

Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 13 octobre 2020

Par

Julie Rieunier

Née le 03 août 1993 à Lavaur

Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations de DDX41 : Une nouvelle entité de LAM ?

Thèse dirigée par Pr. Eric DELABESSE et Pr. Véronique DE MAS

Examineurs :

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de LIMOGES

M. Eric DELABESSE, PU-PH, laboratoire d'Hématologie, CHU de TOULOUSE

Mme Véronique DE MAS, PU-PH, laboratoire d'Hématologie, CHU de TOULOUSE

Mme Suzanne TAVITIAN, PH, Hématologie clinique, CHU de TOULOUSE



Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 13 octobre 2020

Par

Julie Rieunier

Née le 03 août 1993 à Lavar

Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations de DDX41 : Une nouvelle entité de LAM ?

Thèse dirigée par Pr. Eric DELABESSE et Pr. Véronique DE MAS

Examineurs :

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de LIMOGES

M. Eric DELABESSE, PU-PH, laboratoire d'Hématologie, CHU de TOULOUSE

Mme Véronique DE MAS, PU-PH, laboratoire d'Hématologie, CHU de TOULOUSE

Mme Suzanne TAVITIAN, PH, Hématologie clinique, CHU de TOULOUSE

Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2019

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE

BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

MARCHAND Guillaume

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ,

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Merci pour les enseignements que vous m'avez transmis lors de mon passage dans le service de Virologie. Soyez assurée de mon plus grand respect.

A Madame le Docteur Suzanne TAVITIAN,

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury, et d'y apporter votre expertise. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Eric DELABESSE,

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour ce travail et de m'avoir accompagnée tout au long de sa réalisation. Merci pour vos précieux conseils et votre disponibilité malgré votre temps précieux. Je vous prie d'accepter l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Professeur Véronique DE MAS

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci pour votre bienveillance, votre gentillesse et vos conseils lors de la rédaction de ce travail. Je vous remercie pour le savoir que vous m'avez transmis au cours de mon passage dans le service d'Hématologie. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et mon respect.

A celles qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation de ce travail,

A Laetitia LARGEAUD, je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as apportée, pour ta bonne humeur, ton implication, ta disponibilité et ta pédagogie sur ce domaine si particulier qu'est la biologie moléculaire.

A Nais, merci pour ta gentillesse et pour avoir pris le temps de réaliser l'ensemble des analyses pour ce travail.

A toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie de Toulouse, je tiens à vous remercier pour ces deux semestres passés parmi vous. Merci aux biologistes pour vos enseignements et votre grande pédagogie et pour m'avoir donné goût à l'hématologie.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de mon internat, biologistes et techniciens des laboratoires d'Immunologie, d'Hématologie et de Bactériologie-Virologie de Limoges, de Biochimie à Bordeaux et de l'hôpital de Castres. Les différents stages passés parmi vous ont été très formateurs et enrichissants, vous m'avez tous permis d'acquérir les compétences nécessaires pour devenir à mon tour biologiste.

Mes remerciements s'adressent également :

A tous les co-internes et amis que j'ai eu la chance de rencontrer pendant toutes mes années d'études, mon internat n'aurait pas été le même sans vous :

A Pauline et Pauline, Flo, Sophie, Charlotte, Lucille et Marine pour m'avoir permis de supporter mes premiers mois à Limoges, nos soirées GOT et tous les restos qu'on a essayé ensemble.

A Cassandra, Camille, Caro, Guigui, Chacha et Séb, Docteur Cecco, Virginie, Fred, Mouaffak et Malika, Etienne, Geoffrey et les autres, pour tous ces bons moments de rigolade, nos soirées foot, tapas ou raclette, nos séances de sport, week-end ski et montpelliérain... Tous ces moments partagés ensembles sont inoubliables.

A Anita, pour ta douceur et les moments partagés pendant cette période particulière qu'on aura vécu à Castres.

A Pauline, ma meilleure voisine de chambre d'internat, tu es plus folle que moi, ne changes pas !

Et puis à mes co-internes toulousains, Docteur Cecco (tu me suis partout !), Marine, Orancie (le duvet !), Alban, Dorian, Imane, Florence, Julien, Maximin, Ali, Charlotte et les petits derniers Joy, Anne-Marie, Gauthier, Thibault et ceux que je n'ai pas cité... merci pour votre bonne humeur au quotidien et votre patience pour m'avoir permis de boucler ma thèse !

A ma famille exceptionnelle, qui a toujours été là pour moi. Même si personne n'a jamais vraiment compris grand-chose à mes études, merci pour votre éternel soutien.

A mes grands-parents, enfin les études sont finies, j'espère que vous êtes fiers de moi.

A mon frère et ma sœur, je suis fière d'être votre sœur et serait toujours là pour vous.

A mes parents, pour votre soutien depuis le début de mes études et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long, je ne serai pas là sans vous aujourd'hui.

A mes tarnais, Lama, Bastou, Nadège, Mégane, Alex, Marine, Alexia, Claire, merci pour tous ces moments magiques passés depuis tant d'années, vous avez toujours été là pour moi, même quand je suis partie à Limoges. Merci pour être des personnes aussi hors du commun et votre éternelle bonne humeur qui me font toujours me sentir bien à vos côtés.

A Pauline, Anne-Sophie, Laura, Justine et Célia, l'équipe de choc, les plus belles, merci pour tous ces fous rires depuis le lycée et pour votre amitié infaillible depuis toutes ces années.

A Morgane, la distance et le temps ne nous aura jamais séparé.

A mes amis de fac, ma Cécile, mon éternelle binôme, et Julien, Oriane, Clément, Marie-Lou, Damien, Sarah, Wilhelm, Rémy et Nicolas, vous étiez là dès la première étape de ce long parcours et vous m'avez aidé à le traverser.

Charly, pour ton amour et ton soutien sans faille. Toi qui as su me motiver et veiller à ma réussite durant ces dernières années, qui m'a suivi dans mon choix de vie, je ne serai pas là sans toi. Merci pour tous les moments merveilleux passés avec toi et pour tous les prochains à venir. Je t'aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations.....	15
Introduction	17
I. Les Hémopathies Myéloïdes Héritaires (HMH)	18
I.1. Définition et Epidémiologie.....	18
I.2. Classification OMS des HMH	18
I.3. Principaux gènes impliqués	19
I.3.1. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale « pures »	19
I.3.2. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à des anomalies plaquettaires préexistantes.....	21
I.3.3. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à d'autres dysfonctions organiques.....	24
I.4. Identification des patients.....	25
I.4.1. Intérêts du dépistage des HMH	25
I.4.2. Démarche diagnostique.....	26
I.4.3. Proposition d'éléments d'orientation pour identifier les patients avec HMH	26
II. L'hélicase DEAD-box <i>DDX41</i>	28
II.1. Les hélicases à boîte DEAD.....	28
II.1.1. Rôles physiologiques communs	28
II.1.2. Domaines fonctionnels communs	29
II.2. Rôles spécifiques de <i>DDX41</i>	30
II.2.1. Régulation du métabolisme de l'ARN	30
II.2.1.1. Interaction avec le spliceosome dans la régulation de l'épissage de l'ARN ...	30
II.2.1.2. Régulation de la biogenèse des ribosomes et de la prolifération cellulaire ...	31
II.2.2. Immunité innée.....	31
II.3. Relation Structure-activité de <i>DDX41</i>	32
II.4. Mutations et dérégulation de <i>DDX41</i> en pathologie	33
III. Objectifs	36
IV. Matériel et méthodes.....	37
IV.1. Cohorte de patients	37
IV.2. Extraction de l'ADN	37
IV.3. Séquençage ciblé	38
IV.3.1. Principe du NGS	38
IV.3.2. Construction de la librairie.....	38
IV.3.2.1. Technique Haloplex Agilent®.....	39
IV.3.2.2. Technique Sureselect Agilent®.....	40
IV.3.3. Préparation de la matrice de séquençage (amplification clonale)	40
IV.3.4. Séquençage NextSeq Illumina®.....	40
IV.4. Analyse et interprétation des données	41
IV.4.1. Qualité du séquençage	41
IV.4.2. Traitement des données brutes et alignement par rapport au génome.....	42
IV.4.3. Interprétation des variants.....	42
IV.4.4. Détermination du caractère somatique ou germinale par la VAF.....	43
IV.5. Analyses moléculaires complémentaires	43
IV.6. Analyses statistiques	43

V. Résultats.....	44
V.1. Mutations de <i>DDX41</i>	44
V.2. Caractéristiques des patients au diagnostic.....	47
V.2.1. Présentation clinique.....	48
V.2.2. Anomalies cytologiques.....	50
V.2.3. Myélogramme.....	50
V.3. Mutations somatiques associées.....	52
V.4. Corrélation génotype-phénotype.....	54
V.5. Survie et traitement.....	55
VI. Discussion.....	58
VI.1. Epidémiologie des pathologies avec mutations de <i>DDX41</i>	58
VI.2. Mutations de <i>DDX41</i>	59
VI.3. Incidence des mutations associées.....	60
VI.4. Spectre clinico-biologique des LAM avec mutations <i>DDX41</i>	61
VI.5. Corrélation génotype-phénotype.....	62
VI.6. Prise en charge et pronostic.....	62
VI.7. Place de la greffe de CSH.....	63
VI.8. Perspectives thérapeutiques.....	63
Conclusion.....	65
Références bibliographiques.....	66
Annexes.....	71
Serment De Galien.....	77

Table des illustrations

Figure 1 : Fonctions cellulaires des principales protéines codées par les gènes mutés dans les HMH (7).....	19
Figure 2 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations impliquées dans la leucémogénèse sur le gène de <i>CEBPA</i> dans la base de données COSMIC (11)	21
Figure 3 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations sur le gène de <i>RUNX1</i> impliquées dans la leucémogénèse dans la base de données COSMIC (16)	23
Figure 4 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations sur le gène de <i>GATA2</i> impliquées dans la leucémogénèse dans la base de données COSMIC (19)	25
Figure 5 : Schématisation du cycle du splicéosome (23)	28
Figure 6 : Diversité des rôles des protéines à boîte DEAD dans le métabolisme de l'ARN, d'après <i>Linder et al.</i> (24).....	29
Figure 7 : Motifs conservés dans les hélicases à boîte DEAD, d'après <i>Linder et al.</i> (24)	30
Figure 8 : Interaction de <i>DDX41</i> avec les composants du splicéosome, d'après <i>Antony-Debré et al.</i> (27).....	30
Figure 9 : Défaut d'assemblage des ribosomes, d'après <i>Kadono et al.</i> (28)	31
Figure 10 : La voie de signalisation de <i>DDX41</i> dans l'immunité innée, d'après <i>Jiang et al.</i> (25).....	32
Figure 11 : Structure protéique de <i>DDX41</i> , d'après <i>Cheah et al.</i> (36)	33
Figure 12 : Epissage aberrant en cas de mutations de <i>DDX41</i> , d'après <i>Antony-Debré et al.</i> (27).....	34
Figure 13 : Position des mutations germinales (en haut) et somatiques (en bas) de <i>DDX41</i> retrouvées dans la littérature (14)	34
Figure 14 : Modélisation de l'acquisition des mutations de <i>DDX41</i> dans les HM familiales ou acquises, d'après <i>Antony-Debré et al.</i> (27).....	35
Figure 15 : Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire » (42).....	38
Figure 16 : Principe des techniques d'enrichissement de l'ADN SureSelect et Haloplex d'Agilent® (43)	39
Figure 17 : Contenu des amplicons amplifiés par technique Haloplex (44)	39
Figure 18 : Principe du séquençage Illumina, d'après <i>Bonnin et al.</i> (47).....	41
Figure 19 : Représentation graphique de la position sur le gène <i>DDX41</i> des différentes mutations retrouvées dans notre cohorte	44
Figure 20 : Répartition des mutations somatiques de <i>DDX41</i>	46
Figure 21 : Nombre de patients atteints de LAM dans chaque groupe d'âge présentant une mutation de <i>DDX41</i>	48

Figure 22 : Comparaison par représentation en box plot des résultats de la NFS et du pourcentage de blastes avec ou sans mutations de <i>DDX41</i> parmi les patients du protocole LAM-SA 2007.....	51
Figure 23: Fréquence des mutations sur d'autres gènes associées aux mutations de <i>DDX41</i>	53
Figure 24 : Représentation en circos plot des principales co-mutations avec la première mutation supposée germinale de <i>DDX41</i>	54
Figure 25 : Comparaison du pourcentage de blastes médullaires, de l'hémoglobine, des leucocytes et des plaquettes entre les patients porteurs d'une mutation p.Asp140fs* (n=7) et les patients avec une autre mutation de <i>DDX41</i> (n=27).....	55
Figure 26 : Comparaison du pourcentage de blastes médullaires, de l'hémoglobine, des leucocytes et des plaquettes entre les patients porteurs d'une mutation p.Arg525His (n=25) et les patients avec une autre mutation de <i>DDX41</i> (n=9).....	55
Figure 27 : OS et EFS des 24 patients mutés sur <i>DDX41</i> comparé à celles des patients non mutés du protocole LAM-SA 2007.....	56
Figure 28 : OS et EFS des patients porteurs d'une mutation de <i>DDX41</i> sur p.Asp140fs* ou p.Arg525His comparé à celles des patients porteurs d'autres mutations de <i>DDX41</i>	57

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification pronostique ELN 2017 (1)	17
Tableau 2 : Mutations de <i>DDX41</i> retrouvées par NGS pour 34 patients analysés (RefSeq NM_016222.3).....	45
Tableau 3 : Caractéristiques clinico-biologiques moyennes des 34 patients au diagnostic de LAM.....	47
Tableau 4 : Distribution des 424 patients atteints de LAM dans le protocole LAM-SA 2007 selon leur sexe et le statut mutationnel de <i>DDX41</i>	48
Tableau 5 : Présentation clinique et antécédents au diagnostic des 16 patients suivis au CHU de Toulouse.....	49
Tableau 6 : Association entre les mutations de <i>DDX41</i> et des mutations concomitantes sur d'autres gènes pour chaque patient.....	52

Liste des abréviations

ADNdb : ADN double brin

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ATP : adénosine triphosphate

CDN : ADN cyclique dinucléotidique

COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

CRR2 : Commonly Retained Region 2

CSH : cellules souches hématopoïétiques

DCL : leucémie dérivée du donneur

DN : Dominant Négatif

EFS : survie sans événement

ELN : European LeukemiaNet

FILO : French Innovative Leukemia Organization

gnomAD : Genome Aggregation Database

GVH : Réaction du greffon contre l'hôte ou Graft Versus Host disease

HM : Hémopathie myéloïde

HMH : Hémopathie Myéloïde Héritaire

IFN : Interféron

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

MAI : Maladie auto-immune

MO : Moelle osseuse

NFS : Numération Formule Sanguine

NGS : Séquençage de nouvelle génération

NLS : séquence de localisation nucléaire

OMS : Organisation mondiale de la santé

OS : survie globale

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PCR : Polymerase Chain Reaction

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

PRR : Pattern Recognition Receptor

RBP : protéines liant l'ARN ou RNA Binding Protein

SMD : Syndrome Myélodysplasique

SMD-EB : Syndrome myélodysplasique avec excès de blastes

SMD-MLD : Syndrome myélodysplasique avec dysplasie multi-lignée

VAF : Fréquence allélique de variant ou Variant Allelic Frequency

VGM : volume globulaire moyen

Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) correspondent à un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes. Comme de nombreux cancers, elles sont caractérisées par l'acquisition de mutations somatiques affectant les gènes de différentes catégories fonctionnelles à l'origine d'une architecture clonale complexe responsable de l'hétérogénéité phénotypique. La prise en charge des patients atteints de LAM est guidée par les dernières recommandations de l'ELN (*European LeukemiaNet*) qui a établi une stratification pronostique en fonction des anomalies génétiques présentes au diagnostic. Les résultats du caryotype conventionnel et du dépistage des mutations *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* sont actuellement utilisés dans la pratique de routine (1). Ils servent de facteurs pronostiques les plus importants dans la prédiction de la réponse au traitement et du risque de rechute.

Tableau 1 : Classification pronostique ELN 2017 (1)

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low†} Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high†} Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low†} (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A‡</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high†} Mutated <i>RUNX1¶</i> Mutated <i>ASXL1¶</i> Mutated <i>TP53#</i>

Le groupe des LAM de pronostic intermédiaire représentant 40% des patients est composé des LAM à caryotypes normaux et des anomalies cytogénétiques ne correspondant pas aux deux autres groupes (2). Il est donc très hétérogène en termes de réponse aux traitements. L'avènement du séquençage de nouvelle génération (NGS) et la disponibilité des panels de gènes ont permis de mettre en évidence de nouvelles anomalies moléculaires dans ce groupe. Parmi celles-ci, *DDX41* a été découvert récemment dans des cas de LAM et de syndromes myélodysplasiques (SMD) chez des patients âgés (3). Des études ultérieures ont d'ailleurs mis en évidence que ces mutations de *DDX41* étaient présentes au sein de familles atteintes de SMD et LAM (4). Les hémopathies myéloïdes héréditaires (HMH) avec mutations de *DDX41* ont depuis été incorporées dans un groupe distinct dans la classification de l'OMS.

I. Les Hémopathies Myéloïdes Héritaires (HMH)

I.1. Définition et Epidémiologie

Les SMD et les LAM constituent un groupe hétérogène d'hémopathies myéloïdes (HM) dérivant de la transformation clonale de précurseurs myéloïdes. Le SMD se caractérise par une hématopoïèse qualitativement inefficace responsable des cytopénies périphériques. L'évolution naturelle de cette maladie est la LAM qui survient dans environ un tiers des cas. Les LAM se caractérisent par une prolifération clonale incontrôlée de cellules myéloïdes immatures ayant perdu leur potentiel de différenciation conduisant à un envahissement de la moelle osseuse (MO). Dans les deux cas, ces processus malins sont liés à l'acquisition d'événements génétiques anormaux dans une cellule hématopoïétique.

Les SMD et les LAM sont le plus souvent des maladies acquises qui apparaissent de façon sporadique avec un âge médian au diagnostic autour de 65 ans avec une incidence augmentant avec l'âge.

Il existe également des HMH avec prédisposition génétique liées à une mutation germinale. Ce sont des entités rares mais l'identification récente de nouveaux gènes de prédisposition comme *GATA2*, *RUNX1* et *CEBPA* laisse penser que leur fréquence est sous-estimée. La prévalence des HMH n'est pas encore connue, mais on soupçonne que les HMH touchent au moins 4 à 13% des patients pédiatriques et 5% des patients adultes atteints de SMD ou de LAM (5).

I.2. Classification OMS des HMH

La dernière classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2016 comprend maintenant une section distincte sur les hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale, reflétant l'importance croissante de ces tumeurs malignes (6). On peut distinguer 3 grandes catégories d'HMH associées à des mutations de gènes :

- Les HM avec prédisposition germinale sans maladie préexistante ou atteinte d'organe : LAM avec mutation germinale de *CEBPA*, proliférations myéloïdes avec mutation germinale de *DDX41* ;
- Les HM avec prédisposition germinale et anomalie plaquettaire préexistante : proliférations myéloïdes avec mutations germinales de *RUNX1*, d'*ANKRD26* ou d'*ETV6* ;
- Les HM avec prédisposition germinale et dysfonction d'autres organes comprenant plusieurs entités :
 - Les proliférations myéloïdes avec mutations germinales de *GATA2* ;
 - Les proliférations myéloïdes associées à une insuffisance médullaire (*Inherited Bone Marrow Failure syndromes*, IBMF) : anémie de Fanconi, anémie de Blackfan-Diamond, syndrome de Shwachman-Diamond, neutropénie congénitale sévère ;
 - Les proliférations associées à des anomalies des télomères : dyskératose congénitale liée à l'X, ou apparenté à ce syndrome (mutations de *TERT/TERC*) ;

- Les leucémies myélo-monocytaires juvéniles (LMMJ) associées à une neurofibromatose, un syndrome de Noonan ou apparenté à ce syndrome ;
- Les proliférations myéloïdes (ou lymphoïdes) associées au syndrome de Down (trisomie 21 constitutionnelle).

I.3. Principaux gènes impliqués

Ces HMH sont liées à des mutations retrouvées dans des gènes codant des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires regroupées dans la Figure 1 ci-dessous, notamment :

- *CEBPA*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1* et *TP53* sont des facteurs de transcription essentiels à l'hématopoïèse qui se localisent dans le noyau ;
- *DDX41* est une hélicase de l'ARN ;
- *TERT* et *TERC* ont un rôle dans la stabilité des télomères (7).

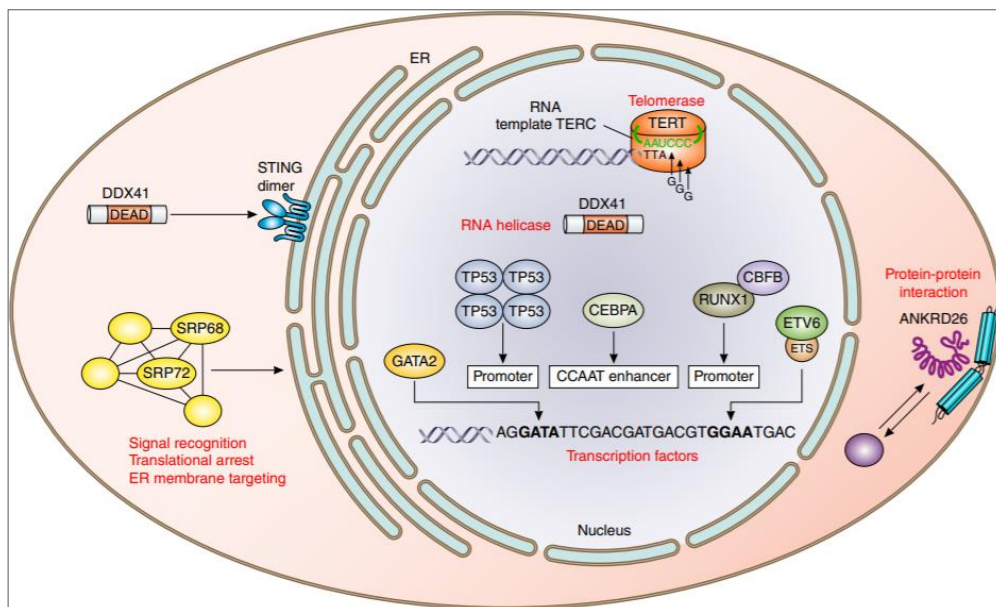


Figure 1 : Fonctions cellulaires des principales protéines codées par les gènes mutés dans les HMH (7)

Nous restreindrons l'analyse aux mutations de gènes ayant un phénotype exclusivement hématopoïétique (à l'exception de *GATA2*).

I.3.1. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale « pures »

Certaines HMH se manifestent principalement sous la forme d'hémopathies myéloïdes isolées de transmission autosomique dominante, sans symptomatologie préexistante.

- **CEBPA**

Le gène *CEBPA* (*CCAAT / enhancer binding protein A*), localisé sur le chromosome 19, est constitué d'un seul exon qui code un facteur de transcription $CEBP\alpha$. Il contient un motif de type fermeture éclair à leucines (leucine-zipper ou bZIP) à l'extrémité C-terminale nécessaire à la dimérisation et à la liaison de l'ADN. L'extrémité N-terminale contient deux domaines de transactivation qui régulent le contrôle de la transcription et l'interaction des protéines (8).

Deux isoformes sont générées physiologiquement : l'isoforme p42, majoritaire, et l'isoforme p30 plus courte ayant perdu son extrémité N-terminale. L'isoforme p42 est impliquée dans la différenciation myéloïde et p30 a un effet dominant négatif (DN) en perdant une partie de sa fonction, et en interférant aussi avec la fonction de l'allèle normal. Cette isoforme maintient ses capacités de dimérisation et de liaison à l'ADN tout en inhibant l'activité de p42 (8).

Il existe deux types de mutations de *CEBPA* qui peuvent se situer :

- Soit dans la région N-terminale, avec un décalage du cadre de lecture entraînant l'arrêt prématuré de la forme complète p42, tout en conservant la traduction de p30 exerçant son effet DN. Les mutations germinales sont surtout retrouvées dans cette région.
- Soit dans la région C-terminale altérant la liaison de l'ADN et les capacités de dimérisation. Ce sont plutôt des mutations faux-sens ou insertions/délétions (indel) acquises (Figure 2) (9).

Ces deux types de mutations ont permis de classer les mutants *CEBPA* en deux groupes : mono- ou bi-alléliques. La majorité des patients atteints de LAM avec une mutation germinale de *CEBPA* présentent une mutation somatique sur le second allèle (8).

Les mutations de *CEBPA* dans les LAM peuvent survenir également de manière somatique, dans 7 à 15% des LAM à caryotype normal. Globalement, 10% des patients atteints de LAM avec des mutations bi-alléliques de *CEBPA* ($CEBPA^{dm}$) possèdent une mutation germinale (5). Des études récentes ont prouvé que seules les mutations $CEBPA^{dm}$ sont de pronostic favorable (8).

Dans les HMH avec mutation de *CEBPA*, la pénétrance est presque complète, à un âge précoce (médiane de 24,5 ans), sans phase préexistante de dysplasie ou de cytopénie (10). De ce fait, l'identification de l'origine germinale des mutations de *CEBPA* parmi les patients présentant des mutations $CEBPA^{dm}$ est recommandée pour faire la distinction entre les cas sporadiques et familiaux. Les patients atteints de LAM familiale peuvent aussi présenter des récurrences dues à des nouveaux clones leucémiques indépendants de ceux de la LAM du diagnostic. Lors de la récurrence, les patients semblent effectivement développer de nouvelles mutations somatiques de *CEBPA*, différentes de celles du diagnostic initial, sans perte de sensibilité aux chimiothérapies et de de la survie globale (9).

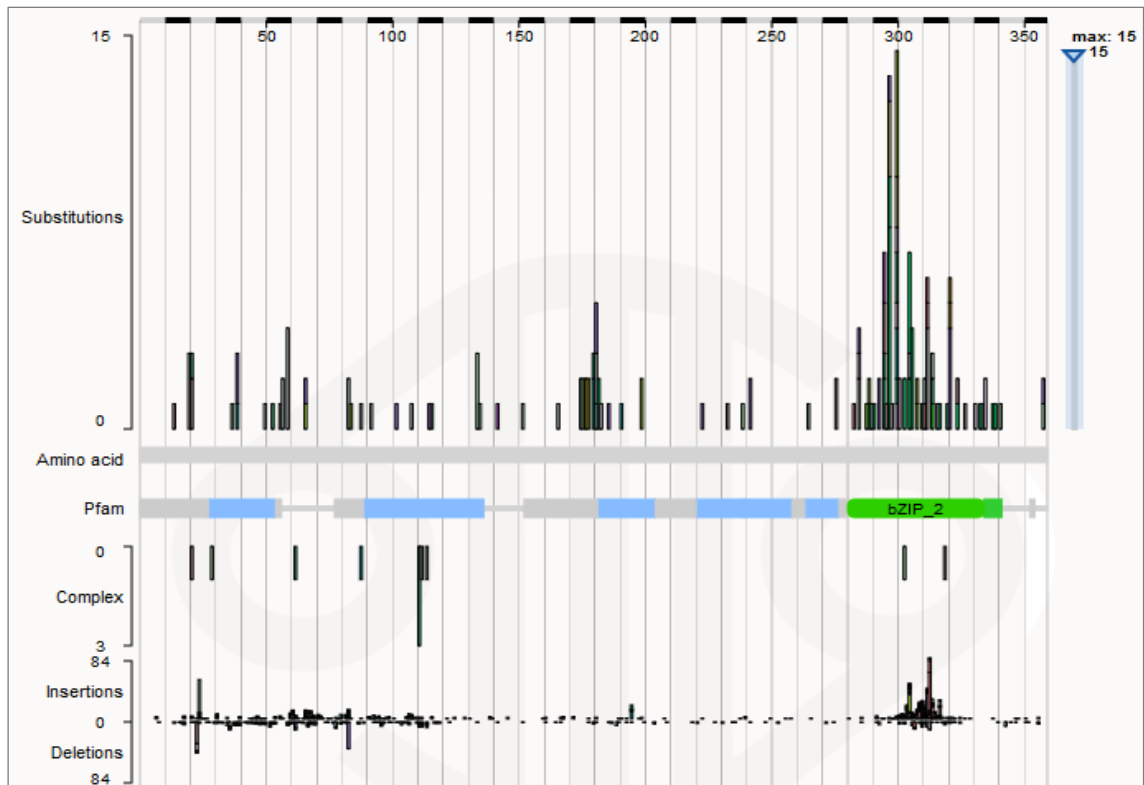


Figure 2 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations impliquées dans la leucémogénèse sur le gène de *CEBPA* dans la base de données COSMIC (11)

- ***DDX41***

Le gène de l'hélicase DEAD-box 41 (*DDX41*) code pour une protéine ARN hélicase jouant un rôle notamment dans la régulation de l'épissage de l'ARN et dans l'immunité innée.

Ce gène peut être muté de façon germinale et somatique dans les HM (12). Des mutations germinales de *DDX41* ont récemment été décrites, à transmission autosomale dominante, chez des patients atteints de SMD ou LAM à un âge avancé (médiane de 62 ans) similaire à celui des cas sporadiques. La prévalence de ces mutations n'est donc pas encore bien connue car la recherche du caractère germinale n'est pas systématique. Certaines cohortes retrouvent cette mutation chez 1 à 5% de patients atteints d'hémopathies myéloïdes, faisant de cette prédisposition germinale la plus fréquente des HMH (13).

Le développement de l'HM est fortement associé à l'acquisition de mutations somatiques à un âge avancé. La mutation germinale est le plus souvent accompagnée d'une mutation somatique additionnelle sur le deuxième allèle de *DDX41* dans un processus similaire à ceux identifiés chez les patients mutés sur *RUNX1* et *CEBPA* (14).

I.3.2. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à des anomalies plaquettaires préexistantes

Les mutations germinales d'*ANKRD26*, d'*ETV6* ou de *RUNX1* prédisposent au SMD et LAM en associant également des troubles plaquettaires selon un mode autosomal dominant. Ces gènes ont des rôles très divers dans l'hématopoïèse. Les patients présentent un

phénotype très hétérogène mais classiquement plutôt une thrombopénie modérée avec une taille de plaquettes normale et des saignements discrets. Le risque de développer une hémopathie myéloïde est plus élevé que dans la population générale (9). Les patients sont souvent diagnostiqués à tort comme porteurs d'un Purpura Thrombopénique Immunologique (PTI). Ces mutations germinales devraient être suspectées devant tout patient atteint d'une thrombopénie avec une histoire familiale de saignement et de SMD ou de LAM (10).

- ***RUNX1***

RUNX1 (Runt Related Transcription Factor 1), situé sur le chromosome 21, code pour la sous-unité alpha du complexe de transcription appelé Core Binding Factor (CBF), un facteur hétérodimérique impliqué dans l'expression de plusieurs gènes de l'hématopoïèse. Il joue aussi un rôle clé dans la maturation et la différenciation des mégacaryocytes (9).

RUNX1 est un des gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM (10% des cas) (15). Les mutations germinales de *RUNX1* sont responsables d'un syndrome autosomal dominant appelé FPD/AML (*Familial Platelet Disorder/AML*). Les patients peuvent présenter des signes pré-leucémiques d'altération de la MO à type de thrombopénie associée à une dysmégacaryopoïèse. Ils ont un risque de développer un SMD ou une LAM dans 44% des cas, avec une grande hétérogénéité dans l'âge d'apparition, allant de 6 à 75 ans (âge médian de 33 ans)(15).

La plupart des mutations germinales caractérisées de *RUNX1* comprennent des mutations non-sens, faux-sens ou entraînant des décalages du cadre de lecture. Elles sont le plus souvent situées dans le domaine conservé N-terminal RUNT responsable de la liaison à l'ADN et de l'hétérodimérisation de CBF (Figure 3). Des délétions larges du bras long du chromosome 21, contenant le gène *RUNX1*, entraînent un phénotype plus complexe (9). Les mutations faux-sens et non-sens ont habituellement un effet dominant négatif en affectant les domaines de liaison à l'ADN de la protéine normale. Les mutations avec décalage du cadre de lecture et les grandes délétions conduisent à une perte de fonction par la formation d'une protéine tronquée responsable de l'haploinsuffisance (9).

Il existe une différence de phénotype et d'association avec des mutations somatiques entre les cas sporadiques de LAM avec mutation de *RUNX1* et les cas familiaux. Dans les cas familiaux, la transformation en LAM se développe à un âge plus jeune avec une leucocytose plus importante (15). Elle semble être associée à l'acquisition d'une mutation somatique impliquant principalement le second allèle de *RUNX1* (9). A la différence de *CEBPA*, les cas sporadiques ne présentent pas de mutations bialléliques de *RUNX1*, mais ces mutations sont régulièrement associées aux mutations d'*ASXL1*. De plus, les mutations somatiques de *RUNX1* sont associées à un spectre phénotypique différent, incluant les LAM et SMD, mais aussi la crise blastique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou la transformation maligne chez les patients atteints d'anémie de Fanconi (8).

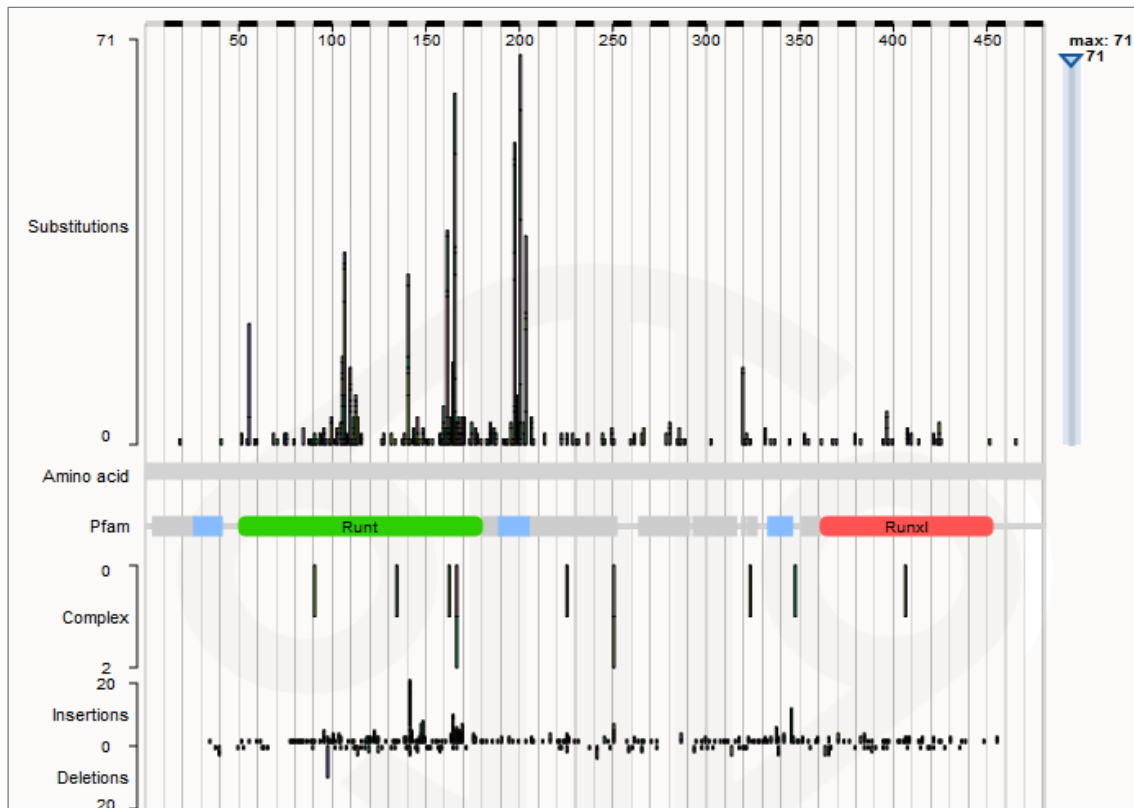


Figure 3 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations sur le gène de *RUNX1* impliquées dans la leucémogénèse dans la base de données COSMIC (16)

- ***ETV6***

ETV6 code pour un répresseur transcriptionnel impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse et nécessaire à la survie des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (10). Les porteurs de mutations d'*ETV6* vont développer une hémopathie maligne dans 25% des cas, principalement des LAL dans l'enfance (5).

- ***ANKRD26***

ANKRD26 joue un rôle dans la régulation de la mégacaryopoïèse et la production de plaquettes. Les mutations germinales dans la région non codante promotrice (5'UTR) perturbent l'interaction avec *RUNX1* et *FLI1*, régulateurs négatifs de l'expression d'*ANKRD26*. L'expression persistante du gène serait à l'origine d'une augmentation des signalisations oncogènes (TPO/MPL, MAPK) dans les mégacaryocytes responsables d'une augmentation du risque de transformation myéloïde. Parmi ces patients, le risque de développer une LAM, un SMD ou une LMC est estimé respectivement à 23 fois, 12 fois et 21 fois plus celui de la population générale (9).

I.3.3. Hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale associées à d'autres dysfonctions organiques

- **GATA2**

GATA2, localisé sur le chromosome 3, code pour un facteur de transcription contenant notamment un domaine de liaison à l'ADN composé de deux domaines contigus à doigts de zinc (8). Il est essentiel au développement de l'hématopoïèse et de la vascularisation lymphatique (17). Dans l'hématopoïèse adulte, *GATA2* est nécessaire à la survie et à l'auto-renouvellement des CSH, en interaction avec des facteurs de transcription comme *FLI1* et *RUNX1*, ainsi qu'à la différenciation myéloïde et lymphoïde (9).

Les mutations germinales du gène *GATA2* sont décrites dans plusieurs syndromes autosomaux dominants à forte pénétrance dès l'enfance. Le syndrome d'Emberger est caractérisé par un lymphœdème primaire et une prédisposition au SMD qui évolue souvent vers une LAM. Le syndrome immunologique MonoMAC est défini par un déficit immunitaire avec une diminution sévère des monocytes, des lymphocytes B et des cellules NK (DCML) associés à des infections mycobactériennes non tuberculeuses disséminées et une sensibilité aux infections virales et aux infections fongiques invasives. Ces mutations peuvent aussi être associées au développement d'une protéinose alvéolaire pulmonaire (9). Les patients ont un risque accru de développer un SMD, une LAM ou une LMMC estimé à 75% au cours de leur vie, à un âge jeune, avec un pic entre 20 et 30 ans (8).

La majorité des mutations est de nature faux-sens, liée à la substitution d'un acide aminé, principalement sur les domaines en doigts de zinc (Figure 4). Il existe aussi des mutations non-sens ou avec décalage du cadre de lecture, distribuées sur tout le gène, ainsi que des délétions, responsables de la synthèse d'une protéine tronquée (8).

Les conséquences physiopathologiques des mutations de *GATA2* dans les cas familiaux sont expliquées par un mécanisme d'haploinsuffisance par perte de fonction de la protéine. Un effet DN de certaines mutations faux-sens n'est tout de même pas exclu (18).

Il semble exister une relation génotype-phénotype puisque la comparaison des phénotypes associés à des mutations faux-sens dans les doigts de zinc ou à des mutations tronquantes montre que les mutations faux-sens seraient plus susceptibles de provoquer une LAM. De plus ces mutations faux-sens affectant les domaines doigt de zinc, ont également été décrites dans des cas somatiques de LAM, en particulier associées aux mutations de *CEBPA* (8). Certaines mutations faux-sens semblent aussi associées à une susceptibilité différente de développer une HM, un syndrome MonoMAC ou un lymphœdème (14).

Dans l'HMH avec mutations de *GATA2*, le développement de la LAM et du SMD est fortement associé à l'acquisition d'une monosomie 7 ou de mutations somatiques, surtout d'*ASXL1*, mais aussi d'*EZH2*, de *SETBP1*, de *WT1*, de *NRAS* et de *STAG2* (8).

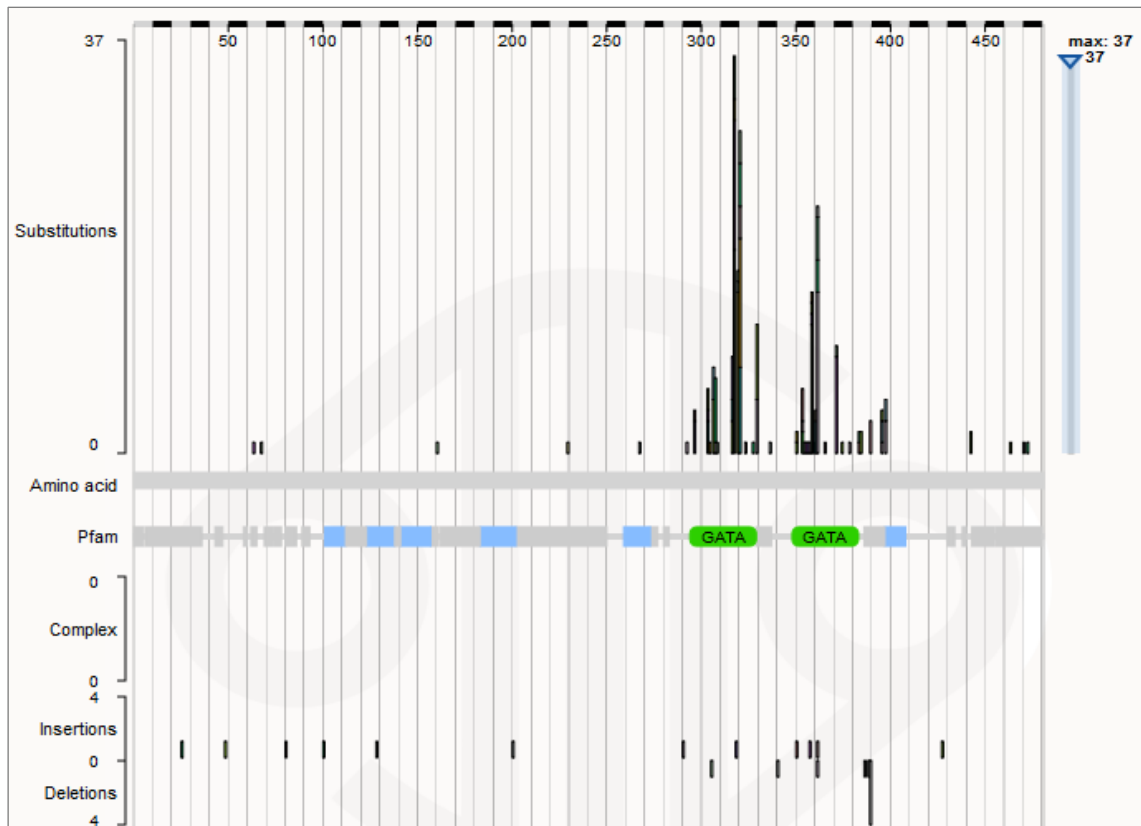


Figure 4 : Représentation graphique de la position et de la fréquence des mutations sur le gène de GATA2 impliquées dans la leucémogénèse dans la base de données COSMIC (19). Les deux domaines en doigt de zinc sont représentés en vert sur le gène.

I.4. Identification des patients

I.4.1. Intérêts du dépistage des HMH

En dépit de l'idée que les HMH touchent principalement les enfants, nous savons maintenant qu'elles touchent les patients de tous âges.

Leur identification est importante car la greffe précoce allogénique de CSH reste une option thérapeutique importante afin d'éradiquer le clone hématopoïétique car certaines de ces HMH sont associées à un risque plus élevé de toxicité liée au traitement et de rechute ou de maladie réfractaire. Dans ce contexte, il est nécessaire d'exclure la présence de la mutation prédisposante chez un potentiel donneur allogénique dans la famille (20).

D'autre part, la recherche de la mutation pour les apparentés asymptomatiques pourrait être envisageable en vue d'un suivi rapproché en hématologie des porteurs et d'un conseil génétique approprié pour le patient et les membres de la famille (5). Il est cependant important de noter qu'aucun marqueur clinique ou biologique n'est actuellement disponible pour prédire si un patient présentant une mutation germinale développera ou non une hémopathie maligne (9).

I.4.2. Démarche diagnostique

Bien que la disponibilité du NGS continue de s'étendre, actuellement il n'est pas recommandé de rechercher systématiquement l'origine génétique de tous les gènes chez tous les patients atteints de SMD ou de LAM (20). Il est donc nécessaire de sélectionner certains patients pour une analyse moléculaire approfondie même s'il n'y a pas de consensus sur les critères définissant les patients qui devraient être testés (20).

Il n'existe pas de caractéristiques cliniques et biologiques spécifiques des HMH au moment du diagnostic permettant d'identifier des patients potentiels. L'orientation diagnostique commence alors par l'interrogatoire détaillé des patients sur leurs antécédents personnels et familiaux, visant à mettre en évidence les symptômes et les troubles syndromiques associés spécifiquement à certaines mutations germinales (6).

Dans la pratique courante, des panels de gènes en NGS sur les cellules leucémiques, incluant ces gènes associés aux HMH, sont de plus en plus utilisés au diagnostic pour établir le profil génétique des LAM/SMD afin d'orienter le traitement en fonction du pronostic (5). L'identification du caractère germinale de la mutation est délicate car de nombreux gènes qui sont mutés dans la lignée germinale peuvent également être mutés de façon somatique dans les SMD et LAM (par exemple *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*). Il a tout de même été démontré que ces panels NGS sur les cellules tumorales pourraient servir de premier élément d'orientation chez les patients n'ayant pas de critères cliniques d'orientation diagnostique lors de leur interrogatoire, notamment certaines HMH se développant au même âge que les cas sporadiques (*CEBPA*, *DDX41*) sans antécédents familiaux. Ainsi parmi 44 patients, Drazer *et al* ont découvert qu'environ un quart des patients (24%) présentant des mutations identifiées avec une fréquence allélique de variant (*Variant Allelic Frequency*, VAF) supérieure à 40% sur les cellules tumorales, possédaient la même mutation dans leur tissu germinale. Au contraire, aucune mutation avec une VAF inférieure à 40% n'était d'origine germinale (3).

Ce séquençage tumoral ne doit cependant pas se substituer au séquençage de la lignée germinale pour les patients suspects, car il omet souvent les gènes liés aux HMH qui subissent des aberrations structurales (disomie uniparentale, perte d'hétérozygotie ou variants mutés dans les sites d'hybridation d'amorce) pouvant diminuer les VAF (5).

Les recherches de mutations germinales sont effectuées sur l'ADN constitutionnel provenant de la culture des fibroblastes cutanés qui est le test de référence. Les ongles et les cheveux peuvent également être utilisés. L'étude sur le sang et la salive est à utiliser avec prudence car ils sont potentiellement contaminés par des cellules leucémiques (5). Tout variant germinale identifié doit être interprété avec prudence. Certains variants sont connus dans la littérature et dans les bases de données pour être pathogènes ou potentiellement pathogènes. Cependant comme de nombreux individus et familles présentent des mutations familiales uniques, beaucoup de variants sont initialement classés comme de signification incertaine et nécessitent des tests fonctionnels pour déterminer leur effet délétère. De plus certaines mutations se trouvent dans les régions non couvertes par le séquençage ciblé ou l'exome (région intronique par exemple) (9).

I.4.3. Proposition d'éléments d'orientation pour identifier les patients avec HMH

Les détails suivants dans l'histoire du patient peuvent faire suspecter une HMH (6,9):

1. Tout patient atteint de LAM ou SMD dont un membre de la famille est atteint d'une hémopathie maligne, de cytopénies caractéristiques ou de signes syndromiques associés aux HMH.
2. Tout patient présentant une hémopathie maligne à un âge jeune (<45-50 ans) et dont un membre de la famille est atteint d'un cancer quelconque diagnostiqué à un âge jeune
3. Tout patient présentant un profil moléculaire et/ou cytogénétique évoquant une HMH (mutations de *CEBPA*, de *RUNX1* ou de *DDX41* bialléliques ou mutations avec un VAF autour de 50%, monosomie 7 associée à une mutation de *GATA2*)
4. Tout donneur potentiel de cellules souches hématopoïétiques (CSH) apparenté en bonne santé, qui présente l'une des affections précédentes ou qui présente une mobilisation périphérique difficile des CSH.

II. L'hélicase DEAD-box *DDX41*

DDX41 fait partie des 40 membres de la famille des hélicases à boîte DEAD (21). C'est la plus grande famille appartenant à la superfamille 2 (SF2) des hélicases à ARN. Elle partage des motifs très conservés contenant des sites de liaison à l'ARN et l'ATP (adénosine triphosphate). Ce sont des protéines liant l'ARN (RBP ou *RNA Binding Protein*) importantes dans la régulation de l'épissage et des différents processus impliquant l'ARN et sont donc essentielles pour la croissance et la viabilité des cellules (21).

II.1. Les hélicases à boîte DEAD

II.1.1. Rôles physiologiques communs

Les hélicases à boîte DEAD sont surtout décrites dans la littérature en tant que régulatrices de l'épissage de l'ARN. L'épissage est réalisé dans le splicéosome, un grand complexe d'épissage très dynamique composé de ribonucléoprotéine (RNP) et de snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) U1, U2, U4/U6 et U5 (22). Il reconnaît des séquences présentes sur le pré-ARNm servant de signaux d'épissage, de part et d'autre des introns. Il réalise la réaction d'épissage en recrutant séquentiellement plusieurs snRNP lors de deux réactions de trans-estérification successives à la suite desquelles le segment intronique est éliminé et les deux exons successifs sont associés dans l'ARNm (Figure 5). Un remodelage du splicéosome doit se produire entre chaque étape (22).

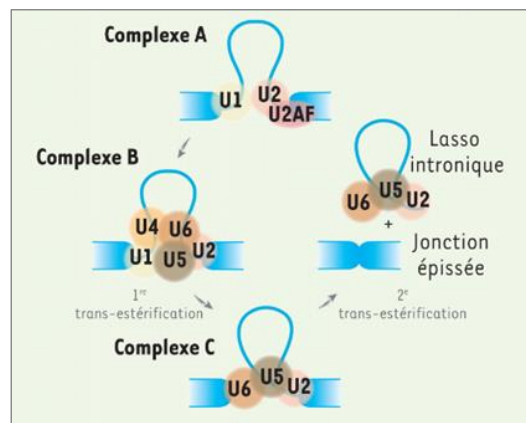


Figure 5 : Schématisation du cycle du splicéosome (23)

L'épissage de l'ARN devant être très précis afin de joindre correctement les exons codants, des mécanismes existent pour vérifier la fidélité de l'épissage. Les hélicases à ARN ont été identifiées comme des régulateurs importants dans les transitions entre chaque étape du cycle d'épissage. Elles ont une activité de déroulement de l'ARN en duplex (ADN-ARN ou ARN-protéine) dépendante de l'hydrolyse de l'ATP, permettant de remodeler notamment les snRNP associés aux protéines dans le splicéosome (24). Elles modulent donc la reconnaissance des sites d'épissage par le splicéosome grâce au changement de conformation de son centre catalytique à chaque étape (22).

Malgré leur noyau conservé, les différentes protéines à boîte DEAD ont d'autres rôles très diversifiés dans le métabolisme de l'ARN: l'exportation de l'ARNm nucléaire, la biogenèse des ribosomes, la dégradation de l'ARNm et leur transport et stockage cytoplasmique (Figure 6) (21). Cette diversité d'activités biologiques leur permet d'être impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques dont la réplication virale, les réponses immunitaires innées ou la prolifération cellulaire (25). Certaines, comme *DDX41*, jouent un rôle dans la transformation néoplasique faisant d'elles des acteurs importants dans le développement et la progression de cancers (25).

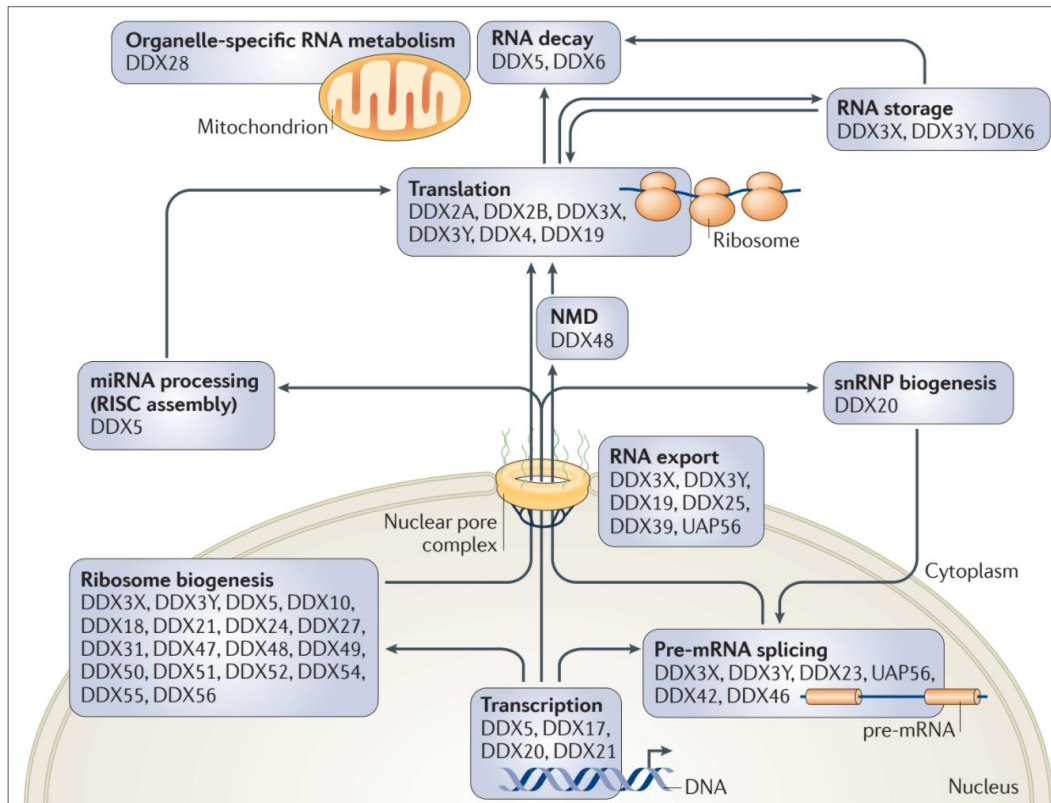


Figure 6 : Diversité des rôles des protéines à boîte DEAD dans le métabolisme de l'ARN, d'après Linder et al. (24)

II.1.2. Domaines fonctionnels communs

Les protéines à boîte DEAD portent le nom de la séquence strictement conservée Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D). Leur fonction hélicase est assurée par un noyau catalytique composé de deux répétitions en tandem de domaines de « type RecA » (appelés communément domaine DEAD et domaine Hélicase) dont la topologie est identique à celle de RecA, une protéine bactérienne impliquée dans les processus de recombinaison de *E. coli* (24). Il présente 13 motifs conservés impliqués dans différentes fonctions (Figure 7) :

- les motifs Q, I, II et VI sont les motifs liant les nucléotides (ADN, ATP) ;
- les motifs Ia, Ib, Ic, IV, IVa et V sont les motifs d'interaction avec l'ARN ;
- les motifs III et Va sont essentiels à l'interaction intramoléculaire entre les différents sites et pour l'hydrolyse de l'ATP (24,26).

La séquence DEAD est située dans le motif II (25). Les extrémités N et C-terminales ne sont pas conservées entre les différentes hélicases et sont importantes pour leur spécificité de fonction (25).

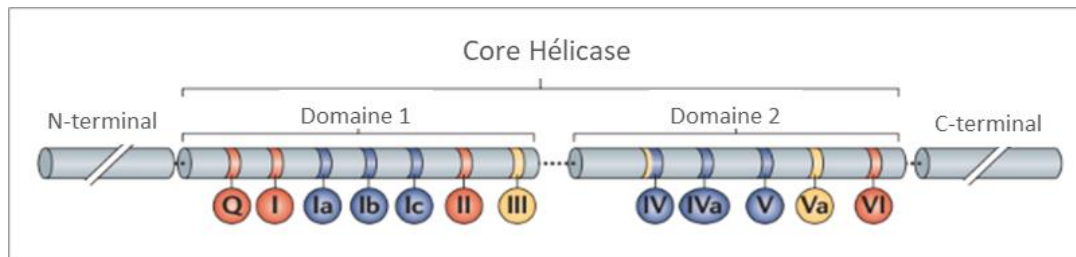


Figure 7 : Motifs conservés dans les hélicases à boîte DEAD, d'après *Linder et al.* (24)

- En rouge : motifs liant l'ADN et l'ATP
- En bleu : motifs liant l'ARN
- En jaune : communication entre site liant ATP et sites liant ARN, hydrolyse de l'ATP

II.2. Rôles spécifiques de *DDX41*

Différents rôles physiologiques de *DDX41* sont étudiés mais ne sont pas encore complètement établis. En plus de son rôle dans la régulation du métabolisme de l'ARN, de l'épissage, et de la biogenèse des ribosomes, elle participe à l'activation de la réponse immunitaire dépendante de l'interféron (IFN).

II.2.1. Régulation du métabolisme de l'ARN

II.2.1.1. Interaction avec le spliceosome dans la régulation de l'épissage de l'ARN

Comme nous l'avons vu précédemment, les hélicases à boîte DEAD ont un rôle essentiel dans l'épissage de l'ARN en régulant le spliceosome. Ainsi, *Polprasert et al.* a montré que *DDX41* se lie plus spécifiquement au complexe U2 (contenant *SF3B1*) et U5 (contenant *PRPF8*) (Figure 8) (4). Indirectement, *DDX41* joue un rôle de suppresseur de tumeur car son interaction avec le spliceosome est essentielle pour l'épissage et l'expression correcte des régulateurs de gènes suppresseurs de tumeurs.

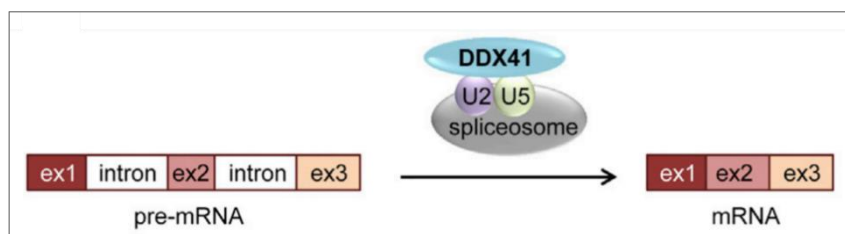


Figure 8 : Interaction de *DDX41* avec les composants du spliceosome, d'après *Antony-Debré et al.* (27)

II.2.1.2. Régulation de la biogenèse des ribosomes et de la prolifération cellulaire

DDX41 participe à la biogenèse des ribosomes, éléments essentiels de la traduction des protéines, en maturant les ARN ribosomiques précurseurs (pré-ARNr) et en participant à l'assemblage des sous-unités ribosomales 60S (28). En cas d'altération de l'assemblage des ribosomes, les protéines ribosomales RPL5 et RPL11 non incorporées sont libérées dans le nucléoplasme et peuvent inhiber la progression du cycle cellulaire, indépendamment de la voie TP53, *via* la voie MDM2-pRB-E2F1 (28), en formant un complexe avec MDM2, une ubiquitine-ligase, provoquant la libération de pRB qui dégradera ultérieurement le facteur de transcription E2F-1 (Figure 9) (29).

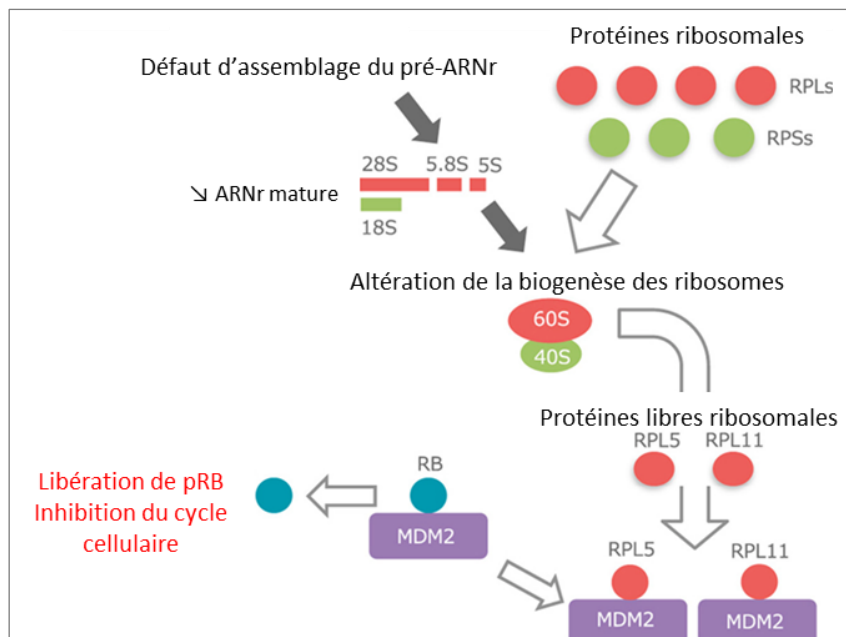


Figure 9 : Défaut d'assemblage des ribosomes, d'après *Kadono et al* (28)

II.2.2. Immunité innée

La réponse immunitaire innée joue un rôle critique dans la défense de l'hôte contre les infections. Elle repose sur la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) par les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR pour *Pattern Recognition Receptor*). Presque tous les PRR partagent la caractéristique commune de reconnaître spécifiquement un seul type de PAMP (30). La transduction du signal intracellulaire *via* la voie STING1 aboutit à l'activation du facteur de transcription IRF3 induisant l'expression du gène des interférons de type 1 (IFN) (31). Les IFN de type 1 ont un rôle essentiel dans la lutte contre les virus et la réparation tissulaire (30).

Contrairement à d'autres hélicases à boîte DEAD spécifiques de l'ARN, *DDX41* peut aussi se lier directement à l'ADN et agir comme un PRR capteur d'ADN dans le cytoplasme des cellules dendritiques myéloïdes et des monocytes (31). C'est un PRR unique car il peut reconnaître deux types différents de PAMP pour activer la réponse IFN de type 1 *via* la voie STING1 (25,32) :

- les petits ADN double brin (ADNdb) intracellulaires, retrouvés dans les virus à ADNdb (par exemple adénovirus, herpèsvirus et papillomavirus) et dans les cellules en apoptose voisines qui ont libéré des fragments d'ADNdb par nécrose (31) ;
- l'ADN cyclique dinucléotidique (CDN) bactérien représenté par le monophosphate de diguanosine cyclique (c-di-GMP) et le monophosphate de diadénosine cyclique (c-di-AMP), utilisés par les bactéries dans la régulation de leur métabolisme et de leur virulence (33).

La voie de signalisation dépendante de *DDX41* est décrite dans la Figure 10. La capacité de liaison à l'ADNdb étranger et à STING1 dépend de plusieurs résidus critiques sur *DDX41*. La phosphorylation de Tyr414 par BTK (Bruton Tyrosine Kinase) dans la région de liaison entre le domaine DEAD et l'hélicase, renforce l'affinité de *DDX41* pour l'ADNdb et stabilise son interaction avec STING1. L'acide aminé Tyr364 non phosphorylé est un autre résidu présent dans le domaine DEAD essentiel aux fonctions de *DDX41* (34). Après la réponse immunitaire, une régulation négative de *DDX41* est essentielle pour éviter une expression excessive d'IFN de type I. TRIM21, une ligase E3 inductible par l'interféron, ubiquitine les lysines 9 et 115 situés sur la partie N-terminale conduisant à la dégradation de *DDX41* par le protéasome (35).

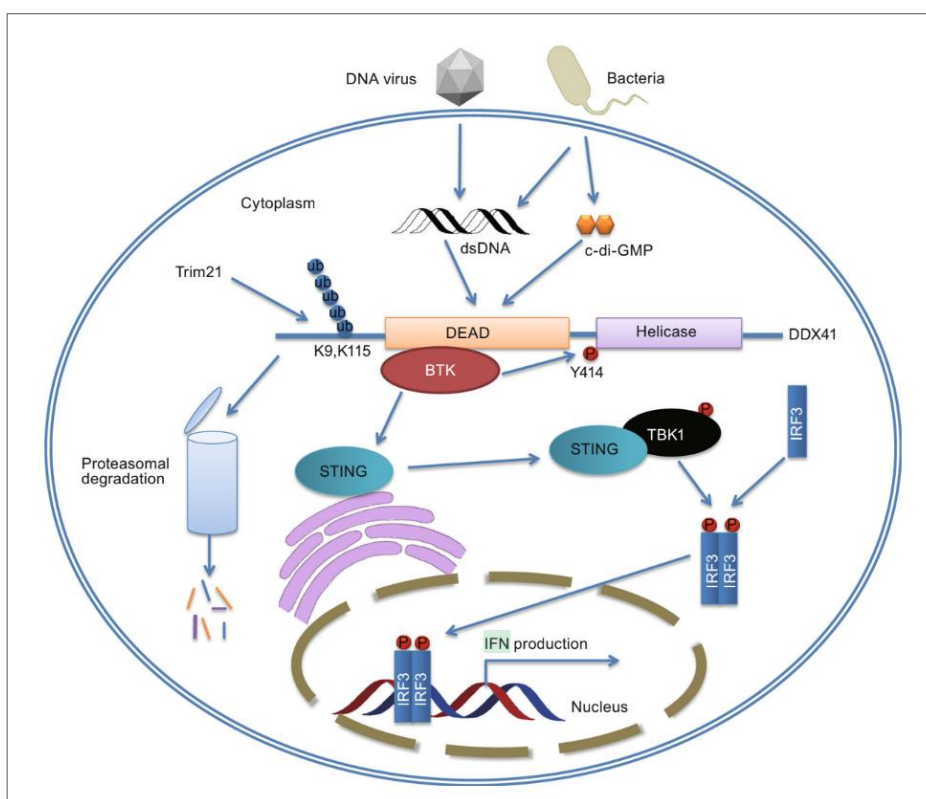


Figure 10 : La voie de signalisation de *DDX41* dans l'immunité innée, d'après Jiang et al. (25)

II.3. Relation Structure-activité de *DDX41*

DDX41 est codée par un gène de 17 exons localisé sur l'extrémité distale du bras long du chromosome 5 en 5q35.3 (37).

Il existe deux isoformes protéiques de *DDX41*, une majoritaire de 70kDa (p70) qui se localise préférentiellement dans le noyau grâce à sa partie N-terminale mais peut aussi se retrouver dans le cytoplasme et une minoritaire de 55kDa (p55) tronquée au niveau de la région N-terminale (29).

En plus des deux domaines conservés dans les hélicases à boîte DEAD, le domaine N-terminal spécifique de *DDX41*, contiendrait une séquence de localisation nucléaire (NLS), tandis que le domaine C-terminal possède un motif en doigt de zinc (32). *DDX41* interagit avec les acides nucléiques (ADNdb, CDN, ARN) et l'ATP *via* les mêmes motifs du domaine DEAD que les autres hélicases (32). Les domaines d'interaction avec les différents acteurs de l'immunité sont regroupés sur la Figure 11.

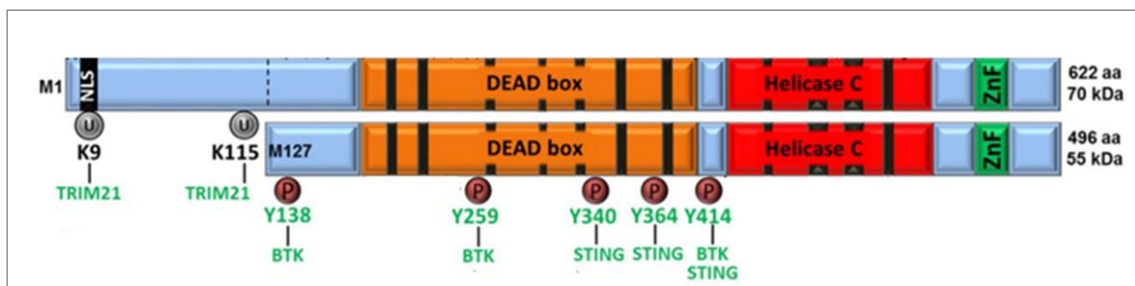


Figure 11 : Structure protéique de *DDX41*, d'après Cheah *et al.* (36)

La protéine contient les domaines conservés 1 (ou DEAD box) et 2 (ou Hélicase C) de type RecA, un motif en doigt de zinc (ZnF) et un signal de localisation nucléaire (NLS) dans l'isoforme de 70 kDa.

II.4. Mutations et dérégulation de *DDX41* en pathologie

En 2012, Ding *et al.* ont pour la première fois identifié, par séquençage de génome entier, la présence de mutations récurrentes de *DDX41* chez des patients atteints de LAM (2). En 2015, Polprasert *et al.* ont découvert une famille comptant 4 membres affectés par une LAM ou un SMD, sur laquelle une mutation germinale de type *frameshift* décalant le cadre de lecture au niveau de l'aspartate 140 de *DDX41* a été retrouvée (p.Asp140Glyfs*) (4). Depuis, l'implication de *DDX41* dans les HM héréditaires et somatiques est bien établie mais les mécanismes physiopathologiques de la leucémogenèse sont encore mal connus.

Les mutations de *DDX41* peuvent être divisées en plusieurs catégories :

- les mutations avec décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon stop et d'une protéine tronquée ;
- les mutations d'un site d'épissage de *DDX41* ;
- les mutations faux-sens dont l'effet n'est pas encore bien connu (14).

Des délétions de *DDX41* sont parfois retrouvées dans des délétions 5q (del5q) mais le gène *DDX41* se trouve dans la région CRR2 (Commonly Retained Region 2) du chromosome 5 qui n'est pas habituellement délétée (38).

Une modélisation des conséquences d'une perte de fonction de *DDX41* a été réalisé dans une lignée cellulaire humaine leucémique (K562) qui a mis en évidence une croissance tumorale accélérée et un blocage de la différenciation, renforçant l'idée d'un pouvoir

suppresseur de tumeur de *DDX41* physiologiquement (4). *In vitro*, la diminution de l'expression de *DDX41* provoque une diminution de son interaction avec le spliceosome. Le mauvais fonctionnement du spliceosome est à l'origine d'un épissage aberrant (Figure 12) et peut entraîner une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (4).

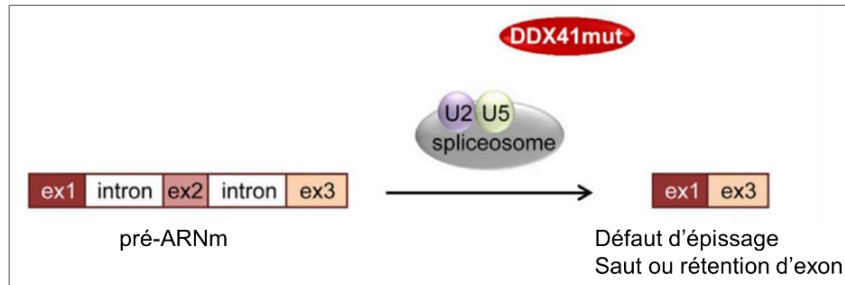


Figure 12 : Epissage aberrant en cas de mutations de *DDX41*, d'après Antony-Debré et al. (27)

Les mutations germinales sont distribuées sur toute la phase codante du gène et les sites d'épissage (Figure 13) conduisant fréquemment à un décalage du cadre de lecture à l'origine d'une perte de fonction par la synthèse d'une protéine tronquée (4). Elles sont toujours hétérozygotes. Les différentes études sur les mutations de *DDX41* ont montré que les mutations germinales récurrentes semblent avoir une répartition ethnique. La mutation germinale la plus couramment décrite parmi les populations caucasiennes correspond à la substitution de la méthionine initiant le cadre de lecture (p.Met1?), suivi de p.Asp140Glyfs* dans le domaine N-terminal. La mutation Ala500Cysfs* dans le domaine hélicase n'a été signalée que dans des familles d'origine asiatique (36).

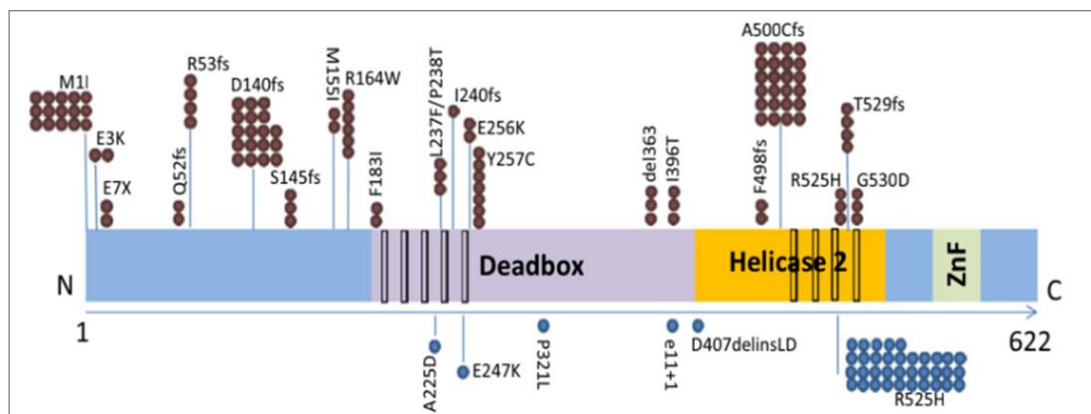


Figure 13 : Position des mutations germinales (en haut) et somatiques (en bas) de *DDX41* retrouvées dans la littérature (14)

Une équipe a remarqué que *in vitro*, la mutation p.Met1? conduit à une perte du codon d'initiation entraînant une baisse de l'expression de p70 sans affecter l'isoforme plus courte p55 à localisation préférentiellement cytoplasmique (39). Cette observation rappelle celle habituellement retrouvée dans les mutations germinales de *CEBPA*, dans lesquelles les mutations N-terminales empêchent la formation de l'isoforme complète sans affecter celle de

l'isoforme plus courte qui a un effet DN. Pour *DDX41* les conséquences physiopathologiques ne sont cependant pas encore connues.

La mutation somatique la plus fréquente est la mutation faux-sens p.Arg525His située dans le domaine de liaison de l'ATP (Figure 13). Cette mutation entraîne une perturbation de l'assemblage des ARN ribosomiques ayant pour effet d'altérer la traduction des protéines et d'inhiber la progression du cycle cellulaire par la voie MDM2-pRB-E2F1. Ce mécanisme pourrait participer au déclenchement des cytopénies (28).

Les conséquences des mutations de *DDX41* sur sa fonction immunitaire sont peu étudiées. La mutation p.Met1? bloquant la formation de p70, empêcherait TRIM21 de se fixer sur les résidus N-terminaux de la protéine et de dégrader la protéine après l'activation de l'IFN (39). Une production excessive d'IFN pourrait être responsable du développement de maladies auto-immunes (35). De plus, des mutations dans les acides aminés Tyr364 ou Tyr414 pourraient être délétères et bloquer la réponse immunitaire IFN1 par la voie DDX41-STING en réponse aux infections.

Parmi les patients porteurs de mutations germinales ayant développé une leucémie, la moitié ont également acquis des mutations somatiques (4). Dans les rares cas somatiques décrits, les mutations somatiques de *DDX41* semblent pourtant plus souvent isolées même si d'autres événements somatiques peuvent parfois se substituer aux mutations de *DDX41* pour remplacer le besoin d'une deuxième atteinte bi-allélique (Figure 14) (14). Le degré de réduction de l'activité génique semble être un facteur important de la prédisposition et de la progression à la leucémie, car une seule mutation ne semble pas suffisante à la progression. Une fonction résiduelle semble tout de même nécessaire pour la survie cellulaire car les mutations germinales avec décalage du cadre de lecture ne sont jamais associées à des délétions ou des mutations somatiques par décalage du cadre de lecture (14).

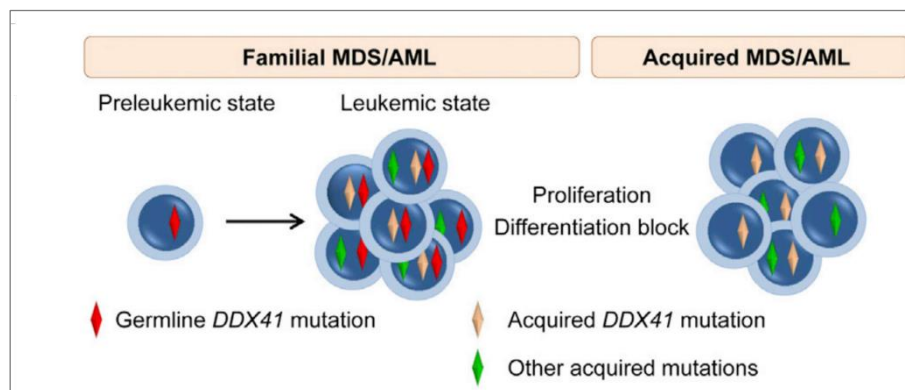


Figure 14 : Modélisation de l'acquisition des mutations de *DDX41* dans les HM familiales ou acquises, d'après Antony-Debré et al. (27)

III. Objectifs

DDX41 semble avoir un rôle important dans l'oncogenèse des HMH. La plupart des études déjà publiées sélectionnent les patients selon la nature germinale de ces mutations et retrouvent de nombreux patients atteints de SMD et de LAM.

Dans notre travail, nous avons examiné une vaste cohorte de patients adultes âgés atteints de LAM, non sélectionnée sur la nature germinale de leurs mutations. Nous avons pu identifier les patients atteints de mutations de *DDX41* car nous recherchons systématiquement en routine cette mutations dans le cadre d'un panel multigénique en NGS.

L'objectif de cette étude est de compléter nos connaissances sur l'incidence, les corrélations biologiques et cliniques ainsi que d'évaluer l'impact pronostique et d'améliorer la compréhension du phénomène d'oncogenèse des LAM avec mutations de *DDX41*, peu décrites dans la littérature, mais qui semblent être une entité à part dans les LAM.

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Cohorte de patients

Depuis 2016, les tests moléculaires par NGS ciblé sur l'analyse de gènes impliqués dans les LAM incluent *DDX41* à l'IUCT-Oncopole de Toulouse. Ils ont été réalisés sur 1018 échantillons médullaires de 976 patients atteints de LAM. Quand le prélèvement peut être réalisé, l'analyse en NGS est effectuée en routine chez tous les patients atteints de LAM au diagnostic, en analyse pré-greffe, et/ou à la rechute.

Parmi les patients analysés, 330 patients proviennent de l'étude clinique prospective randomisée LAM-SA 2007 (40,41). Dans cette étude de phase III multicentrique du groupe d'étude FILO (*French Innovative Leukemia Organization*), 424 patients atteints de LAM *de novo* ont été randomisés afin de mesurer l'impact sur la survie de l'ajout de lomustine (ou CCNU) à la chimiothérapie standard. Celle-ci comprenait de l'idarubicine et de la cytarabine pendant l'induction et la consolidation des patients. 459 patients avaient été recrutés entre février 2008 et décembre 2011. Ils étaient tous âgés de plus de 60 ans, sans anomalies cytogénétiques de pronostic défavorable, ni leucémie promyélocytaire (LAM3) ou sarcome granulocyttaire isolé. 424 patients ont finalement été analysés. Un myélogramme a été réalisé au diagnostic et un prélèvement pour l'analyse moléculaire a pu être effectué pour 330 patients. Le séquençage étendu par NGS a été fait *a posteriori* de manière centralisée sur les échantillons d'ADN stockés. 24 patients porteurs de la mutation *DDX41* ont été identifiés et ont pu être comparé au reste des patients non mutés du même protocole.

10 patients atteints de LAM de plus, qui ne font pas partie du protocole LAM-SA 2007, ont été identifié avec une mutation de *DDX41*.

IV.2. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait des cellules mononucléées médullaires. Après séparation par gradient de densité Ficoll et lyse des globules rouges.

L'extraction est effectuée par technique manuelle à l'aide du kit Promega (Wizard Genomic DNA purification kit) et comprend 4 étapes :

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

Le dosage de la quantité d'ADN extrait est réalisé par mesure de l'absorbance à 260nm sur le spectrophotomètre Nanovue.

IV.3. Séquençage ciblé

IV.3.1. Principe du NGS

Le séquençage haut débit ou NGS est basé sur la génération et la lecture en parallèle de millions de petites séquences d'ADN indépendantes de plusieurs échantillons simultanément. Quatre étapes fondamentales se suivent :

- La préparation des bibliothèques : elles constituent l'ensemble des fragments d'ADN d'intérêts à séquencer ;
- L'amplification clonale des bibliothèques ;
- Le séquençage proprement dit ;
- L'analyse bio-informatique des données brutes.

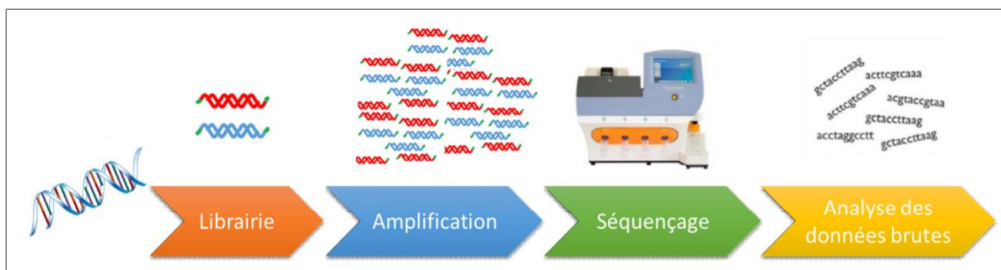


Figure 15 : Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire » (42)

A l'IUCT-Oncopole de Toulouse, l'analyse par NGS est effectuée en utilisant un Illumina NextSeq500 et une méthode d'enrichissement :

- Par la méthode Haloplex HS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ciblée sur les régions codantes complètes de 53 gènes avant 2017 (Annexe 1.1). Cette méthode a été utilisée pour analyser les patients du protocole LAM-SA 2007.
- Par la méthode SureSelect (Agilent, Santa Clara, CA, USA) plus performante, utilisée depuis 2017 et ciblée sur plus de gènes impliqués dans les LAM. Le panel de gènes est en constante évolution et contient plus de 90 gènes aujourd'hui (Annexe 1.2).

IV.3.2. Construction de la librairie

Une première étape de fragmentation de l'ADN est réalisée par digestion enzymatique en utilisant des enzymes de restriction qui coupent l'ADN au niveau de sites de restriction précis. Les fragments d'ADN d'intérêt à séquencer subissent ensuite un ciblage et un enrichissement. Deux principales approches existent :

- La première est l'approche « amplicons » qui consiste à utiliser des amorces encadrant les régions d'intérêt, pour pouvoir les amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) ;

- La deuxième est l'approche « capture », qui consiste à fragmenter l'ADN et à capturer les régions d'intérêt avec des sondes nucléotidiques d'une centaine de paires de bases.

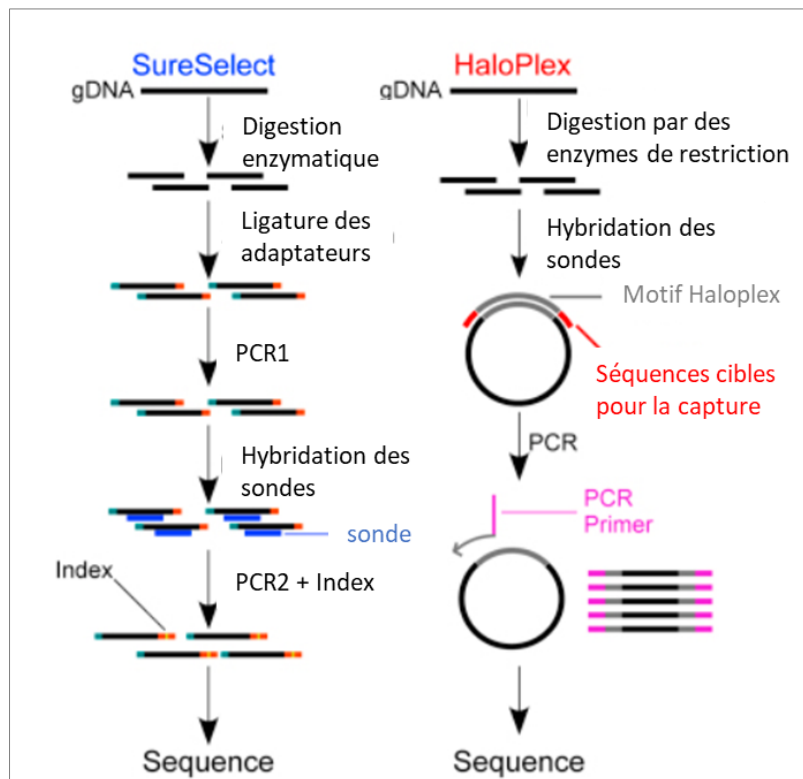


Figure 16 : Principe des techniques d'enrichissement de l'ADN SureSelect et HaloPlex d'Agilent® (43)

IV.3.2.1. Technique HaloPlex Agilent®

La technique par hybridation et PCR-amplicon HaloPlex d'Agilent® utilise la digestion enzymatique par des enzymes de restriction comme technique de fragmentation d'ADN (Figure 16). Un mélange d'enzymes de restriction est utilisé afin d'obtenir des fragments d'environ 100 à 150pb. L'ADN digéré est dénaturé pour devenir simple brin. Il est ensuite hybridé à des milliers de sondes HaloPlex couplées à de la biotine. Ces sondes sont composées de deux zones de reconnaissance de l'ADN situées aux extrémités, spécifiques de la région désignée par les enzymes de restriction, entrecoupées par un index. Chaque index est spécifique de chaque patient analysé (Figure 17).

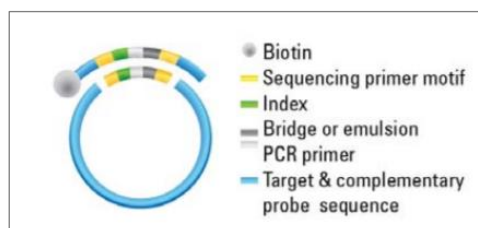


Figure 17 : Contenu des amplicons amplifiés par technique HaloPlex (44)

Après circularisation des fragments d'ADN d'intérêt, ils seront ensuite capturés par des billes magnétiques recouvertes de streptavidine qui ont une très forte affinité pour la biotine couplée aux sondes. Après lavage, seuls restent les fragments d'intérêt. La dernière étape d'amplification par PCR est réalisée à l'aide d'amorces universelles qui reconnaissent spécifiquement certaines bases dans l'index, liées à des adaptateurs Illumina®.

IV.3.2.2. Technique Sureselect Agilent®

La technique actuellement utilisée au laboratoire est la capture par hybridation Sureselect d'Agilent®. L'ADN est fragmenté de la même façon grâce à des enzymes de restriction spécifiques (SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit), en nombre plus important que la précédente technique, pour atteindre une cible de fragments de 150 à 200 pb. Les fragments d'ADN simple brin sont ensuite hybridés à des adaptateurs Illumina® biotinylés et sont amplifiés une première fois (PCR1). Comme pour la méthode Haloplex, les fragments d'ADN ciblés liés aux sondes sont capturés à l'aide de billes magnétiques couplées avec de la streptavidine. Après avoir regroupé dans un même puit les PCR1 issues du même échantillon, les fragments sont ensuite amplifiés une seconde fois (PCR2) avec l'ajout des index spécifiques de chaque patient (Figure 16).

La méthode SureSelect présente une meilleure profondeur grâce aux deux amplifications par PCR successives. Du fait du plus grand nombre de fragments d'ADN générés, cette méthode montre une meilleure qualité de séquençage avec une meilleure homogénéité de profondeur et de couverture inter-échantillons ainsi que moins d'artefacts (43).

Quelle que soit la technique utilisée, un mélange équimolaire de toutes les bibliothèques est ensuite effectué pour obtenir la bibliothèque de séquençage. Afin de pouvoir normaliser les échantillons les uns par rapport aux autres, un dosage fluorimétrique de l'ADN post-purification PCR2 doit être réalisé à l'aide du kit Quantifluor dsDNA System.

IV.3.3. Préparation de la matrice de séquençage (amplification clonale)

La bibliothèque est déposée directement dans le séquenceur NextSeq d'Illumina®, et amplifiée afin de générer des clusters d'amplicons par « *bridge amplification* ». Les réactions ont lieu en phase solide sur une lame en verre appelée *flow cell*. Les amplicons, possédant aux deux extrémités des adaptateurs, vont se fixer sur la *flow cell* sur laquelle sont accrochées des millions de séquences d'oligonucléotides et générer ainsi des ponts. Lors de l'étape d'amplification clonale par pont, l'incorporation des nucléotides puis la dénaturation du double brin permettent la génération de deux amplicons simple brin. L'objectif est de créer jusqu'à 1000 copies identiques de chaque molécule d'ADN au même endroit pour former des groupes ou « *clusters* » de brins d'ADN identiques (45,46).

IV.3.4. Séquençage NextSeq Illumina®

Le séquençage est ensuite réalisé grâce à la synthèse du brin complémentaire par incorporation de nucléotides marqués par un fluorochrome. Chacun des 4 nucléotides est

marqué par un fluorochrome différent. Au cours de chaque cycle de séquençage, un seul désoxynucléoside triphosphate (dNTP) marqué est incorporé à la chaîne d'acide nucléique sous l'action de l'ADN polymérase. Ce marqueur nucléotidique sert de terminateur de chaîne pour la polymérisation. Après chaque incorporation, une lecture laser permet de détecter l'émission fluorescente simultanément pour toutes les positions incorporées. Le fluorochrome est ensuite clivé par action enzymatique pour permettre l'incorporation du nucléotide suivant permettant de reconstituer la séquence de chaque cluster sur la *flow-cell* (Figure 18). Comme chaque cycle est répété n fois, cela permet d'obtenir des « *reads* » de n bases (45,46).

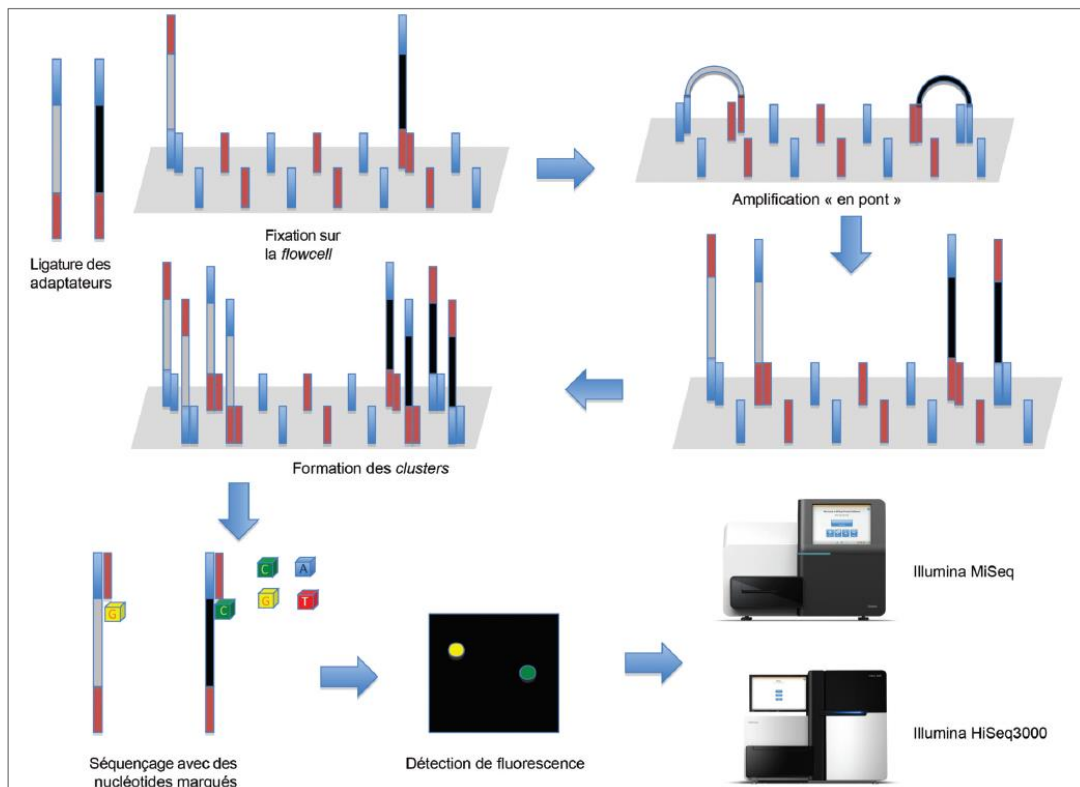


Figure 18 : Principe du séquençage Illumina, d'après *Bonnin et al.* (47)

IV.4. Analyse et interprétation des données

IV.4.1. Qualité du séquençage

Deux critères fondamentaux permettent d'évaluer la qualité des données de séquençage :

- La profondeur de lecture est le nombre moyen de lecture par base à une position ;
- La couverture de lecture correspond au pourcentage de bases effectivement séquencées par rapport au nombre total de bases ciblées au départ.

Les performances de couverture et de profondeur sont dépendantes des techniques d'enrichissement utilisées.

IV.4.2. Traitement des données brutes et alignement par rapport au génome

Les données brutes subissent plusieurs pré-traitements suivant des algorithmes qui génèrent des fichiers au format FASTQ. Les données sont filtrées afin de ne garder que les meilleurs fragments séquencés en fonction d'un score de qualité. Ces fichiers sont ensuite alignés sur le génome humain de référence. Trois programmes bioinformatiques distincts d'identification des variants sont utilisés, ayant des propriétés différentes sur la taille de l'alignement, la détection des insertions/délétions, les fractions alléliques (VAF) et la qualité de l'annotation.

IV.4.3. Interprétation des variants

Un polymorphisme est défini par un changement dans la séquence d'ADN présent chez plus de 1% de la population. Le SNP (*single-nucleotide polymorphism*) représente le polymorphisme le plus courant. Il n'est la plupart du temps pas associé à une maladie (48). Une mutation est définie comme un changement dans la séquence d'ADN présent chez moins de 1% de la population. Ce changement de la séquence nucléotidique peut ou non provoquer des changements phénotypiques (49).

Les variants obtenus sont donc classés en fonction de leur fréquence estimée dans la population générale et de leur pathogénicité théorique pour sélectionner celui ou ceux potentiellement responsables de la pathologie du patient. Deux situations sont possibles : cette variation de séquence a déjà été décrite au préalable (récurrence), ou non. Cette information sera basée sur l'utilisation d'outils de prédiction bio-informatiques et de bases de données.

Si la variation de séquence a déjà été rapportée, les informations disponibles peuvent permettre de savoir si elle a un caractère délétère qui a déjà été confirmé au préalable chez d'autres patients, ou au contraire si elle a été identifiée sans effets pathologiques dans la population générale. Plusieurs sites de prédictions du potentiel pathogène des mutations sont disponibles en ligne :

- La base de données GnomAD (*Genome Aggregation Database* et son prédécesseur ExAC pour *Exome Aggregation Consortium*) rassemble des données de séquence de plusieurs milliers d'individus sains. Les données sont issues de 123.136 exomes de sujets non apparentés et de 15.496 génomes (2017). Les variants répertoriés constituent une large base de polymorphismes à priori non pathogène même si elle peut tout de même contenir des variants de prédisposition ou dans de rares cas, de vrais mutations (hématopoïèse clonale) ;
- La base de données COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) répertorie les variants pathologiques mais contient aussi de vrais polymorphismes ;
- La base de données UCSC (*University of California Santa Cruz*) permet regrouper pour un même variant toutes les bases de données.

Ces données permettent de classer les variants en trois catégories, selon l'impact présumé de la mutation sur la fonction des protéines :

- « variant défavorable » et « probablement défavorable » : Ces variants peuvent être des variants entraînant la formation d'une protéine tronquée (décalage de

cadre de lecture, mutations non-sens) ainsi que les variants décrits pathogènes dans la littérature et les bases de données ;

- « variant de signification indéterminée » : Ces variants ne peuvent pas être interprétés dans l'état actuel des connaissances (polymorphisme ou mutation rares non récurrentes) ;
- « variant bénin » et « probablement bénin » : Il s'agit de variants qui entraînent peu ou pas de modifications sur la protéine codée. Ces variants n'ont que des conséquences minimales voire aucune sur la protéine, correspondant généralement à des polymorphismes.

IV.4.4. Détermination du caractère somatique ou germlinal par la VAF

La VAF est la proportion de lectures d'une séquence d'ADN présentant un variant spécifique, divisées par la couverture globale de cette base pour un patient. Elle donne une estimation de la proportion d'ADN portant ce variant. Par exemple si la VAF est de 100%, alors toutes les cellules analysées présentent ce variant et le patient est homozygote pour ce variant. Si elle est 50%, soit toutes les cellules sont hétérozygotes pour ce variant, soit la moitié des cellules sont homozygotes pour ce variant (50). Nous considérerons les variants avec une VAF entre 40 et 60% comme potentiellement d'origine germinale, comme décrit par Drazer *et al.* (3).

IV.5. Analyses moléculaires complémentaires

La présence de duplication interne en tandem de FLT3 a été testée par PCR et analyse de fragment sur séquenceur (selon Nakao *et al.*, 1996, Leukemia). La recherche de mutations du CEBPA a été effectuée par séquençage classique de Sanger. Six régions de mutations récurrentes (ASXL1 exon 12, DNMT3A exon 23, FLT3 exon 20, IDH1 exon 4, IDH2 exon 4 et NPM1 exon 12) sont également séquencées dans un premier temps (diagnostic rapide des LAM) en utilisant le NGS et une PCR multiplex.

IV.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Excel®, STATA® version 13.1 (StataCorp, College Station, TX, USA) et GraphPad Prism® version 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Nous avons utilisé le test de Mann Whitney pour les comparaisons de variables quantitatives, et le test du Chi2 pour les comparaisons des variables qualitatives. Pour les comparaisons de survie, le test du log-rank a été utilisé et les courbes de Kaplan-Maier ont permis de les représenter graphiquement. Des valeurs de p (*p-value* pour *probability value*) inférieures au seuil usuel de 0,05 étaient considérées comme significatives.

V. Résultats

V.1. Mutations de *DDX41*

L'analyse par NGS de 976 patients atteints de LAM a permis d'identifier 34 patients porteurs de mutations de *DDX41*. 24 patients ont été analysés par méthode Haloplex, ils étaient issus du protocole multicentrique d'essais clinique LAM-SA 2007 (ID 1 à 24) et 10 patients non sélectionnés (ID 25 à 34) ont été identifiés lors de l'analyse de routine, par méthode Haloplex ou SureSelect. 67 mutations sur 26 positions distinctes du gène *DDX41* ont été détectées (Figure 19).

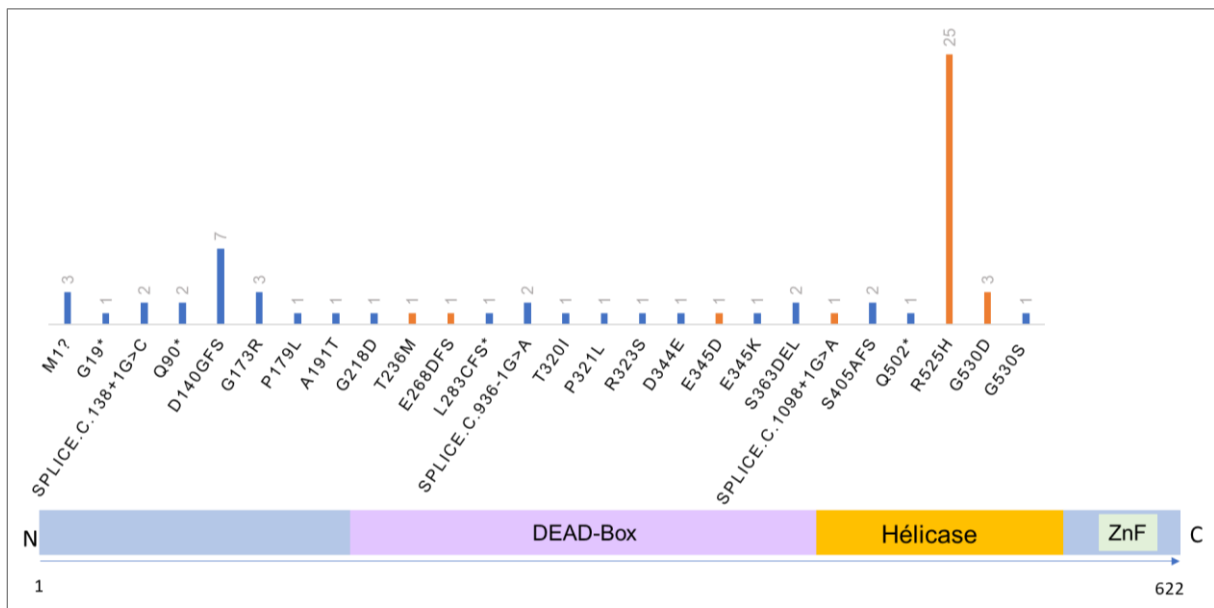


Figure 19 : Représentation graphique de la position sur le gène *DDX41* des différentes mutations retrouvées dans notre cohorte : En bleu sont représentées les mutations avec une VAF > 40% et en orange les mutations avec une VAF < 40%. Le nombre de patients présentant la mutation est indiqué au-dessus.

33/34 patients (97%) possèdent deux mutations de *DDX41* (Tableau 2). Les mutations sont réparties le long du gène *DDX41*. Cinq patients ont une mutation dans la zone d'épissage en dehors des exons. Les patients ont le plus souvent une substitution ou une mutation de type *frameshift*. La seule mutation isolée chez un patient est la mutation c.936-1G>A située dans la zone d'épissage (patient 6).

Nous pouvons supposer que 32/34 patients (94%) possèdent une mutation d'origine germinale. Ils présentent en effet au moins un variant avec une VAF > 40%. De plus, les deux patients issus de la même famille (patients 33 et 34) possèdent le même variant. La confirmation de la nature germinale n'a cependant pas été réalisée.

La majorité des mutations bialléliques ont un variant avec une VAF > 40% et un variant avec une VAF < 40%. *DDX41* semble être impliqué dans le développement des LAM presque exclusivement de façon germinale et biallélique.

Tableau 2 : Mutations de *DDX41* retrouvées par NGS pour 34 patients analysés (RefSeq NM_016222.3) : les mutations avec une VAF > 40% sont indiquées en vert

ID	Mutation DDX41 1	Nucléotide 1	Protéine 1	VAF 1	Mutation DDX41 2	Nucléotide 2	Protéine 2	VAF 2
1	M1?	c.3G>A	p.Met1?	45	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	11
2	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	50	P321L	c.962C>T	p.Pro321Leu	25
3	A191T	c.571G>A	p.Ala191Thr	54	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	15
4	G19*	c.55G>T	p.Gly19*	46	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	15
5	M1?	c.3G>A	p.Met1?	59	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	5
6	splice.c.936-1G>A	c.936-1G>A		47				
7	Q90*	c.268C>T	p.Gln90*	56	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	24
8	R323S	c.967C>A	p.Arg323Ser	49	T236M	c.707C>T	p.Thr236Met	2
9	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	50	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	14
10	E268Dfs	c.804del	p.Glu268Aspfs*36	26	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	15
11	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	52	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	13
12	S363del	c.1088_1090del	p.Ser363del	46	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	14
13	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	55	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	13
14	S363del	c.1088_1090del	p.Ser363del	49	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	10
15	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	45	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	12
16	splice.c.138+1G>C	c.138+1G>C		50	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	7
17	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	55	E345D	c.1035G>C	p.Glu345Asp	19
18	L283Cfs*20	c.847del	p.Leu283Cysfs*20	48	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	5
19	splice.c.138+1G>C	c.138+1G>C		45	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	7
20	D140Gfs	c.415_418 dup	p.Asp140Glyfs*2	43	G530D	c.1589G>A	p.Gly530Asp	10
21	splice.c.1098+1G>A	c.1098+1G>A		29	G530D	c.1589G>A	p.Gly530Asp	19
22	E345K	c.1033G>A	p.Glu345Lys	47	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	15
23	G173R	c.517G>A	p.Gly173Arg	49	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	18
24	G218D	c.653G>A	p.Gly218Asp	54	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	7
25	splice.c.936-1G>A	c.936-1G>A		49	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	24
26	Q502*	c.1504C>T	p.Gln502*	50	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	20
27	T320I	c.959C>T	p.Thr320Ile	42	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	17
28	G173R	c.517G>A	p.Gly173Arg	47	D344E	c.1032C>A	p.Asp344Glu	45
29	G530S	c.1588G>A	p.Gly530Ser	44	P179L	c.536C>T	p.Pro179Leu	42
30	M1?	c.3G>A	p.Met1?	48	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	14
31	Q90*	c.268C>T	p.Gln90*	48	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	30
32	G173R	c.517G>A	p.Gly173Arg	50	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	16
33	S405Afs	c.1212_1226delinsAG	p.Ser405Alafs*4	42	R525H	c.1574G>A	p.Arg525His	11
34	S405Afs	c.1212_1226delinsAG	p.Ser405Alafs*4	50	G530D	c.1589G>A	p.Gly530Asp	21

Parmi les variants avec une VAF > 40%, les mutations les plus fréquentes sont p.Asp140fs* (n=7 soit 21%) et p.Met1? (n=3 soit 9%, ? car le début de cette phase codante débute plus loin) déjà rapportées dans les précédentes études. Les autres mutations les plus fréquentes dans notre cohorte sont p.Gly173Arg (n=3), p.Gln90* (n=2), p.Ser363del (n=2) et p.Ser405Alafs (n=2) retrouvée dans les deux membres de la même fratrie.

La mutation somatique acquise (VAF<40%) la plus fréquente est p.Arg525His, retrouvée dans 73% des cas (n=25), suivie de p.Gly530Asp (n=3, 9%) (Figure 20).

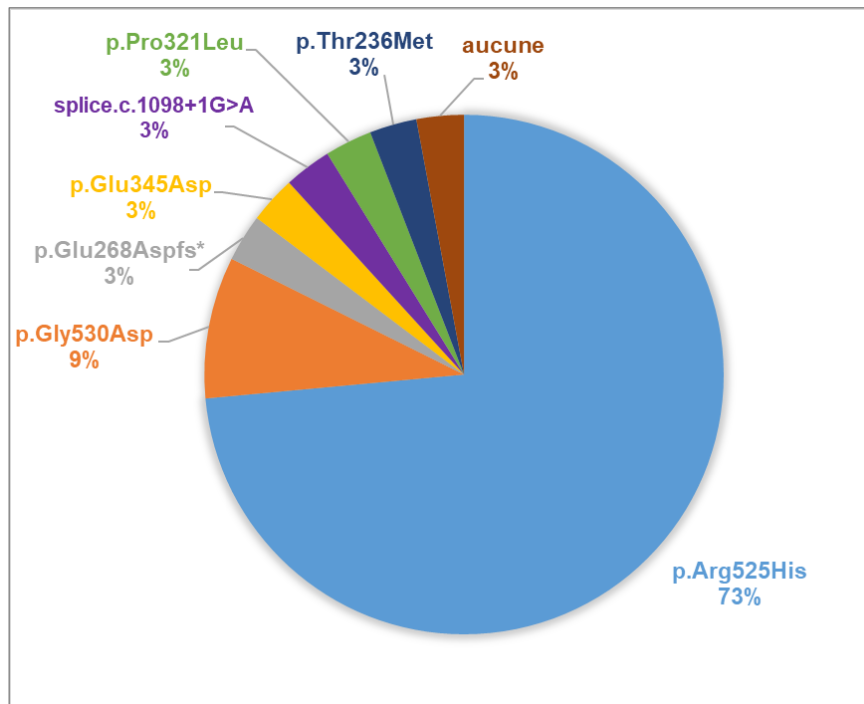


Figure 20 : Répartition des mutations somatiques de *DDX41*

V.2. Caractéristiques des patients au diagnostic

Tableau 3 : Caractéristiques clinico-biologiques moyennes des 34 patients au diagnostic de LAM

Paramètres	Valeur
Age médian au diagnostic (ans) [min-max]	64 [39-81]
Sexe (nombre de patients)	
Homme	26 (76%)
Femme	8 (24%)
Mutations de DDX41 avec VAF>40%	32 (94%)
Mutation bi-allélique de DDX41	33 (97%)
Patients avec mutations concomitantes	23 (68%)
Cytogénétique	
normale	28 (82%)
del5q	1 (3%)
Tri8	1 (3%)
del20q	1 (3%)
Hémogramme au diagnostic (moyenne)	
hémoglobine (g/dL)	10,4
VGM (fL)	103
plaquettes (G/L)	71
GB (G/L)	2,2
PNN (G/L)	0,70
Monocytes (G/L)	0,08
Blastes (%) (médiane parmi 14 patients avec des blastes circulants) [min-max]	2,5% [1-87%]
Myélogramme	
Classification FAB (nombre de patients)	
LAM2	28 (82%)
LAM1	4 (12%)
LAM0	2 (6%)
Densité (nombre de patients)	
diminuée	16 (47%)
normale	15 (44%)
augmentée	3 (1%)
Lignées médullaires (% moyen)	
Lignée granuleuse	18
Lignée érythroblastique	22
Blastes (% moyen)	37%
Dysplasie (nombre de patients)	11 (32%)
Lignée mégacaryocytaire	7
Lignée granuleuse	6
Lignée érythroblastique	6
Survie	
Patients décédés (nombre de patients)	20 (59%)
Médiane OS (mois) [min-max]	31 [3-60]
EFS à 2 ans (nombre de patients)	16 (47%)
OS à 2 ans (nombre de patients)	20 (59%)

V.2.1. Présentation clinique

76% des patients étaient des hommes (n=26/34). Parmi les 24 patients du protocole LAM-SA 2007, la répartition était significativement différente par rapport au reste des patients du protocole ($\text{Chi}^2 = 4,671$, $p\text{-value} = 0,03$) démontrant un biais masculin (Tableau 4).

Tableau 4 : Distribution des 424 patients atteints de LAM dans le protocole LAM-SA 2007 selon leur sexe et le statut mutationnel de *DDX41*

Protocole LAM-SA 2007	Hommes	Femmes
Patients <i>DDX41</i> muté	19	5
Patients <i>DDX41</i> non muté	227	173

La majorité des patients était âgée entre 60 et 70 ans au diagnostic, avec un âge médian de 64 ans (39-81 ans) sur la totalité des 34 patients. En excluant les 24 patients du protocole LAM-SA 2007, l'âge médian des 10 patients restant est de 62 ans. Trois patients ont été diagnostiqués avant 60 ans dont un à 39 ans (Figure 21).

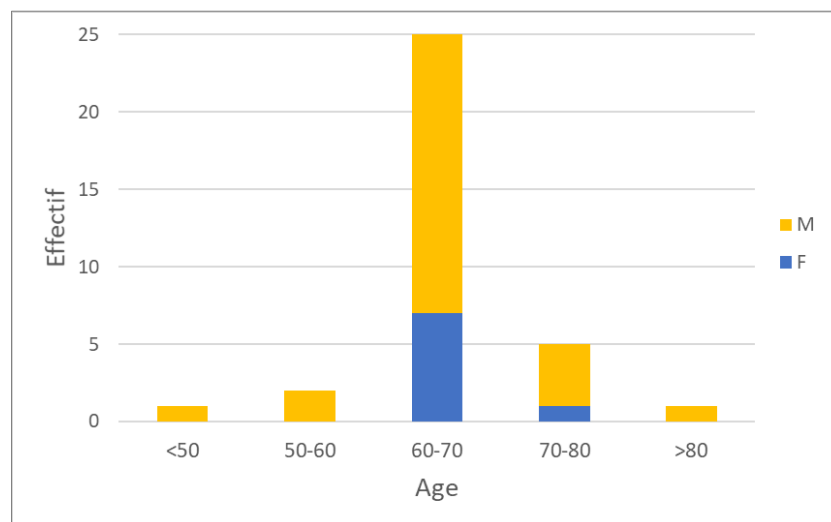


Figure 21 : Nombre de patients atteints de LAM dans chaque groupe d'âge présentant une mutation de *DDX41* (M = homme, F = femme)

Parmi 16 patients identifiés à Toulouse pour lesquels nous avons les renseignements cliniques (Tableau 5), 11 étaient asymptomatiques au diagnostic. La LAM a été découverte de façon fortuite sur le bilan biologique ou lors du suivi de cytopénies préexistantes. Une histoire personnelle de cytopénies a été documentée pour 11 patients mais celle-ci était le plus souvent récente (quelques mois). Quatre patients avaient déjà reçu un diagnostic de SMD.

Les patients présentaient rarement des antécédents familiaux. Cette observation est probablement sous-estimée car la recherche d'antécédents familiaux est généralement absente du questionnaire médical en raison de l'âge des patients au diagnostic. On retrouve

une histoire familiale d'hémopathie maligne chez quatre patients (LA). Deux patients sont issus de la même famille et leur mère est décédée d'une LA. Cinq patients avaient une histoire familiale de cancer solide. Trois patients avaient des antécédents immuns personnels ou familiaux, à type d'infections à répétition ou de maladies auto-immune (diabète de type 1, maladie de Basedow).

Tableau 5 : Présentation clinique et antécédents au diagnostic des 16 patients suivis au CHU de Toulouse

ID	Mutation de DDX41 supposée germinale	Mutation somatique de DDX41	Age	Circonstances découverte	Histoire familiale	Histoire personnelle hématologique	Autre histoire personnelle
5	p.Met1?	p.Arg525His	73	Aggravation des cytopénies	NC	Anémie macrocytaire depuis 1 an (probable carence en B12)	
8	p.Arg323Ser	p.Thr236Met	68	Aggravation des cytopénies	NC	Bicytopénie depuis 6 mois	
11	p.Asp140 Glyfs*2	p.Arg525His	60	Découverte d'une pancytopenie	Cancer métastatique père, 3 sœurs bonne santé		
20	p.Asp140 Glyfs*2	p.Gly530 Asp	70	Biologique	NC	Neutropénie depuis 3 mois	Cancer épidermoïde de la glotte
23	p.Gly173 Arg	p.Arg525His	61	Biologique	NC		
24	p.Gly218 Asp	p.Arg525His	62	Ecchymoses et thrombopénie	non	Thrombopénie depuis 2 mois	
25	splice.c.93 6-1G>A	p.Arg525His	70	Aggravation des cytopénies	Cancer du colon père	Leucopénie depuis plusieurs années	Prostatites à répétition, rhinite allergique
26	p.Gln502*	p.Arg525His	71	Suivi de SMD	LAM frère de 52 ans	SMD-EB1 en 2016	
27	p.Thr320 Ile	p.Arg525His	63	Asthénie	non		Cancer du sein
28	p.Gly173A Arg	p.Asp344 Glu	58	Douleurs angineuses	père cancer des poumons sur silicose, diabète de type 1 frère jumeau et grand-mère		
29	p.Gly530Ser	p.Pro179 Leu	72	Suivi de SMD	NC	SMD-MLD 2016 transformé en SMD-EB2 2018 sous Vidaza	
30	p.Met1 ?	p.Arg525His	61	Suivi de SMD	LA père, maladies auto-immunes	SMD-EB2 2016	
31	p.Gln90*	p.Arg525His	61	Aggravation des cytopénies	non	Neutropénie depuis mars 2018	
32	p.Gly173 Arg	p.Arg525His	39	Pancytopenie	non	non	
33	p.Ser405 Alafs*4	p.Arg525His	67	Aggravation des cytopénies	Fratrie, leucémie chez la mère, cancer de la prostate chez un frère	SMD depuis 2016	
34	p.Ser405 Alafs*4	p.Gly530 Asp	54	Aggravation des cytopénies		Bicytopénies depuis 2008 (PNN, plaquettes)	

ID = identifiant du patient, NC = Non communiqué

V.2.2. Anomalies cytologiques

Les principales anomalies biologiques sur la NFS (Numération Formule Sanguine) des 34 patients sont répertoriées dans le Tableau 3.

En général, l'hémogramme montre une anémie macrocytaire plus discrète que pour les patients sans mutation de *DDX41*, suggérant, même sans diagnostic préalable, un contexte de myélodysplasie préexistant. On retrouve également une thrombopénie et une leucopénie associant une neutropénie et une monocytopenie.

Nous avons comparé les données des patients mutés à ceux non mutés du même protocole LAM-SA 2007, la différence était significative pour l'hémoglobine ($p=0,005$), le volume globulaire moyen (VGM) ($p=0,0001$), le nombre de leucocytes ($p<0,0001$) et de monocytes ($p=0,0004$) (Figure 22 A-D). Les patients avec des mutations de *DDX41* sont aussi caractérisés par une plus faible blastose périphérique ($p<0,0001$) (Figure 22E). L'hémogramme de 14/34 patients (41%) présentait des blastes circulants mais avec une médiane de 2.5% de blastes (1-87%). Seul un patient présentait 87% de blastes circulants au diagnostic (patient 28).

V.2.3. Myélogramme

L'examen cytologique du myélogramme conclut dans 82% des cas à un diagnostic de LAM2 dans la classification FAB (28/34 patients). Un diagnostic de LAM1 (4/34) ou LAM0 (2/34) est aussi retrouvé moins fréquemment (Tableau 3).

La présence de mutations de *DDX41* est fortement associée à un myélogramme plus hypocellulaire ($\text{Chi}^2=11.9613$, $p=0,003$) par rapport aux patients non mutés. Elle est également associée à une faible blastose médullaire (37% de blastes en moyenne), significativement inférieure à celle des patients non mutés ($p=0,0008$) (Figure 22F). Le maintien d'une hématopoïèse résiduelle est notable. Des dysplasies ont été décrites chez 11 patients, sur une ou plusieurs lignées de façon non spécifique. Les blastes ne présentent pas de caractéristiques morphologiques spécifiques communes.

L'analyse par cytométrie en flux était disponible pour 16 patients. Les blastes exprimaient majoritairement les marqueurs CD34 (88%), CD13 (83%), CD33 (80%), CD117 (84%) et HLADR (92%).

L'association du caryotype avec les mutations de *DDX41* n'est pas évaluable car les patients issus du protocole LAM-SA 2007 étaient sélectionnés selon leur caryotype de pronostic non péjoratif. 21 patients avaient un caryotype normal au diagnostic et un patient présentait une trisomie 8. Parmi les 10 patients de plus non sélectionnés, 7 patients présentaient également un caryotype normal. Un patient avait une délétion du bras long du chromosome 20 (del20q) et un seul patient avait une délétion de pronostic péjoratif (del5q). A la rechute deux patients ont acquis une anomalie cytogénétique supplémentaire (t(7,14) et monosomie 7).

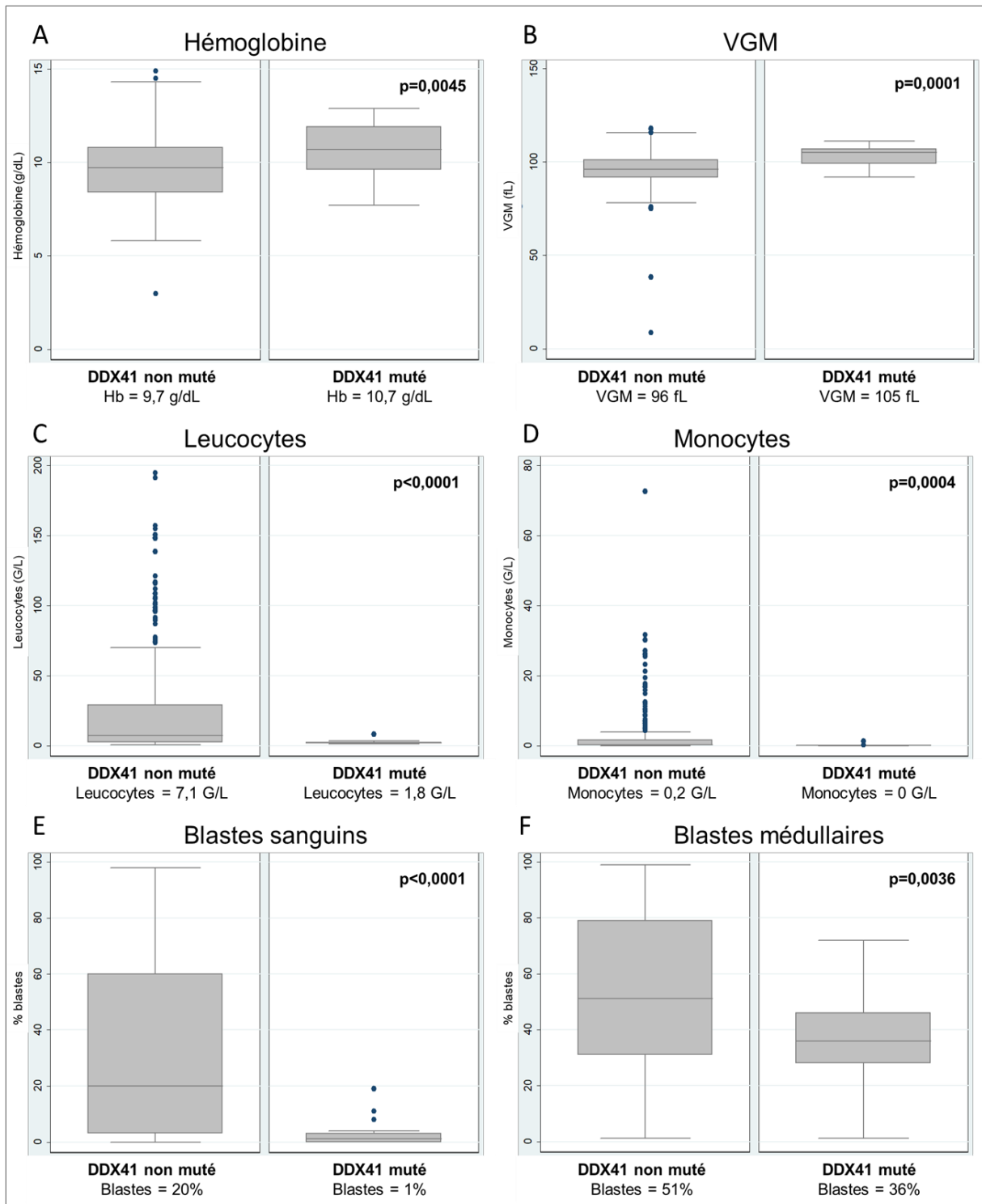


Figure 22 : Comparaison par représentation en box plot des résultats de la NFS et du pourcentage de blastés avec ou sans mutations de *DDX41* parmi les patients du protocole LAM-SA 2007. (A : Hémoglobine en g/dL, B : VGM en fL, C : Leucocytes en G/L, D : Monocytes en G/L, E : % de blastés sanguins, F : % de blastés médullaires).

La distribution des résultats est représentée sous forme de boîte à moustache. La boîte délimite les 25e et 75e percentiles, avec la médiane à l'intérieur de la boîte et les moustaches délimitent les 5e et 95e percentiles. Les points individuels sont situés en dehors des 5e et 95e percentiles. Les valeurs de la médiane et de la *p-value* sont également indiquées.

V.3. Mutations somatiques associées

Nous avons détecté 52 mutations associées sur d'autres gènes, dès le diagnostic ou à la rechute. 23 patients (68%) ont au moins une de ces mutations oncogéniques (Tableau 6).

Tableau 6 : Association entre les mutations de *DDX41* et des mutations concomitantes sur d'autres gènes pour chaque patient

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	Total		
DDX41 supposé germlinal	[Blue bar]																																		34		
DDX41 somatique	[Blue bar]																																		33		
Signalisation intracellulaire	[Grid]																																				
CBL																																					
CSF3R																																					
FLT3																																					
JAK2																																					
KIT																																					
KRAS																																					
NRAS																																					
NF1																																					
PTPN11																																					
Modification de la chromatine	[Grid]																																				
ASXL1																																					
ASXL2																																					
EZH2																																					
KDM5A																																					
KDM6A																																					
KMT2D																																					
Complexe de la cohésine	[Grid]																																				
RAD21																																					
SMC1A																																					
SMC3																																					
STAG2																																					
Méthylation de l'ADN	[Grid]																																				
DNMT3A																																					
IDH1																																					
IDH2																																					
TET2																																					
NPM1	[Grid]																																				
NPM1																																					
Facteurs de transcription myéloïde	[Grid]																																				
CEBPA																																					
EP300																																					
ETV6																																					
GATA1																																					
GATA2																																					
MYC																																					
RUNX1																																					
SETBP1																																					
SF3B1																																					
Splicéosome	[Grid]																																				
SRSF2																																					
U2AF1																																					
ZRSR2																																					
Gènes suppresseurs de tumeur	[Grid]																																				
TP53																																					
PHF6																																					
WT1																																					
Autres	[Grid]																																				
ATM																																					
BCOR																																					
BCORL1																																					
CCND2																																					
CUX1																																					
DHX15																																					
MGA																																					
PPM1D																																					
PRPF8																																					
ZBTB7A																																					
ETNK1																																					
Total mutations associées par patients	2	1	1	6	1	1	3		1	3			1	3		1	3		1	3			1	1	2	2	1	2	4	3	3	3	5	2			

La fréquence des mutations concomitantes retrouvées est représentée dans la Figure 23. *ASXL1* est le gène le plus fréquemment muté (n=9/34 soit 26% des patients), suivi de *STAG2* (n=4, 12%), *SRSF2* (n=4) et *DNMT3A* (n=4). La fréquence de certaines mutations a pu cependant être sous-estimée car les panels de gènes sont en perpétuelle évolution.

Notamment le panel Haloplex utilisé pour l'analyse des patients du protocole LAM-SA 2007 comprenait moins de gènes associés aux LAM, que le panel SureSelect.

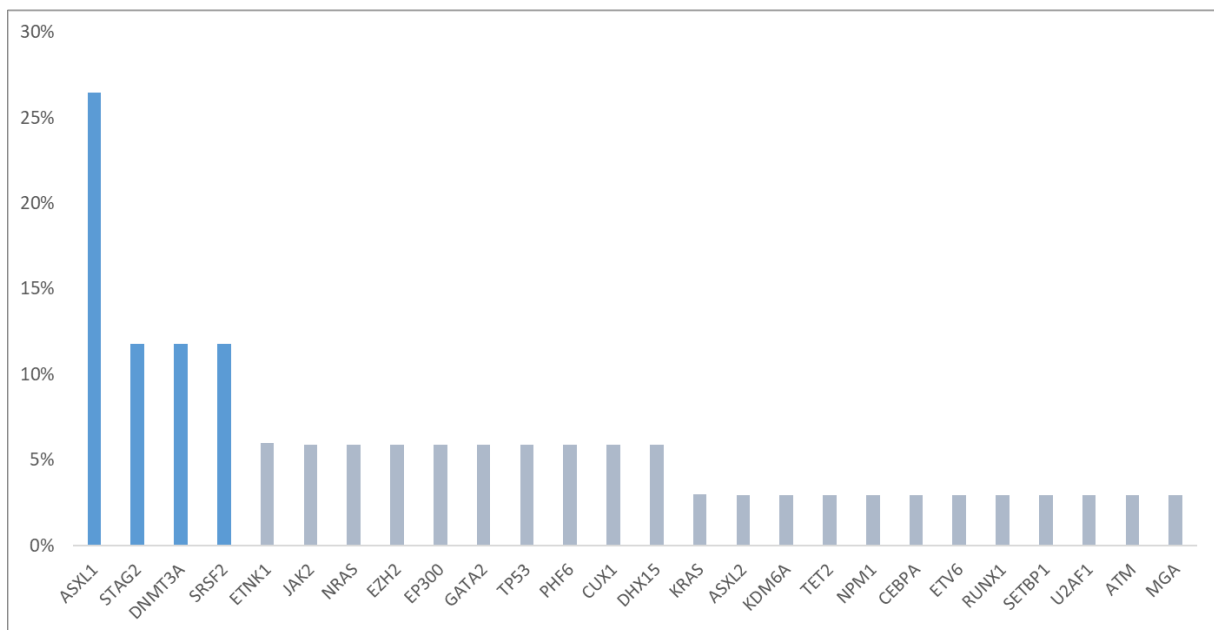


Figure 23: Fréquence des mutations sur d'autres gènes associées aux mutations de *DDX41*

L'association des mutations somatiques à une première mutation de *DDX41* supposée germinale est modélisée dans la Figure 24. Comme nous l'avons vu, la majorité des mutations supposées germinales est associée à une seconde mutation somatique dans *DDX41* et des gènes impliqués dans la modification de la chromatine (*ASXL1*). Les mutations de *DDX41* sont rarement associées aux mutations du spliceosome, à l'exception de *SRSF2*. De même, elles sont moins fréquemment associées aux mutations de *NPM1* et de gènes impliqués dans la signalisation intra-cellulaire et dans la suppression de tumeur. Cette dernière observation comporte cependant des limites car les mutations de *TP53* ont probablement été sous-estimées, car elles sont fréquemment associées aux LAM avec caryotype complexe exclues du protocole LAM-SA 2007 (51).

NPM1, *FLT3*, *DNMT3A* et *IDH1* et 2 sont les gènes les plus souvent mutés dans la cohorte de patients du protocole LAM-SA 2007 (41). Parmi les patients mutés sur *DDX41*, on ne retrouve jamais de mutations dans *FLT3*, *IDH1* et *IDH2*. Nous avons cependant retrouvé de façon isolée, un patient ayant des mutations de *NPM1* et *CEBPA* monoallélique associées. Ce patient, à la différence des autres, est le seul de la cohorte qui présentait 87% de blastes circulants au diagnostic (patient 28). Celui-ci est porteur de deux mutations de *DDX41* avec des VAF>40% supposées germinales, pouvant correspondre à des polymorphismes sans implication fonctionnelle, ce qui pourrait expliquer les différences par rapport aux autres patients.

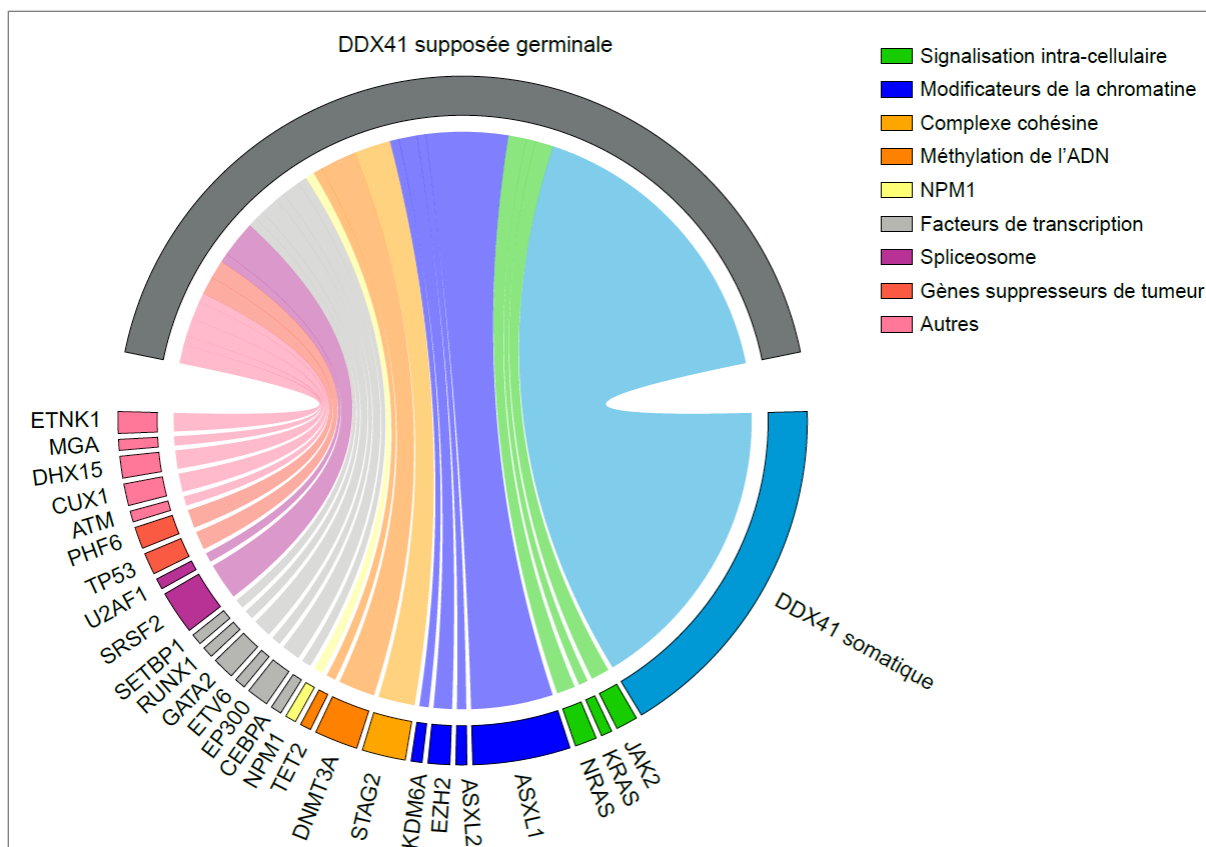


Figure 24 : Représentation en circos plot des principales co-mutations avec la première mutation supposée germinale de *DDX41*

V.4. Corrélation génotype-phénotype

Certaines études ont émis l'hypothèse d'une corrélation génotype-phénotype en fonction de la position de la mutation de *DDX41*. Nous avons donc comparé différents paramètres biologiques entre les différentes mutations. Nous avons comparé les patients atteints de mutations les plus fréquentes dans notre cohorte, p.Asp140fs (n=7) et p.Arg525His (n=25) par rapport aux autres patients malgré le faible effectif de patients.

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative en comparant le pourcentage de blastes médullaires, le taux d'hémoglobine et de plaquettes entre les patients avec une mutation p.Asp140fs et les patients avec d'autres mutations supposées germinales dans *DDX41* (Figure 25). Le taux de leucocytes était par contre significativement inférieur (p=0,04) pour les patients porteur de la mutation p.Asp140fs (leucocytes médian = 1 G/L) par rapport aux autres patients (médiane = 2 G/L).

Nous ne retrouvons cependant aucune différence significative pour ces mêmes paramètres entre les patients porteurs d'une mutation p.Arg525His et les patients avec d'autres mutations somatiques de *DDX41* (Figure 26).

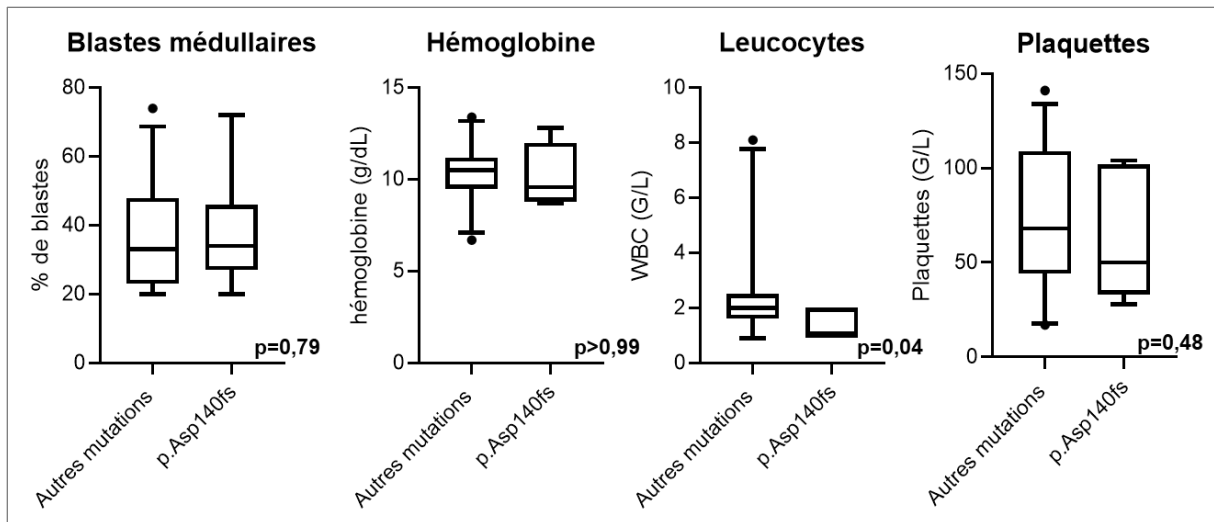


Figure 25 : Comparaison du pourcentage de blastes médullaires, de l'hémoglobine, des leucocytes et des plaquettes entre les patients porteurs d'une mutation p.Asp140fs* (n=7) et les patients avec une autre mutation de *DDX41* (n=27)

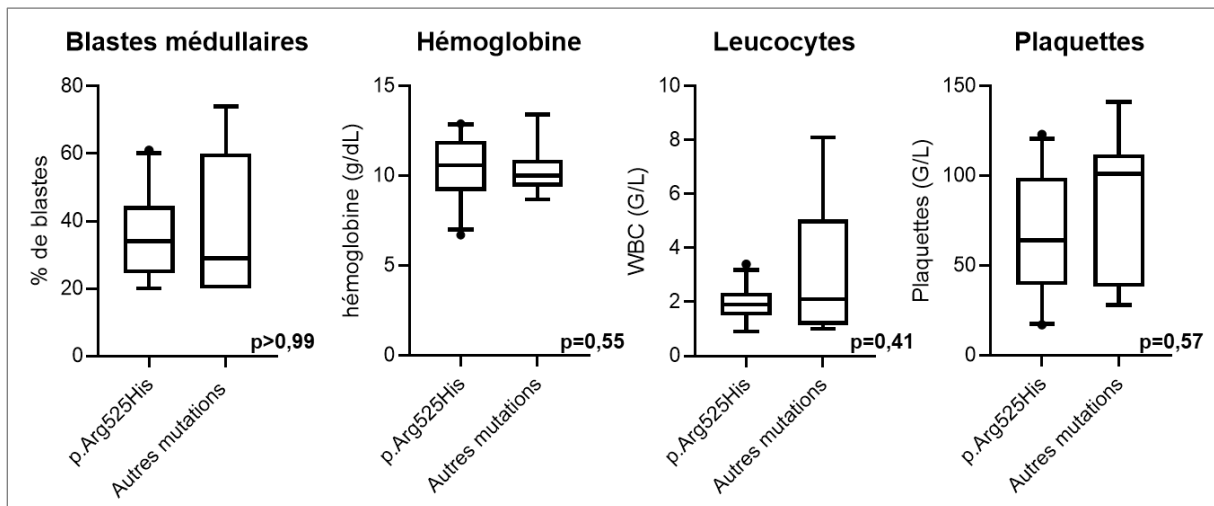


Figure 26 : Comparaison du pourcentage de blastes médullaires, de l'hémoglobine, des leucocytes et des plaquettes entre les patients porteurs d'une mutation p.Arg525His (n=25) et les patients avec une autre mutation de *DDX41* (n=9)

V.5. Survie et traitement

Dans notre cohorte, le suivi des patients a été limité à 5 ans, 59% des patients sont décédés (n=20), principalement à la suite de complications hématologiques ou infectieuses, avec une médiane de survie globale (OS) à 31 mois (3-60 mois).

10 patients ont reçu une chimiothérapie standard par idarubicine et cytarabine dans le cadre de différents protocoles (BIG1, LAM-SA 2007), 20 patients ont reçu cette chimiothérapie standard associée à la lomustine selon le protocole LAM-SA 2007. Les autres patients ont reçu d'autres types de chimiothérapie (daunorubicine, venetoclax, protocole DEXAML associant la chimiothérapie standard avec lomustine et dexaméthasone). A 2 ans, l'OS était de 59% (n=20) et la survie sans évènement (EFS) de 47% (n=16).

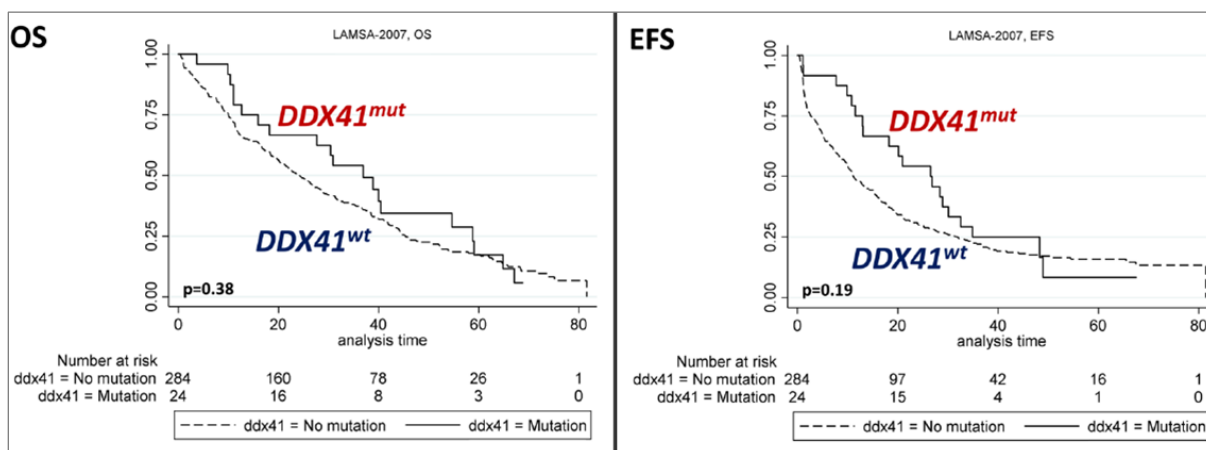


Figure 27 : OS et EFS des 24 patients mutés sur *DDX41* comparé à celles des patients non mutés du protocole LAM-SA 2007.

La comparaison de l'OS et de l'EFS entre les patients atteints de mutations de *DDX41* et les patients non mutés a pu être effectuée grâce au protocole LAM-SA 2007 dans lequel les patients sont répartis dans les différents bras de traitement de façon randomisée. Nous ne retrouvons pas de différence significative entre les 24 patients mutés sur *DDX41* et le reste de la cohorte (Figure 27).

6 patients ont reçu une greffe de MO, dont 4 patients une greffe d'un donneur extra-familial et 2 patients une greffe intra-familial. Trois patients n'ont pas eu de toxicité et sont en rémission. Une GVH (réaction du greffon contre l'hôte) est survenue chez deux patients, dont un est décédé. Parmi les patients qui ont reçu une greffe de MO intra-familiale, un patient a rechuté 10 mois après la greffe (patient 32). Nous ne savons pas s'il a acquis de nouvelles mutations car l'analyse moléculaire au diagnostic n'avait pas pu être réalisée. L'autre patient (patient 33) est toujours en rémission 33 mois après la greffe.

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative de l'OS et de l'EFS entre les patients porteurs d'une mutation p.Asp140fs* comparé aux patients avec d'autres mutations de *DDX41* ($p=0,36$ pour l'OS ; $p=0,55$ pour l'EFS) et ceux avec une mutation p.Arg525His ($p=0,36$; $p=0,70$ respectivement) (Figure 28).

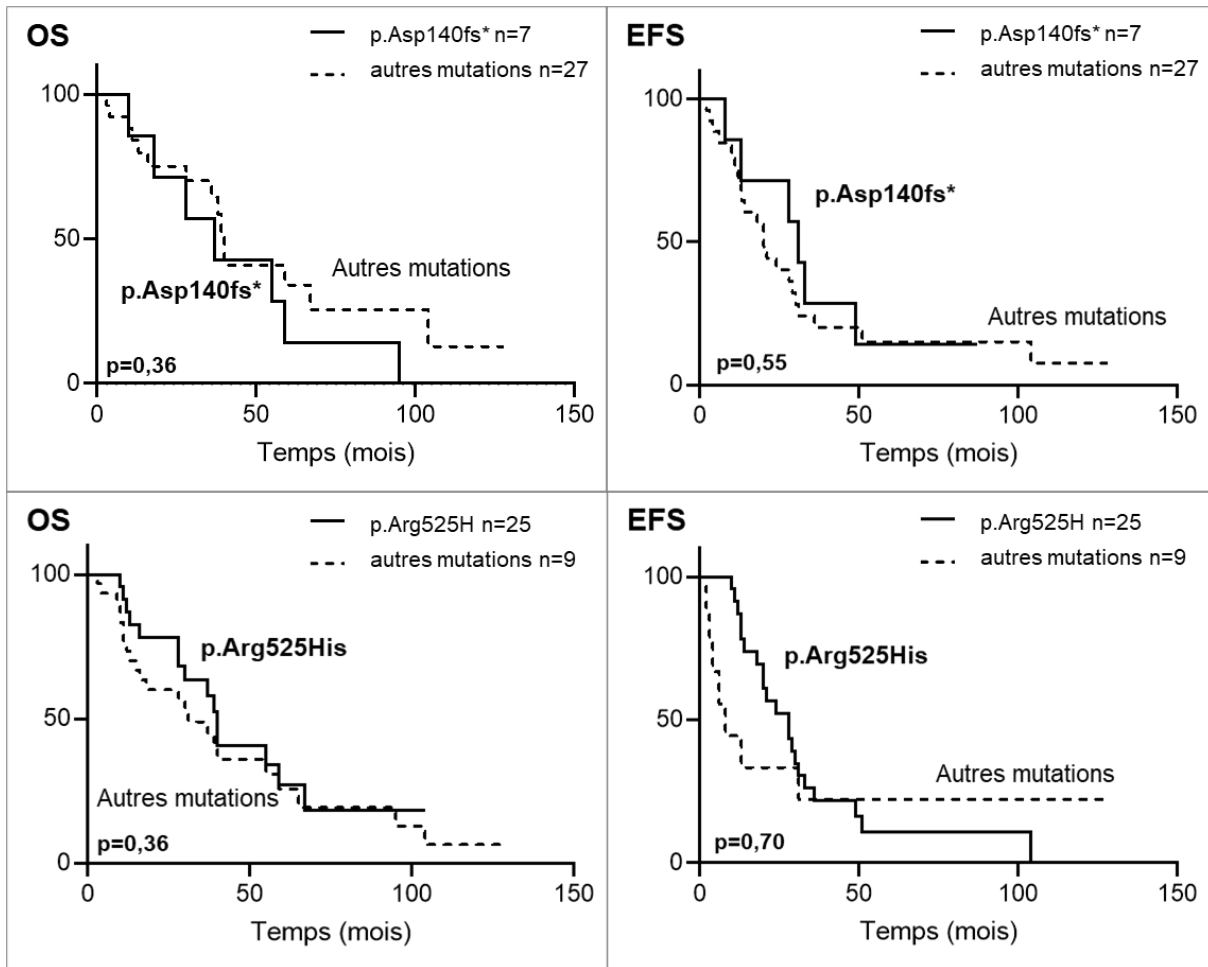


Figure 28 : OS et EFS des patients porteurs d'une mutation de *DDX41* sur p.Asp140fs* ou p.Arg525His comparé à celles des patients porteurs d'autres mutations de *DDX41*

VI. Discussion

VI.1. Epidémiologie des pathologies avec mutations de *DDX41*

Les patients porteurs de mutations germinales de *DDX41* sont souvent asymptomatiques jusqu'à l'âge de 60 ans. Comme évoqué précédemment, les cas de LAM et de SMD familiaux sortent de la norme des HMH en raison de l'âge d'apparition semblable à l'âge diagnostique des cas sporadiques. Dans les cohortes des différentes études, les cas d'HM avec mutations de *DDX41* représentent 1 à 5% du total des cohortes de LAM/SMD (13). Il en est de même pour notre étude dans laquelle les LAM avec mutations de *DDX41* représentent 4% des LAM analysées par NGS à Toulouse.

Les différentes études constatent que les mutations de *DDX41* semblent prédisposer au développement de SMD de plus haut grade et de LAM. Les larges cohortes de patients porteurs de mutations de *DDX41* comportent plus de cas de SMD-EB et de LAM que de SMD de bas grade (4,13,52).

Plus rarement, d'autres HMH notamment des syndromes myéloprolifératifs, des LMMC (4,12) ou des anémies aplasiques (52) ont également été décrites.

L'équipe de Diness *et al.* a été la seule à décrire une forme pédiatrique de leucémie possiblement en lien avec une mutation germinale dans *DDX41*. Elle a identifié le cas de deux sœurs, sans antécédents familiaux tumoraux, porteuses de deux mutations hétérozygotes faux-sens p.Pro321Leu (mère) et p.Gly313Arg (père). L'une des deux sœurs avait un retard intellectuel et psychomoteur et l'autre sœur a développé une leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques (BPDCN) sans autres mutations oncogènes (53).

Il semblerait que *DDX41* pourrait prédisposer à d'autres pathologies non myéloïdes. Des mutations de *DDX41* ont été décrites dans une famille de patients atteints de pathologies lymphoïdes portant la mutation p.Arg164Trp (lymphomes non-hodgkinien, maladie de Hodgkin, myélome multiple) (39). Des pathologies lymphoïdes ont également été retrouvées dans d'autres cohortes (52). De plus des histoires familiales de tumeurs solides non-hématopoïétiques sont aussi décrites (digestif, pulmonaire, prostate) (14,39,52,54). Dans notre cohorte, 5 patients ont une histoire personnelle ou familiale de tumeur solide. Le lien entre *DDX41* et le risque de développer ces pathologies reste tout de même inconnu en raison de l'absence d'études cliniques et de séquençage systématique de ce gène au diagnostic de ces maladies.

Des atteintes non-tumorales ont rarement été répertoriées dans la littérature malgré le rôle physiologique de *DDX41* dans le système immunitaire. Nous avons tout de même retrouvé un patient avec une histoire personnelle d'infections à répétition et deux autres patients avec des histoires familiales de maladies auto-immune sans connaître le lien réel avec cette mutation. Lewinsohn *et al.* ont retrouvé une famille avec une mutation p.Met1? germinale dont le père est atteint d'une LAM avec une histoire familiale dysimmunitaire (sarcoïdose, eczéma, asthme) (39). Il est difficile de savoir si plus de patients peuvent avoir des atteintes immunitaires car cela ne fait pas partie du questionnaire habituel au diagnostic de l'hémopathie.

La pénétrance est difficile à évaluer en raison de la longue période de latence associée à cette maladie et de son apparition insidieuse (certains diagnostics sont réalisés sur des numérations systématiques). L'identification de ces syndromes héréditaires chez les personnes âgées est d'autant plus difficile sans signes annonciateurs préexistants. Nous ne

savons pas dans quelle mesure les mutations germinales sur un des deux allèles influencent l'apparition d'une mutation secondaire sur l'autre allèle, et si les porteurs développeront systématiquement une hémopathie maligne. Une étude comparant la fréquence des mutations avec perte de fonction de *DDX41* observée dans les SMD/LAM, à la fréquence observée dans la base de données de sujet sains ExAC, a obtenu un Odd ratio de 8,05. En prenant en compte une probabilité de 1/100 de contracter la maladie, cela se traduirait par un risque relatif de 7,51 (54).

VI.2. Mutations de *DDX41*

Ce travail a mis en évidence le profil mutationnel d'une cohorte de 34 patients atteints d'une LAM avec mutations de *DDX41*. Les mutations bialléliques de *DDX41* représentent 97% des patients de notre cohorte. Nous pouvons supposer que dans la quasi-totalité des cas, *DDX41* a besoin d'être muté de façon biallélique pour exercer son rôle oncogène. Or, les études publiées au sujet des HMH avec mutations germinales de *DDX41* montrent que 50% des porteurs de mutations germinales qui ont développé une LAM ou un SMD, ont également acquis une mutation somatique *DDX41* (4,12,52). Cette fréquence est plus faible que ce que notre cohorte laisse supposer.

Face à cette différence dans la fréquence des mutations bialléliques, nous pouvons nous demander si parmi les sujets portant apparemment une seule mutation, ces études n'ont pas exclu les mutations dans une région intronique, ou l'insertion ou la délétion d'un plus grand fragment. De même, nous aurions pu exclure des mutations qui étaient considérées comme une erreur de séquençage lors du pré-traitement, ou comme un polymorphisme. Certaines mutations germinales de *DDX41* sont en effet considérées comme des polymorphismes dans les bases de données de sujets sains (gnomAD), et ne sont pas considérées comme des mutations pathogènes dans la base de données COSMIC.

L'étude des VAF des mutations de *DDX41* retrouvées sur notre cohorte laisse penser que, pour 94% des patients, une des deux mutations semble d'origine germinale (VAF > 40%). Contrairement aux autres gènes impliqués dans les HMH, pouvant souvent être mutés de façon somatique dans les LAM sporadiques (*GATA2*, *CEBPA*, *RUNX1*), l'implication de *DDX41* dans l'oncogenèse semble presque exclusivement familiale. De la même façon, l'étude de Sébert *et al.* a montré, sur 1385 patients atteints de SMD ou de LAM, que les mutations de *DDX41* semblaient d'origine germinale chez 3,1% des patients (VAF>40%) mais seulement 0,4% des patients avaient une mutation somatique de *DDX41* (52).

Lors de l'analyse des données du séquençage ciblé par NGS, il est donc important, lorsqu'une première mutation de *DDX41* est retrouvée, de rechercher une seconde mutation et de vérifier les VAF de celles-ci. Ainsi, si la VAF se situe autour de 50%, la nature germinale de ces mutations devrait être recherchée au cours d'une consultation génétique du patient et des membres de sa famille.

La littérature rapporte quelques cas non familiaux en supposant que d'autres événements somatiques peuvent remplacer le besoin de la deuxième atteinte biallélique (14). Cependant l'étude de Qu *et al.* a constaté que des patients ayant développé des HM avec des mutations somatiques simples acquièrent autant de mutations concomitantes sur d'autres gènes que ceux avec des mutations bialléliques de *DDX41* (13).

La majorité des mutations présumées de la lignée germinale se situent plutôt en amont du domaine hélicase, alors que les mutations somatiques se situent dans le domaine hélicase, suggérant que le type et la localisation de la mutation *DDX41* pourraient prédire l'origine de la mutation. Dans notre cohorte, nous retrouvons des mutations déjà décrites ainsi que de nouvelles mutations se situant dans l'ensemble du gène et au niveau des sites d'épissage. La majorité des mutations germinales de *DDX41* entraînent l'apparition d'une protéine tronquée par des mutation non-sens ou décalant le cadre de lecture. Nous retrouvons par ailleurs dans notre cohorte, la même fréquence de mutations que dans les précédentes études (4,12,52) :

- p.Asp140fs* et p.Met1? sont les mutations supposées germinales les plus fréquentes ;
- p.Arg525His est la mutation somatique majoritairement retrouvée.

VI.3. Incidence des mutations associées

Peu de mutations concomitantes récurrentes dans d'autres gènes ont été identifiées chez les patients avec des mutations de *DDX41*. Les différentes études sur les patients atteints de SMD ou de LAM retrouvent surtout *TP53*, *ASXL1* (12), *RUNX1* (4), *SRSF2* (52), *PHF6* et *EZH2* (13). Polprasert *et al* ont aussi identifié des mutations récurrentes dans *LUC7L2* (4) mais celles-ci ne sont jamais retrouvées dans les autres études, ni dans la nôtre car les panels en NGS ne contiennent pas ce gène.

Habituellement, les mutations dans *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3-ITD*, *IDH1*, *IDH2* et *CEBPA* sont identifiées chez les patients atteints de LAM avec caryotype normal (55). Un sous-ensemble de mutations est cependant plus spécifique de la LAM *de novo*, alors qu'un autre ensemble de mutations est spécifique de la LAM secondaire et est retrouvé couramment dans les SMD. La présence d'une mutation de *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* ou *STAG2* est ainsi très spécifique du diagnostic de LAM secondaire (56).

Dans notre cohorte, et dans les différentes études, *DDX41* semble être exclusif des mutations habituellement retrouvées dans les LAM à caryotype normal (*NPM1*, *IDH*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*), excepté *DNMT3A*. 64% de nos patients avaient tout de même au moins une mutation oncogénique associée. *ASXL1*, *STAG2*, *SRSF2* et *DNMT3A* étaient les plus fréquemment associés, la plupart étant décrites comme spécifiques des LAM secondaires, argument supplémentaire en faveur d'une probable phase préexistante de SMD pour ces patients.

. Nous n'avons identifié que trois patients mutés sur *TP53*, probablement sous-estimés en raison de l'exclusion des LAM à caryotype complexe dans le protocole LAM-SA 2007. Au contraire, Quesada *et al* estiment avoir surestimé la proportion de *TP53* car la plupart des patients de leur cohorte étaient atteints d'HM de mauvais pronostic (12). Une étude avec une plus grande de cohorte de patients non sélectionnés serait utile pour mieux définir le degré d'association entre *TP53* et *DDX41*.

Les gènes du spliceosome *LUC7L2*, *PRPF8*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2* sont fréquemment mutés dans les HM. Ces mutations émergent à des fréquences variées allant de 40 à 85% des SMD et de 5 à 10% des LAM. Elles sont mutuellement exclusives car elles ont probablement le même impact dans l'oncogenèse (57). Les mutations de *DDX41*, interagissant physiologiquement avec le spliceosome, semblent, elles aussi, mutuellement exclusives des gènes du spliceosome, excepté *SRSF2*, muté de façon concomitante dans

plusieurs études. Le lien entre *DDX41* et *SRSF2* n'est pour l'instant pas connu dans la littérature.

VI.4. Spectre clinico-biologique des LAM avec mutations *DDX41*

Peu d'études décrivent spécifiquement et précisément le spectre clinico-biologique des patients atteints de LAM.

Comme les différentes études le confirment, les patients peuvent développer une LAM *de novo* ou une LAM secondaire à un SMD connu (4,12,13,52). Notre cohorte ne comprend que des patients atteints de LAM, mais un antécédent de SMD ou une dysplasie au diagnostic ont pu être retrouvés (12/34 patients). De plus, l'existence d'une anémie macrocytaire au diagnostic et un antécédent personnel de cytopénies plusieurs mois ou années avant le diagnostic peuvent laisser supposer une histoire de SMD sous-jacent préexistant. Les antécédents de cytopénies et de SMD personnels et familiaux ne sont cependant pas toujours documentés car ils peuvent passer inaperçus (12,39,52).

Nos patients sont majoritairement des hommes avec un âge avancé au diagnostic (64 ans) comme montré dans les différentes études publiées (4,12,52), malgré le biais de notre cohorte composée majoritairement de patients du protocole LAM-SA 2007 sélectionnés selon leur âge supérieur à 60 ans. Quesada *et al.* ont émis l'hypothèse que le sexe peut influencer la pénétrance notamment par la variation allélique, l'architecture génomique spécifique au sexe et l'empreinte génomique (12,58). Nous pouvons également nous demander quelle est la raison de l'apparition si tardive des mutations somatiques sur le second allèle et de la LAM en présence de mutations germinales de *DDX41*. L'association des différents événements liés à l'âge (altération du micro-environnement, inflammation chronique, erreurs d'épissage, défaut d'apoptose) (59,60) aux mutations bialléliques de *DDX41* entraînant une perte de fonction de la protéine impliquée dans ces mêmes événements, pourrait jouer un rôle important dans l'augmentation de la prévalence des LAM à un âge avancé chez les personnes porteuses de mutations germinales *DDX41*.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'atteinte hématologique au diagnostic. Une pancytopenie est fréquemment retrouvée (12,52). Une des particularités de notre étude est la description plus détaillée de l'hémogramme au diagnostic de la LAM. Contrairement aux autres LAM sans mutation de *DDX41*, les patients présentent une discrète anémie, à tendance macrocytaire, et une leucopénie touchant préférentiellement les PNN et les monocytes.

La majorité des LAM diagnostiquées, dans notre étude ainsi que dans celle de Sébert *et al.*, sont des LAM avec différenciation (LAM2) et plus rarement des LAM sans différenciation (LAM0) ou avec différenciation minimale (LAM1) (52). Une étude a aussi retrouvé des mutations de *DDX41* parmi des patients atteints de LA érythroïde (61).

Lorsque les informations sont présentes, les différentes études décrivent comme la nôtre, une moelle normo ou hypocellulaire avec un faible nombre de blastes (12,52) ainsi que des dysplasies sur au moins deux lignées pour 35% des patients (12). Une équipe a étudié les caractéristiques phénotypiques des blastes qui expriment les mêmes marqueurs que ce que nous avons retrouvés (CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, CD123 et HLA-DR) (12).

Contrairement aux SMD et aux LAM du sujet âgé pour lesquels le caryotype est normal dans la moitié des cas (62,63), le caryotype ne présente pas d'anomalies dans plus de 70 à 85% des cas de SMD/LAM avec mutations de *DDX41* (4,52). Malgré la sélection de nos patients sur le caryotype non défavorable, cela semble correspondre à notre analyse. Sur la totalité des 34 patients, nous avons retrouvé deux patient avec un caryotype de pronostic intermédiaire (del20q, trisomie 8) et un patient de pronostic défavorable (del5q) au diagnostic comme constaté dans la littérature (4,12,52).

DDX41 est présent dans le locus CRR2 habituellement retenu lors de la del5q. Polprasert *et al.* ont tout de même retrouvé une del5q incluant le locus *DDX41* (5q35.3) dans 26% des cas de del5q (4). Hosono *et al.* ont plutôt montré qu'une mutation hétérozygote de *DDX41* est plus fréquemment associée aux del5q, que les délétions larges incluant CRR2 (38).

VI.5. Corrélation génotype-phénotype

Malgré la publication de plusieurs études, très peu de corrélations génotype-phénotype ont pu être identifiées. La variabilité des phénotypes entre les patients et dans une même famille peut suggérer qu'une mutation germinale isolée de *DDX41* ne suffit pas au développement d'hémopathies malignes mais qu'une association avec une mutation somatique dans le second allèle ou d'autres mutations acquises semble indispensable.

Lewinsohn *et al.* ont tout de même constaté qu'une famille porteuse de la mutation p.Arg164Trp était atteinte de pathologies plutôt lymphoïdes (39). Les histoires lymphoïdes découvertes dans l'étude de Sébert *et al* n'étaient cependant pas associées à la même mutation (52).

Kadono *et al.* ont montré que la mutation somatique p.Arg525His est associée à des cytopénies périphériques plus importantes et un nombre de blastes médullaires diminué par rapport aux autres patients sans cette mutation (28). Nous n'avons pas trouvé de différence significative pour les patients porteurs de p.Arg525His dans notre étude. Nous avons par contre retrouvé plus de patients leucopéniques avec la mutation p.Asp140fs* mais cette observation devrait être vérifiée sur une plus grande cohorte.

Comme observé dans notre étude, Quesada *et al.* n'ont pas retrouvé de différence significative dans l'OS des patients atteints de la mutation p.Asp140fs ou p.Arg525His par rapport aux patients atteints d'une autre mutation de *DDX41* (12).

VI.6. Prise en charge et pronostic

Dans notre étude, comme dans les études précédentes, la majorité des patients atteints de LAM ont reçu un traitement standard par chimiothérapie. La chimiothérapie d'induction associait une anthracycline (idarubicine surtout ou daunorubicine) et un analogue nucléosidique de la pyrimidine (cytarabine) dans le cadre du protocole clinique BIG-1 pour les patients plus jeunes et du protocole LAMSA 2007. Celle-ci a été associée à la lomustine chez certains patients dans le protocole LAMSA 2007. Ces traitements permettent une réduction tumorale et l'objectif est d'atteindre une rémission complète

avant la phase de consolidation. Les patients éligibles et ayant un donneur compatible ont pu recevoir une allogreffe.

En raison du faible effectif des différentes études sur les HMH avec mutations de *DDX41*, l'impact pronostique de ces mutations est controversé et encore mal connu aujourd'hui. *DDX41* a été identifié comme un facteur de meilleur pronostic mais pas de façon significative dans la cohorte de Sébert *et al* qui retrouvait une survie à 2 ans de 90% et une survie globale de 5,2 ans (52). Dans l'étude de Quesada *et al.*, les patients avaient une survie globale médiane de 7 ans et 3 mois (12). Au contraire, dans l'étude de Polprasert *et al.*, les mutations et les délétions de *DDX41* sont associés à un plus mauvais pronostic (4). Contrairement aux études précédentes, celle-ci incluait plus de cas del5q, reconnus pour être de pronostic défavorable dans les LAM, d'autant plus si une mutation de *DDX41* est associée (38).

VI.7. Place de la greffe de CSH

L'allogreffe de CSH reste le meilleur moyen de prévenir les rechutes de LAM. Cependant elle est associée à un risque élevé de morbidité et de mortalité liée au conditionnement, surtout chez les personnes âgées. C'est pourquoi, elle n'est pas envisagée pour tous les patients. De plus, comme de nombreux donneurs de CSH sont issus de la même famille, cette approche pourrait présenter un danger pour les personnes ayant une prédisposition germinale. Dans ce contexte le dépistage de la présence de mutations de *DDX41* chez des donneurs apparentés est primordial pour prévenir une éventuelle leucémie dérivée du donneur (DCL).

Deux études documentent des cas de DCL parmi des familles porteuses d'une mutation germinale de *DDX41*. La première a décrit un frère asymptomatique de 62 ans, donneur intrafamilial de CSH pour son frère de 58 ans atteint d'une LAM. Ce dernier a ensuite rechuté avec une DCL 4 ans après la greffe. L'analyse moléculaire a identifié une mutation faux-sens p.Met1? germinale chez les deux frères. Les cellules de la DCL secondaire avaient acquis une mutation somatique *DNMT3A* (64). Dans la seconde étude, un homme de 49 ans qui a développé une SMD a reçu une greffe de CSH de son frère et a ensuite rechuté avec une DCL 6 ans après. Les deux individus se sont révélés porteurs d'une mutation germinale sur *DDX41* A500fs* et une mutation somatique p.Arg525His mais à une VAF négligeable chez le donneur (0,4%). Les cellules de la DCL avaient une VAF plus élevée de la mutation p.Arg525His et avaient acquis des mutations secondaires (65). Ces différentes études laissent supposer que les altérations du microenvironnement dues au stress à la suite de la greffe de CSH, pourraient être un déclencheur potentiel de mutations somatiques secondaires contribuant au développement d'une DCL.

VI.8. Perspectives thérapeutiques

La caractérisation du profil moléculaire des LAM est fondamentale pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et pour offrir de nouvelles opportunités de traitements ciblés.

Des réflexions sur les traitements sont en cours d'étude mais plutôt pour les patients atteints de SMD avec des mutations de *DDX41*. Le lénalidomide est à l'origine utilisé pour les

patients atteints de SMD avec une del5q. Les patients porteurs de mutations *DDX41* semblent mieux répondre au traitement par le lénalidomide que les patients avec une del5q sans altération de *DDX41* (4).

Des agonistes de STING sont également actuellement en phase de développement. Ils ont démontré une activité anti-tumorale chez la souris (36).

Le variant somatique le plus fréquent p.Arg525His de *DDX41* pourrait également constituer une cible médicamenteuse pour le traitement de la LAM. Une équipe a identifié en recherche des inhibiteurs spécifiques de ce variant mais leur efficacité dans les cellules tumorales doit être évaluée (66).

Conclusion

L'étude clinico-biologique sur notre cohorte nous a permis d'approfondir nos connaissances sur les LAM avec mutations de *DDX41*, relativement fréquentes au sein des LAM à caryotype normal et peu associées aux mutations habituellement retrouvées. Conformément aux études sur des cohortes non sélectionnées de patients atteints de SMD/LAM, nous avons confirmé que les mutations de *DDX41* semblent presque exclusivement d'origine germinale malgré l'âge avancé des patients. Nous avons montré qu'au diagnostic de la LAM, les mutations de *DDX41* sont toujours bialléliques, et peuvent être associées à d'autres mutations concomitantes dans des gènes impliqués dans les LAM secondaires à une myélodysplasie. En plus de la prédominance masculine déjà connue, nous retrouvons des caractéristiques biologiques homogènes des patients (faible blastose au diagnostic, discrète anémie macrocytaire associée à une leucopénie et une monocytopenie), distinctes des autres LAM, pouvant définir les LAM liées aux mutations *DDX41* comme une entité spécifique. Les mutations de *DDX41* sont associées au développement d'hémopathies de haut risque, mais ne semblent pas associées à un pronostic plus péjoratif que les cas sporadiques. Malgré le manque d'histoire familiale chez la plupart des patients, l'étude en NGS des cellules tumorales, qui est de plus en plus utilisée en pratique, peut servir de méthode de dépistage des patients présentant des mutations germinales potentielles (VAF>40%, mutations bialléliques) afin de faciliter la prise en charge appropriée des patients et de leurs apparentés (conseil génétique, dépistage avant greffe de CSH intra-familiale).

Les LAM avec mutations de *DDX41* sont donc une entité à part en raison de la prédisposition presque exclusivement familiale mais de l'évolution très tardive vers la LAM à la suite de l'acquisition d'une mutation somatique sur le second allèle de *DDX41* dans le processus d'oncogenèse. Des études prospectives des apparentés sains porteurs des mutations germinales de *DDX41* seraient intéressantes afin d'évaluer la pénétrance du développement de l'hémopathie et vérifier l'existence de signes évocateurs préexistants (signes de dysplasie, cytopénies, anomalies immunologiques), l'enjeu étant de prédire au mieux la transformation leucémique. De plus, l'étude de plus larges cohortes de patients atteints de LAM avec mutations de *DDX41* permettrait de définir de façon plus représentative leurs caractéristiques clinico-biologiques communes, les mutations récurrentes associées et leur pronostic.

Références bibliographiques

1. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.
2. Döhner H, Dolnik A, Tang L, Seymour JF, Minden MD, Stone RM, et al. Cytogenetics and gene mutations influence survival in older patients with acute myeloid leukemia treated with azacitidine or conventional care. *Leukemia*. déc 2018;32(12):2546-57.
3. Drazer MW, Kadri S, Sukhanova M, Patil SA, West AH, Feurstein S, et al. Prognostic tumor sequencing panels frequently identify germ line variants associated with hereditary hematopoietic malignancies. *Blood Adv*. 2018;2(2):146-50.
4. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 11 mai 2015;27(5):658-70.
5. Akpan IJ, Osman AEG, Drazer MW, Godley LA. Hereditary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis, Questions, and Controversies. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018;13(6):426-34.
6. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
7. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(14):1800-1813. doi:10.1182/blood-2016-05-670240
8. Brown AL, Hahn CN, Scott HS. Secondary leukemia in patients with germline transcription factor mutations (RUNX1, GATA2, CEBPA). *Blood*. 2 juill 2020;136(1):24-35.
9. Duployez N, Lejeune S, Renneville A, Preudhomme C. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with genetic predispositions: a new challenge for hematologists. *Expert Rev Hematol*. déc 2016;9(12):1189-202.
10. Baptista RLR, Dos Santos ACE, Gutiyama LM, Solza C, Zalcborg IR. Familial Myelodysplastic/Acute Leukemia Syndromes-Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition. *Front Oncol*. 2017;7:206.
11. Cosmic. CEBPA Gene - COSMIC [Internet]. [cité 18 sept 2020]. Disponible sur: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/>
12. Quesada AE, Routbort MJ, DiNardo CD, Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, Khoury JD, et al. DDX41 mutations in myeloid neoplasms are associated with male gender, TP53 mutations and high-risk disease. *Am J Hematol*. juill 2019;94(7):757-66.
13. Qu S, Li B, Qin T, Xu Z, Pan L, Hu N, et al. Molecular and clinical features of myeloid neoplasms with somatic DDX41 mutations. *Br J Haematol*. 2020.
14. Maciejewski JP, Padgett RA, Brown AL, Müller-Tidow C. DDX41-related myeloid neoplasia. *Semin Hematol*. 2017;54(2):94-7.

15. Simon L, Spinella J-F, Yao C-Y, Lavallée V-P, Boivin I, Boucher G, et al. High frequency of germline RUNX1 mutations in patients with RUNX1-mutated AML. *Blood*. 21 mai 2020;135(21):1882-6.
16. Cosmic. RUNX1 Gene - COSMIC [Internet]. [cité 18 sept 2020]. Disponible sur: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/>
17. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci*. mars 2014;1310(1):111-8.
18. Pasquet M, Fieschi C, Bellanné-Chantelot C, Sicre de Fontbrune F, Lamant M, Delabesse E, et al. Mutations GATA2 : une entité clinico-biologique pléomorphe. Recommandations de prise en charge du « club GATA2 ». *Rev Oncol Hématologie Pédiatrique*. 1 mars 2016;4(1):13-24.
19. Cosmic. GATA2 Gene - COSMIC [Internet]. [cité 18 sept 2020]. Disponible sur: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/>
20. Czuchlewski DR, Peterson LC. Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition: A New Provisional Entity Within the World Health Organization Classification. *Surg Pathol Clin*. mars 2016;9(1):165-76.
21. Bourgeois CF, Mortreux F, Auboeuf D. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2016;17(7):426-38.
22. Cordin O, Beggs JD. RNA helicases in splicing. *RNA Biol*. 1 janv 2013;10(1):83-95.
23. Dujardin G, Dagueneat É, Bernard DG, Flodrops M, Durand S, Chauveau A, El Khoury F, Le Jossic-Corcus C, Corcos L. L'épissage des ARN pré-messagers : quand le spliceosome perd pied [Pre-mRNA splicing: when the spliceosome loses ground]. *Med Sci (Paris)*. déc 2016;32(12):1103-1110.
24. Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 22 juill 2011;12(8):505-16.
25. Jiang Y, Zhu Y, Liu Z-J, Ouyang S. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. *Protein Cell*. févr 2017;8(2):83-9.
26. Jiang Y, Zhu Y, Qiu W, Liu Y-J, Cheng G, Liu Z-J, et al. Structural and functional analyses of human DDX41 DEAD domain. *Protein Cell*. janv 2017;8(1):72-6.
27. Antony-Debré I, Steidl U. Functionally relevant RNA helicase mutations in familial and sporadic myeloid malignancies. *Cancer Cell*. 11 mai 2015;27(5):609-11.
28. Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, et al. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2016;44(8):745-754.e4.
29. Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 12;18(1):140.
30. Chanut R, Petrilli V. Détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING - De l'immunité innée vers le contrôle de la tumorigenèse [Cytosolic DNA sensing by the cGAS-STING pathway in cancer]. *Med Sci (Paris)*. Jun-Jul 2019;35(6-7):527-534.

31. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu Y-J. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol.* 4 sept 2011;12(10):959-65.
32. Omura H, Oikawa D, Nakane T, Kato M, Ishii R, Ishitani R, et al. Structural and Functional Analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Sci Rep.* 10 2016;6:34756.
33. Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol.* déc 2012;13(12):1155-61.
34. Lee K-G, Kim SS-Y, Kui L, Voon DC-C, Mauduit M, Bist P, et al. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates DDX41 and activates its binding of dsDNA and STING to initiate type 1 interferon response. *Cell Rep.* 24 févr 2015;10(7):1055-65.
35. Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu Y-J. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol.* févr 2013;14(2):172-8.
36. Cheah JJC, Hahn CN, Hiwase DK, Scott HS, Brown AL. Myeloid neoplasms with germline DDX41 mutation. *Int J Hematol.* août 2017;106(2):163-74.
37. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 11 janv 2012;481(7382):506-10.
38. Hosono N, Makishima H, Mahfouz R, Przychodzen B, Yoshida K, Jerez A, et al. Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget.* 24 janv 2017;8(4):6483-95.
39. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, Phung C, Rafidi G, Lee MK, et al. Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood.* 25 févr 2016;127(8):1017-23.
40. Pigneux A, Béné MC, Salmi L-R, Dumas P-Y, Delaunay J, Bonmati C, et al. Improved Survival by Adding Lomustine to Conventional Chemotherapy for Elderly Patients With AML Without Unfavorable Cytogenetics: Results of the LAM-SA 2007 FILO Trial. *J Clin Oncol.* 10 nov 2018;36(32):3203-10.
41. Largeaud L, Cornillet-Lefebvre P, Hamel J-F, Dumas P-Y, Prade N, Dufrechou S, et al. Lomustine is beneficial to older AML with ELN2017 adverse risk profile and intermediate karyotype: a FILO study. *Leukemia.* 18 sept 2020;
42. Gros A. Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire. [Internet]. Disponible sur: <http://www.canceropole-gso.org>
43. Samorodnitsky E, Datta J, Jewell BM, Hagopian R, Miya J, Wing MR, et al. Comparison of Custom Capture for Targeted Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Diagn JMD.* janv 2015;17(1):64-75.
44. HaloPlex Exome Target Enrichment System For Illumina Sequencing [Internet]. Disponible sur: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9906-90000_HaloPlexExome_Manual.pdf

45. J-L Beaudoux, Kaltenbach S, Lhermitte L. Séquençage haut débit en onco-hématologie : application à la leucémie lymphoïde chronique. *Feuill Biol* 2018 ; 344 : 5-13.
46. Illumina Sequencing Technology [Internet]. Disponible sur: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
47. Dortet, Laurent & Bonnin, Rémy & Naas, Thierry. Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Feuill Biol* 2017;354.
48. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers*. 2001;17(2):89-98.
49. Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of « mutation: » A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat*. janv 2002;19(1):69-75.
50. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med*. mars 2016;13(1):3-11.
51. Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer*. juill 2005;43(3):227-38.
52. Sébert M, Passet M, Raimbault A, Rahmé R, Raffoux E, Sicre de Fontbrune F, et al. Germline DDX41 mutations define a significant entity within adult MDS/AML patients. *Blood*. 24 2019;134(17):1441-4.
53. Diness BR, Risom L, Frandsen TL, Hansen B, Andersen MK, Schmiegelow K, et al. Putative new childhood leukemia cancer predisposition syndrome caused by germline bi-allelic missense mutations in DDX41. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(12):670-4.
54. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, Ellison A, Lowe R, Tummala H, et al. Germline heterozygous DDX41 variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(10):2083-6.
55. Metzeler KH, Group on behalf of the AS, Herold T, Group on behalf of the AS, Rothenberg-Thurley M, Group on behalf of the AS, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 4 août 2016;128(5):686-98.
56. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 26 févr 2015;125(9):1367-76.
57. Visconte V, O Nakashima M, J Rogers H. Mutations in Splicing Factor Genes in Myeloid Malignancies: Significance and Impact on Clinical Features. *Cancers (Basel)* Nov 2019;11(12):1844.
58. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*. 1 oct 2013;132(10):1077-130.

59. Ho Y-H, Méndez-Ferrer S. Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*. 1 janv 2020;105(1):38-46.
60. Mejia-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*. 1 janv 2020;105(1):22-37.
61. Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, Choi JK, Shi L, Pounds SB, et al. Genomic subtyping and therapeutic targeting of acute erythroleukemia. *Nat Genet*. 2019;51(4):694-704.
62. Döhner H, Dolnik A, Tang L, Seymour JF, Minden MD, Stone RM, et al. Cytogenetics and gene mutations influence survival in older patients with acute myeloid leukemia treated with azacitidine or conventional care. *Leukemia*. 2018;32(12):2546-57.
63. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 21 nov 2013;122(22):3616-27.
64. Berger G, van den Berg E, Sikkema-Raddatz B, Abbott KM, Sinke RJ, Bungener LB, et al. Re-emergence of acute myeloid leukemia in donor cells following allogeneic transplantation in a family with a germline DDX41 mutation. *Leukemia*. 2017;31(2):520-2.
65. Kobayashi S, Kobayashi A, Osawa Y, Nagao S, Takano K, Okada Y, et al. Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31(4):1020-2.
66. Yoneyama-Hirozane M, Kondo M, Matsumoto S-I, Morikawa-Oki A, Morishita D, Nakanishi A, et al. High-Throughput Screening to Identify Inhibitors of DEAD Box Helicase DDX41. *SLAS Discov* oct 2017;22(9):1084-92.

Annexes

Annexe 1. Panels mutationnels du NGS LAM utilisés au CHU de Toulouse	72
Annexe 1.1. Panel Haloplex	72
Annexe 1.2. Panel SureSelect.....	73
Annexe 2. Tableau des caractéristiques biologiques sur l'hémogramme et le myélogramme, le traitement et l'évolution des 34 patients atteints de LAM avec mutations de <i>DDX41</i>	74

Annexe 1. Panels mutationnels du NGS LAM utilisés au CHU de Toulouse

Annexe 1.1. Panel Haloplex

ASXL1	MGA
ASXL2	MPL
ATM	MYC
BCOR	NF1
BCORL1	NPM1
CBL	NRAS
CCND2	PHF6
CEBPA	PIGA
CSF3R	PPM1D
CUX1	PRPF8
DDX41	PTPN11
DHX15	RAD21
DNMT3A	RUNX1
EP300	SETBP1
ETV6	SF3B1
EZH2	SMC1A
FLT3	SMC3
GATA1	SRSF2
GATA2	STAG2
GATA2_INTRON4	TET2
IDH1	TP53
IDH2	U2AF1
JAK2	WT1
KDM5A	ZBTB7A
KDM6A	ZRSR2
KIT	
KMT2D	
KRAS	

Annexe 1.2. Panel SureSelect

Gène	Référence	Gène	Référence	Gène	Référence
AFDN	NM_001366320	H1-4	NM_005321	RUNX1	NM_001754
ANKRD26	NM_014915	HAX1	NM_006118	SAMD9	NM_017654
ASXL1	NM_015338	IDH1	NM_005896	SAMD9L	NM_152703
ASXL2	NM_018263	IDH2	NM_002168	SBDS	NM_016038
ATM	NM_000051	IKZF1	NM_006060	SETBP1	NM_015559
BCOR	NM_001123383	JAK2	NM_004972	SETD2	NM_014159
BCORL1	NM_021946	JAK3	NM_000215	SF1	NM_004630
BIRC6	NM_016252	KAT6B	NM_012330	SF3B1	NM_012433
BRAF	NM_004333	KDM5A	NM_001042603	SH2B3	NM_005475
BRINP3	NM_199051	KDM6A	NM_021140	SMARCA2	NM_003070
CALR	NM_004343	KIT	NM_000222	SMC1A	NM_006306
CBL	NM_005188	KMT2D	NM_003482	SMC3	NM_005445
CCND2	NM_001759	KRAS	NM_004985	SOS1	NM_005633
CEBPA	NM_004364	MBD4	NM_003925	SRSF2	NM_003016
CHEK2	NM_001005735	MECOM	NM_001105077	STAG2	NM_001042749
CIC	NM_015125	MED12	NM_005120	TERT	NM_198253
CSF3R	NM_156039	MGA	NM_001164273	TET2	NM_001127208
CSMD1	NM_033225	MPL	NM_005373	TP53	NM_000546
DDX41	NM_016222	MYC	NM_002467	TYK2	NM_003331
DHX15	NM_001358	NF1	NM_000267	U2AF1	NM_006758
DNMT3A	NM_022552	NOTCH1	NM_017617	WT1	NM_024426
ELANE	NM_001972	NPM1	NM_002520	ZBTB7A	NM_015898
EP300	NM_001429	NRAS	NM_002524	ZRSR2	NM_005089
ERCC2	NM_000400	PDE4DIP	NM_014644		
ERCC6L2	NM_020207	PHF6	NM_032458		
ETNK1	NM_018638	PIGA	NM_002641		
ETV6	NM_001987	PIK3C2B	NM_002646		
EZH2	NM_004456	PIK3CG	NM_002649		
FANCA	NM_000135	PPM1D	NM_003620		
FAT1	NM_005245	PRPF8	NM_006445		
FLT3	NM_004119	PTPN11	NM_002834		
GATA1	NM_002049	RAD21	NM_006265		
GATA2	NM_032638	RIT1	NM_006912		
GIGYF2	NM_015575	RTEL1	NM_001283009		

Annexe 2. Tableau des caractéristiques biologiques sur l'hémogramme et le myélogramme, le traitement et l'évolution des 34 patients atteints de LAM avec mutations de *DDX41*

ID	Mut. 1 DDX41	Mut. 2 DDX41	Age Sexe	NFS							Myélogramme							Traitement et évolution					
				Hb g/dL	VGM (fL)	GB (G/l)	PNN (G/l)	Mono (G/l)	Plaq. (G/l)	% BI sg	FAB	% BI MO	Rich- esse	MK	LG LE %	Dyspl	Caryo	Chimio	Greffe MO	1 ^{er} évêve- ment	EFS mois	Décès	OS mois
1	p.Met1 ?	p.Arg 525His	65 M	11,2	108,0	1,5	0,5	0,0	68		M2	35	N	N	24 9	LE	N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	36	Oui	40
2	p.Asp 140Gly fs*2	p.Pro 321Leu	69 M	9,6	102,5	1,0	0,1	0,1	102	1	M2	20	↗	N	35 11		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	13	Oui	18
3	p.Ala 191Thr	p.Arg 525His	64 M	10,5	106,1	2,4	0,9	0,1	34	8	M2	28	N	N	17 32		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	51	Oui	60
4	p.Gly 19*	p.Arg 525His	64 F	12,1	96,5	1,9	0,5	0,0	110	1	M2	42	↘	N	10 29		N	LAM-SA sans CCNU			60	Non	60
5	p.Met1 ?	p.Arg 525His	73 F	10,1	100,9	2,7	0,7	0,0	113	3	M2	33	↘	N	12 33	MK	N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	29	Oui	39
6	splice.c .936- 1G>A		66 M	10,3	106,3	8,1	3,3	1,2	101	11	M0	48	N	N	6 22		N	LAM-SA sans CCNU		Echec	2	Oui	4
7	p.Gln 90*	p.Arg 525His	63 M	11,9	94,9	0,9	0,1	0,0	48	4	M1	61	N	↘	4 20		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	21	Non	60
8	p.Arg 323Ser	p.Thr 236Met	68 M	11,1	106,6	2,0	0,7	0,0	45	1	M2	20	↘	↘	18 22		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	31	Oui	59
9	p.Asp 140Gly fs*2	p.Arg 525His	64 M	8,8	94,0	1,5	0,5	0,1	34	1	M2	43	↗	↘	13 0		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	33	Oui (infect- ion)	59
10	p.Glu 268Asp fs*36	p.Arg 525His	63 M	12,9	106,0	2,2	1,1	0,0	78	2	M2	38	↗	N	11 26		Tri8	LAM-SA avec CCNU		Décès	13	Oui	13
11	p.Asp 140Gly fs*2	p.Arg 525His	60 M	12,0	105,1	2,3	0,8	0,0	50		M2	27	N	↘	37 16	LG	N	LAM-SA sans CCNU		Décès	28	Oui	28

12	p.Ser 363del	p.Arg 525His	66 M	10,2	111,0	1,6	0,2	0,0	44		M2	51	N	N	7 31		N	LAM-SA sans CCNU		Rechute	13	Oui	16
13	p.Asp 140Gly fs*2	p.Arg 525His	75 M	12,8	108,4	1,2	0,5	0,1	104		M2	34	N	N	15 38	MK	N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	49	Oui	55
14	p.Ser 363del	p.Arg 525His	62 M	11,2	107,5	3,4	1,4	0,1	94		M2	36	N	↘	27 21		Del 20q	LAM-SA avec CCNU		Rechute	28	Oui	40
15	p.Asp 140Gly fs*2	p.Arg 525His	66 M	12,0	92,4	2,4	0,6	0,1	94		M2	46	↘	↘	16 18		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	31	Oui	37
16	splice.c .138+1 G>C	p.Arg 525His	62 F	10,9	102,2	1,6	0,9	0,0	109		M2	20	N	N	23 29		NC	LAM-SA avec CCNU		Décès	10	Oui	10
17	p.Asp 140Gly fs*2	p.Arg 525His	78 M	9,6	95,0	1,2	0,1	0,0	28		M2	72	N	↘	1 9		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	8	Oui	10
18	p.Leu2 83Cysf s*20	p.Arg 525His	61 M	8,8	126,0	1,0	0,6	0,0	85		M2	20	↘	↘	32 13		N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
19	splice.c .138+1 G>C	p.Arg 525His	63 F	9,6	105,6	1,6	0,2	0,1	51		M1	58	↘	Abs	9 14		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	20	Oui	30
20	p.Asp 140Gly fs*2	p.Gly 530Asp	70 M	8,7	109,0	1,1	0,4	0,0	33	2	M2	29	↘	N	25 31		Echec	LAM-SA avec CCNU			60	Non	60
21	splice.c .1098+ 1G>A	p.Gly 530Asp	52 F	10,7	103,5	2,1	0,9	0,1	141		M1	46	N	Abs	9 23		N	LAM-SA sans CCNU		sortie pour toxicité	4	Non	36
22	p.Glu 345Lys	p.Arg 525His	81 M	9,5	111,1	2,1	1,1	0,1	123		M0	26	↘	Abs	32 18		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	18	Non	31
23	p.Gly 173Arg	p.Arg 525His	61 M	7,7	99,0	1,1	0,1	0,0	61	4	M2	57	↘	↘	12 27		N	LAM-SA avec CCNU	Extra- familial	Décès	11	Oui (GVH)	11
24	p.Gly 218Asp	p.Arg 525His	62 M	12,5	107,0	2,6	1,5	0,1	56		M2	23	↘	N	20 28		N	LAM-SA sans CCNU	Extra- familial		60	Non	60
25	splice.c .936- 1G>A	p.Arg 525His	70 M	11,4	94,5	0,9	leuco pénie	leuco pénie	69		M2	25	↘	N	22 29	LG MK	Echec	DEXAML	Extra- familial		9	Non	9

26	p.Gln 502*	p.Arg 525His	71 M	6,7	92,8	2,0	0,7	0,2	23		M2	54	N	↘	26 9	LG LE MK	N	Vidaza + veneto- clax		Décès	12	Oui	12
27	p.Thr 320 Ile	p.Arg 525His	63 F	10,6	95,5	2,3	0,7	0,0	17		M2	24	↘	↘	16 31		N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	24	Oui (Infec- tion)	28
28	p.Gly 173Arg	p.Asp 344Glu	58 M	10,0	86,6	7,3	0,1	0,0	43	87	M1	74	↘	↘	7 3		N	BIG1		Décès	3	Oui (Infec- tion)	3
29	p.Gly 530Ser	p.Pro 179Leu	72 M	9,2	104,5	2,4	0,2	0,0	120	5	M2	20	N	N	36 33	LG LE MK	N	LAM-SA avec CCNU		Rechute	6	Oui	11
30	p.Met1 ?	p.Arg 525His	61 F	10,3	104,2	2,0	0,4	0,0	64		M2	22	↘	Abs	17 24	LE	N	BIG1		Rechute	30	Non	38
31	p.Gln 90*	p.Arg 525His	61 F	10,9	90,3	1,8	0,8	0,0	115		M2	23	N	N	15 42		N	BIG1		Rechute	20	Non	24
32	p.Gly 173Arg	p.Arg 525His	39 M	8,4	96	1,63	0,10	0,00	19	1	M2	36	↘	↘	13 13	MK	N	BIG1	Intra- familial	Rechute	14	Non	15
33	p.Se r405Ala fs*4	p.Arg 525His	67 M	8,5	114,0	2,5	1,0	0,1	21		M2	29	↘	↘	17 34	MK LE	N	LAM-SA avec CCNU	Intra- familial		40	Non	40
34	p.Ser 405Ala fs*4	p.Gly 530Asp	54 M	13,4	104,6	2,8	1,2	0,0	104		M2	28	N	N	17 20	MK	del5q	Dauno- rubicine + aracytine	Extra- familial		60	Non	60

Abs : absence ; BI : blastes ; caryo : caryotype ; Dyspl : dysplasie ; F : Femme ; GB : Globules blancs ; Hb : hémoglobine ; LE : lignée érythroblastique ; LG : lignée granuleuse ; M : homme ; MK : lignée mégacaryocytaire ; Mono : monocytes ; N : normal ; Plaq : plaquettes.

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.

Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations de *DDX41* : Une nouvelle entité de LAM ?

Les mutations de *DDX41* sont régulièrement retrouvées dans des cas familiaux de syndromes myélodysplasiques (SMD) et de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) à un âge avancé. Parmi 976 patients atteints de LAM analysés par séquençage à haut débit (NGS) ciblé, nous avons identifié 34 patients porteurs de mutations de *DDX41*, non sélectionnées sur leur nature germinale. La majorité des patients (n=24) étaient issus de la cohorte du protocole d'essai clinique LAM-SA 2007, incluant des patients de plus de 60 ans avec un caryotype non défavorable. 97% des patients étaient porteurs de mutations bialléliques de *DDX41* et une mutation était supposée germinale dans 94% des cas. La mutation supposée germinale la plus fréquente était p.Asp140fs* (21%) et la mutation somatique était p.Arg525His (73%). Des mutations concomitantes dans d'autres gènes ont été détectées chez 68% des patients mais les plus récurrentes étaient *ASXL1*, *STAG2*, *SRSF2* et *DNMT3A*. Au diagnostic, les patients présentaient surtout une LAM2 avec un caryotype normal et une plus faible blastose médullaire que les patients sans mutation de *DDX41*. Leur hémogramme révèle une discrète anémie à tendance macrocytaire avec une leucopénie et une monocytopenie, laissant supposer une phase de myélodysplasie préexistante. Il y a significativement plus d'hommes atteints (76%) avec un âge médian de 64 ans. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans la survie des patients mutés par rapport aux patients non mutés traités selon le protocole LAM-SA 2007 (survie globale médiane = 31 mois). Au final, ces LAM semblent être une entité à part au sein des LAM sans anomalies cytogénétiques ou moléculaires récurrentes habituellement retrouvées.

Mots-clés : Leucémie aiguë myéloïde familiale, *DDX41*, mutation germinale

Acute myeloid leukemia (AML) with *DDX41* mutations: A novel entity of AML?

DDX41 mutations are frequently found in familial cases of myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) at older age. Among 976 AML patients analyzed by targeted NGS, we identified 34 patients with *DDX41* mutations, not selected for their germline nature. The majority of patients (n=24) were found in the LAM-SA 2007 clinical trial cohort with patients over 60 years old with non-adverse karyotype. 97% of the patients carried biallelic *DDX41* mutations and a mutation was presumed germline in 94% of cases. The most common suspected germline variant was p.Asp140fs* (21%) and the somatic variant was the missense mutation p.Arg525His (73%). Concomitant mutations in other genes were detected in 68% of patients but only *ASXL1*, *STAG2*, *SRSF2* and *DNMT3A* were the most recurrent. At diagnosis, patients had mild macrocytic anemia with leukopenia and monocytopenia associated with a lower bone marrow blasts number than patients without *DDX41* mutations, suggesting a pre-existing myelodysplasia. There were significantly more men (76%) with a median age of 64 years. We didn't find a significant difference in the survival of mutated patients compared to non-mutated patients treated with the LAM-SA 2007 protocol (median OS = 31 months). Finally, AML with *DDX41* mutations seem to be a separate entity within AMLs without the usual recurrent cytogenetic or molecular abnormalities.

Keywords : familial acute myeloid leukemia, *DDX41*, germline mutation

