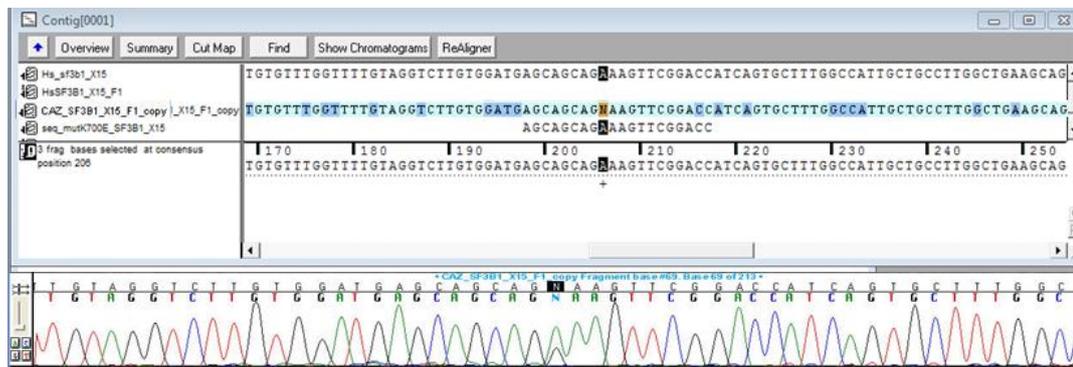


Illustration 40 : Mise en évidence de la mutation K700E par séquençage.

2.2.2 Résultats

Parmi l'ensemble des patients testés, 18 présentent la mutation K700E.

A noter que pour un patient, la mutation K700E est associée à une mutation du gène *SRSF2* (P95L) : il s'agit d'un patient atteint d'une ARS.

Les types de SMD sont les suivants :

- 9 ARS
- 1 AR
- 3 CRDM-RS
- 2 LMMC-1 (sans excès de sidéroblastes)
- 2 AREB-1
- 1 AREB-2.

2.3 Synthèse des mutations de SF3B1

Au total, parmi les 77 patients testés, 21 présentent une mutation au niveau du gène *SF3B1*, soit 27,3 %.

Dans cette cohorte, les résultats en fonction de la catégorie de SMD sont les suivants :

- 9 ARS sur 10
- 2 ARS-T sur 2
- 4 CRDM-RS sur 10
- 1 AR sur 1

- 2 LMMC (de type 1 dans les deux cas) sur 13
- 2 AREB-1 sur 11
- 1 AREB-2 sur 9

Une mutation du gène *SF3B1* est retrouvée chez 15 patients atteints de SMD-RS parmi les 22 testés, soit 68 %. En cas d'ARS (avec ou sans thrombocytose), la mutation est retrouvée chez 11 patients sur 12 soit 92 %.

Aucune mutation du gène *SF3B1* n'est retrouvée parmi les patients atteints de SMD secondaires (seulement 3 testés).

Parmi les 21 patients présentant une mutation de *SF3B1*, 3 sont décédés (1 patiente atteinte d'ARS d'hypertension intracrânienne à 81 ans, 1 patiente atteinte d'AR d'hémorragie digestive à 85 ans, et 1 patient atteint de CRDM-RS d'un syndrome de détresse respiratoire aigu à 81 ans) sans transformation préalable.

3. U2AF1

3.1 Mutations de l'exon 2 du gène U2AF1

3.1.1 Mise au point de la méthode HRM

Concernant *U2AF1*, il existe essentiellement 2 points de mutation, dont l'un est situé au niveau de l'exon 2 : il s'agit de la mutation S34F/Y. Quatre amorces ont été testées (voir [illustration 41](#)). Les 2 amorces sens sont situées au niveau de l'intron 1-2 (amorces U2AF1 X02 F1 en jaune et U2AF1 X02 F2 en orange). Les 2 amorces anti-sens sont situées à la jonction entre l'exon 2 et l'intron 2-3 (amorces U2AF1 X02 R1 en vert clair et U2AF1 X02 R2 en vert foncé).



Illustration 41 : Exon 2 de U2AF1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation S34F/Y à mettre en évidence.

Les couples d'amorces ont été testés de la même façon que pour l'exon 14 de *SF3B1*. La sélection du meilleur couple d'amorces est réalisée selon les mêmes critères.

Le couple d'amorces choisi pour l'amplification de l'exon 2 du gène *U2AF1* est U2AF1 X02 F1-U2AF1 X02 R2. En effet, les résultats montraient une courbe d'amplification débutant avant 30 cycles, l'absence d'amplification de l'eau et une courbe de fusion de type exponentielle négative avec un seul point d'inflexion.

Afin de vérifier que ce couple d'amorce amplifie bien uniquement le fragment attendu, une électrophorèse en gel d'agarose a été réalisée. La taille attendue du fragment correspondant était de 162 pb, sans produit de PCR non spécifique (voir [illustration 34](#)).

Selon la littérature, la mutation S34F/Y n'est pas retrouvée de façon préférentielle dans un groupe de SMD.

Ce type de mutation a été testé chez l'ensemble des patients et a pu être mis en évidence par méthode HRM (voir [illustration 42](#)), avec confirmation par séquençage (voir [illustration 43](#)), permettant de valider le couple d'amorces choisi.

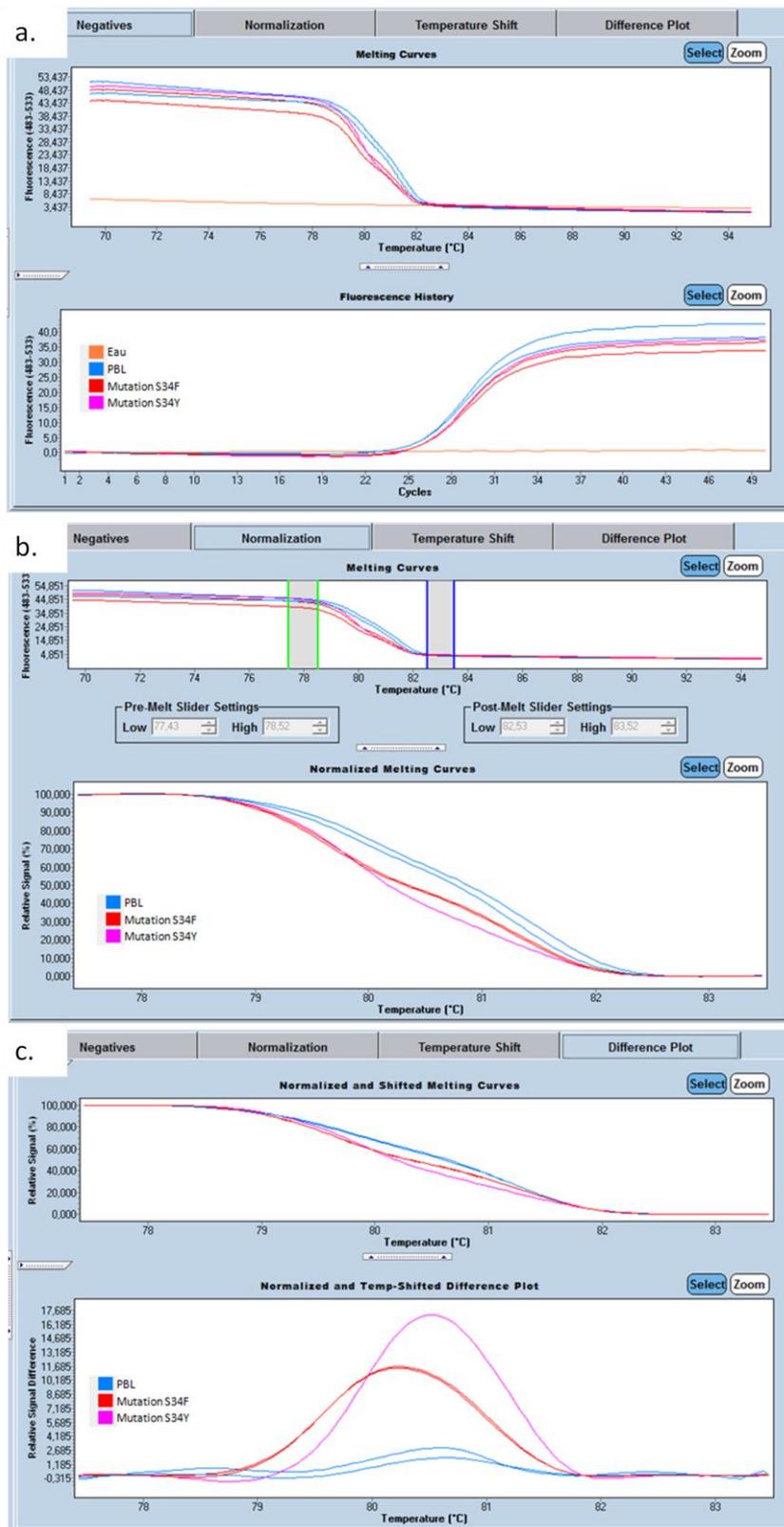


Illustration 42 : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 2 du gène U2AF1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation S34F, en rose un patient présentant la mutation S34Y). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.



Illustration 43 : Mise en évidence des mutations S34F (en haut) et S34Y (en bas) par séquençage.

3.1.2 Résultats

Parmi les patients testés, 3 présentent une mutation de l'exon 2 du gène *U2AF1*. Les catégories de SMD sont 1 thrombopénie réfractaire, 1 CRDM et 1 AREB-2.

Le patient atteint de CRDM est décédé à l'âge de 81 ans, sans transformation préalable.

3.2 Mutations de l'exon 6 du gène *U2AF1*

3.2.1 Mise au point de la méthode HRM

Concernant *U2AF1*, il existe essentiellement 2 points de mutation, dont l'un est situé au niveau de l'exon 6 : il s'agit de la mutation Q157P/R. Quatre amorces ont été testées (voir [illustration 44](#)). Les 2 amorces sens sont situées au niveau de l'intron 5-6 pour l'une (amorce *U2AF1 X06 F1* en jaune) et à la jonction intron 5-6 exon 6 pour l'autre (*U2AF1 X06 F2* en orange). Les 2 amorces anti-sens sont au niveau de l'intron 6-7 (amorces *U2AF1 X06 R1* en vert clair et *U2AF1 X06 R2* en vert foncé).

Intron
 5-6 gactatcttgaagttaatctcattgaaaataaaggattttcaattatcctgtaatactattccaccttactatacctgagtggtatctctctgatat
U2AF1 X06 F1 U2AF1 X06 F2
acttgattggttaattgagaaagtcttattaaagcgtggatggcaagcactctgttttctctttcagTTTCGCCGTGAGGAAGATGCGGA
 AAAGGCTGTGATTGACTTGAATAACCGTTGGTTAATGGACAGCCGATCCACGCCGAGCTGTACCCCGTGACGGAC
 Exon 6
■ U2AF1 X06 R1 U2AF1 X06 R2
 TTCAGAGAAGCCTGCTGCCGTCAGTATGAGATGGGgtgagtgaggagtggccagtgacgtgactgagcacagttcggggccgtgtgc
 Intron
 6-7 acacgaggtagtaaatgtctcctccaaccacccacag

Illustration 44 : Exon 6 de U2AF1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation Q157P/R à mettre en évidence.

Les couples d'amorces ont été testés de la même façon que pour l'exon 14 de SF3B1. La sélection du meilleur couple d'amorces est réalisée selon les mêmes critères.

Le couple d'amorces choisi pour l'amplification de l'exon 6 du gène U2AF1 est U2AF1 X06 F1-U2AF1 X06 R2. En effet, les résultats montraient une courbe d'amplification débutant avant 30 cycles, l'absence d'amplification de l'eau. La courbe de fusion de type exponentielle négative présente deux points d'inflexion. Afin de vérifier que ce couple d'amorce amplifie bien uniquement le fragment attendu, une électrophorèse en gel d'agarose a été réalisée. La taille attendue du fragment correspondant était de 222 pb, sans produit de PCR non spécifique (voir [illustration 34](#)).

Selon la littérature, la mutation Q157R/P n'est pas retrouvée de façon préférentielle dans un groupe de SMD.

Ce type de mutation a été testé chez l'ensemble des patients et a pu être mis en évidence par méthode HRM (voir [illustration 45](#)), avec confirmation par séquençage (voir [illustration 46](#)), permettant de valider le couple d'amorces choisi.

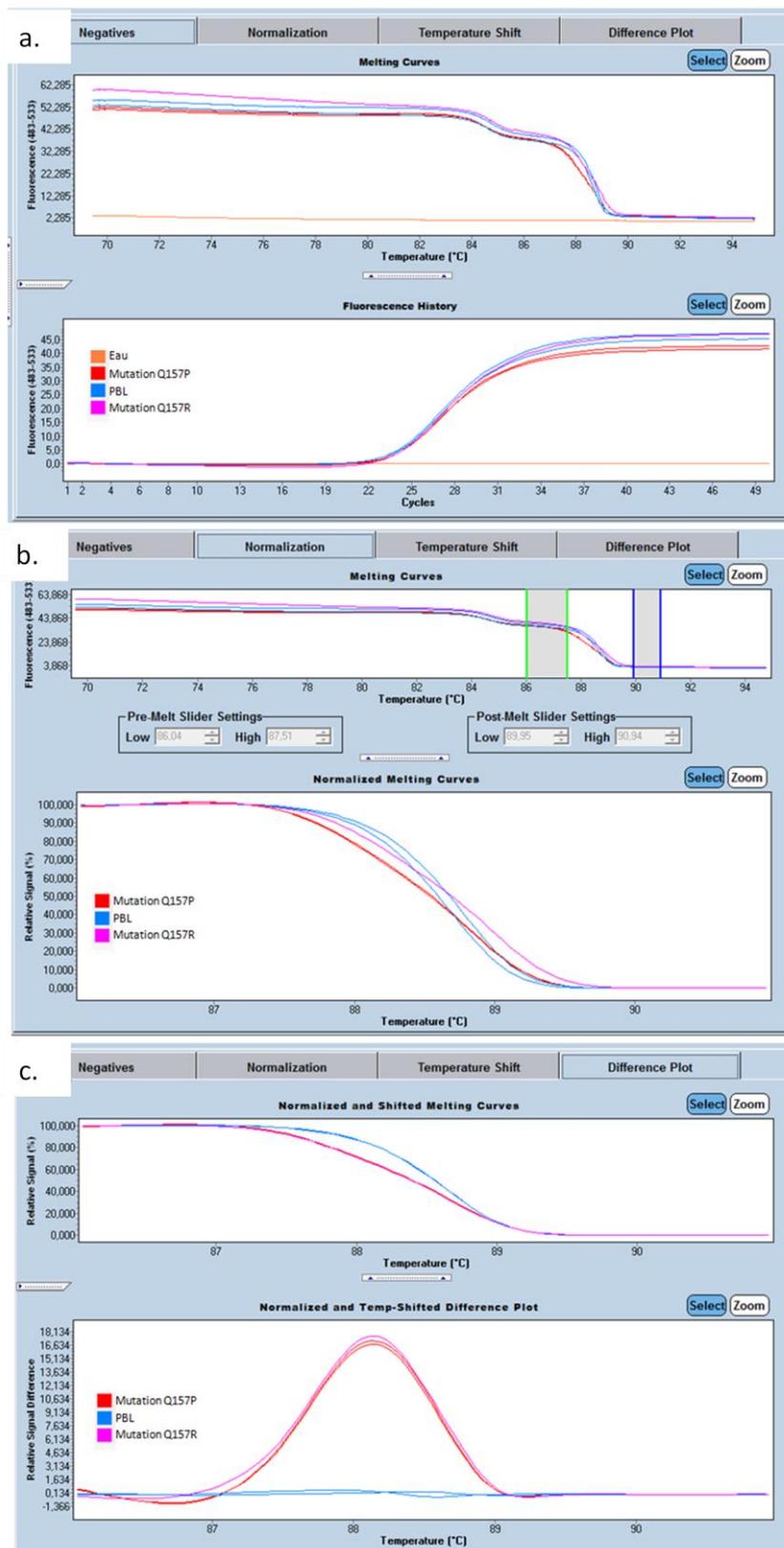


Illustration 45 : Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 6 du gène U2AF1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation Q157P, en rose un patient présentant la mutation Q157R). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.

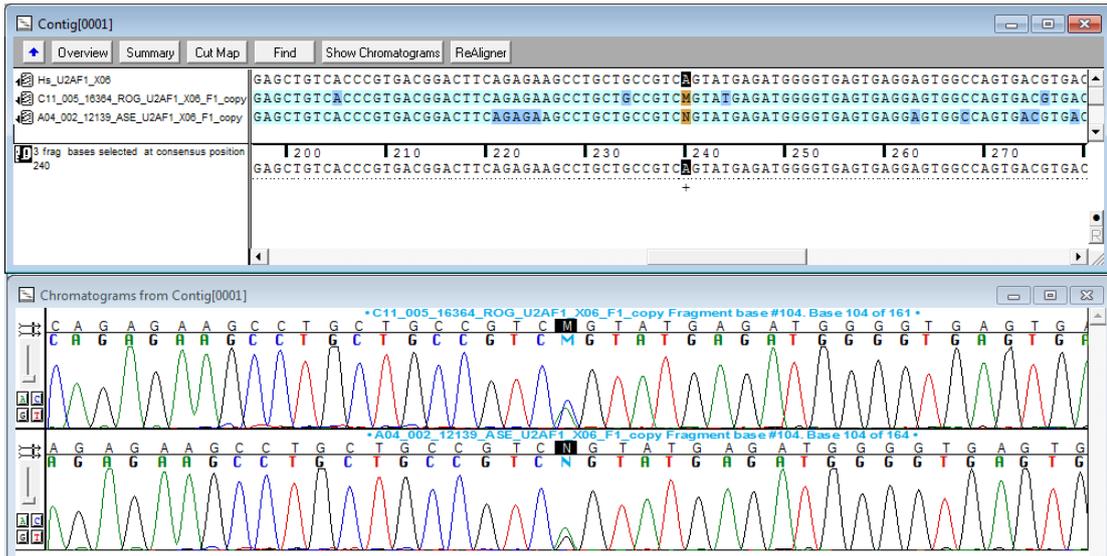


Illustration 46 : Mise en évidence des mutations Q157P (en haut) et Q157R (en bas) par séquençage.

3.2.2 Résultats

Parmi les patients testés, 3 présentent une mutation au niveau de l'exon 6 du gène *U2AF1* (2 mutations Q157P et 1 mutation Q157R).

Les catégories de SMD sont 1 thrombopénie réfractaire, 1 LMMC-1 et 1 AREB-1.

Une patiente (atteinte d'AREB-1) a progressé vers une LMMC-2.

3.3 Synthèse des mutations de *U2AF1*

Au total, 5 patients présentent une mutation au niveau du gène *U2AF1*, soit 6,5 %.

A noter qu'un patient présente deux mutations au niveau du gène *U2AF1* (S34Y et Q157R). Il s'agit du patient atteint de thrombopénie réfractaire.

4. SRSF2

4.1 Mise au point de la méthode HRM

Concernant *SRSF2*, il existe essentiellement 1 point de mutation, situé au niveau de l'exon 1 : il s'agit de la mutation P95H/L/R. Cinq amorces ont été testées (voir [illustration 47](#)). Les 3 amorces sens sont situées au niveau de l'exon 1 (amorces SRSF2 X01 F1 en jaune, SRSF2 X01 F2 en orange clair et SRSF2 X03 F3 en orange foncé). Les 2 amorces anti-sens sont situées pour l'une au niveau de l'exon 1 (amorce SRSF2 X01 R1 en vert clair) et pour l'autre à la jonction entre l'exon 1 et l'intron 1-2 (amorce SRSF2 X01 R2 en vert foncé).

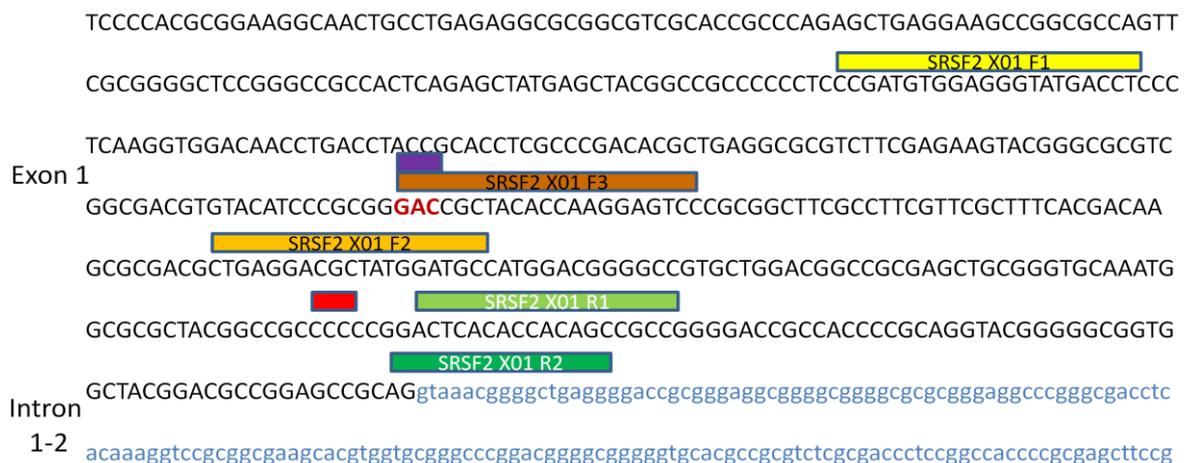


Illustration 47 : Exon 1 de *SRSF2* et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation P95H/L/R à mettre en évidence. En violet, un SNP fréquent (SNP rs237057).

L'exon 1 du gène *SRSF2* est particulièrement riche en GC, rendant plus difficile la sélection d'amorces. Dans un premier temps, seul le couple d'amorces SRSF2 X01 F1-SRSF2 X01 R1 a été testé. Les résultats étaient satisfaisants mettant en évidence une courbe d'amplification débutant avant 30 cycles, l'absence d'amplification de l'eau. La courbe de fusion de type exponentielle négative présentait un seul point d'inflexion, mais la température de fin de fusion devait être augmentée du fait du fort pourcentage en GC de la séquence.

Afin de vérifier que ce couple d'amorces amplifie bien uniquement le fragment attendu, une électrophorèse en gel d'agarose a été réalisée. La taille attendue du fragment correspondant était de 285 pb sans produit de PCR non spécifique (voir [illustration 34](#)).

Selon la littérature, la mutation P95H/L/R est retrouvée de façon préférentielle chez les patients atteints de LMMC.

Ce type de mutation a été testé chez une cohorte des patients atteints de LMMC et a pu être mis en évidence par méthode HRM (voir [illustration 48](#)), avec confirmation par séquençage (voir [illustrations 50 et 51](#)), permettant de valider le couple d'amorces choisi. Cependant, de nombreux autres échantillons étaient détectés comme positifs en HRM en l'absence de mutation. Il s'avère que la technique HRM mettait en évidence la présence d'un SNP fréquent en D48, présent y compris chez le PBL.

L'ensemble des patients atteints de LMMC ont été séquencés après amplification avec le couple d'amorces SRSF2 X01 F1-SRSF2 X01 R1 permettant la mise en évidence des mutations recherchées.

Un test a été réalisé pour vérifier s'il existait des différences dans les profils obtenus en HRM entre les patients présentant une mutation ou un SNP (voir [illustration 48](#)). Ces différents profils avaient été déterminés par séquençage. Cependant, les profils obtenus après normalisation n'étaient pas suffisamment discriminants.

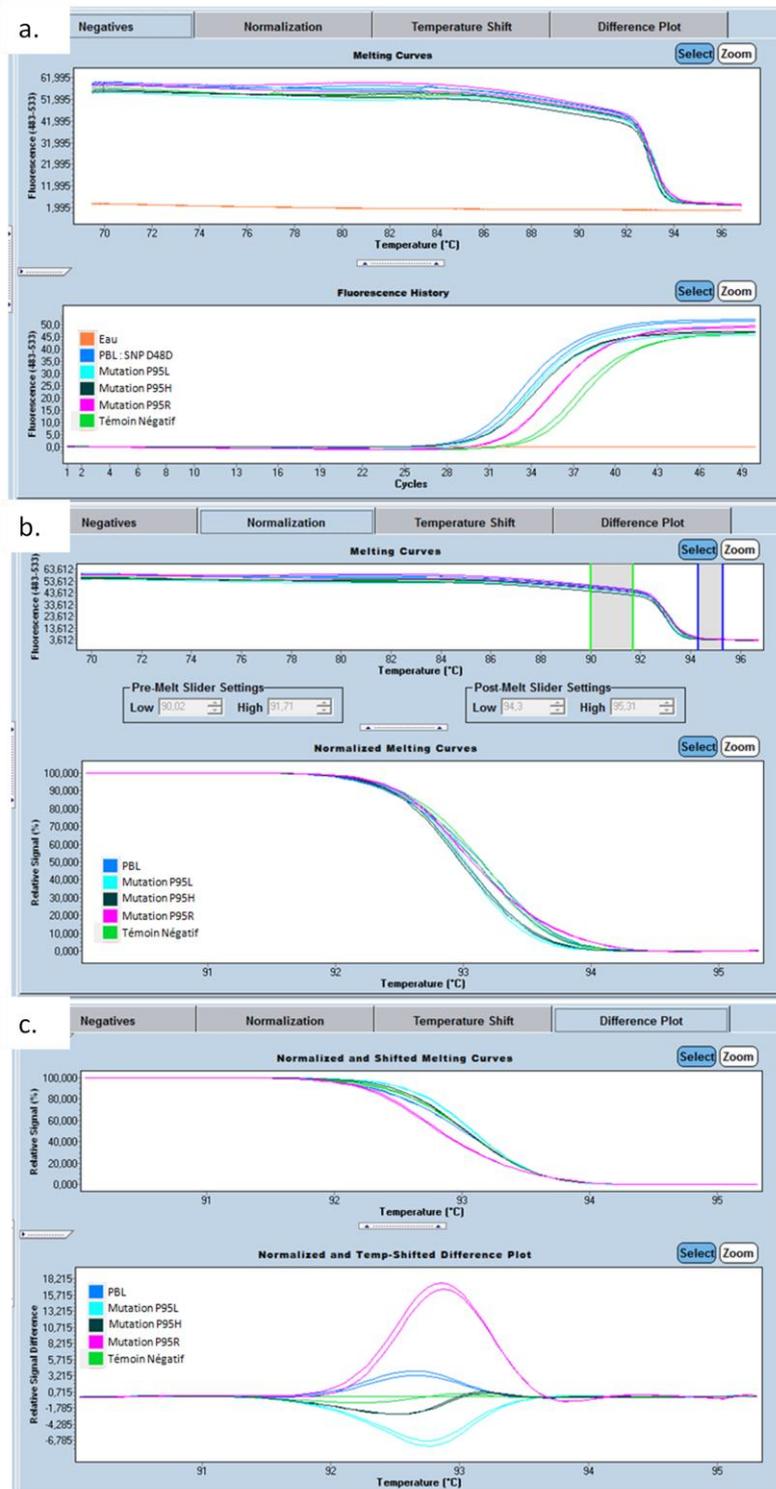


Illustration 48 : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de LMMC et présentant des mutations au niveau de l'exon 1 du gène SRSF2 (en orange l'eau, en bleu le PBL présentant le SNP fréquent en position D48, en bleu clair un patient présentant la mutation P95L, en vert foncé un patient présentant la mutation P95H, en rose un patient présentant la mutation P95R et en vert clair un témoin négatif sans SNP ni mutation) après amplification avec les amorces SRSF2 X01 F1-SRSF2 X01 R1. b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées

Un autre couple d'amorces a dû être testé pour pouvoir mettre en évidence la présence d'une mutation, sans faux positif lié à la présence du SNP.

Les différents couples d'amorces ont été testés de la même façon que pour l'exon 14 de *SF3B1*. Le couple d'amorces choisi est SRSF2 X01 F2-SRSF2 X01 R1 qui permet d'amplifier un fragment ne contenant pas le SNP en position 48, et donc d'éviter les interférences dans la détection de mutations. Les résultats avec ce couple d'amorces montraient une courbe d'amplification débutant avant 30 cycles, l'absence d'amplification de l'eau. La courbe de fusion de type exponentielle négative présente un seul point d'inflexion (voir [illustration 49](#)). Ce couple d'amorces permet la détection des mutations P95H/L/R, sans faux positif lié au SNP rs237057.

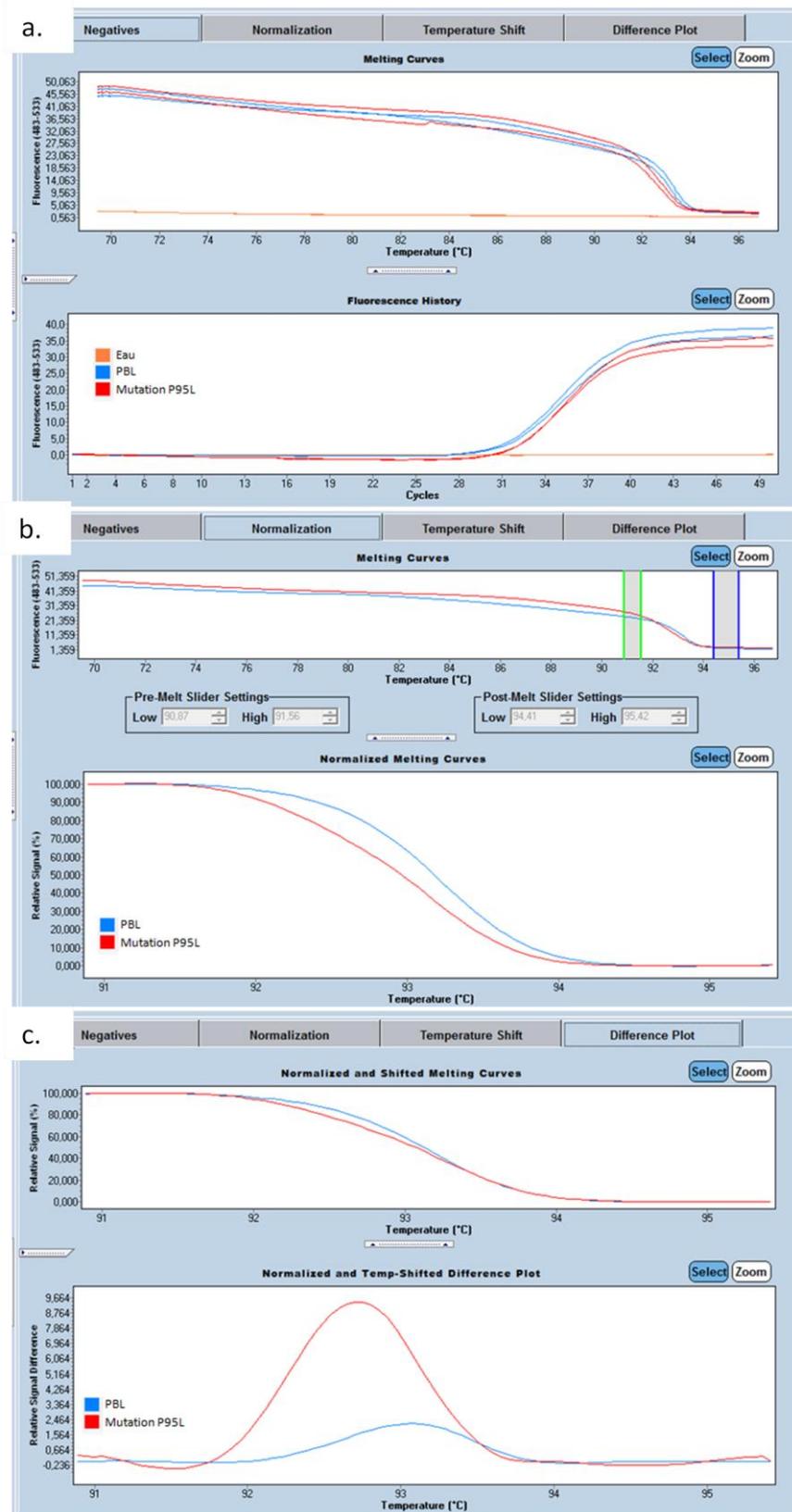


Illustration 49 : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 1 du gène SRSF2 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation P95L) après amplification avec les amorces SRSF2 X01 F2-SRSF2 X01 R1. b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.

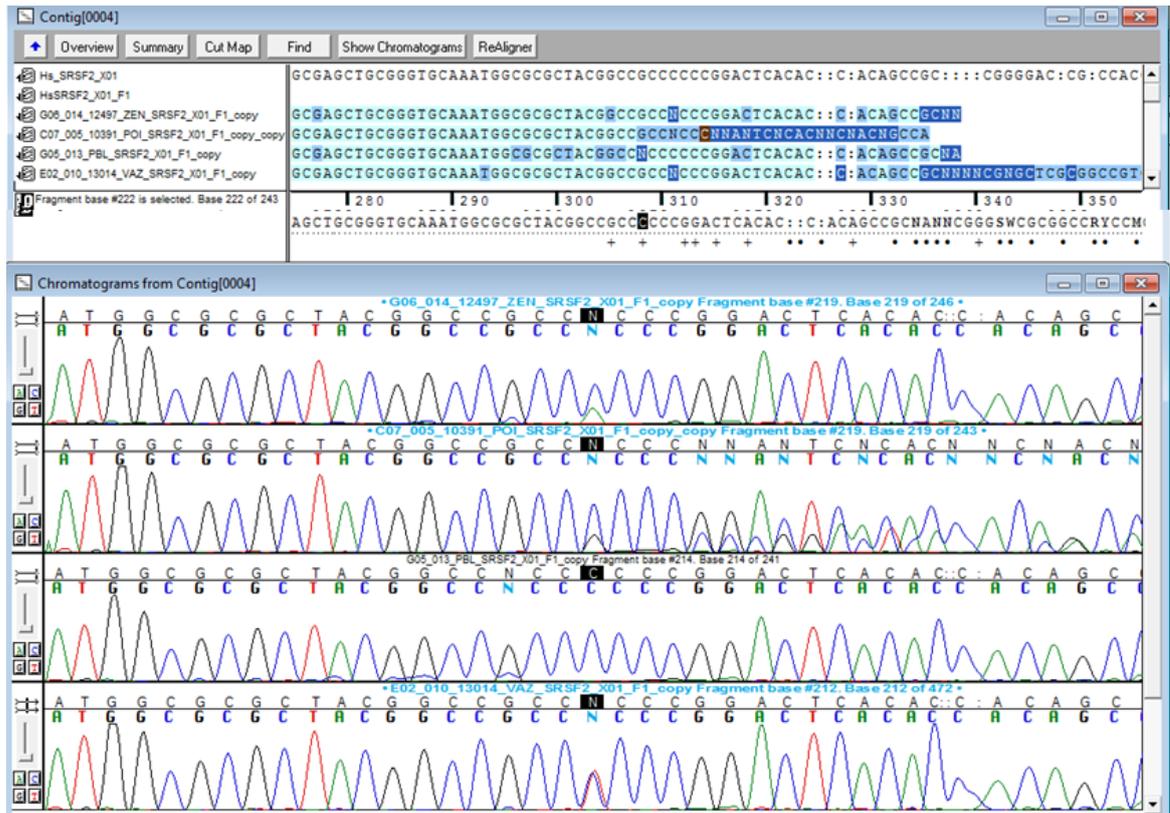


Illustration 50 : Mise en évidence des mutations P95H (en haut), P95R (2^{ème} en partant du haut) et P95L (en bas) par séquençage. Absence de mutation pour le PBL (3^{ème} en partant du haut).



Illustration 51 : Mise en évidence du SNP rs237057 à l'état homozygote (en haut), et à l'état hétérozygote (en bas).

4.2 Résultats

Parmi les 77 patients testés, 10 présentent une mutation au niveau de l'exon 1 du gène *SRSF2*. Ils étaient atteints d'une LMMC-1 pour 5, d'une ARS pour 1, d'une CRDM-RS pour 1, d'une AREB-2 pour 2 et d'un SMD-I pour 1.

Si on ne s'intéresse qu'aux patients atteints de SMD primaires, *SRSF2* est muté dans 8,6 % des cas.

Une mutation du gène *SRSF2* est retrouvée pour 5 LMMC sur 13, soit 39 %.

5. BILAN DES MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME RECHERCHEES

Au total, 35 mutations d'un des gènes du spliceosome sont retrouvées parmi les 77 patients testés.

Si on ne s'intéresse qu'aux patients atteints de SMD primaires, soit 58 patients, 25 présentent une mutation d'un des gènes étudiés, soit 43 % :

- 17 mutations pour le gène *SF3B1*, soit 29 % (dont 15 mutations K700E) ;
- 5 mutations pour le gène *SRSF2* (2 P95H, 2 P95L et 1 double muté P95L et SF3B1 K700E) ;
- 4 mutations pour le gène *U2AF1* (1 Q157P, 2 S34F et 1 double muté Q157R et S34Y).

5.1 SMD sans excès de sidéroblastes en couronne

Une mutation d'un des gènes du spliceosome testés est retrouvée chez 11 patients (sur 38, soit 28,9 %) atteints de SMD primaire sans excès de RS avéré: 4 patients ont une mutation du gène *SF3B1*, 3 du gène *SRSF2* et 4 du gène *U2AF1*.

Syndromes myélodysplasiques sans excès de RS

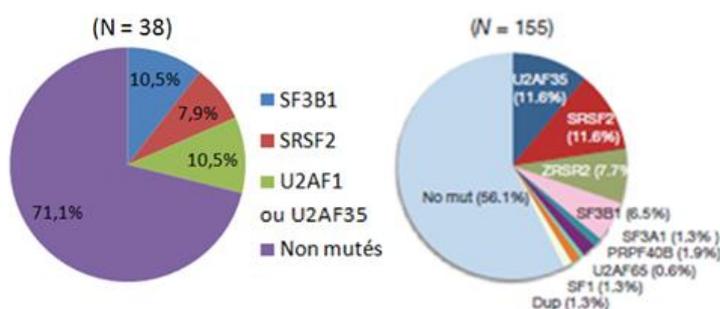


Illustration 52 : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de SMD sans excès de RS avéré dans notre étude et selon [16].

Les différents gènes testés sont mutés dans des proportions semblables dans les SMD sans excès de RS avéré.

5.2 SMD avec excès de sidéroblastes en couronne

Une mutation d'un des gènes du spliceosome testés est retrouvée chez 14 patients atteints de SMD-RS (exclusion des ARS-T) soit 70 % :

- 12 patients présentent une mutation de l'exon 15 de *SF3B1* (mutation K700E) soit 60 % ;
- 1 patient présente une mutation de l'exon 14 de *SF3B1* (mutation H662Q).
- 2 patients présentent une mutation de l'exon 1 de *SRSF2* (mutation P95L).

Il faut noter la présence d'un patient présentant 2 mutations : mutation P95L de *SRSF2* et K700E de *SF3B1*.

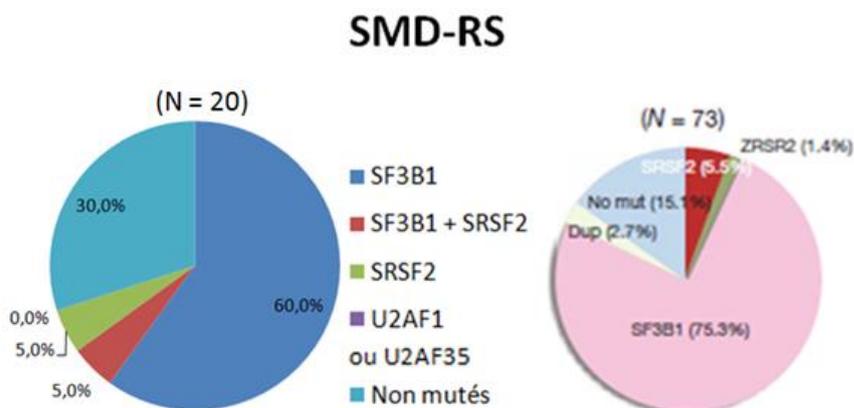


Illustration 53 : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de SMD-RS dans notre étude et selon [16].

Parmi les 10 ARS testées, 1 seul patient n'a pas de mutation détectée. Les 9 autres ont une mutation du gène *SF3B1* (K700E).

Concernant les 10 CRDM-RS, 5 sont mutés : 1 pour *SRSF2* et 4 pour *SF3B1*.

La majorité des patients atteints de SMD-RS présente une mutation pour *SF3B1*.

5.3 LMMC

Concernant les 13 patients atteints de LMMC, une mutation d'un des gènes du spliceosome testés est retrouvée chez 8 patients soit 61,5 % :

- 2 patients présentent une mutation de l'exon 15 de *SF3B1* (mutation K700E) soit 15 % ;

- 5 patients soit 38 % ont une mutation de l'exon 1 de *SRSF2* (mutation P95L pour 2, P95H pour 2 et P95R pour 1) ;

- 1 patient (soit 8 %) présente une mutation de l'exon 6 de *U2AF1* (mutation Q157P).

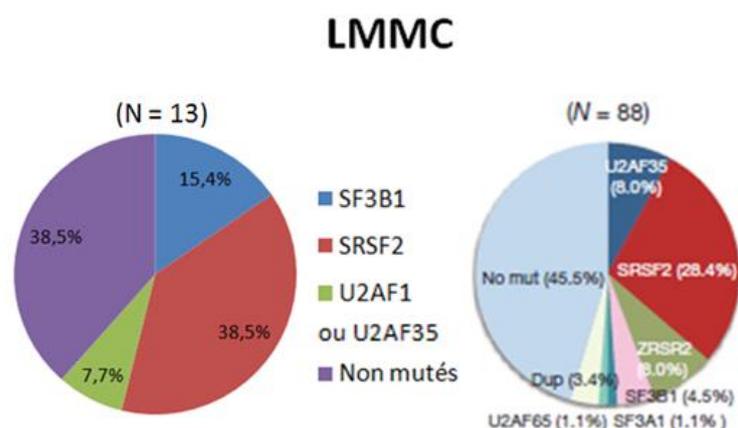


Illustration 54 : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de LMMC dans notre étude et selon [16].

La mutation de *SRSF2* est la plus fréquente dans les LMMC.

5.4 Fréquence des mutations en fonction des catégories IPSS et IPSS-r

Si l'on observe les mutations en fonction de la catégorie de risque attribuée selon le score IPSS :

- chez les patients à risque faible, 10 sont mutés (8 pour *SF3B1* seul, 1 pour *SF3B1* et *SRSF2* et 1 pour *U2AF1*) sur 19 (53 %);
- chez les patients à risque intermédiaire-1, 8 sont mutés (6 pour *SF3B1*, 1 est muté pour *SRSF2*, et 1 est muté pour *U2AF1*) sur 19 (42 %) ;
- chez les patients à risque intermédiaire-2, 5 sont mutés (2 pour *SF3B1*, 2 pour *SRSF2* et 1 pour *U2AF1*) sur 16 (31 %) ;
- chez les patients à risque haut, 2 sont mutés (1 pour *SRSF2* et 1 pour *U2AF1*) sur 4 (50 %).

En fonction de la catégorie de risque attribuée selon le score IPSS-r, les pourcentages de mutation sont les suivants :

- pour les patients à risque très faible, 5 sont mutés (tous pour *SF3B1*) sur 10 (50 %) ;
- pour les patients à risque faible, 9 sont mutés (5 pour *SF3B1* seul, 1 pour *SF3B1* et *SRSF2*, 1 pour *SRSF2* seul, et 2 pour *U2AF1*) sur 18 (50 %) ;
- pour les patients à risque intermédiaire, 6 sont mutés (5 pour *SF3B1* et 1 pour *SRSF2*) sur 10 (60 %) ;
- pour les patients à risque haut, 3 sont mutés (1 pour *SF3B1*, 1 pour *SRSF2* et 1 pour *U2AF1*) sur 11 (27 %) ;
- pour les patients à risque très haut, 2 sont mutés (1 pour *SRSF2* et 1 pour *U2AF1*) sur 9 (22 %).

5.5 Etude de l'association entre mutation d'un des gènes étudiés et caryotype

Il est intéressant de constater que les mutations des gènes du spliceosome sont significativement plus fréquentes en cas de caryotype normal (test du Khi-Deux sur les 77 patients, en séparant mutés/non mutés et caryotype normal/simple/complexe : $p < 0,001$).

Il s'avère que parmi les 77 patients, seuls 6 n'ont ni anomalie cytogénétique, ni mutation d'un des gènes du spliceosome testés. Sur ces 6 patients, 3 sont atteints de LMMC et 3 de SMD-RS. Concernant les 18 patients ayant un caryotype complexe, seuls 2 ont une mutation, et dans les 2 cas, il s'agit de *U2AF1* (patients atteints d'une AREB-1 et d'une AREB-2).

5.6 Analyses de survie

Il est difficile de réaliser des analyses de survie sur des effectifs relativement modestes et chez des patients ayant reçu des traitements variés. L'objectif est de visualiser des tendances éventuelles à explorer sur des cohortes plus importantes.

5.6.1 Ensemble des patients

L'analyse a été réalisée sur les 65 patients pour lesquels les données cliniques étaient disponibles. Malgré un $p = 0,4836$, il semble qu'il y ait une tendance à une meilleure survie parmi les patients mutés.

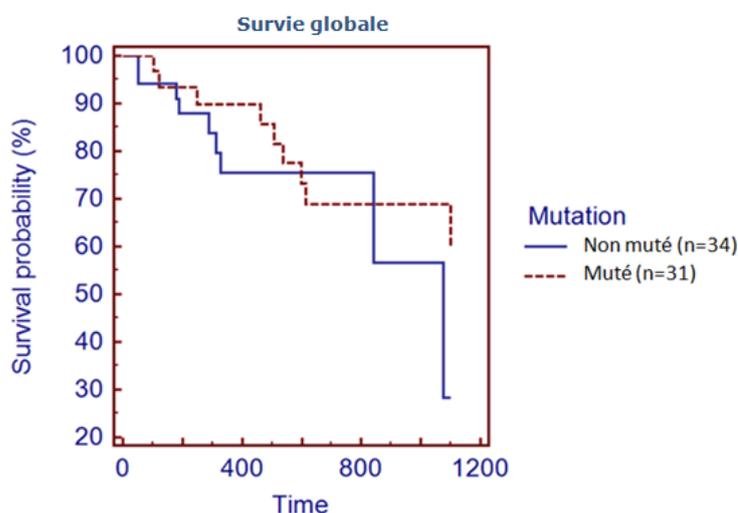


Illustration 55 : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez l'ensemble des patients de la cohorte en fonction de la présence ou non de mutation d'un gène du spliceosome ($n=65$, $p=0,4856$).

L'analyse a ensuite été réalisée sur la cohorte de patients atteints de SMD primaire : malgré un p à $0,4455$, il semble exister une tendance à une meilleure survie pour les patients mutés pour *SF3B1*.

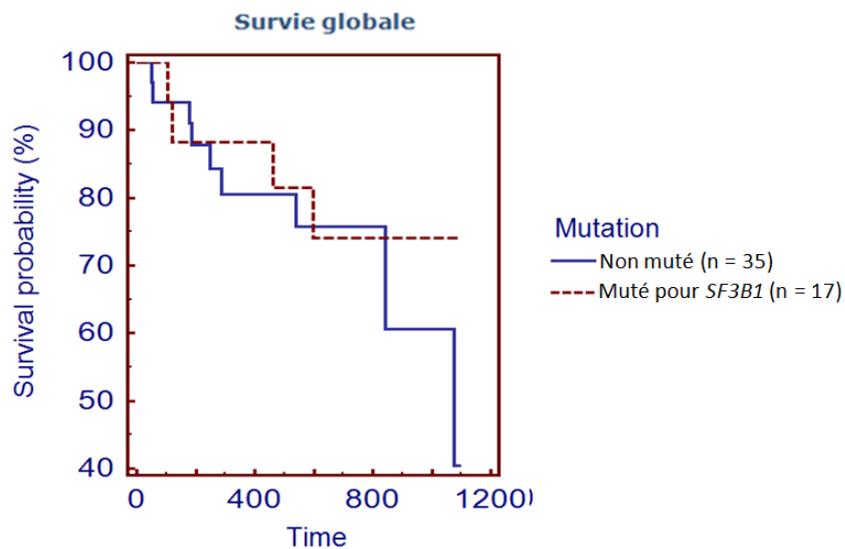


Illustration 56 : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez les patients atteints de SMD primaire en fonction de la présence ou non de mutation pour SF3B1 (n=52, p=0,4455).

5.6.2 SMD sans excès de sidéroblastes en couronne

Chez les patients atteints de SMD sans excès de RS, il ne semble pas exister de réelle différence de survie globale entre les statuts muté et non muté pour un des gènes du spliceosome.

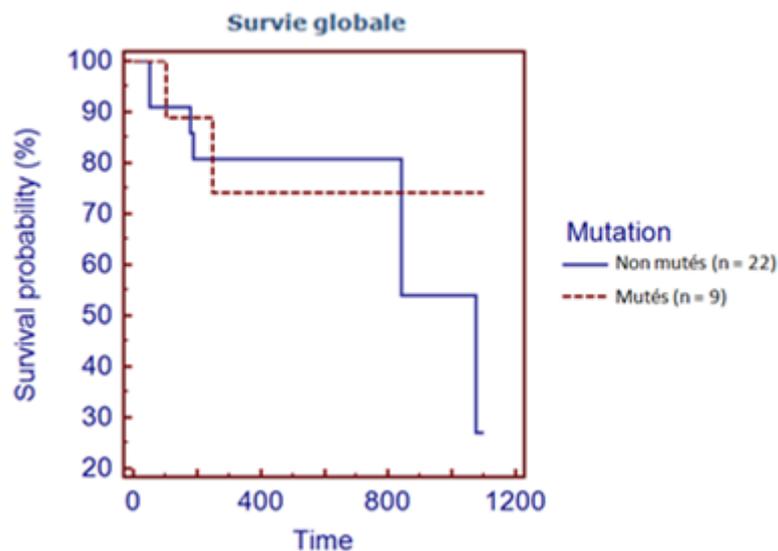


Illustration 57 : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez les patients atteints de SMD sans excès de RS avéré en fonction de la présence ou non de mutation d'un gène du spliceosome (n=31, p = 0,7711).

DISCUSSION

Dans notre étude, nous retrouvons des mutations des gènes du spliceosome (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) chez 45,5 % des patients de notre cohorte (n=77). Ces mutations se répartissent de la façon suivante :

- 29 % des SMD primaires sans excès de RS avéré (n=38), sans prédominance d'un des gènes étudiés ;
- 70 % des SMD-RS (n=20), avec une association particulière avec le gène *SF3B1* (mutation présente chez 60 % des patients atteints de SMD-RS),
- 62 % des LMMC (n=13), avec une prédominance importante de *SRSF2* (mutation présente chez 38,5 % des patients atteints de LMMC).

Le premier objectif de cette étude est de vérifier les fréquences des mutations au niveau des gènes du spliceosome avancées dans les publications. La première étude [16], basée sur 582 patients, retrouvait 43,9 % de mutations chez les patients atteints de SMD sans excès de sidéroblastes et 29,7 % en étudiant seulement *SF3B1*, *U2AF1* et *SRSF2*, chiffre comparable à notre étude (29 %). La répartition des mutations entre ces 3 gènes était de 6,5 % pour *SF3B1* (contre 10,5 %), de 11,6 % pour *U2AF1* (contre 10,5 %) et de 11,6 % pour *SRSF2* (contre 7,9 %). Cette même étude retrouvait 84,9 % de mutations chez les patients atteints de SMD-RS, et 80,8 % en étudiant seulement *U2AF1*, *SF3B1* et *SRSF2*. Nous retrouvons un nombre de mutations comparable bien qu'inférieur dans cette population (70 %). Une mutation de *SF3B1* était retrouvée dans 75,3 % des SMD-RS (contre 65 % dans notre étude), une mutation de *SRSF2* dans 5,5 % (contre 10 %). Aucune mutation du gène *U2AF1* n'était retrouvée chez ce type de patients, ce qui est également notre cas. Concernant les LMMC, l'étude retrouvait une mutation d'un gène du spliceosome dans 54,5 % des cas, et 40,9 % en étudiant seulement *SF3B1*, *U2AF1* et *SRSF2* (contre 62 %). Cette fréquence est beaucoup plus élevée dans notre étude du fait d'une cohorte très petite (seulement 13 patients). Cette population n'est pas celle qui nous intéresse dans ce travail.

Une deuxième étude basée sur 336 patients atteints de SMD (toute catégorie confondue) retrouvait une fréquence de mutation de 20 % pour le gène *SF3B1*, contre 29,3 % dans notre étude, avec 65 % dans les SMD-RS [20]. Les répartitions en fonction des pathologies étaient les suivantes :

- 68 % des ARS (n = 59), contre 90 % pour notre cohorte (n = 10) ;

- 57 % des CRDM-RS (n = 23), contre 40 % dans notre étude (n = 10) ;
- 10 % des AR (n = 91) ; concernant nos patients, 1 seul était classé dans cette catégorie et était muté pour *SF3B1* ;
- 6 % des CRDM (n = 53), contre 0 % dans notre étude (n = 9) ;
- 5 % des AREB (n = 110), contre 15 % pour notre cohorte (n = 20).

La présence d'une mutation du gène *SF3B1* est encore un fois associée à la présence de sidéroblastes en couronne (65 % des cas, comme dans notre étude).

Ces mutations étaient retrouvées dans moins de 10 % des cas dans d'autres pathologies myéloïdes (LAM, myélofibrose, LMMC et thrombocytémie essentielle), et de 1 à 5 % dans d'autres types de tumeurs.

La même équipe publie des pourcentages de mutations de *SF3B1* similaires [21] :

- 79 % (sur 107 patients) dans les ARS ;
- 57,7 % (sur 54) dans les CRDM-RS ;
- 11,5 % (sur 135) dans les AR ;
- 6,3 % (sur 102) dans les CRDM ;
- 8,4 % (sur 87) dans les AREB-1 ;
- 11,3 % (sur 57) dans les AREB-2 ;
- 18,2 % (sur 22) dans les syndromes 5q-.

Au total, dans cette étude, 28,1 % des patients atteints de SMD sont porteurs d'une mutation du gène *SF3B1*. Dans la LMMC, sur 67 patients, 6,5 % présentaient une mutation de ce gène. Selon eux, la fréquence de cette mutation est plus importante chez les femmes (27 %) que chez les hommes (18 %), fait non retrouvé dans notre étude (8 sur 27 femmes soit 29,6 % et 9 hommes sur 31 soit 29,0 %).

Patnaik *et al.* retrouvent 53 patients mutés pour *SF3B1* sur 107 (soit 49,5 %), taux significativement inférieur à ceux retrouvés dans les autres études. Cette différence serait expliquée par des différences d'interprétation morphologique et de classification des patients. Il faut aussi noter que les SMD-RS étudiés comprennent des AREB et des SMD-U, ce qui pourrait contribuer à la diminution de la fréquence observée.

Thol *et al.* [22] ont étudié les mutations des gènes *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2* chez 193 patients atteints de SMD. Ils ont retrouvé 34,7 % de patients mutés, avec 12,4 % de mutation pour *SRSF2*, 7,3 % pour *U2AF1*, 3,1 % pour *ZRSR2* et 14,5 % pour *SF3B1*.

Wu *et al.* [23] se sont intéressés plus particulièrement à *SRSF2*. Ils retrouvent 11,7 % de mutations de ce gène dans les SMD (sur 171 patients), contre 8,6 % dans notre étude (sur 58 patients). La mutation est retrouvée préférentiellement chez les hommes. Cette tendance est également retrouvée dans notre étude : parmi les 77 patients étudiés, 10 mutations de *SRSF2* ont été retrouvées dont 8 sont observées chez des hommes

	Yoshida et al	Papaemmanuil et al	Malcovati et al	Patnaik et al	Etude au CHU de Toulouse
SMD primaires	28,5 % (n=228)	20 % (n=354)	28,1 % (533)		29,3 % (n=58)
Avec RS	75,3 % (n=73)	64,6 % (n=82)	72,0 % (n=157)	49,5 % (n=107)	65 % (n=20)
ARS		68 % (n=59)	79,0 % (n=105)	72,9 % (n=48)	90 % (n=10)
CRDM-RS		57 % (n=23)	57,7 % (n=52)	37,2 % (n=43)	40 % (n=10)
Sans RS	6,5 % (n=155)	7,1% (n=254)	9,8 % (n=376)		10,5 % (n=38)
AR		10 % (n=91)	11,5 % (n=122)		100 % (n=1)
TR					0 % (n=1)
CRDM		6 % (n=53)	6,3 % (n=96)		0 % (n=9)
5q-			18,2 % (n=22)		0 % (n=4)
AREB-1		} 6 % (n=110)	8,4 % (n=83)		18,2 % (n=11)
AREB-2			11,3 % (n=53)		11,1 % (n=9)
SMD-I					0 % (n=3)
Autres	4,6 % (n=239)	5 % (n=106)	15,3 % (n=118)		21,1 % (n=19)
SMD secondaires					0 % (n=3)
ARS-T			66,7 % (n=18)		100 % (n=2)
LMMC	4,5 % (n=88)	5 % (n=106)	6,5 % (n=62)		15,4 % (n=13)
LAM secondaires à un SMD	4,8 % (n=151)		5,3 % (n=38)		0 % (n=1)
Total	16,3 % (n=467)	16,7 % (n=460)	25,8 % (n=651)		27,3 % (n=77)

Tableau 13 : Synthèse des fréquences de mutations observées pour *SF3B1* dans différentes populations de patients en fonction de diverses études [16], [20], [21] [24].

Les fréquences de mutations des gènes du spliceosome avancées dans la littérature sont comparables avec celles retrouvées dans notre étude.

D'autre part, le caractère mutuellement exclusif de ces mutations est retrouvé : seul un patient de notre cohorte présente une mutation au niveau de 2 gènes du spliceosome.

Dans notre étude, les mutations des gènes du spliceosome étudiées sont significativement plus fréquentes en cas de caryotype normal bien qu'il existe un biais du fait d'un plus grand nombre de patients présentant un caryotype normal parmi les patients atteints de SMD-RS. Parmi les 77 patients testés, seuls 6 n'ont ni anomalie cytogénétique, ni mutation détectée d'un des gènes testés, (dont seulement 3 atteints de SMD primaire). Cet aspect est particulièrement

intéressant dans une approche diagnostique pour confirmer la présence d'un SMD et mérite d'être étudié plus précisément.

Par ailleurs, dans l'ensemble des études, l'incidence d'une mutation de *SF3B1* est significativement plus importante dans les ARS que dans les CRDM-RS et dans les CRDM-RS que dans les CRDM.

Les catégories CRDM-RS et CRDM sont à présent regroupées selon la classification OMS, alors que selon les différentes études, y compris la nôtre, le pourcentage de patients mutés pour *SF3B1* est significativement plus élevé dans les CRDM-RS, suggérant un pronostic meilleur de ce type de pathologie. Il serait par conséquent intéressant de distinguer ces deux catégories, ou de distinguer les patients atteints de CRDM (avec ou sans RS) mutés pour *SF3B1*.

La fréquence élevée de ces mutations a soulevé la question de leur implication dans le phénotype des patients concernés. En plus de son association à la présence de sidéroblastes, une mutation de *SF3B1* est retrouvée chez des patients ayant des comptes de leucocytes et de plaquettes supérieurs alors que le taux d'hémoglobine semble inchangé [20]. Dans notre étude, il s'avère que parmi les patients atteints de SMD-RS, 3 patients présentent une thrombopénie sévère et aucun n'est porteur d'une mutation du gène *SF3B1*. En ce qui concerne la neutropénie, 2 patients ont une neutropénie sévère et sont porteurs d'une mutation de *SF3B1*. Par ailleurs, les 2 patients atteints d'ARS-T sont mutés pour *SF3B1* (mutation *JAK2* également présente). Les auteurs décrivent également une hyperplasie érythroïde médullaire plus marquée et un pourcentage de blastes plus faible. Le fait le plus marquant est l'impact sur la survie de ces patients, avec une survie sans événement et une survie globale très significativement supérieures en cas de mutation pour *SF3B1* (voir [illustration 58](#)).

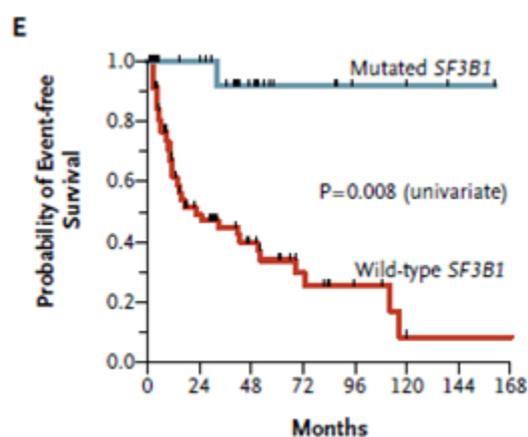


Illustration 58 : Courbes de Kaplan-Meier concernant la survie sans événement chez des patients atteints de SMD, en fonction de la présence ou non d'une mutation de *SF3B1*, selon [20].

Ces résultats suggèrent l'association de la mutation de *SF3B1* à des SMD de bon pronostic.

Concernant l'impact pronostique de ce phénotype, l'étude de Malcovati *et al.* [21] ne montre aucune différence significative en terme de survie globale entre ARS, ARS-T et CRDM-RS ; la survie sans événement était identique entre ARS et ARS-T, et significativement plus courte en cas de CRDM-RS. Il semblerait que la mutation *JAK2* conférerait un meilleur pronostic au sein des ARS-T. Ils ont également étudié l'impact de la charge en allèle muté : dans les ARS et CRDM-RS, la charge en allèle muté pour *SF3B1* est significativement plus importante, mais aucune relation n'a été mise en évidence avec les caractéristiques hématologiques et cliniques par ailleurs. L'étude de l'impact pronostique de *SF3B1* muté au sein des SMD-RS montrait une survie significativement supérieure en cas de mutation en analyse univariée, mais pas en analyse multivariée (tenant compte de l'âge, du sexe, du taux d'hémoglobine, des comptes de neutrophiles et de plaquettes, du caryotype, du pourcentage de blastes médullaires et du pourcentage de RS).

Une autre publication [24] s'intéresse à l'impact pronostique de *SF3B1* dans les SMD-RS spécifiquement. L'étude met également en évidence des comptes de plaquettes plus élevés chez les patients mutés. Enfin, la survie sans événement et la survie globale sont meilleures en cas de mutation dans les SMD-RS pris dans leur globalité, mais dans des proportions inférieures à celles démontrées par Papaemmanuil *et al.* et cet effet est perdu si les catégories ARS et CRDM-RS sont étudiées séparément : la mutation *SF3B1* n'aurait selon cette étude pas d'impact pronostique indépendant.

L'étude de Visconte *et al.* retrouve l'impact pronostic positif suggéré par Papaemmanuil *et al.* est retrouvé [25].

D'autres publications ont voulu vérifier l'impact pronostique des autres mutations des gènes du spliceosome. Selon Thol *et al.* [22], les mutations de *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2* ne sont pas associées à d'autres caractéristiques telles que la catégorie IPPS, l'âge, le pourcentage de blastes médullaire, le taux d'hémoglobine, le caryotype, le type de SMD ou la dépendance transfusionnelle. Les mutations de *U2AF1* n'avaient pas d'impact significatif sur la survie globale, mais avaient tendance à être associées à un délai plus court avant transformation en LAM en analyse univariée (effet non retrouvé en analyse multivariée prenant en compte l'IPSS, la dépendance transfusionnelle et d'autres mutations associées). Les patients mutés pour *SRSF2* avaient un taux plus important de transformation en LAM et une survie globale diminuée, y compris chez les patients de catégorie de risque plus faible selon l'IPSS (en analyse uni et multivariée).

Concernant l'impact de *SRSF2*, Wu *et al.* [23] indiquent que l'incidence de ce type de mutation est similaire entre les groupes de SMD de faible risque et de haut

risque (risque établi à partir de différents paramètres dont le groupe cytogénétique, le type de SMD ou le score IPSS). Dans notre étude, la mutation semble être un peu plus fréquente dans les groupes de haut risque, particulièrement après catégorisation à l'aide du score IPSS-r (voir [tableau 14](#)), mais l'échantillonnage reste trop faible. Par ailleurs, les patients mutés pour *SRSF2* présentaient des taux de mutation significativement plus élevés pour d'autres gènes tels que *RUNX1*, *ASXL1* et *IDH2*. Les mutations de *SRSF2* sont plus fréquentes chez des patients plus âgés (non retrouvé dans notre étude : moyenne d'âge des patients mutés de 75,4 ans, contre 74,7 pour la totalité des patients). L'impact pronostique négatif d'une mutation du gène *SRSF2* est retrouvé chez les patients atteints de SMD de faible risque, mais pourrait être influencé par l'âge des patients (cet impact n'est pas retrouvé lorsque l'étude se cantonne aux patients de plus de 50 ans). Cet impact n'est pas mis en évidence parmi les patients atteints de SMD de haut risque ou de LMMC. La mutation *SRSF2* serait plutôt impliquée dans le développement des SMD plutôt que dans leur progression. Par ailleurs, la mutation *SRSF2* est toujours associée à une absence de mutation de *EZH2* dans les LMMC, ce qui n'est pas le cas dans les SMD.

Catégorie IPSS	Pourcentage de mutation pour SRSF2
Risque bas	10,5 %* (n= 19)
Risque intermédiaire-1	5,3 % (n=19)
Risque intermédiaire-2	12,5 % (n=16)
Risque haut	25 % (n=4)
Catégorie IPSS-r	Pourcentage de mutation pour SRSF2
Risque très bas	0 % (n=10)
Risque bas	5,6 %* (n=18)
Risque intermédiaire	10 % (n=10)
Risque haut	9,1 % (n=11)
Risque très haut	11,1 % (n=9)
* dont 1 double muté SF3B1 et SRSF2	

Tableau 14 : Pourcentage de patients atteints de SMD présentant une mutation pour le gène SRSF2 en fonction de la catégorie IPSS ou IPSS-r.

Une autre étude s'est intéressée à l'impact pronostique des mutations récurrentes du spliceosome chez les patients de catégories de plus faible risque selon le score IPSS (catégories de risque faible ou intermédiaire-1) [26]. En effet, parmi ces patients, certains vont avoir une évolution plus agressive. Il serait donc intéressant de mettre en évidence de nouveaux facteurs pronostiques permettant de les différencier et de mettre en place un traitement adapté. Ils ont étudié

différents gènes pour 288 patients de plus faible risque selon l'IPSS. Ils ont retrouvé 22 % de mutations pour *SF3B1*, 16 % pour *U2AF1* et 15 % pour *SRSF2*. Ils ont mis en évidence une association des mutations pour *SF3B1* et *DNMT3A* : parmi 36 patients mutés pour *DNMT3A*, 20 étaient également mutés pour *SF3B1* (soit 56 %). La proportion de mutations de *SF3B1* parmi les patients atteints de SMD-RS était de 78 %, contre 13 % chez les patients ne présentant pas d'excès de RS. La présence d'au moins 4 % de blastes médullaires est associée avec la mutation *SRSF2*. Une thrombopénie profonde (< 50 G/L) est associée avec la mutation de *U2AF1*. A l'inverse, la mutation de *SF3B1* est associée à des taux de plaquettes normaux ou augmentés. Par ailleurs, chez des patients de catégorie de risque plus élevé, les mutations pour *SRSF2* et *U2AF1* étaient significativement plus importantes, alors que pour *SF3B1*, elles étaient significativement plus faibles. En analyse univariée, les mutations de *SRSF2* et *U2AF1* étaient associées à une survie globale plus courte, alors que les mutations de *SF3B1* n'étaient pas significativement associées à une meilleure survie globale. Cependant, après ajustement avec d'autres paramètres (cytogénétique, compte médullaire de blastes et cytopénies intégrés dans un score de risque pour les SMD de plus faible risque ou LR-PSS), l'impact péjoratif des mutations de *SRSF2* et *U2AF1* était perdu. Parmi l'ensemble des gènes testés, une mutation de *EZH2* était associée significativement à une survie globale inférieure chez les patients de plus faible risque, en analyse uni- et multivariée.

Enfin, la fréquence importante des mutations des gènes du spliceosome dans les syndromes myélodysplasiques pourrait suggérer leur implication dans la pathogénèse. Les mutations les plus fréquentes du gène *SF3B1* étaient situées entre les exons 12 à 15, avec dans 55 % des cas la mutation K700E. Les 4 points récurrents de mutations E622, R625, H662 et K666 sont également retrouvés. Ces mutations maintiendraient l'intégrité structurale de la protéine, mais entraînent probablement une altération de son activité [20]. La récurrence de cette mutation dans les syndromes myélodysplasiques avec excès de sidéroblastes laissent penser à un rôle de ce gène dans la pathogénèse. Pour essayer d'étayer cette hypothèse, les auteurs ont étudié les profils d'expression de gènes chez des patients atteints de SMD sur des cellules CD34+ purifiées à partir d'échantillons de moelle osseuse. Ils ont retrouvé 50 sets de gènes sous-régulés chez les patients mutés pour *SF3B1* dont sept impliquent des voies clés déterminant des fonctions mitochondriales. Cependant, aucune anomalie dans l'épissage des gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales n'a été mise en évidence. Une mutation du gène *SF3B1* est associée à une sous-régulation systématique des réseaux essentiels de gènes mitochondriaux, mais le mécanisme n'est pas élucidé. De plus, les changements transcriptionnels précèdent l'apparition de dépôts de fer mitochondriaux [20].

Une étude récente [25] s'est intéressée à l'impact de la mutation de *SF3B1* sur la formation de RS. Les auteurs ont d'abord vérifié les fréquences précédemment avancées et retrouvent des résultats similaires (68 % des patients atteints d'ARS sont mutés pour *SF3B1* et 81 % des ARS-T). Afin de vérifier si la mutation de *SF3B1* entraîne des différences dans la répartition du fer, les érythroblastes ont été étudiés par microscopie électronique chez des patients atteints d'ARS mutés et non mutés pour *SF3B1* : les dépôts de fer observés en microscopie seraient plus denses chez les patients mutés ; cette différence est indiscernable par coloration de Perls. Ils ont étudié l'effet de l'inhibition de *SF3B1* sur l'épissage : les introns type-U2 étaient significativement moins bien épissés. A partir de lignées cellulaires (K562, cellules myéloïdes immortalisées, à partir d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique en phase blastique), ils ont étudié l'effet de l'inhibition de *SF3B1* sur la formation de RS, mais aucun dépôt de fer mitochondrial anormal n'a pu être mis en évidence (coloration de Perls et microscopie électronique). En revanche, à partir de cellules de moelle osseuse de sujets sains, l'inhibition chimique de *SF3B1* entraînait la formation de RS. De plus, au niveau de la moelle osseuse obtenue à partir du modèle murin *Sf3b1*^{+/-}, de nombreux RS ont été mis en évidence, en l'absence de cytopénies périphériques. L'absence de formation de RS au niveau des cellules K562 pourrait venir du type cellulaire et d'autres tests sur des lignées cellulaires différentes pourraient être envisagés. Ils ont également étudié le niveau d'expression de gènes associés à un mauvais pronostic tels que *ASXL1* et *CBL*, et n'ont pas mis en évidence de différence, de même que pour des gènes codant pour des acteurs des voies mitochondriales présumés comme impliqués dans la pathogénèse des ARS comme *ALAS2*, *ABCB7*, *SLC25A38* et *FTMT*. D'autres auteurs avaient cependant mis en évidence une sur-expression de *ALAS2* et une sous-régulation de *ABCB7* sur des cellules CD34⁺. Le type de cellules utilisées pourrait expliquer ces différences.

Actuellement, le rôle de *SF3B1* dans la pathogénèse des ARS n'est pas connu. L'effet de *SF3B1* muté au niveau des voies mitochondriales pourrait intervenir à différents niveaux. Ainsi un rôle au niveau de l'export de l'hème, de l'activité de la ferrochelatase, de la formation et de l'export des complexes fer/sulfure est possible, soit par anomalie d'épissage et d'expression de gènes, soit par anomalie d'interaction entre protéines [27].

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mettre au point une méthode robuste de dépistage des principales mutations récurrentes des gènes du spliceosome puisque nous retrouvons des fréquences similaires à celles avancées par la littérature.

Les différentes publications sur le sujet étudient l'intérêt pronostique de ces mutations. Concernant *SF3B1*, les mutations mises en évidence seraient plutôt associées à un bon pronostic, mais l'indépendance de cet impact par rapport à la catégorie de SMD n'est pas encore clairement établie. A l'inverse, plusieurs publications associent les mutations de *SRSF2* à un mauvais pronostic, quelque soit la catégorie de SMD, sans encore une fois que l'indépendance de cet impact ne soit clairement établie. En revanche, les mutations de *U2AF1* n'auraient pas d'impact pronostique. Afin d'avoir des données robustes, le nombre de patients doit être élargi. Une étude multicentrique avec recueil de données clinico-biologiques permettrait d'étudier à grande échelle ces mutations et d'établir avec une meilleure significativité l'impact pronostique de ces mutations.

Notre étude met en évidence une fréquence significativement plus importante des mutations des gènes du spliceosome étudiés avec l'absence d'anomalie cytogénétique. La combinaison du caryotype à la recherche de ces mutations semble importante pour la validation du diagnostic de SMD en plus de la cytologie médullaire.

Il est intéressant de constater que des mutations de *SF3B1* sont retrouvées dans des pathologies aussi différentes que les SMD et la LLC. Dans le cas des SMD, la physiopathologie est caractérisée par une augmentation de l'apoptose, et la mutation *SF3B1* semble associée à un bon pronostic, alors que dans le cas de la LLC, la physiopathologie montre plutôt une prolifération clonale incontrôlée et la mutation *SF3B1* est associée à un mauvais pronostic avec un délai de besoin thérapeutique raccourci et une résistance à la fludarabine accrue.

L'évolution clonale dans les SMD est vraisemblablement un processus en plusieurs étapes dans lequel différents événements génétiques apparaissent.

En plus de son implication dans la pathogénèse des syndromes myélodysplasiques, et de son intérêt pronostique et éventuellement diagnostique, *SF3B1* pourrait constituer une cible thérapeutique pour des modulateurs de *SF3B1*, qui sont actuellement en développement préclinique en tant que médicaments anticancéreux.

ANNEXES

Annexe 1 : Récapitulatif des caractéristiques des patients de l'étude sur les mutations récurrentes des gènes du spliceosome au CHU de Toulouse.

Numéro patient attribué	Age	Sexe	Diagnostic	Mutation	Caryotype	% Blastes	Hb (g/dL)	PNN (G/L)	Pq (G/L)	Classe IPSS	Classe IPSS-r
1	72	F	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	0%	10,5	4,7	309	B	TB
2	73	M	ARS	SF3B1 (K700E) + SRSF2 (P95L)	46,YY[20]	1%	9,4	6,7	410	B	B
3	81	F	ARS-T	SF3B1 (R625C)	46,XX[20]	0%	8,3	4,7	545	B	B
4	64	M	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XY[20]	0%	8,5	2,2	207	B	B
5	82	M	ARS	SF3B1 (K700E)	47,XY,+8 [16]/45,X,-Y [3]/46,XY [1]	0%	7,6	3,3	286	I1	I
6	78	F	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	0%	10,2	3,8	354	B	TB
7	81	F	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	0%	10,5	5,7	211	B	TB
8	76	M	CRDM-RS	SF3B1 (K700E)	46,XY,del(7)(q22q22) [17]/46,XY[3]	1%	7,9	0,6	115	I2	I
9	69	M	CRDM-RS	SF3B1 (K700E)	45,X,-Y [19]/46,XY [1]	3%	9,6	0,8	183	I1	B
10	70	M	CRDM-RS	SRSF2 (P95L)	45,XY,-7[18]/46,XY[2]	1%	9,6	1,1	66	I2	I
11	73	M	CRDM-RS	-	46,XY[20]	0%	14,6	2	69	B	TB
12	83	F	CRDM-RS	SF3B1 (K700E)	46,XX,del(5)(q31q32) [9] / 46,XX,del(13)(q13q13) [5] / 46,XX [6]	0%	9,5	1,7	249	I1	B
13	81	F	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	1%	10,2	2,9	317	B	TB
14	85	F	AR	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	0%	6,8	5,6	329	B	B
15	82	F	ARS-T	SF3B1 (H662Q)	46,XX[20]	0%	9,8	6,8	716	B	B
16	68	M	CRDM-RS	-	46,XY[20]	1%	12,8	1,8	136	B	TB
17	84	M	CRDM-RS	-	46,XY,del(20)(q12) [2] / 45,idem,-7 [5] / 46,XY [13]	1%	13,2	2	156	I1	B
18	84	M	CRDM-RS	-	46,XY,del(20)(q11q12)[8]/46,XY[12]	0%	9,8	2	327	B	B
19	70	M	ARS	-	46,XY[20]	0%	13,2	3,4	292	B	TB
20	81	M	ARS	SF3B1 (K700E)	45,X,-Y [20]	1%	7,8	3	286	B	TB
21	85	M	ARS	SF3B1 (K700E)	46,XY[20]	1%	8,3	2,1	297	B	B
22	60	F	CRDM-RS	-	47,XX,+8,del(17)(p12)[17] / 48,sl,+8[2] / 46,XX[2]	0%	9,3	1,2	19	I2	H
23	81	M	CRDM-RS	SF3B1 (H662Q)	46,XY,del(9)(q21q31) [5] / 46,XY [15]	0%	6,5	2,4	258	I1	I
24	67	M	LMMC-1	SRSF2 (P95R)	47,XY,+8[20]	0%	12,9	3,7	119	I1	B
25	63	F	LMMC-1	SRSF2 (P95H)	46,XX[20]	4%	10,6	9,3	180	B	B
26	58	M	LMMC-1	SRSF2 (P95L)	46,XY[25]	4%	13,3	7,2	99	B	B
27	89	F	LMMC-1	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	0%	7	4,1	152	B	B
28	83	M	LMMC-1	-	46,XY[20]	1%	9,5	2,8	162	B	B
29	63	M	LMMC-1	-	46,XY[20]	10%	13,2	8,7	365	I1	B
30	78	F	LMMC-1	-	46,XX[20]	1%	10,7	19,8	17	B	B
31	79	M	LMMC-1	U2AF1 (Q157P)	46,XY[20]	7%	13,9	6,1	151	I1	B
32	79	M	LMMC-1	SRSF2 (P95H)	46,XY[20]	6%	15,7	2,4	80	I1	I
33	81	F	LMMC-1	SF3B1 (K700E)	46,XX[20]	1%	9,9	22,8	276	B	B
34	78	F	LMMC-1	SRSF2 (P95L)	46,XX[20]	6%	10,2	3,4	108	I1	B

35	78	F	LMMC-1	-	45,XX,-7 [20]	1%	12,9	5,9	227	I1	B
36	81	M	Thrombopéni éréfractaire	U2AF1 (S34Y + Q157R)	47,XY,+8 [4]/46,XY [16]	1%	10	3,4	110	I1	B
37	90	F	AREB-1	-	46,XX,del(5)(q12q32) [6] / 46,sl,del(9)(q21q32) [3] / 46,sl,t(X;16)(q11;p12) [2] / 46,sl,t(X;20)(p11;p11),del(12)(p12p12) [1] / 46,sl,t(X;20)(q11;q12) [1] / 46,XX [7]	8%	10,2	2,8	413	I2	H
38	62	M	CRDM	-	46,XY,del(5)(q21q31) [17] / 46,XY [3]	4%	16,7	1,8	104	I1	B
39	48	F	AREB-1	-	46,XX,der(22)t(1;22)(q11;p11) [6] / 46,XX [14]	7%	8,6	1,7	169	I2	H
40	64	F	LMMC-2	-	47,XX,der(7)t(1;7)(q21;q21),+8 [20]	8%	12,1	3,3	69	I2	H
41	44	F	SMD-1	-	46,XX,del(5)(q23q34)[11] / 46,idem,del(X)(q22q27)[2]	0%	8,9	1,86	373	I1	B
42	78	F	AREB-1	-	46,XX,der(3;7)(7pter->7q11::3p14- >3qter),del(4)(q?26q?32), del(5)(q11q35),+8,der(21)t(7;21)(q11;q22)[9]/46,XX[12]	9%	9,8	2,6	194	I2	TH
43	75	F	CRDM	-	45,XX,del(5)(q12q32),-18 [5] / 44,idem, add(6)(p21),hsr(11)(q23),-14, i(22)(q10) [cp12]	1%	8,9	0,3	92	I2	H
44	75	M	AREB-2	-	45,XY,-7,del(12)(p12p12)[18] / 46,XY[2]	11%	9,7	2,1	59	H	TH
45	77	F	AREB-1	-	46,XX,del(5)(q21q34),del(6)(q11q21) [19] / 46,XX [1]	6%	9,6	2,1	162	I1	I
46	65	M	CRDM	-	45,XY,del(5)(q13q35),add(12)(p12),-21 or der(12;21)(q10;q10) [2]/idem,-6, dup(6)(q16q25),der(7) add(7)(p15)add(7)(q31),-18 [9]/46,XY [9]	2%	10	2,4	105	I1	I
47	57	F	CRDM	-	46,XX,der(7)del(7)(p12)del(7)(q11)[7]/ 46,XX[13]	2%	12,6	2,2	108	I1	B
48	81	F	CRDM	-	45,XX,der(5;17)(p10;q10) [12] / 45,sl,t(2;6)(q36;q12) [3] / 45,sl,- 17,+der(5;17) [1] / 45,sl,del(6)(p21p24) [3] / 46,XX [1]	2%	9,5	1,9	81	I2	H
49	62	M	AREB-1	-	46,XY,t(11;17)(q24;q22)?c[20]	6%	7,8	3,9	237	I1	H
50	76	M	AREB-2	U2AF1 (S34F)	48,XY,+10+11,del(20)(q12)[2] / 46,XY[4]	12%	7,5	0,3	64	H	TH
51	94	F	SMD-1	-	46,XX,del(5)(q13q33) [12] / 46,XX [8]	0%	10,2	5,2	209	B	TB
52	90	F	AREB-1	SF3B1 (K700E)	46,XX,del(11)(q13q24) [7] / 46,XX [13]	8%	9,5	1,4	65	I2	I
53	69	M	5q-	-	46,XY,del(5)(q15q23)[16] / 46,XY[4]	0%	14,9	6,7	442	B	TB
54	82	M	AREB-2	SRSF2 (P95L)	47,XY,+8 [5] / 46,XY [15]	12%	Absence de cytopénie				
55	91	F	5q-	-	46,XX,del(5)(q21q33) [19] / 46,XX [1]	0%	8,8	3,1	663	B	B
56	81	F	AREB-1	-	47,XX,del(5)(q12q33),-7,+8,+11[3] / 47,sl,+7,der(7;12)(p10;q10)[cp6] / 45,sdl1,- 3,-8,-11,add(11)(q24),?r(22) or ? ider(22)(q?),+?r(22) or +? ider(22)[cp4] / 52,sdl1,+X,+del(5)(q12q33),+8,+13,+22[cp8]	6%	8,1	1,7	agrégats estimation entre 90000 et 130000	I2	TH
57	69	M	AREB-2	-	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 1] / 47,sl,der(1)t(1;18)(q11;?p11),der(18)del(18) (p11)del(18)(q11)[cp9]	8%	8,9	4,6	108	I2	TH
58	86	M	AREB-1	-	46,XY,der(7)t(1;7)(q11;q11) [10] / 49,idem,+8,+15,+21 [10]	5%	7,7	3,1	144	I2	TH
59	92	F	5q-	-	46,XX,del(5)(q13q33) [12]/46,XX [8]	3%	7,9	3,1	192	B	I
60	71	F	AREB-2	-	47,XX,- 5,add(7)(q21),+8,der(15;22)(q10;q10),+19 [4] / 47,sl,t(9;12)(q11;p11) [3] / 53,XX,+4,- 5,ider(?)t(?;6)(?;?),del(7)(q11q36),+8,+9,+a dd(11)(q21),+13,add(18)(p11),+19,+22,+r [13]/46,XX [1]	16%	10,6	0,38	23	H	TH
61	79	F	AREB-1	-	46,XX,del(20)(q12) [7] / 46,XX [13]	6%	13,2	2,3	43	I1	I
62	76	M	CRDM	-	45,X,- Y,add(3)(p11),der(19)t(3;19)(p22;p13)[1] / 45,sl,der(2)(del(2)(p11)del(2)(q21),der(16)(1qter->1q22::16p12->16q13::?:2p11- >2pter)+mar[1] / 45,sdl1,der(8)(?2qter- >?2q31::HSR::8p23- >8qter),add(12)(p13)[cp8] / 46,XY[12]	0%	7,4	0,8	98	I2	H
63	70	M	CRDM	-	47,XY,der(20)del(20)(p12)del(20)(q11),+der(20) [21]	0%	12,7	0,884	80	I1	B

64	63	F	CRDM	-	45,XX,t(1;2)(p11;q34),der(4)t(4;11)(p11;q11),der(6)t(4;6)(p11;p11)t(6;?)(q26;?),-7,der(11)t(6;11)(p21;q11)[13] / 46,XX[7]	4%	8,6	3	538	I1	H
65	73	M	SMD-I	SRSF2 (P95H)	46,XY,del(7)(q22q22)[9]/46,XY [11]	1%	9,2	5	273	I1	B
66	87	M	AREB-2	SRSF2 (P95H)	47,XY,+8[20]	13%	8,8	1,1	96	H	TH
67	66	F	AREB-1	U2AF1 (Q157P)	46,XX,del(7)(q11q35)[8] / 47,XX,+14[10] / 47,sl,?del(7)(q21q31)[2]	6%	9,7	8,1	169	I2	H
68	70	M	AREB-2	-	45,X,-Y [3] / 46,XY [19]	10%	12,5	1,3	86	I1	B
69	85	M	LAM secondaire à un SMD	-	46,Y,t(X;13)(q21;q21),del(4)(q23q28),dic(5;17)(q12;p11),del(7)(p13p14),der(11)t(11;17)(p11;p11)del(11)(q23q24),hsr(17)(q?),der(20)add(20)(p?)add(20)(q?),+mar1[cp4]/47 à 52,sl,-dic(5;17),+der(5;17)add(5)(p15)dic(5;17)(q10;p10),+1 à 6mar2[cp9]/50,sdl1,+mar3[3]/46,XY[8]	13%	9,3	3,4	101	H	TH
70	73	M	AREB2	SF3B1 (K700E)	46,XY,del(5)(q13q33)[14] / 45,X,-Y[4] / 46,XY[2]	10%	11,5	1	149	I1	I
71	69	F	SMD secondaire	-	46,XX,ins(5;6)(q13;p22p23) [54]	5%	13,3	2	230	I1	I
72	56	M	SMD secondaire	-	45,XY,add(5)(q13),der(6)t(6;13)(q21;q13),add(7)(q21),der(9)t(9;17)(p21;q11),add(13)(q13),-17[3]/45,idem,-20,+mar or der(20)[4] / 46,XY[13]	1%	11,3	3,5	111	I1	I
73	87	F	AREB-2	-	51,XX,del(1)(p33p35),+del(1)(p33p35),+6,+8,+14,+19[9] / 46,XX[3]	4%	7,7	0,7	49	I2	TH
74	51	F	5q-	-	46,XX,del(5)(q13q32) [11] / 46,XX [9]	4%	11,8	3	415	B	B
75	67	M	SMD secondaire	-	46,XY,t(1;13)(q24;q21),del(5)(q21q33),?del(13)(q12q34) [4] / 46,sl,-16,der(20)t(?16;20)(q11;q12),+mar [7] / 46,sl,add(16)(p12) [3] / 46,sl,i(9)(p10),-del(13)(q12q34),der(16)add(16)(p12)add(16)(q23),der(21)(21pter->21q21::?9q21->?9q34::9q21->9qter),+mar[4]	0%	9,2	3,1	99	I2	H
76	81	M	CRDM	U2AF1 (S34F)	46,XY,del(20)(q12) [12] / 46,XY [2]	0%	9,3	3,94	156	B	B
77	78	F	AREB-1	SF3B1 (K700E)	46,XX,del(11)(q14q24)[16]/46,idem,del(20)(q12)[2]/46,XX[3]	6%	9,5	3,8	287	I1	H

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VARET B., BELANGER C. *Hématologie*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007. ISBN : 9782257121479 2257121473.
- [2] SWERDLOW S. H., INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN : 9789283224310 9283224310.
- [3] GROUPE FRANÇAIS DES MYÉLODYSPLASIES, FONTENAY M., RAYNAUD S., ROSE C., GARDIN C., VARET B., BAUMELOU E., CAHN J., GYAN E., BARDIAUX L., SOCIÉ G., GUARDIOLA P., DOMBRET H., BORDESSOULE D., VAULTIER S., DREYFUS F., FENAUX P. « Propositions pour un consensus français sur les syndromes myélodysplasiques : diagnostic, classifications, traitement. » [s.l.] : [s.n.], 2012. Disponible sur : < <http://www.gfmgroup.org/recommandationsDet.php?lid=7> > (consulté le 12 décembre 2012)
- [4] THEML H., DIEM H., HAFERLACH T. *Atlas de poche d'hématologie : diagnostic pratique morphologique et clinique ; 32 tableaux*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2006. ISBN : 2257121325 9782257121325.
- [5] MUFTI G. J., BENNETT J. M., GOASGUEN J., BAIN B. J., BAUMANN I., BRUNNING R., CAZZOLA M., FENAUX P., GERMING U., HELLSTRÖM-LINDBERG E., JINNAI I., MANABE A., MATSUDA A., NIEMEYER C. M., SANZ G., TOMONAGA M., VALLESPI T., YOSHIMI A. « 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 ». 1 novembre 2008. p. 1712-1717.
- [6] VARDIMAN J. « The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond ». *Leukemia Research*. décembre 2012. Vol. 36, n°12, p. 1453-1458.
- [7] GERMING U., STRUPP C., KUENDGEN A., ISA S., KNIPP S., HILDEBRANDT B., GIAGOUNIDIS A., AUL C., GATTERMANN N., HAAS R. « Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes ». *Haematologica*. décembre 2006. Vol. 91, n°12, p. 1596-1604.
- [8] MALCOVATI L., PORTA M. G. D., PASCUTTO C., INVERNIZZI R., BONI M., TRAVAGLINO E., PASSAMONTI F., ARCAINI L., MAFFIOLI M., BERNASCONI

P., LAZZARINO M., CAZZOLA M. « Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making ». *Journal of Clinical Oncology*. 20 octobre 2005. Vol. 23, n°30, p. 7594-7603.

- [9] DELHOMMEAU F., DUPONT S., VALLE V. D., JAMES C., TRANNOY S., MASSÉ A., KOSMIDER O., LE COUEDIC J.-P., ROBERT F., ALBERDI A., LÉCLUSE Y., PLO I., DREYFUS F. J., MARZAC C., CASADEVALL N., LACOMBE C., ROMANA S. P., DESSEN P., SOULIER J., VIGUIÉ F., FONTENAY M., VAINCHENKER W., BERNARD O. A. « Mutation in TET2 in Myeloid Cancers ». *New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 360, n°22, p. 2289-2301.
- [10] HILLMEN P., HALL C., MARSH J. C. W., ELEBUTE M., BOMBARA M. P., PETRO B. E., CULLEN M. J., RICHARDS S. J., ROLLINS S. A., MOJCIK C. F., ROTHER R. P. « Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria ». *New England Journal of Medicine*. 2004. Vol. 350, n°6, p. 552-559.
- [11] YOUNG N. S. « Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure ». *Haematologica*. 1 janvier 2009. Vol. 94, n°1, p. 3-7.
- [12] GERMING U., KÜNDGEN A. « Prognostic scoring systems in MDS ». *Leukemia Research*. décembre 2012. Vol. 36, n°12, p. 1463-1469.
- [13] GREENBERG P. L., TUECHLER H., SCHANZ J., SANZ G., GARCIA-MANERO G., SOLÉ F., BENNETT J. M., BOWEN D., FENAUX P., DREYFUS F., KANTARJIAN H., KUENDGEN A., LEVIS A., MALCOVATI L., CAZZOLA M., CERMAK J., FONATSCH C., LE BEAU M. M., SLOVAK M. L., KRIEGER O., LUEBBERT M., MACIEJEWSKI J., MAGALHAES S. M. M., MIYAZAKI Y., PFEILSTÖCKER M., SEKERES M., SPERR W. R., STAUDER R., TAURO S., VALENT P., VALLESPI T., VAN DE LOOSDRECHT A. A., GERMING U., HAASE D. « Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes ». *Blood*. 20 septembre 2012. Vol. 120, n°12, p. 2454-2465.
- [14] BEJAR R., LEVINE R., EBERT B. L. « Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes ». *Journal of Clinical Oncology*. 10 février 2011. Vol. 29, n°5, p. 504-515.
- [15] CLUZEAU T., FENAUX P. « Actualités des syndromes myélodysplasiques Société française d'hématologie (Paris, 2011), MDS Foundation (Edimbourg, 2011) ». 1 novembre 2011. p. 3-15.
- [16] YOSHIDA K., SANADA M., SHIRAISHI Y., NOWAK D., NAGATA Y., YAMAMOTO R., SATO Y., SATO-OTSUBO A., KON A., NAGASAKI M., CHALKIDIS G., SUZUKI Y., SHIOSAKA M., KAWAHATA R., YAMAGUCHI T., OTSU M., OBARA N., SAKATA-YANAGIMOTO M., ISHIYAMA K., MORI H.,

NOLTE F., HOFMANN W.-K., MIYAWAKI S., SUGANO S., HAFERLACH C., KOEFFLER H. P., SHIH L.-Y., HAFERLACH T., CHIBA S., NAKAUCHI H., MIYANO S., OGAWA S. « Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia ». *Nature*. 6 octobre 2011. Vol. 478, n°7367, p. 64-69.

- [17] LIPPERT É. « Comment épissez-vous? » *Hématologie*. 2 janvier 2012. Vol. 18, n°1, p. 20-23.
- [18] WANG L., LAWRENCE M. S., WAN Y., STOJANOV P., SOUGNEZ C., STEVENSON K., WERNER L., SIVACHENKO A., DELUCA D. S., ZHANG L., ZHANG W., VARTANOV A. R., FERNANDES S. M., GOLDSTEIN N. R., FOLCO E. G., CIBULSKIS K., TESAR B., SIEVERS Q. L., SHEFLER E., GABRIEL S., HACOHN N., REED R., MEYERSON M., GOLUB T. R., LANDER E. S., NEUBERG D., BROWN J. R., GETZ G., WU C. J. « SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia ». *New England Journal of Medicine*. 29 décembre 2011. Vol. 365, n°26, p. 2497-2506.
- [19] ROSSI D., BRUSCAGGIN A., SPINA V., RASI S., KHIABANIAN H., MESSINA M., FANGAZIO M., VAISITTI T., MONTI S., CHIARETTI S., GUARINI A., GIUDICE I. D., CERRI M., CRESTA S., DEAMBROGI C., GARGIULO E., GATTEI V., FORCONI F., BERTONI F., DEAGLIO S., RABADAN R., PASQUALUCCI L., FOÀ R., DALLA-FAVERA R., GAIDANO G. « Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness ». *Blood*. 22 décembre 2011. Vol. 118, n°16, p. 6904-6908.
- [20] PAPAEMMANUIL E., CAZZOLA M., BOULTWOOD J., MALCOVATI L., VYAS P., BOWEN D., PELLAGATTI A., WAINSCOAT J. S., HELLSTROM-LINDBERG E., GAMBACORTI-PASSERINI C., GODFREY A. L., RAPADO I., CVEJIC A., RANCE R., MCGEE C., ELLIS P., MUDIE L. J., STEPHENS P. J., MCLAREN S., MASSIE C. E., TARPEY P. S., VARELA I., NIK-ZAINAL S., DAVIES H. R., SHLIEN A., JONES D., RAINE K., HINTON J., BUTLER A. P., TEAGUE J. W., BAXTER E. J., SCORE J., GALLI A., DELLA PORTA M. G., TRAVAGLINO E., GROVES M., TAURO S., MUNSHI N. C., ANDERSON K. C., EL-NAGGAR A., FISCHER A., MUSTONEN V., WARREN A. J., CROSS N. C. P., GREEN A. R., FUTREAL P. A., STRATTON M. R., CAMPBELL P. J. « Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts ». *New England Journal of Medicine*. 13 octobre 2011. Vol. 365, n°15, p. 1384-1395.
- [21] MALCOVATI L., PAPAEMMANUIL E., BOWEN D. T., BOULTWOOD J., DELLA PORTA M. G., PASCUTTO C., TRAVAGLINO E., GROVES M. J., GODFREY A. L., AMBAGLIO I., GALLI A., DA VIÀ M. C., CONTE S., TAURO S., KEENAN N., HYSLOP A., HINTON J., MUDIE L. J., WAINSCOAT J. S., FUTREAL P. A., STRATTON M. R., CAMPBELL P. J., HELLSTRÖM-LINDBERG E., CAZZOLA M. « Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms ». *Blood*. 8 décembre 2011. Vol. 118, n°24, p. 6239-6246.

- [22] THOL F., KADE S., SCHLARMANN C., LÖFFELD P., MORGAN M., KRAUTER J., WLODARSKI M. W., KÖLKG B., WICHMANN M., GÖRLICH K., GÖHRING G., BUG G., OTTMANN O., NIEMEYER C. M., HOFMANN W.-K., SCHLEGELBERGER B., GANSER A., HEUSER M. « Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes ». *Blood*. 12 avril 2012. Vol. 119, n°15, p. 3578-3584.
- [23] WU S.-J., KUO Y.-Y., HOU H.-A., LI L.-Y., TSENG M.-H., HUANG C.-F., LEE F.-Y., LIU M.-C., LIU C.-W., LIN C.-T., CHEN C.-Y., CHOU W.-C., YAO M., HUANG S.-Y., KO B.-S., TANG J.-L., TSAY W., TIEN H.-F. « The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution ». *Blood*. 11 octobre 2012. Vol. 120, n°15, p. 3106-3111.
- [24] PATNAIK M. M., LASHO T. L., HODNEFIELD J. M., KNUDSON R. A., KETTERLING R. P., GARCIA-MANERO G., STEENSMA D. P., PARDANANI A., HANSON C. A., TEFFERI A. « SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value ». *Blood*. 12 janvier 2012. Vol. 119, n°2, p. 569-572.
- [25] VISCONTE V., ROGERS H. J., SINGH J., BARNARD J., BUPATHI M., TRAINA F., MCMAHON J., MAKISHIMA H., SZPURKA H., JANKOWSKA A., JEREZ A., SEKERES M. A., SAUNTHARARAJAH Y., ADVANI A. S., COPELAN E., KOSEKI H., ISONO K., PADGETT R. A., OSMAN S., KOIDE K., O'KEEFE C., MACIEJEWSKI J. P., TIU R. V. « SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes ». *Blood*. 18 octobre 2012. Vol. 120, n°16, p. 3173-3186.
- [26] BEJAR R., STEVENSON K. E., CAUGHEY B. A., ABDEL-WAHAB O., STEENSMA D. P., GALILI N., RAZA A., KANTARJIAN H., LEVINE R. L., NEUBERG D., GARCIA-MANERO G., EBERT B. L. « Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes ». *Journal of Clinical Oncology*. 20 septembre 2012. Vol. 30, n°27, p. 3376-3382.
- [27] GATTERMANN N. « SF3B1 and the riddle of the ring sideroblast ». *Blood*. 18 octobre 2012. Vol. 120, n°16, p. 3167-3168.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Sommaire	8
Liste des abréviations	11
Les syndromes myélodysplasiques	14
1. DEFINITION	14
2. EPIDEMIOLOGIE	14
3. ETIOLOGIES	14
4. CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE	15
5. EXAMEN CLINIQUE	15
6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	16
6.1 Numération-Formule sanguine	16
6.2 Autres anomalies biologiques.....	16
6.3 Myélogramme	17
6.4 Critères cytologiques de dysplasie	17
6.5 Cytochimie.....	29
7. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	30
8. CLASSIFICATION DES SMD	31
8.1 Classification FAB.....	31
8.2 Classification OMS.....	32
8.2.1 Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU)	33
8.2.2 Anémie réfractaire avec sidérobastes en couronne (ARS)	36
8.2.3 Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée	37
8.2.4 Anémie réfractaire avec excès de blastes.....	38
8.2.5 SMD avec délétion isolée du bras long du chromosome 5 ou syndrome 5q- 39	
8.2.6 Syndromes myélodysplasiques inclassables.....	40
8.2.7 Syndromes myélodysplasiques atypiques et formes frontières	41
8.2.7.1 Anémie réfractaire avec sidérobastes en couronne et thrombocytose (ARS-T) 41	
8.2.7.2 La leucémie myélomonocytaire chronique	42
8.2.7.3 Syndromes myélodysplasiques avec myélofibrose	42

8.2.7.4	Syndromes myélodysplasiques avec clone HPN (Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne).....	43
8.2.8	Syndromes myélodysplasiques de l'enfant	44
8.3	Caryotype.....	44
8.4	Facteurs pronostiques	46
8.4.1	Introduction	46
8.4.2	Scores IPSS et IPSS révisé	46
8.4.3	Score WPSS	48
9.	TRAITEMENT	49
9.1	Traitement symptomatique	49
9.2	Traitement à visée curative	50
9.3	Chimiothérapie	50
9.3.1	Cytarabine	50
9.3.2	Lénalidomide	50
9.3.3	Agents déméthylants	50
	Les mutations récurrentes observées dans les gènes du spliceosome.....	51
1.	INTRODUCTION	51
2.	LE SPLICEOSOME	53
3.	MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES....	54
4.	MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME DANS LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC)	58
	Objectifs	60
	Matériels et méthodes.....	61
1.	ECHANTILLONS ET PATIENTS	61
2.	EXTRACTION D'ADN.....	61
3.	DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES	62
4.	MÉTHODE HIGH-RESOLUTION MELTING (HRM)	62
5.	ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE	67
6.	PURIFICATION DES PRODUITS DE PCR.....	67
7.	SEQUENÇAGE	68
8.	STATISTIQUES.....	68
	Résultats.....	69
1.	PATIENTS.....	69
1.1	SMD sans excès de sidéroblastes en couronne avéré	69
1.2	SMD avec excès de sidéroblastes en couronne	70
1.3	LMMC.....	71

2.	SF3B1	71
2.1	Mutations de l'exon 14 du gène SF3B1	71
2.1.1	Mise au point de la méthode HRM	71
2.1.1.1	Tests avec les amorces SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R1	72
2.1.1.2	Tests avec les amorces SF3B1 X14 F1-SF3B1 X14 R2	74
2.1.1.3	Tests avec les amorces SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R1	75
2.1.1.4	Tests avec les amorces SF3B1 X14 F2-SF3B1 X14 R2	76
2.1.1.5	Conclusion.....	78
2.1.2	Résultats.....	80
2.2	Mutations de l'exon 15 du gène SF3B1	81
2.2.1	Mise au point de la méthode HRM	81
2.2.2	Résultats.....	83
2.3	Synthèse des mutations de SF3B1	83
3.	U2AF1	84
3.1	Mutations de l'exon 2 du gène U2AF1	84
3.1.1	Mise au point de la méthode HRM	84
3.1.2	Résultats.....	87
3.2	Mutations de l'exon 6 du gène U2AF1	87
3.2.1	Mise au point de la méthode HRM	87
3.2.2	Résultats.....	90
3.3	Synthèse des mutations de U2AF1	90
4.	SRSF2	91
4.1	Mise au point de la méthode HRM	91
4.2	Résultats	97
5.	BILAN DES MUTATIONS DES GENES DU SPLICEOSOME RECHERCHEES.....	97
5.1	SMD sans excès de sidéoblastes en couronne	97
5.2	SMD avec excès de sidéoblastes en couronne	98
5.3	LMMC.....	99
5.4	Fréquence des mutations en fonction des catégories IPSS et IPSS-r.....	100
5.5	Etude de l'association entre mutation d'un des gènes étudiés et caryotype	100
5.6	Analyses de survie	101
5.6.1	Ensemble des patients	101
5.6.2	SMD sans excès de sidéoblastes en couronne.....	102
	Discussion	103
	Conclusion.....	111

Annexes.....	112
Bibliographie	115
Table des matières	119
Table des illustrations	123
Table des tableaux	127

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Illustration 1</u> : Erythroblastes avec bourgeonnement nucléaire (Objectif x100).	19
<u>Illustration 2</u> : Erythroblaste avec pont internucléaire (Objectif x100).....	19
<u>Illustration 3</u> : Erythroblaste binucléé et érythroblaste multinucléé (Objectif x100)...	19
<u>Illustration 4</u> : Erythroblaste à noyau fragmenté et bourgeonnement nucléaire (Objectif x100).	20
<u>Illustration 5</u> : Erythroblaste à chromatine perlée (Objectif x100).	20
<u>Illustration 6</u> : Asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique (Objectif x100).	21
<u>Illustration 7</u> : Sidéroblastes en couronne (coloration de Perls) (Objectif x100).....	21
<u>Illustration 8</u> : Erythroblaste avec vacuolisation du cytoplasme (Objectif x100).....	22
<u>Illustration 9</u> : Perte de la forme ronde du noyau d'érythroblastes (Objectif x100)....	22
<u>Illustration 10</u> : Erythroblastes avec plages cytoplasmiques de deshémoglobinisation (Objectif x100).	23
<u>Illustration 11</u> : Erythroblastes avec ponctuations basophiles (Objectif x100).	23
<u>Illustration 12</u> : Hématie avec ponctuations basophiles (Objectif x100).....	24
<u>Illustration 13</u> : Erythroblastes à cytoplasme feuilleté (Objectif x100).....	24
<u>Illustration 14</u> : Polynucléaire pelgerisé (Objectif x100).	25
<u>Illustration 15</u> : Polynucléaires à noyau hypersegmenté (Objectif x100).....	25
<u>Illustration 16</u> : Polynucléaire hyposegmenté et dégranulé (Objectif x100).....	25
<u>Illustration 17</u> : Corps d'Auer dans un myéloblaste (Objectif x100).	26
<u>Illustration 18</u> : Mégacaryocyte de petite taille (Objectif x100).	26
<u>Illustration 19</u> : Micromégacaryocytes (Objectif x100)	27
<u>Illustration 20</u> : Mégacaryocyte monolobé (type 5q-) (Objectif x10).	27
<u>Illustration 21</u> : Mégacaryocyte multinucléé (Objectif x100).	28
<u>Illustration 22</u> : Composants du spliceosome (complexe E/A) et mutations retrouvées dans les SMD (signifiées par les éclairs) selon [16]	54

<u>Illustration 23</u> : Fréquence des mutations des gènes du spliceosome en fonction du type de pathologie myéloïde (a), et répartition des mutations par patient en fonction du gène muté et de la pathologie (b) selon [16].	56
<u>Illustration 24</u> : Mutations du spliceosome selon [16] (chaque flèche correspondant à un cas muté).	57
<u>Illustration 25</u> : Courbes d'amplification	65
<u>Illustration 26</u> : Courbes de fusion avant normalisation	65
<u>Illustration 27</u> : Courbes de fusion après normalisation	66
<u>Illustration 28</u> : Courbes normalisées en fonction du témoin négatif (le PBL).	66
<u>Illustration 29</u> : Exon 14 de SF3B1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, les points de mutation (E622D, R625L, H662Q/D, K666T/E/R) à mettre en évidence.	72
<u>Illustration 30</u> : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F1 et SF3B1 X14 R1 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.	73
<u>Illustration 31</u> : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F1 et SF3B1 X14 R2 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.	74
<u>Illustration 32</u> : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F2 et SF3B1 X14 R1 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.	76
<u>Illustration 33</u> : a. Courbes de fusion et d'amplification avec les amorces SF3B1 X14 F2 et SF3B1 X14 R2 (en bleu le témoin négatif PBL en duplicat, en orange, l'eau). b. Courbes de fusion avant et après normalisation.	77
<u>Illustration 34</u> : Résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec les couples d'amorces sélectionnés pour chaque exon. MW = Poids moléculaire ; X15 = exon 15 de SF3B1 ; X14 = exon 14 de SF3B1 ; X01 = exon 1 de SRSF2 ; X02 = exon 2 de U2AF1 ; X06 = exon 6 de U2AF1.	78
<u>Illustration 35</u> : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD-RS et présentant des mutations au niveau de l'exon 14 du gène SF3B1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation H662Q, en vert un patient présentant la mutation R625C). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.	79
<u>Illustration 36</u> : Mise en évidence de la mutation R625C par séquençage.	80
<u>Illustration 37</u> : Mise en évidence de la mutation H662Q par séquençage.	80
<u>Illustration 38</u> : Exon 15 de SF3B1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation K700E à mettre en évidence.	81

<u>Illustration 39</u> : a. Courbes d'amplification et de fusion (en haut) d'un patient atteint de SMD-RS et présentant la mutation K700E au niveau de l'exon 15 du gène SF3B1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation K700E). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées	82
<u>Illustration 40</u> : Mise en évidence de la mutation K700E par séquençage.	83
<u>Illustration 41</u> : Exon 2 de U2AF1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation S34F/Y à mettre en évidence.	84
<u>Illustration 42</u> : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 2 du gène U2AF1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation S34F, en rose un patient présentant la mutation S34Y). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.....	86
<u>Illustration 43</u> : Mise en évidence des mutations S34F (en haut) et S34Y (en bas) par séquençage.	87
<u>Illustration 44</u> : Exon 6 de U2AF1 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation Q157P/R à mettre en évidence.	88
<u>Illustration 45</u> : Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 6 du gène U2AF1 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation Q157P, en rose un patient présentant la mutation Q157R). b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.....	89
<u>Illustration 46</u> : Mise en évidence des mutations Q157P (en haut) et Q157R (en bas) par séquençage.....	90
<u>Illustration 47</u> : Exon 1 de SRSF2 et schéma des amorces testées. En bleu, les introns. En noir, les exons. En rouge, le point de mutation P95H/L/R à mettre en évidence. En violet, un SNP fréquent (SNP rs237057).	91
<u>Illustration 48</u> : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de LMMC et présentant des mutations au niveau de l'exon 1 du gène SRSF2 (en orange l'eau, en bleu le PBL présentant le SNP fréquent en position D48, en bleu clair un patient présentant la mutation P95L, en vert foncé un patient présentant la mutation P95H, en rose un patient présentant la mutation P95R et en vert clair un témoin négatif sans SNP ni mutation) après amplification avec les amorces SRSF2 X01 F1-SRSF2 X01 R1. b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées	93
<u>Illustration 49</u> : a. Courbes d'amplification et de fusion de patients atteints de SMD et présentant des mutations au niveau de l'exon 1 du gène SRSF2 (en orange l'eau, en bleu le PBL, en rouge un patient présentant la mutation P95L) après amplification avec les amorces SRSF2 X01 F2-SRSF2 X01 R1. b. Courbes de fusion avant et après normalisation. c. Courbes normalisées.	95

<u>Illustration 50</u> : Mise en évidence des mutations P95H (en haut), P95R (2 ^{ème} en partant du haut) et P95L (en bas) par séquençage. Absence de mutation pour le PBL (3 ^{ème} en partant du haut).	96
<u>Illustration 51</u> : Mise en évidence du SNP rs237057 à l'état homozygote (en haut), et à l'état hétérozygote (en bas).	96
<u>Illustration 52</u> : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de SMD sans excès de RS avéré dans notre étude et selon [16].	98
<u>Illustration 53</u> : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de SMD-RS dans notre étude et selon [16].	98
<u>Illustration 54</u> : Répartitions des mutations des gènes du spliceosome chez les patients atteints de LMMC dans notre étude et selon [16].	99
<u>Illustration 55</u> : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez l'ensemble des patients de la cohorte en fonction de la présence ou non de mutation d'un gène du spliceosome (n=65, p=0,4856).	101
<u>Illustration 56</u> : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez les patients atteints de SMD primaire en fonction de la présence ou non de mutation pour SF3B1 (n=52, p=0,4455).	102
<u>Illustration 57</u> : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale chez les patients atteints de SMD sans excès de RS avéré en fonction de la présence ou non de mutation d'un gène du spliceosome (n=31, p = 0,7711).	102
<u>Illustration 58</u> : Courbes de Kaplan-Meier concernant la survie sans événement chez des patients atteints de SMD, en fonction de la présence ou non d'une mutation de SF3B1, selon [20].	106

TABLE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Grille de quantification de la dysplasie proposée par le GFM.....	29
<u>Tableau 2</u> : Classification FAB des SMD.	31
<u>Tableau 3</u> : Caractéristiques sanguines et médullaires dans les SMD selon la classification OMS 2008 [2].	33
<u>Tableau 4</u> : Caractéristiques des ARS-T [2] [9].....	41
<u>Tableau 5</u> : Anomalies chromosomiques récurrentes et leurs fréquences dans les SMD au diagnostic selon l'OMS [2].	45
<u>Tableau 6</u> : Score IPSS	47
<u>Tableau 7</u> : Anomalies chromosomiques prises en compte pour les scores IPSS et WPSS	47
<u>Tableau 8</u> : Anomalies chromosomiques prises en compte pour le score IPSS-r.	48
<u>Tableau 9</u> : Variables prises en compte dans l'établissement du score IPSS-r et catégories de risque	48
<u>Tableau 10</u> : Score WPSS	49
<u>Tableau 11</u> : Impact pronostique des mutations retrouvées dans les SMD selon [15]	52
<u>Tableau 12</u> : Préparation du mix pour HRM	64
<u>Tableau 13</u> : Synthèse des fréquences de mutations observées pour SF3B1 dans différentes populations de patients en fonction de diverses études [16], [20], [21] [24].	105
<u>Tableau 14</u> : Pourcentage de patients atteints de SMD présentant une mutation pour le gène SRSF2 en fonction de la catégorie IPSS ou IPSS-r.....	108

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.