

Place de la cytogénétique dans la prise en charge des syndromes myélodysplasiques : mise à jour du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Cytogenetic place in managing myelodysplastic syndromes: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Virginie Eclache¹
Marina Lafage-Pochitaloff²
Christine Lefebvre³
Dominique Penther⁴
Sophie Raynaud⁵
Isabelle Tigaud⁶

¹ Laboratoire d'hématologie et de cytogénétique, Hôpital Avicenne, AP-HP, Bobigny, France
<virginie.eclache@avc.aphp.fr>

² Département de génétique, Aix Marseille Université, APHM, Hôpital Timone, Marseille, France

³ Laboratoire de cytogénétique onco-hématologique, Institut de biologie, CHU de Grenoble, France

⁴ Laboratoire de génétique oncologique, Centre de lutte contre le cancer Henri Becquerel, Rouen, France

⁵ Laboratoire d'oncohématologie, Hôpital Pasteur, Nice, France

⁶ Laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire, Service d'hématologie biologique, CBPAS, GHS, Hospices civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

Résumé. Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des syndromes pré-leucémiques du sujet âgé caractérisés par des cytopénies persistantes et la présence d'une hématopoïèse clonale dérégulée. Les anomalies cytogénétiques acquises sont multiples, retrouvées dans moins de 50 % des cas *de novo*, elles sont plus fréquentes dans les SMD secondaires (jusqu'à 80 %). Le caryotype est important pour la compréhension de la physiopathologie, du diagnostic et du calcul d'un score pronostique permettant une évaluation du risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde et une aide à la prise de décision thérapeutique. La cytogénétique conventionnelle réalisée sur la moelle des patients suspects de SMD reste la méthode de référence pour la détection d'anomalies spécifiques les plus fréquentes telles que les délétions partielles et monosomies des chromosomes 5 (-5/5q-) et 7 (-7/7q-) mais également d'une grande variété d'anomalies autres ou de leur combinaison. Les techniques d'hybridation *in situ* fluorescente et d'hybridation génomique comparative sur puces ADN permettent dans certains cas d'identifier des anomalies cryptiques mais ne sont pas recommandées en routine diagnostique. Les nouvelles techniques de séquençage haut débit ont identifié récemment des mutations somatiques fréquentes dans les SMD, dont certaines ont un rôle dans la physiopathologie de ces maladies (mutations touchant les gènes de l'épissage) et d'autres ont un impact pronostique important (*TP53*, *ASXL1*...) ; leur place dans la prise en charge thérapeutique des patients doit être précisée dans les années à venir.

Mots clés : *syndromes myélodysplasiques, anomalies cytogénétiques, caryotype, FISH*

Abstract. The myelodysplastic syndromes (MDS) are preleukemic diseases of elderly patients characterized by defective maturation of clonal hematopoietic progenitor cells resulting in peripheral blood cytopenias. Clonal chromosomal abnormalities are heterogeneous and can be detected in less than 50% of patients with *de novo* MDS and more frequently in secondary MDS (up to 80%). The karyotype plays an important role in the pathogenesis, diagnosis, and prognosis to evaluate the risk of leukemic transformation and, more recently, in treatment allocation. The gold standard for cytogenetic diagnosis in MDS is conventional chromosome banding analyses of bone marrow metaphases. The most frequent

Article reçu le 24 février 2016,
accepté le 29 février 2016

Tirés à part : V. Eclache

abnormalities are deletions and losses of chromosomes 5 (-5/5q-) and 7 (-7/7q-) and various isolated or combined abnormalities. Fluorescent in situ hybridization and array comparative genomic hybridization can reveal cryptic genetic abnormalities but are not recommended in routine diagnosis. New techniques including next generation sequencing revealed somatic driver mutations especially those affecting genes involved in RNA splicing or those harboring important prognostic value (*TP53*, *ASXL1*...) with potential applications in clinical practice in the future.

Key words: myelodysplastic syndromes, cytogenetic abnormalities, karyotype, FISH

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe de pathologies hématopoïétiques clonales, caractérisées par une ou plusieurs cytopénies périphériques dues à une hématopoïèse inefficace avec une augmentation de l'apoptose, et un risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans environ 30 % des cas [1]. En dehors de rares cas de maladies héréditaires prédisposantes (telles que l'anémie de Fanconi, la dyskératose congénitale et de rares syndromes mutationnels), il s'agit d'une pathologie du sujet âgé avec une médiane de 70 ans au diagnostic et dont la fréquence augmente avec l'âge. Détectables par le caryotype médullaire dans environ 40 % des SMD *de novo* et dans 80 % des SMD secondaires, les anomalies cytogénétiques sont multiples. Elles ont un rôle important pour le diagnostic et le pronostic et permettent de choisir l'option thérapeutique la plus adaptée [2].

Intérêt de la cytogénétique dans le diagnostic des syndromes myélodysplasiques

La classification de référence des syndromes myélodysplasiques est celle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) publiée en 2008 [3], et repose sur la cytologie, la cytochimie et la cytogénétique. Cette classification tient compte du nombre de cytopénies sanguines, du nombre de blastes circulants et médullaires, du nombre de lignées présentant des signes de dysplasie significatifs dans la moelle, la présence de plus ou moins 15 % de sidéroblastes en couronne, la présence de corps d'Auer. Les principales entités reconnues sont les cytopénies réfractaires (anémie, thrombopénie, neutropénie) avec dysplasie uni- (CRDU) ou multi-lignées (CRDM) ; les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) de type 1 si les blastes médullaires sont compris entre 5 et 9 % ou AREB de type 2 si les blastes médullaires sont entre 10 et 19 %. Depuis 2001 l'OMS a reconnu comme entité à part entière le « syndrome 5q- » initialement décrit par Van den Berghe [4],

associant une anémie macrocytaire à une dysmégacaryopoïèse caractéristique dans la moelle (mégacaryocytes de petite taille avec un noyau monolobé), l'absence d'excès de blastes ou de corps d'Auer et sans thrombopénie initialement. Enfin une nouvelle catégorie apparue dans la classification de 2008 appelée « syndromes myélodysplasiques inclassables » intègre les cytopénies chroniques sans dysplasie significative (dans moins de 10 % des cellules d'une lignée) ni excès de blastes mais présentant une ou des anomalies cytogénétiques évocatrices de SMD (tableau 1).

Tableau 1. Anomalies cytogénétiques spécifiques de syndromes myélodysplasiques en l'absence de dysplasies morphologiques (d'après [3]).

| Anomalies | Fréquence estimée | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| | SMD <i>de novo</i> | SMD <i>de novo</i> |
| Déséquilibrées | | |
| +8* | 10 % | |
| -5/del(5q) | 10 % | 40 % |
| -7/del(7q) | 10 % | 50 % |
| del(20q)* | 5-8 % | |
| -Y* | 5 % | |
| i(17q)/t(17p) | 3-5 % | |
| -13/del(13q) | 3 % | |
| del(11q) | 3 % | |
| del(12p)/t(12p) | 3 % | |
| del(9q) | 1-2 % | |
| idic(X)(q13) | 1-2 % | |
| Équilibrées | | |
| t(11;16)(q23;p13) | | 3 % |
| t(3;21)(q26;q22) | | 2 % |
| inv(3)(q21q26)/t(3;3) | 1 % | |
| t(1;3)(p36;q21) | < 1 % | |
| t(2;11)(p21;q23) | < 1 % | |
| t(6;9)(p23;q34) | < 1 % | |

SMD : syndromes myélodysplasiques. * La présence de trisomie 8 et la del(20q) isolées ne sont pas considérées comme spécifiques pour le diagnostic de SMD en l'absence de signes de dysplasie mais sont cependant fréquentes et marqueurs de clonalité. La perte de l'Y dans une faible contingent de mitoses peut être due à l'âge.

Les anomalies les plus fréquentes dans les SMD sont des monosomies ou des délétions touchant principalement les bras longs des chromosomes 5 (5q-) et 7 (7q-) et aussi les bras longs des chromosomes 11, 13, 20, ou les bras courts des chromosomes 12 et 17 ; en revanche, les translocations réciproques sont rares en dehors de celles impliquant le gène *EVII* (ou *MECOM*) en particulier la t(3;3)(q21;q26) et son équivalent l'inversion (3)(q21q26). À noter que la trisomie 8 et la délétion 20q, bien que fréquentes dans ces pathologies, sont le reflet d'une pathologie myéloïde clonale mais ne permettent pas à elles seules de poser le diagnostic de SMD. En effet la trisomie 8 peut être retrouvée dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ou les LAM *de novo*. Enfin l'existence d'un syndrome de trisomie 8 constitutionnel en mosaïque est toujours débattue [5]. La délétion partielle du bras long du chromosome 20 ou del(20q) est également retrouvée dans les SMP en particulier dans la myélofibrose primitive. Malgré son manque de spécificité « absolue » elle doit être recherchée dans les cas de thrombopénie du sujet après l'âge de 60 ans pour différencier une hémopathie débutante d'une thrombopénie d'origine auto-immune [6].

Le problème de la perte de l'Y est délicat à trancher : d'une part, la perte de l'Y est considérée comme physiologiquement due à l'âge avancé des patients masculins surtout lorsqu'elle concerne un petit nombre de mitoses (moins de 15 %) et, d'autre part, les SMD touchent une population relativement âgée. Les seules études épidémiologiques consacrées à ce sujet ont été menées aux États-Unis par Wiktor *et al.* [7] montrant l'augmentation de la nullosomie Y avec l'âge, d'une part, et dans les hémopathies malignes, d'autre part. Les auteurs considèrent comme spécifiques d'une hémopathie des taux de 80 à 100 % de mitoses avec perte de l'Y. Lorsque la perte concerne moins de 80 % des mitoses, il est donc impossible de conclure à l'heure actuelle.

Du fait de cette nouvelle classification de l'OMS 2008, l'exploration médullaire étiologique de cytopénies chroniques inexplicables comprend actuellement l'étude systématique du caryotype.

Intérêt de la cytogénétique comme marqueur pronostique

Le caryotype est considéré comme un facteur pronostique indépendant dans les syndromes myélodysplasiques. Le score pronostique international (IPSS) établi par un groupe d'experts en 1997 a été largement utilisé en pratique clinique pour la prise en charge thérapeutique des patients [8]. Les anomalies chromosomiques y étaient réparties en trois groupes dits de bon, intermédiaire ou mauvais pro-

nostic selon la survie globale et le risque de transformation en LAM d'une cohorte de patients présentant un SMD ou une leucémie pauci-blastique (correspondant à l'ancienne désignation d'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (AREB-t) de la classification FAB : *French-American-British*). Les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) avec taux de GB inférieur à 12 G/L y étaient également évaluées. Toutefois, en raison de la grande hétérogénéité des anomalies cytogénétiques, de la combinaison de ces anomalies entre elles et du nombre limité de patients à caryotype anormaux de la cohorte ayant permis d'établir l'IPSS, seul l'impact pronostique des anomalies chromosomiques les plus fréquentes (-5/5q-, -7/7q-, +8, 20q-, -Y, et caryotypes complexes définis par la présence d'au moins 3 anomalies), a été établi de manière rigoureuse. Les données combinées de la cohorte austro-germanique de l'international MDS Risk Analysis Workshop, du groupe coopératif espagnol et d'un groupe de travail international sur les SMD ont été réévaluées aboutissant à un score pronostique révisé IPSS-R [9, 10]. Seuls les patients non traités ou traités par soins de support ont été analysés dans cette étude collaborative portant sur 7 012 patients, qui a permis de déterminer plus précisément la valeur pronostique de quelques-unes des anomalies rares et de redéfinir les groupes pronostiques (*tableau 2*) [10].

Les auteurs ont défini 19 catégories cytogénétiques permettant le classement de 91 % des patients (contre 86 % avec l'IPSS de 1997), réparties en 5 groupes pronostiques dont les survies diffèrent significativement de 61 mois pour les « très bons » à 6 mois pour les « très mauvais ». Les analyses statistiques ont tenu compte plus précisément de facteurs cliniques et biologiques tels que l'âge (> 60 ans), le sexe, les taux d'hémoglobine (Hb) et de plaquettes et de la blastose médullaire pour pondérer leurs résultats. Le nouveau système a été validé sur une cohorte italienne indépendante par ailleurs [11].

Les principaux changements à retenir sont l'intégration de nouvelles anomalies isolées : la del(11q) et la del(12p) respectivement dans les groupes de très faible et faible risque pronostique, les anomalies 3q dans le groupe défavorable, l'isochromosome 17q, les trisomies 19 et 21 dans le groupe intermédiaire. Cette nouvelle classification permet d'intégrer les anomalies doubles : ainsi on retiendra le bon pronostic des délétions (5q) quand elles sont isolées ou associées à une seule autre anomalie non défavorable. Enfin les auteurs attribuent un très mauvais score aux caryotypes complexes dès que le nombre d'anomalies dépasse trois. Cette nouvelle classification s'intègre dans un score IPSS révisé qui tient aussi compte de la profondeur des cytopénies, et du nombre de blastes médullaires (*tableau 3*) [12]. Il pourrait également être profondément modifié par les données récentes sur les mutations en

Tableau 2. Définition et survie des différents sous-groupes pronostiques cytogénétiques selon [10].

| Groupes pronostiques | Anomalie cytogénétique | Fréquence (%) | Médiane de survie en mois |
|-------------------------|--|---------------|---------------------------|
| Très bon | -Y 11q- | 2,9 | 60,8 |
| Bon pronostic | Normal 5q- 12p- 20q- Double AN dont 5q- | 51,7 | 48,6 |
| Pronostic intermédiaire | i(17q) + 21 + 8 + 19 7q- Clones indépendants Doubles AN sans -7/7q- Autres AN | 19,2 | 26 |
| Défavorable | AN 3q Complexe (= 3 AN) -7 Doubles AN avec -7/7q- | 5,4 | 15,8 |
| Très défavorable | Complexe (> 3 AN) | 6,8 | 5,9 |

AN : anomalies.

Tableau 3. Score pronostique révisé de Greenberg ou IPSS- R [12].

| Valeur pronostique | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|-----------|--------------|-----------|----------|---------------|---------|--------------|
| Cytogénétique | Très bon | - | Bon | - | Intermédiaire | Mauvais | Très mauvais |
| Blastes médullaires | ≤ 2 % | - | 2 %-< 5 % | - | 5 %-10 % | > 10 % | - |
| Hémoglobine | ≥ 10 g/dL | - | 8-10 g/dL | < 8 g/dL | - | - | - |
| Plaquettes | ≥ 100 G/L | 50-< 100 G/L | < 50 G/L | - | - | - | - |
| PNN | ≥ 0,8 G/L | < 0,8 G/L | - | - | - | - | - |

PNN : polynucléaires neutrophiles.

particulier pour les patients présentant un caryotype « normal ».

Le score pronostique est particulièrement pris en compte pour le choix de la stratégie thérapeutique. Ce choix tient compte, outre du score pronostique précédemment défini, de l'âge et de l'état général du patient, du type de SMD et de l'existence d'un donneur potentiel de moelle osseuse pour les patients les plus jeunes [13]. Les patients jeunes, classés en « haut risque » et qui sont en bon état général, sont traités soit de façon intensive (comme des LAM) soit par des médicaments plus novateurs comme les agents déméthylants dont la 5-azacytidine et la décitabine. Les patients classés en « faible risque » qui présentent une délétion du bras long du chromosome 5 peuvent bénéficier, en plus des traitements symptomatiques, d'un traitement immunomodulateur par le lénalidomide seul ou combiné à d'autres chimiothérapies.

Cas particulier des SMD avec délétion 5q

La délétion interstitielle sur le bras long du chromosome 5 est l'anomalie la plus spécifique et l'une des plus fréquentes au sein des SMD. Elle se caractérise par une délétion de taille variable, mais incluant au minimum la région 5q31q32 considérée comme le segment critique nécessaire et suffisant pour l'apparition du « syndrome 5q- ». La recherche des gènes mis en cause par ces délétions, a permis de délimiter une région de délétion minimale commune (RMD) de 1.5-mégabase, située en 5q31-q32, riche en gènes exprimés dans les cellules souches pluripotentes CD34⁺ et les précurseurs myéloïdes [14].

Utilisant une approche fonctionnelle basée sur l'utilisation d'ARN interférence, Ebert *et al.* ont montré en 2008 qu'une perte de fonction partielle de la protéine RPS14 (membre

du complexe protéique de la sous-unité ribosomale 40S) reproduit le phénotype du « syndrome 5q- » dans les cellules CD34⁺ normales [15]. Une des conséquences de la perte de fonction de *RPS14* est un défaut dans la transformation des ARN pré-ribosomiaux, anomalie fonctionnellement équivalente à ce qui est observé dans l'anémie de Blackfan-Diamond. D'autres gènes situés dans la RMD peuvent être impliqués dans le « syndrome 5q- », tel *SPARC* qui code pour une protéine ayant un rôle important dans la régulation de la matrice extracellulaire et dans l'adhésion cellulaire : Lehmann *et al.* ont montré que des souris *SPARC*^{-/-} présentent une thrombopénie et une capacité médullaire de production de colonies érythroïdes (BFU-E) significativement réduite [16]. Récemment, Pellagatti *et al.* ont montré qu'un traitement par lénalinomide *in vitro* induit une up-régulation de *SPARC* et une augmentation d'expression de la protéine dans les érythroblastes, confirmant le rôle potentiel de ce gène dans le syndrome 5q- [17]. L'implication de deux miRNA présents dans la RMD a également été démontrée. Starczynowski *et al.* ont en effet montré que la perte (ou l'haploinsuffisance) des miR-145 et miR-146a (situés à moins de une mégabase de *RPS14*) par knock-down dans des cellules souches hématopoïétiques de souris est responsable de l'apparition d'un phénotype médullaire identique au syndrome 5q- [18]. Enfin, utilisant des techniques d'ingénierie chromosomique avancées, Barlow *et al.* ont généré un modèle murin de syndrome 5q- et montré l'implication de la voie p53 dans le déclenchement de l'apoptose accrue du compartiment cellulaire érythroïde [19]. De plus l'haploinsuffisance de la caséine kinase A1 *CSNK1A1* pourrait expliquer la sensibilité relative des SMD avec del(5q) au lénalidomide.

Bien que l'on ne connaisse pas son mécanisme d'action de façon précise, des études récentes montrent que le lénalidomide, même à faible dose, est capable d'induire une réponse hématologique chez les patients présentant un SMD de faible risque avec délétion 5q isolée. List *et al.*, sur une cohorte initiale de SMD avec délétion 5q, ont pu observer une réponse hématologique, définie par l'indépendance transfusionnelle, dans 2/3 des cas [20]. Cette réponse était accompagnée d'une rémission cytogénétique partielle (diminution de plus la moitié du clone avec 5q-) dans 3/4 des cas et d'une rémission cytogénétique complète (disparition du clone avec délétion 5q-) dans 45 % des cas. Des résultats beaucoup moins spectaculaires ont été observés sur des cohortes de patients présentant des SMD sans del(5q) ou avec del(5q) non isolée ou présentant un excès de blastes [21].

Ces résultats cliniques incitent donc à rechercher une délétion 5q de façon précise (au sein d'un caryotype complexe par exemple) et nécessitent une quantification du clone avec délétion 5q. En cas d'échec ou de caryotype très complexe pouvant masquer la del(5q), l'hybridation *in situ* (FISH)

à l'aide d'une sonde localisée précisément dans la région minimale délétée (ex : *EGR1*) est particulièrement indiquée ; elle permettra d'une part, de mettre en évidence le clone anormal au diagnostic et, d'autre part, de le quantifier lors du suivi en l'absence de méthode de biologie moléculaire ou de cytométrie en flux spécifiques. Cependant, les échecs de caryotype étant rares dans les SMD qui sont caractérisés par des moelles riches, la cytogénétique conventionnelle demeure la technique de choix pour la détection et le suivi du « syndrome 5q- » [22].

Il a été récemment montré que des mutations de *TP53* étaient plus fréquentes dans les SMD avec délétion 5q et pouvaient précéder la transformation leucémique et/ou induire une résistance au traitement [23, 24]. Les mutations de *TP53* ne sont pas systématiquement associées à une délétion de l'autre allèle (détectée en FISH) lorsque la del(5q) est isolée. Par contre dans les caryotypes complexes l'association d'une délétion 17p et d'une mutation de *TP53* est plus fréquente. Elles sont alors associées à une évolution très péjorative [25].

Place de la technique d'hybridation *in situ*

Lorsque le caryotype montre toutes les anomalies chromosomiques de nombre et de structure présentes dans une même cellule, la FISH ne permet d'analyser que les anomalies détectables par la sonde génomique choisie (une sonde fluorescente spécifique de la séquence d'ADN à étudier). La présence de caryotypes complexes n'étant pas rare dès le diagnostic du SMD, la FISH voit son emploi limité car l'utilisation de multiples sondes rendrait cette technique coûteuse et chronophage. Les indications majeures de la FISH sont orientées par le caryotype lui-même (*tableau 4*). Elle permet :

- en cas d'échec du caryotype d'éliminer des anomalies simples de mauvais pronostic sur noyaux interphasiques. L'hybridation peut être réalisée sur culots cytogénétiques ou, à défaut, sur frottis cellulaires. Dans ces situations, l'utilisation des sondes spécifiques des centromères des chromosomes 7 et 8 (CEP7/CEP8) et des sondes génomiques homologues des gènes *EVII* et *TP53* est recommandée par le Groupe francophone des myélodysplasies (GFM) [26]. Pour rappel, en l'absence d'anomalie clonale, on parle d'échec complet du caryotype quand le nombre de mitoses obtenues après cultures est inférieur à 10 et d'échec partiel si l'analyse n'a pu porter que sur 10 à 19 mitoses ;
- de rechercher une anomalie chromosomique non détectée au caryotype mais attendue au vu des résultats de la morphologie (c'est l'exemple des del(5q) cryptiques dans de rares cas de « syndrome 5q- », détectables par les sondes couvrant le gène *EGR1*) ;

Tableau 4. Recommandations du GFCH pour la cytogénétique des syndromes myélodysplasiques : caryotype obligatoire sur moelle.

| Caryotype informatif | Gènes impliqués | Caryotype autre | Échec du caryotype |
|---|---------------------------|---------------------------|---|
| Normal ≥ 20 mitoses Anomalies compatibles avec un SMD | | | (< 20 mitoses sans anomalie clonale) |
| -5/del(5q) | <i>EGR1</i> | Anomalies non spécifiques | Nouvelle tentative de caryotype sur moelle si possible ou caryotype sur sang si fibrose et précurseurs circulants |
| -7/del(7q) | | | |
| i(17q)/t(17p) | <i>TP53</i> | +8 del(20q) | |
| -13/del(13q) | | - Y | |
| del(11q) | <i>ATM/MLL(KMT2A)</i> | ou | |
| del(12p)/t(12p) | <i>ETV6/CDNK1</i> | Anomalies autres | Si nouvel échec : FISH obligatoire : CEP7 (qui peut se combiner avec CEP8 ou 7q) |
| del(9q) | | | |
| idic(X)(q13) | | | |
| t(11;16)(q23;p13) | <i>MLL/CREBBP</i> | | |
| t(3;21)(q26;q22) | <i>RUNX1/MECOM (EVI1)</i> | | |
| inv(3)(q21q26)/t(3;3) | <i>GATA2/MECOM</i> | | |
| t(1;3)(p36;q21) | <i>PRDM16/?PSMD2</i> | | |
| t(2;11)(p21;q23) | miR-125b | | |
| t(6;9)(p23;q34) | <i>DEK-NUP214</i> | | |
| Pas de FISH sauf si doute sur une anomalie ou discordance avec l'aspect cytologique (dysmégacaryopoïèse...) 5q (<i>EGR1</i>), 3q(<i>EVI1</i>), 11q (<i>ATM/MLL</i>)... | | Idem | FISH optionnelle : 5q (<i>EGR1</i>), 3q (<i>EVI1</i>), CEP8, 20q, 17p(<i>TP53</i>)... ou autre en fonction du contexte et des implications thérapeutiques, à discuter au cas par cas |

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence ; GFCH : Groupe francophone de cytogénétique hématologique. Absence de région minimale délétée pour la plupart des délétions en particulier pour 7q et 20q, pas de sonde locus spécifique définie, les sondes commerciales peuvent être prises en défaut. Pour le suivi des SMD le caryotype sur moelle est indispensable pour repérer de nouvelles anomalies en cas d'évolution. En cas de traitement si une anomalie a été détectée au diagnostic, elle pourra être recherchée en FISH en cas d'échec du caryotype

– de fournir une indication quantitative de la taille d'un clone plus sûre que le caryotype puisqu'elle prend en compte toutes les cellules, en cycle ou non, et qu'il est possible d'analyser plusieurs dizaines ou centaines de noyaux interphasiques.

Si le diagnostic des SMD nécessite un prélèvement médullaire initial, les ponctions de moelle répétées lors de suivi des traitements sont parfois mal tolérées par les patients. Lors d'une étude multicentrique internationale, Cherry *et al.* [27] ont montré qu'il était possible de rechercher les anomalies les plus fréquentes des SMD par une combinaison de sondes appropriées. Le panel utilisé comprenait les combinaisons de sondes suivantes *EGR1/D5S721/D5S23* ; *D7S486/D7Z1/1q25* ; *D8Z2/c-MYC* ; *MLL* double-couleur, *ETV6/RUNX1* ; *D13S19/13q34* ; *TP53/D17Z1* ; *D20S108/20qter*. Les résultats de cette étude ont montré que les clones majoritaires pouvaient être détectés dans le sang comme dans la moelle des patients prélevés en parallèle mais en proportion moindre dans le sang, et que les clones minoritaires n'étaient pas toujours détectables. Les

techniques de FISH réalisées sur des cellules CD34 positives purifiées à partir du sang circulant à l'aide de billes magnétiques, sont beaucoup plus performantes et pourraient être utilisées dans le cadre du suivi thérapeutique des patients traités à condition cependant d'avoir un minimum de précurseurs circulants [28] ; néanmoins l'arrivée des techniques de séquençage haut débit laisse peu de place à cette approche pour le suivi des patients.

Intérêt du caryotype moléculaire d'allèles dans la prise en charge des SMD

Devant l'importance de la cytogénétique pour la prise en charge des patients, des techniques plus sensibles réalisées à l'aide de puces à ADN (micro-arrays) ont été développées pour la détection d'anomalies cryptiques se situant en deçà du seuil de l'analyse chromosomique. L'hybridation

génomique comparative sur micro-arrays (CGH-arrays) détecte les pertes et gains de matériel chromosomique de petite taille. Elle est donc particulièrement performante pour les SMD qui présentent une majorité de délétions. Les puces de type single nucléotide polymorphisme (SNP-arrays) permettent de détecter ces pertes d'hétérozygotie (LOH) y compris lorsque celles-ci se présentent sous la forme de disomies uniparentales ((UPD) - présence d'une paire de chromosomes ou de segments de chromosome provenant d'un seul parent dans les cellules diploïdes). Ces UPD ont un rôle potentiellement important dans l'oncogenèse car elles peuvent être porteuses de mutations bi-alléliques de gènes critiques dans le développement de la maladie [29].

LOH et UPD sont fréquents dans les SMD, y compris chez les patients ayant un caryotype normal. Gondek *et al.* ont montré que 78 % des SMD présentaient des anomalies cytogénétiques détectables par l'approche SNP-array versus 59 % par cytogénétique conventionnelle, réduisant à 22 % le nombre de patients sans anomalies génétiques détectables ; 20 % des patients présentaient également des UPD [30]. Dans certaines de ces régions il a ensuite été mis en évidence des mutations de gènes récurrentes dont le rôle dans la pathogénie des hémopathies est maintenant bien établi comme *TET2* en 4q24, *TP53* en 17p13, *EZH2* en 7q36 et c-CBL en 11q23 [31].

Utilisé en complément des techniques de cytogénétique conventionnelle, le caryotype moléculaire permet d'affiner le pronostic des patients [32]. Le groupe des SMD *de novo* à caryotype normal, qui représente environ 50 % des patients au diagnostic, pourrait bénéficier de ces approches.

Intérêt de la technique *multiplex ligation dependant probe amplification*

Les gains et pertes de matériel génétique peuvent être détectés par *multiplex ligation dependant probe amplification* (MLPA). C'est une technique de screening utilisant une PCR multiplex quantitative qui permet d'étudier plusieurs régions d'intérêt du génome après amplification simultanée spécifique, séparation selon la taille des fragments et analyse sur un séquenceur en mode analyse de fragment. Sa sensibilité est faible (le seuil de détection est d'environ 20 %) mais peut être augmentée après un tri CD34 positif des cellules médullaires. Les régions cibles sont choisies dans les régions identifiées comme étant fréquemment modifiées dans les SMD par les techniques de CGH-array et les données de la littérature. Son utilisation est moins fastidieuse et moins onéreuse que la FISH qui nécessite de multiples sondes ; cependant, en raison de sa faible sensibilité son développement est resté limité à un petit nombre de laboratoires [33].

Apport des nouvelles technologies : analyse du transcriptome, séquençage haut débit

Les profils d'expression géniques et les puces détectant les polymorphismes (SNP-arrays) ont montré sur des études unicentriques des données supplémentaires et pronostiques dans les SMD [34]. Le séquençage à haut débit (NGS) met en évidence des mutations somatiques dans la plupart des SMD en particulier dans les SMD à caryotype normal. En 2011 Béjar *et al.* en analysant 111 régions d'intérêt ciblées, ont identifié 18 mutations récurrentes dans une cohorte de 439 SMD, certaines de ces mutations étaient associées à des paramètres déjà établis comme facteurs pronostiques, ainsi les mutations de *RUNX1*, de *TP53* et de *NRAS* étaient plus fréquentes chez les patients présentant une thrombopénie ou un pourcentage élevé de blastes dans la moelle. Dans cette étude, les mutations des gènes *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* et *ASXL1* ont été clairement associées à une survie globale inférieure par rapport aux cas ne présentant pas ces mutations [29].

Des études de tout le génome ou de tout l'exome permettent maintenant de mieux définir le profil génomique des SMD et de définir des sous-groupes pathologiques (*tableau 5*) [35]. Les mutations concernant des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1* et *IDH2*) sont les plus fréquentes et sont mutuellement exclusives. Les mutations touchant les tyrosines kinases *JAK2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* sont elles aussi mutuellement exclusives. Sans avoir un impact pronostique évident sur la survie des patients non traités, elles pourraient avoir un effet sur la réponse au traitement par les agents déméthylants comme l'azacytidine qui est l'un des traitements actuel des SMD [36] ou la décitabine.

Des mutations touchant des gènes codant pour des enzymes impliquées dans les mécanismes de l'épissage ont été récemment identifiées par séquençage de tout l'exome, elles sont également très fréquentes (environ 25 % des cas) et peuvent être associées aux mutations impliquées dans la méthylation. Les mutations touchant le gène *SF3B1* sont particulièrement associées à la présence de sidéroblastes en couronne et à un taux de blastes faible [37]. Les autres gènes sont moins fréquemment mutés, il s'agit principalement des gènes *U2AF35*, *ZRSR2* et *SRSF2*. Bien qu'important pour la compréhension de la physiopathologie des SMD, leur recherche en pratique clinique n'est pas encore définie.

La mutation *JAK2*^{V617F} est fréquente dans les syndromes myéloprolifératifs *BCR-ABL1* négatifs dont elle est un élément diagnostique, elle est trouvée dans des formes frontières de SMD/SMP en particulier dans les anémies réfractaires avec sidéroblastes et thrombocytose [38].

Tableau 5. Principales mutations acquises des syndromes myélodysplasiques [35-39].

| Gène | Fréquence des mutations | Fonction génique | Pronostic |
|-------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>SF3B1</i> | 15-30 % | Épissage | Favorable ? |
| <i>TET2</i> | 15-25 % | Hydroxyméthylation de l'ADN | Neutre |
| <i>ASXL1</i> | 10-20 % | Modification des histones | Défavorable |
| <i>RUNX1</i> | 5-15 % | Facteur de transcription | Défavorable |
| <i>TP53</i> | 5-10 % | Facteur de transcription | Défavorable |
| <i>DNMT3A</i> | 5-10 % | Méthylation de l'ADN | Défavorable ? |
| <i>NRAS, KRAS</i> | 5-10 % | Traduction du signal | Défavorable |
| <i>SRSF2</i> | 5-10 % | Épissage | Défavorable |
| <i>U2AF1</i> | 5-10 % | Épissage | Défavorable (faibles risques) |
| <i>BCOR-L1</i> | 5-6 % | Répression de la transcription | Défavorable |
| <i>ZRSR2</i> | 5 % | Épissage | Neutre ? |
| <i>EZH2</i> | 3-7 % | Modifications des histones | Défavorable |
| <i>ETV6</i> | 3 % | Facteur de transcription | Défavorable |
| <i>JAK2</i> | 3-4 % | Traduction du signal | Favorable ? |
| <i>IDH1, IDH2</i> | 4-5 % | Modification des histones | Défavorable |
| <i>UTX</i> | 1-2 % | Modification des histones | Défavorable |

La présence de mutations dans des sous-clones minoritaires (représentant 1-2 %) détectées par des techniques extrêmement sensibles comme le NGS pose également des problèmes d'interprétation clinique qui doivent être clarifiés dans les années à venir [39]. Une étude récente a mis en évidence le rôle pronostique défavorable des mutations conductrices (*driver*) qu'elles soient à l'état clonal ou sous-clonal, ce qui inciterait à rechercher ces mutations avec des techniques très sensibles.

En dehors des mutations somatiques, les données récentes ont montré que des syndromes dont les manifestations cliniques peuvent être discrètes, tels que ceux liés à des mutations constitutionnelles des gènes *RUNX1*, *GATA2* et *SRP72*, pouvaient prédisposer à la survenue de myélodysplasies ou de LAM, l'acquisition d'une ou plusieurs autres anomalies étant souvent nécessaire pour développer une hémopathie. Il est recommandé de rechercher ces mutations chez les patients jeunes avec monosomie 7 (*GATA2*) ou avec antécédents familiaux de SMD/LAM [40].

Conclusion

Étant donné son rôle clairement établi pour la stratification pronostique, le caryotype demeure un « gold standard » dans la prise en charge des malades et doit être prescrit au diagnostic chez tout patient suspect de SMD. Les techniques FISH complémentaires sont réalisées essentiellement pour rechercher des anomalies spécifiques dans des caryotypes complexes ou en cas d'échecs répétés du caryotype. Cependant devant la grande diversité des anomalies rencontrées dans les SMD, un panel extensif de sondes serait nécessaire ; en pratique seule l'utilisation

de quelques sondes est recommandée par le GFCH et le GFM, les autres indications de sondes restant optionnelles en fonction du contexte clinique. En complément des techniques de cytogénétique conventionnelle, le caryotype moléculaire permet d'affiner le pronostic des patients. Enfin, l'étude du profil mutationnel issu des analyses par séquençage haut débit est riche et prometteuse. Cependant, l'impact des différentes mutations détectées sur la survie, la réponse au traitement et la transformation en leucémie reste à préciser dans les différents sous-groupes de patients.

Remerciements. Les auteurs remercient les docteurs C. Bastard, I. Luquet, M. J. Mozziconacci, B. Poppe, S. Raynaud, F. Speleman pour leur contribution lors de la parution de la première version de ces recommandations (*Pathol Biol (Paris)* 2004 ; 53).

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Mufti GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004 ; 17 : 543-57.
2. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, *et al.* European Leukemia Net. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. *Blood* 2013 ; 122 : 2943-64.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Lee Harris N, *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 ; 114 : 937-51.

4. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of n. 5 chromosome. *Nature* 1974; 251 : 437-8.
5. Maserati E, Aprili F, Vinante F, Locatelli F, Amendola G, Zatterale A, et al. Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20% of cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33 : 93-7.
6. Braun T, de Botton S, Taksin AL, Park S, Beyne-Rauzy O, Coiteux V, et al. Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk Res* 2011; 35 : 863-7.
7. Wiktor AE, Van Dyke DL, Hodnefield JM, Eckel-Passow J, Hanson CA. The significance of isolated Y chromosome loss in bone marrow metaphase cells from males over age 50 years. *Leuk Res* 2011; 35 : 1297-300.
8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89 : 2079-88.
9. Solé F, Luno E, Sanzo C, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90 : 1168-78.
10. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New Comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30 : 820-9.
11. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Dambrosio I, Zapatore R. Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. *Am J Hematol* 2013; 88 : 120-9.
12. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120 : 2454-65.
13. Adès L, Itzykson R, Fenau P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 2014; 6736 : 61901-7.
14. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 2002; 99 : 4638-41.
15. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008; 451 : 335-9.
16. Lehmann S, O'Kelly J, Raynaud S, Funk SE, Sage EH, Koeffler HP. Common deleted genes in the 5q- syndrome: thrombocytopenia and reduced erythroid colony formation in SPARC null mice. *Leukemia* 2007; 21 : 1931-6.
17. Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, Cattani H, Christensson B, Emanuelsson EK, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 : 11406-11.
18. Starczynowski D, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* 2010; 16 : 49-58.
19. Barlow J, Drynan L, Hewett D, Homes L, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 2010; 16 : 59-66.
20. List A, Dewald G, Bennet J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Myelodysplastic syndrome-003 Study investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355 : 1456-65.
21. List AF, Bennett JM, Sekeres MA, Skikne B, Fu T, Shammo JM, et al. Extended survival and reduced risk of AML progression in erythroid-responsive lenalidomide-treated patients with lower-risk del(5q) MDS. *Leukemia* 2014; 28 : 1033-40.
22. Zou YS, Fink SR, Stockero KJ, Paternoster SF, Smoley SA, Tun HW, et al. Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for EGR1 to detect deletion 5q in hematological disorders and to assess response to treatment with lenalidomide. *Leuk Res* 2007; 31 : 1185-9.
23. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol* 2011; 29 : 1971-9.
24. Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, Mozziconacci MJ, Penther D, Döbelstein S, et al. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51 : 1086-92.
25. Mallo M, Del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoiz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol* 2013; 162 : 74-86.
26. Fenau P, Ades L, Fontenay M, Raynaud S, Eclache V, Rose C, et al. Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) et la leucémie myéomonocytaire chronique: diagnostic, classification et traitement. Mise à jour 2015 par le Groupe francophone des myéodysplasies (GFM). *Hématologie* 2015; 21 : 28-45.
27. Cherry AM, Slovak ML, Campbell LJ, Chun K, Eclache V, Haase D, et al. Will a peripheral blood (PB) sample yield the same diagnostic and prognostic cytogenetic data as the concomitant bone marrow (BM) in myelodysplasia? *Leuk Res* 2012; 36 : 832-40.
28. Bräulke F, Jung K, Schanz J, Götze K, Müller-Thomas C, Platzbecker U, et al. Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes: first results from a prospective multicenter German diagnostic study. *Leuk Res* 2013; 37 : 900-6.
29. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; 364 : 2496-506.
30. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; 111 : 1534-42.
31. Cluzeau T, Moreilhon C, Mounier N, Karsenti JM, Gastaud L, Garnier G, et al. Total genomic alteration as measured by SNP-array-based molecular karyotyping is predictive of overall survival in a cohort of MDS or AML patients treated with azacitidine. *Blood Cancer J* 2013; 3 : e155.
32. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 2011; 117 : 4552-60.
33. Stamatoullas A, Waultier A, Jardin F, Callat MP, Parmentier F, Burgot C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the detection of genomic copy number changes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2012; 36 : e93-7.
34. Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbrales E, et al. Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with

unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes Chromosomes Cancer* 2013 ; 52 : 1167-77.

35. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, *et al.* Chronic myeloid disorders working group of the International cancer genome consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013 ; 122 : 3616-27.

36. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, *et al.* Groupe francophone des myélodysplasies (GFM). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2011 ; 25 : 1147-52.

37. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, *et al.* Groupe francophone des myélodysplasies.

Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012 ; 119 : 3211-8.

38. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, *et al.* Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006 ; 108 : 2173-81.

39. Bejar R, Abdel-Wahab O. The importance of subclonal genetic events in MDS. *Blood* 2013 ; 122 : 3550-1.

40. Babushok DV, Bessler M. Genetic predisposition syndromes: when should they be considered in the work-up of MDS ? *Best Pract Res Clin Haematol* 2015 ; 28 : 55-68.