



HAL
open science

Apport clinique du NGS appliqué aux hémopathies myéloïdes au CHU de Clermont-Ferrand

William Bombardier

► **To cite this version:**

William Bombardier. Apport clinique du NGS appliqué aux hémopathies myéloïdes au CHU de Clermont-Ferrand. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-04089986

HAL Id: dumas-04089986

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04089986v1>

Submitted on 5 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE D'EXERCICE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

SPECIALITE : BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement

le : **25 septembre 2020**

par **William BOMBARDIER**

**Apport clinique du NGS appliqué
aux hémopathies myéloïdes
au CHU de Clermont-Ferrand**

Directeur de thèse : Monsieur Marc BERGER, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, service d'Hématologie Biologique, UFR de Médecine et des Professions Paramédicales de Clermont-Ferrand

Jury :

Présidente :

Madame Valérie LIVRELLI

Professeur des Universités, Praticien attaché, service de Parasitologie-Mycologie, UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres :

Monsieur Olivier TOURNILHAC

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, service d'Hématologie Clinique, UFR de Médecine et des Professions Paramédicales

Madame Céline BOURGNE

Ingénieur Biologiste Hospitalier, Service d'Hématologie Biologique

Monsieur Benjamin LEBECQUE

Assistant Hospitalo-Universitaire, service d'Hématologie Biologique, UFR de Médecine et des Professions Paramédicales



PROFESSEURS des UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS(HDR)

Mme SAUTOU Valérie (pharmacien)

M. WALRAND Stéphane

PROFESSEURS des UNIVERSITES (HDR)

Mme ALRIC Monique

Mme BARTHOMEUF Chantal (pharmacien)

M. BEYSSAC Eric (pharmacien)

Mme CALDEFIE-CHEZET Florence (pharmacien)

M. CARDOT Jean-Michel (pharmacien)

M. CHAVIGNON Olivier

M. CHEZAL Jean-Michel

M. COUDERT Pascal (pharmacien)

Mme COURTEIX Christine

Mme FORESTIER Christiane (pharmacien)

M. GAUMET Vincent

Mme GUEIRARD Pascale (pharmacien)

Mme LIVRELLI Valérie (pharmacien)

M. MAUNIT Benoît

Mme RANCHON-COLE Isabelle (pharmacien)

Mme SAUVANT-ROCHAT Marie-Pierre (pharmacien)

Mme TERRAIL Laurence (pharmacien)

Mme VENNAT Brigitte (pharmacien)

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBA DELGADO Cristina

Mme ARCHIMBAUD Christine (pharmacien)

M. AUZELOUX Philippe (pharmacien)

M. BALAYSSAC David (HDR) (pharmacien)

M. BALESTRINO Damien (HDR)

Mme BEGOU Melina (pharmacien)

Mme BLANQUET-DIOT Stéphanie (HDR)

M. BONNET Jean-Louis

Mme BOYER Anne (pharmacien)

M. CIA David

Mme CIVIALE Marie-Ange (HDR) (pharmacien)

M. CLUZEL Jacques (HDR)

Mme COLLIN Aurore (pharmacien)

Mme COUDERT Catherine (HDR) (pharmacien)

M. DEBITON Eric

Mme DECOMBAT Caroline (pharmacien)

Mme DELORT Laetitia (HDR)

M. DOLY Stéphane

Mme FARGES Marie-Chantal

Mme FELGINES Catherine (HDR) (pharmacien)

Mme GALMIER Marie-Josèphe (HDR) (pharmacien)

M. GARRAIT Ghislain (HDR)

M. GONCALVES-MENDES Nicolas

Mme HENNEQUIN-ROBIN Claire (pharmacien)

Mme LAINE Emmanuelle

Mme MAISONIAL Aurélie

M. MALLET Christophe

Mme MIQUEL Sylvie

M. MOREAU Emmanuel (HDR)

Mme PEYRODE Caroline (pharmacien)

Mme QUINTANA DA INES Mercedes

M. ROMOND Pierre-Charles (pharmacien)

M. ROSSARY Adrien (HDR) (pharmacien)

M. ROUZAIRE Paul (pharmacien)

Mme SAPIN Anne-Françoise (pharmacien)

Mme SAVANOVITCH Chantal

M. SENEJOUX François (pharmacien)

M. SION Benoit (pharmacien)

M. TALVAS Jérémie

Mme TY Nancy (pharmacien)

Mme VAREILLE Marjolaine

Mme VIVIER Magali (pharmacien)

Mme WEBER Valérie

M. WERSINGER Eric

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIES

Mme BEDHOMME Sabrina (pharmacien)

Mme BERNARD Lise (pharmacien)

Mme VAN LANDER Axelle

Mme LAFARGE Elodie (pharmacien)

Mme PESTRE Odile (pharmacien)

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M. CHENNEL Philip (pharmacien)

Mise à jour : 09/05/2019



UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

**PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE D'AUVERGNE**

: JOYON Louis
: DOLY Michel
: TURPIN Dominique
: VEYRE Annie
: DULBECCO Philippe
: ESCHALIER Alain

**PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

: CABANES Pierre
: FONTAINE Jacques
: BOUTIN Christian
: MONTEIL Jean-Marc
: ODOUARD Albert
: LAVIGNOTTE Nadine

**PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT
VICE-PRESIDENT DU CONSEIL D'ADMINISTRATION
VICE-PRESIDENT DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE
VICE PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA
FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES**

: BERNARD Mathias
: DEQUIEDT Vianney
: WILLIAMS Benjamin
: HENRARD Pierre
: PEYRARD Françoise
: PAQUIS François



UFR DE MEDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES

: DETEIX Patrice
: CHAZAL Jean

**DOYEN
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE**

: CLAVELOU Pierre
: ROBERT Gaëlle

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BOUCHER Daniel - BOURGES Michel - BUSSIÈRE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATLINA Pierre - CHABANNES Jacques - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DAUPLAT Jacques - DECHELOTTE Pierre - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - GLANDDIER Gérard - Mme GLANDDIER Phyllis - M. JACQUETIN Bernard - Mme LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LESOURD Bruno - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MALPUECH Georges - MARCHEIX Jean-Claude - MICHEL Jean-Luc - MOLINA Claude - MONDIE Jean-Michel - PERI Georges - PETIT Georges - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFLER Pierre - SIROT Jacques - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Me VEYRE Annie

PROFESSEURS EMERITES :

MM. - BEYTOUT Jean - BOITEUX Jean-Paul - BOMMELAER Gilles - CHAMOIX Alain - DETEIX Patrice - DUBRAY Claude - ESCHALIER Alain - IRTHUM Bernard - KEMENY Jean-Louis - LABBE André - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LUSSON Jean-René - RIBAL Jean-Pierre

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

PROFESSEURS DE CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M. AUMAITRE Olivier	Médecine Interne
M. LABBE André	Pédiatrie
M. AVAN Paul	Biophysique et Traitement de l'Image
M. DURIF Franck	Neurologie
M. BOIRE Jean-Yves	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M. POULY Jean-Luc	Gynécologie et Obstétrique
M. CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme PENAULT-LLORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. BAZIN Jean-Etienne	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
M. BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M. BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M. CLAVELOU Pierre	Neurologie
M. DUBRAY Claude	Pharmacologie Clinique

M.	GILAIN Laurent	O.R.L.
M.	LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M.	CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	DAPOIGNY Michel	Gastro-Entérologie
M.	LLORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes
M.	PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M.	SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale
M.	BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme	DUCLOS Martine	Physiologie
M.	SCHMIDT Jeannot	Thérapeutique
M.	BERGER Marc	Hématologie
M.	GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M.	ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M.	SOUBRIER Martin	Rhumatologie

PROFESSEURS DE
1ère CLASSE

M.	CAILLAUD Denis	Pneumo-phtisiologie
M.	VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M.	CITRON Bernard	Cardiologie et Maladies Vasculaires
M.	D'INCAN Michel	Dermatologie - Vénérologie
Mme	JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
Mlle	BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M.	GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M.	TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M.	MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	RICHARD Ruddy	Physiologie
M.	RUIVARD Marc	Médecine Interne
M.	SAPIN Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M.	COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme	GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	ABERGEL Armando	Hépatologie
M.	LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M.	CHIAMBARETTA Frédéric	Ophthalmologie
M.	FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M.	GUY Laurent	Urologie
M.	TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M.	ANDRE Marc	Médecine Interne
M.	BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M.	CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	COSTES Frédéric	Physiologie
M.	FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme	HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M.	MOTREFF Pascal	Cardiologie
Mme	PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique
M.	RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique

**PROFESSEURS DE
2ème CLASSE**

Mme CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie
M. TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie
M. CORNELIS François	Génétique
M. DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale
M. CANAVESE Federico	Chirurgie Infantile
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
M. AZARNOUSH Kasra	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
Mme HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M. ESCHALIER Romain	Cardiologie
M. MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M. DURANDO Xavier	Cancérologie
M. DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme FANTINI Maria Livia	Neurologie
M. SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M. BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M. GUEZE Romain	Hématologie
M. POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M. SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie
M. EVRARD Bertrand	Immunologie
M. POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. CLEMENT Gilles	Médecine Générale
Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
M. VORILHON Philippe	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M. CAMBON Benoît	Médecine Générale
M. TANGUY Gilles	Médecine Générale

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

**MAITRES DE CONFERENCES
HORS CLASSE**

Mme CHAMBON Martine	Bactériologie Virologie
Mme BOUTELOUP Corinne	Nutrition

**MAITRES DE CONFERENCES DE
1ère CLASSE**

M. MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mlle GOUMY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Mme FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mlle GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. ROBIN Frédéric	Bactériologie
Mlle VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. DELMAS Julien	Bactériologie
Mlle MIRAND Audrey	Bactériologie Virologie
M. OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mlle COSTE Karen	Pédiatrie
Mlle AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
Mme CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LEBRETON Aurélien	Hématologie
M. BUISSON Anthony	Gastroentérologie

**MAITRES DE CONFERENCES DE
2ème CLASSE**

Mme PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
M. BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. COLL Guillaume	Neurochirurgie
Mme SARRET Catherine	Pédiatrie
M. MAQDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme VAURS-BARRIERE Catherine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. BAILLY Jean-Luc	Bactériologie Virologie
Mlle AUBEL Corinne	Oncologie Moléculaire
M. BLANCHON Loïc	Biochimie Biologie Moléculaire
Mlle GUILLET Christelle	Nutrition Humaine
M. BIDET Yannick	Oncogénétique
M. MARCHAND Fabien	Pharmacologie Médicale
M. DALMASSO Guillaume	Bactériologie
M. SOLER Cédric	Biochimie Biologie Moléculaire
M. GIRAUDET Fabrice	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène	Médecine Générale
Mme LAPORTE Catherine	Médecine Générale
M. LOLIGNIER Stéphane	Neurosciences – Neuropharmacologie
Mme MARTEIL Gaëlle	Biologie de la Reproduction
M. PINEL Alexandre	Nutrition Humaine
M. PIZON Frank	Santé Publique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES

M. BERNARD Pierre	Médecine Générale
Mme ESCHALIER Bénédicte	Médecine Générale
Mme RICHARD Amélie	Médecine Générale
M. TESSIERES Frédéric	Médecine Générale

Remerciements

Aux membres de mon jury de thèse.

Madame la Professeure Valérie Livrelli, Présidente du jury,

Mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je te remercie pour tous les vendredis passés à tes côtés dans la joie et la bonne humeur de la Parasitologie ! Merci d'avoir accepté d'être ma présidente de jury à 3 semaines de la thèse (les joies de la réforme !). Je te prie de croire en l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Olivier Tournilhac,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'y apporter votre expertise clinique, veuillez accepter l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Benjamin Lebecque,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. J'espère que cette première thèse en tant que jury se déroulera pour le mieux pour toi. Merci pour ta disponibilité et tous tes conseils durant cette dernière année, de la mise en place du tableau pour le recueil de données à la relecture de ma thèse, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Madame la Docteur Céline Bourgne,

Je te remercie de m'avoir fait découvrir le vaste monde de la biologie moléculaire, de mon projet lors de mon premier stage en Hématologie à mon sujet de thèse. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité et surtout le temps passé à m'expliquer les spécificités du NGS. Enfin, je te suis très reconnaissant pour toutes les relectures que tu as effectuées pour arriver à un tel résultat. Je suis très heureux de ta présence dans ce jury.

Monsieur le Professeur Marc Berger, Directeur de thèse,

Je vous remercie de m'avoir proposé ce projet et de m'avoir accordé votre pleine confiance tout au long de ce travail. Vous ne m'avez que très peu mis la pression sur la réalisation du manuscrit, quand bien même rien n'était près fin juillet. Je vous remercie pour votre accompagnement et d'avoir été disponible à chaque fois que j'en avais besoin. Je vous prie de bien recevoir toute ma gratitude et mon profond respect.

A tous ceux qui ont participé.

Madame Fanny Moumouni, Madame Isabelle Maubert et Monsieur Bertrand Maubert, je vous remercie d'avoir pris de votre temps afin de m'apporter des données manquantes à mon travail. Grâce à vous, mon recueil a pu être complet.

Monsieur Bruno Pereira, un grand merci pour ton expertise statistique ainsi de ton intérêt pour mon sujet de thèse. Je te suis reconnaissant pour tous tes conseils.

A l'équipe de techniciens de Montluçon et à Sébastien, merci pour votre accueil et votre gentillesse pendant mon stage avec vous.

Aux biologistes de Montluçon, je vous suis très reconnaissant de m'avoir permis d'avancer ce travail pendant ce semestre passé à vos côtés malgré des conditions inédites.

A Thomas, merci de m'avoir expliqué et montré pleins de petits *tips* lors de ma venue à Montluçon. Merci pour tous tes conseils.

A Hélène, merci d'avoir partagé ton bureau avec moi et d'avoir pris du temps pour m'initier à l'Immuno-Hématologie. J'espère que le radiateur sera efficace pour cet hiver !!!

A Valérie, merci pour ta bonne humeur constante et de m'avoir fait re-découvrir la Biochimie sous un autre angle.

A Sophie, merci pour ton encadrement, ton professionnalisme, ta disponibilité et ta gentillesse au quotidien. Merci d'avoir pris le temps de réfléchir sur mon travail de thèse.

Aux techniciens et biologistes du CHU de Clermont et plus particulièrement ceux en Hématologie, merci de votre disponibilité et de votre aide qui était toujours la bienvenue pour moi. Aux biologistes de cytologie (Gabrielle, Marie-Ange, Nathalie et Louis-Thomas), merci pour votre formation et votre bonne humeur au microscope.

A tous les techniciens de Biologie Moléculaire (Nathalie, Anaïs et Anna et Esteban), et plus particulièrement Esteban, qui a dû répondre à toutes mes questions pendant ces manips, merci pour votre accueil et votre disponibilité.

A mes co-internes de mon stage actuel, Nadia la grande clinicienne, Elise et les boites de nuit perdus, Emeline la grande féministe, Mourad aka MouMou et Gauthier le breton occidental, merci de m'avoir permis de prendre du temps sur le stage pour avancer ma thèse et de m'avoir ménagé en tant que seul niveau 2.

A mes amis,

A mes amis clermontois,

A mes co-internes clermontois qui ont partagé un stage ou un bureau avec moi pendant ces années d'internat, merci pour les bons moments passés ensemble, les parties de baby, les sorties avec l'asso, les soirées au 2B, les ragots de stage (dédicace à Laurie là-dessus !), ...

A Pauline et Marion, merci d'avoir rendu ce DIU plus agréable malgré les lymphomes T ! On a quand même fait du pays et trouver de bons petits resto !

A Audrey, Marie-lyne, PL et Ruby, merci de m'avoir accueilli dans votre famille et de m'avoir fait aimer la Lozère, non je rigole !!! Il pleut et ça caille tout le temps !

A Lucie, Samy, Claudel et Vincent, merci pour tous ces bons moments passés avec vous, trop de souvenirs pour n'en citer qu'un ou deux ! L'internat n'aurait pas eu la même saveur sans vous, on s'est vraiment bien marré et ce n'est pas fini !! Si je dois résumer en une phrase notre internat ensemble : « on n'est pas payé chère mais on rigole » !

A mes amis lyonnais,

A Mariette, merci pour toutes ces années d'étude en pharma passées à tes côtés dans la joie et la bonne humeur !! Merci d'avoir été le meilleur binôme possible pour les TP et d'avoir vu avant tout le monde mon Parkinson débutant, lol !! Tu m'as tiré vers le haut pendant toutes ces années, je t'en suis très reconnaissant !

A Baptiste (#Guy) et Romain (#Guy), mes deux acolytes de soirées et de déconnade à Lyon, merci pour tous ces fous-rire et toutes ces actions improbables qu'on s'est tapé pendant nos études !! A tous nos voyages passés ensemble et aux futurs qui nous attendent !!

A mes amis d'enfance,

A tous mes amis du fameux Collège et Lycée du Bugey, Justine, Baptiste, Portos, Caro, Smoker, Vincent D, Granger, Schmitt, ... Merci pour tous ces bons souvenirs et ces bons moments partagés ensemble.

A Val, merci pour toutes ces années vécues ensemble chez JM du 69 !! On était plus que calé dans notre appart à Mermoz City avec les voitures qui brulaient, Bachir qui se faisait défoncer par sa mère et JM qui ramenait que le pain ! Je n'oublie pas, bien sur, toutes les soirées devant Top chef et sur Halo à essayer de finir le jeu en mode hardcore !! Que des bons moments !!

A Vincent et Pierre-Louis, mes deux frères de l'école primaire, mes deux pagu du Bugey Gud !! Beaucoup, mais alors beaucoup trop, de souvenirs et de bons moments passés avec vous ! Une thèse ne suffirait pas pour raconter toutes nos aventures de l'école primaire de Contrev' City (à la péniche, au théâtre, au city stad, à la cascade), en passant par le Collège (avec les parachutes, les : « arrache tes yeux, baisse les mains », les pseudo-bastons de PL, les premières soirées), le Lycée (la suite des soirées, les sorties lacs, l'Ardèche) et maintenant avec vos voyages annuels à Clermont pour faire de la rando dans le brouillard, la pluie et le froid ! On aime ça vin dieu ! Merci d'avoir été à mes côtés pour tous ces bons souvenirs et je n'oublie pas le grand voyage aux States qu'on a planifié ensemble il y a maintenant de ça une bonne quinzaine d'années !!

A ma famille,

A mes grands-parents, mémé Dédé, mémé Julia et pépé Guste, merci pour toutes vos histoires racontées du temps de votre jeunesse, de tous les fous-rire lors des repas de famille à Noël ou au jour de l'An mais surtout, merci de votre soutien sans faille.

A mes tantes et oncles, Marie-Line, Françoise, Frédéric et Alain, merci pour tous ces bons moments passés ensemble et surtout de votre hospitalité en tous temps, pour m'accueillir avec mon frère, pour venir s'éclater avec les cousins ! On s'est toujours senti comme chez nous !

A ma cousine et mes cousins, Clara, Quentin et Fabrice, à tous nos souvenirs chez les grands-parents avec toutes les conneries qui les accompagnent, des déguisements pour Noël aux parties de tennis en plein cagnard ! C'est toujours un bonheur de se voir chaque année en vacances ou au repas de famille et je n'échangerai pour rien au monde tous ces moments !

A mes parents, Sylvie et Walter, merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir tout fait pour ma réussite ! Vous êtes les meilleurs parents qu'un fils pourrait avoir et je suis fier d'être votre fils ! Merci pour votre éducation et les valeurs que vous nous avez inculquées, on sait d'où on vient et on ne doit à personne d'autre que nous même notre réussite ! Merci pour tous ces beaux voyages et tous ces grands moments de vie partagés ensemble avec Greg ! Cette thèse est également la vôtre, je vous la dédie. Je vous aime de tous mon cœur !

A mon frère, Greg, je suis si fière de toi ! Je suis tellement heureux d'avoir un frère comme toi, on partage tellement de choses ensemble même si on a pas du tout les mêmes caractères (essaye quand même de t'améliorer à la pétanque, j'aimerai bien essayer le nouveau râteau). Sache que je serai toujours à tes côtés dans n'importe quelle situation et que je crois dur comme fer en toi ! Je t'aime fort !

A mon petit cœur, Maïlys, merci de faire partie de ma vie depuis un petit moment maintenant et de m'avoir encouragé et poussé quand cela était nécessaire dans ce travail ! Merci de ta bonne humeur au quotidien, de tes petits pétages de cable à l'appartement pour rien, de tes tics et tocs réguliers, d'être toi-même au naturel au final ! Je suis si heureux d'être à tes côtés et de partager tous ces moments de sports, de jeu, de balade et de vie avec toi en Lozère, chez moi ou en voyage. A nos futurs voyages et grands moments de vie qui nous attendent ensemble ! Je t'aime très très très fort !!!

Fin des remerciements et comme on dit chez moi : RI-DEAU !

Liste des abréviations

- A : Autre pathologie
- AITL : Lymphome T Angio-Immunoblastique
- ATRA : Acide Tout Trans-Rétinoïque
- CD : Cluster de Différenciation
- CHIP : *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
- CMF : Cytométrie en Flux
- CPSS : *CMML-specific Prognostic Scoring System*
- CPSS-Mol : *new CMML-specific Prognostic Scoring System*
- ddPCR : *droplet digital Polymerase Chain Reaction*
- DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules
- DTA : DNMT3A, TET2 et ASXL1
- ELN : *European Leukemia Net*
- FAB : *French-American-British*
- FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*
- GHT : Groupement Hospitalier de Territoire
- GIPSS : *Genetically Inspired Prognostic Scoring System*
- HC : Hématopoïèse Clonale
- HIF : *Hypoxia Inductible Factor*
- IPPS-R : *International Prognostic Scoring System Revised*
- IPSS : *International Prognostic Scoring System*
- ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
- LA : Leucémie Aiguë
- LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
- LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
- LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
- LMCa : Leucémie Myéloïde Chronique atypique
- LMMC : Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique
- LZM : Lymphome de la Zone Marginale

- MFI : MyéloFibrose Idiopathique
- MIPSS : *Mutation and Karyotype enhanced International Prognostic Scoring System*
- MRD : Maladie Résiduelle
- NFS : Numération Formule Sanguine
- NGS : *Next-Generations Sequencing*
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- PCTL NOS : Lymphome T Périphérique sans signification
- PNB : Polynucléaire Basophile
- PNE : Polynucléaire Eosinophile
- PNN : Polynucléaire Neutrophile
- PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique
- RuBIH-2 : Réseau de Biologie Innovatrice en onco-Hématologie
- SF : Syndrome Frontière
- SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique
- SMD EB : Syndrome Myélo-Dysplasique avec Excès de Blastes
- SMD MLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie multilignée
- SMD RS SLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie unilignée et excès de sidéroblastes de couronne
- SMD RS MLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie multilignée avec excès de sidéroblastes de couronne
- SMD SLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie unilignée
- SMD/SMP RS T : Syndrome Myélo-Dysplasique/ Myélo-Prolifératif avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose
- SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif
- TE : Thrombocytémie Essentielle
- VAF : *Variant Allele Frequency*
- WES : *Whole-Exome Sequencing*

Introduction bibliographique.....	1
I. Hémopathies malignes : généralités.....	2
II. Méthodes diagnostiques des hémopathies myéloïdes	3
III. Apport du séquençage haut débit dans la prise en charge des hémopathies myéloïdes	5
Objectifs de l'étude	8
Matériel et Méthodes	9
I. Population étudiée	10
II. Analyse Next Generation Sequencing (NGS).....	11
1. Préparation des échantillons	11
2. Préparation des bibliothèques d'ADN	11
3. Etape de capture des fragments d'intérêt.....	12
4. Amplification par pont.....	12
5. Séquençage par synthèse nucléotidique.....	13
6. Analyse des données et validation technico-biologique	13
III. Recueil et méthode d'analyse des données par le clinicien	15
1. Classification initiale des demandes NGS	15
2. Données clinico-biologiques recueillies	15
3. Classification de l'apport clinico-biologique du NGS.....	16
4. Méthode d'analyse de la concordance des conclusions du NGS par rapport au diagnostic final retenu	17
5. Analyse statistique.....	18
Résultats.....	19
I. Caractéristiques initiales de la cohorte	20
II. Résultats de l'analyse NGS.....	21
1. Cohorte globale	21
2. Groupe Syndrome Myélo-Prolifératif (SMP)	22
3. Groupe Syndrome Myélo-Dysplasique (SMD)	23
4. Groupe Syndrome Frontière (SF)	23
5. Groupe Autre diagnostic (A)	25
6. Groupe Leucémie Aiguë (LA).....	25
7. Relation entre l'indication du NGS et le diagnostic retenu final	27
III. Analyse de l'apport clinico-biologique du NGS.....	28
IV. Analyse de la concordance des conclusions	29
Discussion.....	31
Conclusion	40
Références bibliographiques	42
Annexes	53

Introduction bibliographique

I. Hémopathies malignes : généralités

Le cancer est une cause majeure de décès qui représente 13% de la mortalité mondiale (1). Dans la dernière Enquête Nationale d'Incidence des Cancers de 2019, toutes localisations confondues, le nombre de nouveaux cas de cancers est estimé à 382 000 par an (204 600 chez l'homme et 177 400 chez la femme) (2). Parmi eux, les hémopathies malignes représentent 12% des diagnostics de cancers, soit 45 000 nouveaux cas/an (25 000 chez l'homme et 20 000 chez la femme) (2). Une tendance à l'augmentation de l'incidence des hémopathies malignes a été observée ces dernières années, tous âges et sexes confondus.

Une hémopathie maligne est caractérisée par une prolifération clonale de cellules hématopoïétiques transformées par un processus d'oncogénèse. On distingue des pathologies aiguës, caractérisées par un blocage de la différenciation cellulaire, et chroniques, avec un maintien de cette différenciation. Environ deux tiers des hémopathies touchent la lignée lymphoïde, parmi lesquelles le myélome multiple (5442 nouveaux cas/an), le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL) (5071 nouveaux cas/an) et la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) (4674 nouveaux cas/an) sont les plus représentés (2). Les pathologies lymphoïdes ne seront pas abordées dans ce travail de thèse. Concernant les hémopathies affectant la lignée myéloïde, les pathologies chroniques les plus fréquentes sont les Syndromes Myélo-Dysplasiques (SMD), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et les Syndromes Frontières (SF) avec, respectivement, 4735, 2057 et 1439 nouveaux cas/an. Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), hors leucémie aigüe promyélocytaire, représentent 3428 nouveaux cas/an et une évolution moyenne constante de plus d'1%/an de l'incidence des LAM est observée sur la période 1990/2018.

Les progrès réalisés dans le diagnostic, le traitement, et le suivi des patients, ont permis d'observer une tendance à l'amélioration de la survie à 5 ans pour toutes les hémopathies malignes et tous sexes confondus (3). Cette amélioration globale reste néanmoins variable en fonction des pathologies considérées. En effet, les patients atteints de Syndromes Frontières (SF) et les LAM présentent encore aujourd'hui une survie à 5 ans inférieure à 33%. De façon générale, et comme observé pour les cancers solides, la survie en cas de survenue d'une hémopathie maligne chez une personne âgée est diminuée. Au niveau national, la survie globale des hémopathies malignes est bien meilleure qu'au niveau européen, ce qui peut s'expliquer par une meilleure prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique (thérapies innovantes) de ces pathologies par rapport aux autres pays (4).

II. Méthodes diagnostiques des hémopathies myéloïdes

Historiquement, le diagnostic des hémopathies myéloïdes reposait sur l'aspect des cellules, ce qui a permis la création de classifications basées sur la morphologie cellulaire. Les classifications *French-American-British* (FAB) ont été les premières classifications mises en place pour les SMD (5) et pour les LAM (6). En complément de ces examens cytologiques, des analyses cytochimiques (coloration de Perls) et biologiques (dosage vitaminique (7), bilan immunologique, bilan infectieux, EPO (8)) ont également été utilisées.

Les techniques cytogénétiques (caryotype et *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH)) ont ensuite permis une amélioration des connaissances concernant la physiopathologie des hémopathies myéloïdes. Par exemple, la translocation t(9 ;22), accompagnée du transcrite de fusion BCR-ABL1, a permis de simplifier le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (9,10). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a alors intégré les découvertes faites au niveau cytogénétique pour la création de l'entité « LAM avec translocations cytogénétiques récurrentes » comprenant les LAM avec translocations t(8 ;21), les LAM t(15 ;17), les LAM avec inversion du 16 et les LAM avec anomalies du 11q23 (11). Puis l'évolution des techniques, et notamment, la détection de marqueurs moléculaires ciblés, a permis d'affiner la classification des hémopathies myéloïdes. Ainsi, en 2017, une actualisation de la classification OMS 2008 est effectuée avec l'ajout d'autres anomalies cytogénétiques récurrentes ainsi que la création d'entité provisoire liée à la présence de mutations sur les gènes *NPM1* et *CEBPA* (11).

Outre ses conséquences au niveau diagnostique, l'identification de marqueurs moléculaires a également permis la mise en place de scores pronostiques. Ainsi, la recherche de mutations sur certains gènes comme *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* s'ajoute à des anomalies détectables au caryotype pour les LAM dans le score *European Leukemia Net* (ELN) de 2010 (12). Concernant les SMD *de novo*, l'*International Prognostic Scoring System* (IPSS) est publié en 1997 et a permis de prédire le risque d'acutisation en leucémie aiguë en prenant en compte la présence de cytopénies, le taux de blastes au niveau médullaire et la présence, au niveau du caryotype, d'anomalies pouvant toucher les chromosomes 5, 7, 8, 20 ou le chromosome sexuel Y (13). Ce score a été révisé en 2012 afin d'ajouter des catégories tant au niveau cytologique que cytogénétique (14). Ces deux scores font référence de nos jours au niveau clinique. Les Syndromes Frontières (SF) ont également bénéficié de l'apport de la cytogénétique et plus particulièrement la Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique (LMMC) avec la création d'un score pronostique comportant la présence d'anomalies cytogénétiques touchant notamment les

chromosomes 7 ou 8, en plus des taux de blastes sanguins et médullaires, de la concentration en leucocytes et de la dépendance transfusionnelle (15).

Par ailleurs, la mise en évidence de ces anomalies moléculaires a donné la possibilité de développer des traitements ciblés. Les Inhibiteurs des Tyrosines Kinases (ITK), l'Acide Tout Trans-Rétinoïque (ATRA) et la midostaurine (Rydapt®) en sont les exemples les plus connus pour la Leucémie Myéloïde Chronique (16), la LAM promyélocytaire (17) et les LAM ayant une mutation sur le gène *FLT3* (18), respectivement.

Une amélioration du suivi des patients a également été possible grâce à ces avancées techniques en quantifiant par exemple les transcrits de fusion BCR-ABL (19) ou les transcrits *NPM1* (20), permettant une évaluation précise de la Maladie Résiduelle (MRD).

Cependant, toutes les hémopathies ne sont pas concernées par ces anomalies. Par exemple, aucune anomalie chromosomique récurrente n'est identifiée chez 50% des patients atteints de SMD (21,22), ce qui limite l'utilité de la cytogénétique pour ce type de pathologie. L'apparition de la Cytométrie en Flux (CMF) multiparamétrique a permis l'étude des marqueurs protéiques exprimés à la surface des cellules. De nombreuses anomalies immunophénotypiques ont ainsi été décrites dans les SMD (23–25), offrant de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie. De nouvelles recommandations diagnostiques ont ainsi pu être émises (26) et le score pronostique *International Prognostic Scoring System-Revised* (IPSS-R) a pu être affiné avec la création de nouveaux sous-groupes (27).

Malgré toutes ces évolutions, des impasses diagnostiques persistent. L'amélioration des connaissances a permis le développement de nouveaux outils moléculaires basés sur l'amplification génique *in vitro* (28). De plus en plus de mutations récurrentes au sein de gènes cibles ont alors pu être identifiées et reliées à des pathologies. Ainsi, le diagnostic des Syndromes Myélo-Prolifératifs (SMP) a pu être associé à la présence de la mutation *JAK2* V617F (29–31) mais également à des mutations sur l'exon 12 du gène *JAK2* (32), l'exon 10 du gène *MPL* (33) ou l'exon 9 du gène *CALR* (34–36). En plus d'un rôle diagnostique, ces nouvelles cibles sont utilisées dans le suivi de patients. Le transit *WT1* est, par exemple, quantifié dans le suivi des LAM afin d'évaluer la réponse aux traitements. L'évaluation précise de la MRD (37) permet de détecter précocement les rechutes (parfois, avant la détection de cellules malignes en cytologie) (38,39) et d'adapter, si besoin, la thérapeutique (40). Ces techniques ont marqué le début de la médecine personnalisée.

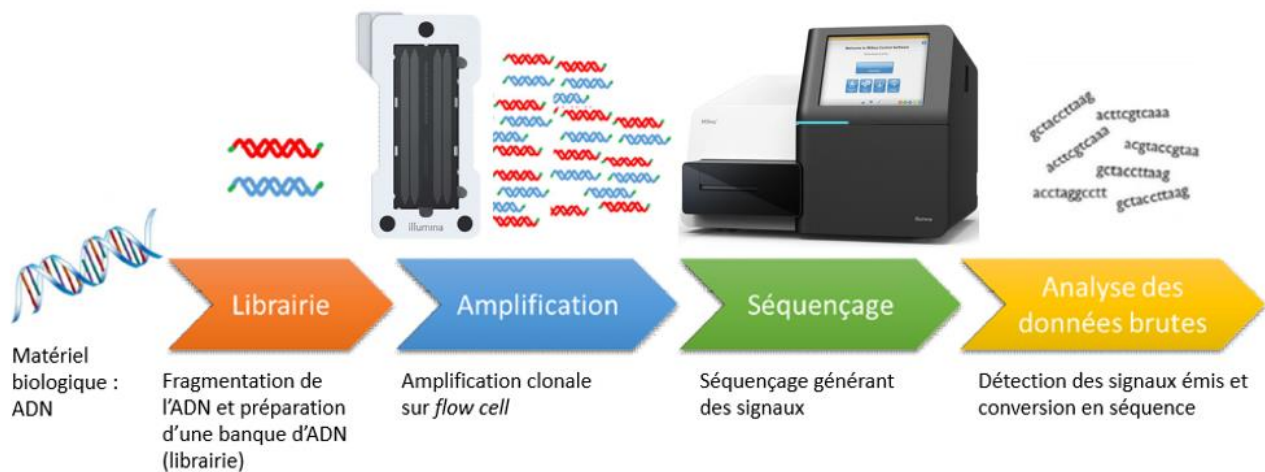


Figure 1 : Représentation simplifiée de la technique *Next Generation Sequencing* (NGS)

Après extraction, l'ADN des patients est fragmenté puis amplifié de façon à obtenir une banque d'ADN à séquencer.

Le séquençage est réalisé sur un support solide, *flow cell*, selon la technique Illumina® basée sur la détection de signaux lumineux convertis en séquences.

III. Apport du séquençage haut débit dans la prise en charge des hémopathies myéloïdes

A l'ère de la médecine personnalisée, l'adaptation de la prise en charge nécessite de plus en plus d'évaluer les caractéristiques moléculaires précises des cellules malignes. Suite au séquençage par méthode Sanger (41), l'évolution des techniques a permis d'élaborer des méthodes plus rapides, plus sensibles, moins coûteuses et autorisant l'analyse d'un nombre élevé de séquences, regroupées sous le terme de séquençage à haut débit (ou *Next-Generation Sequencing* NGS) de deuxième génération (42). Une seule analyse est alors suffisante pour évaluer plusieurs cibles définies en panel, voire le génome entier. Le pyroséquençage (43), le séquençage par ligation (44) et le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (45) sont les techniques NGS de deuxième génération utilisables en routine dans les laboratoires. A ce jour, un quasi-monopole de séquençage par terminateurs réversibles est observé (46). Cette technique débute par la fragmentation des ADN de chaque patient, suivi de la création d'une librairie d'ADN (**Figure 1**). L'ADN de chaque patient est lié à des séquences uniques propres à chaque patient, permettant d'analyser les ADN de plusieurs patients dans une même série. Les fragments d'intérêt sont ensuite hybridés avec des sondes spécifiques des gènes d'intérêt puis le séquençage est réalisé sur un support solide, appelé *flow cell*. Chaque brin d'ADN hybridé sur la *flow cell* est séquençé, base après base, par synthèse d'un brin complémentaire. Chaque base étant associée à un fluorophore différent, elles sont détectées au fur et à mesure de leur incorporation et la lecture est effectuée cycle après cycle. Cette méthode permet l'acquisition en parallèle (brin sens et anti-sens) de plus de trois milliards de séquences de 150 paires de bases (42). Une analyse bio-informatique permet enfin de convertir tous les signaux émis en séquence et de conclure sur de possibles mutations. Une troisième génération de NGS est disponible (47,48) mais reste peu utilisée dans la pratique courante.

Grâce au NGS, près de 50 mutations somatiques ont été identifiées comme potentiellement récurrentes dans les hémopathies myéloïdes (35,49–51). Ces mutations sont détectées dans plus de 90% des cas de SMD (49,52,53), dont deux tiers des cas avec un caryotype normal (54), et chez plus de 95% des patients atteints de LAM (55), dont la moitié des cas étaient catégorisés avec un risque cytogénétique intermédiaire (56). Ces mutations récurrentes ont permis de comprendre la physiopathologie des hémopathies myéloïdes, en particulier l'architecture clonale (57), et jouent désormais un rôle de biomarqueurs utiles dans la prise la charge globale du patient.

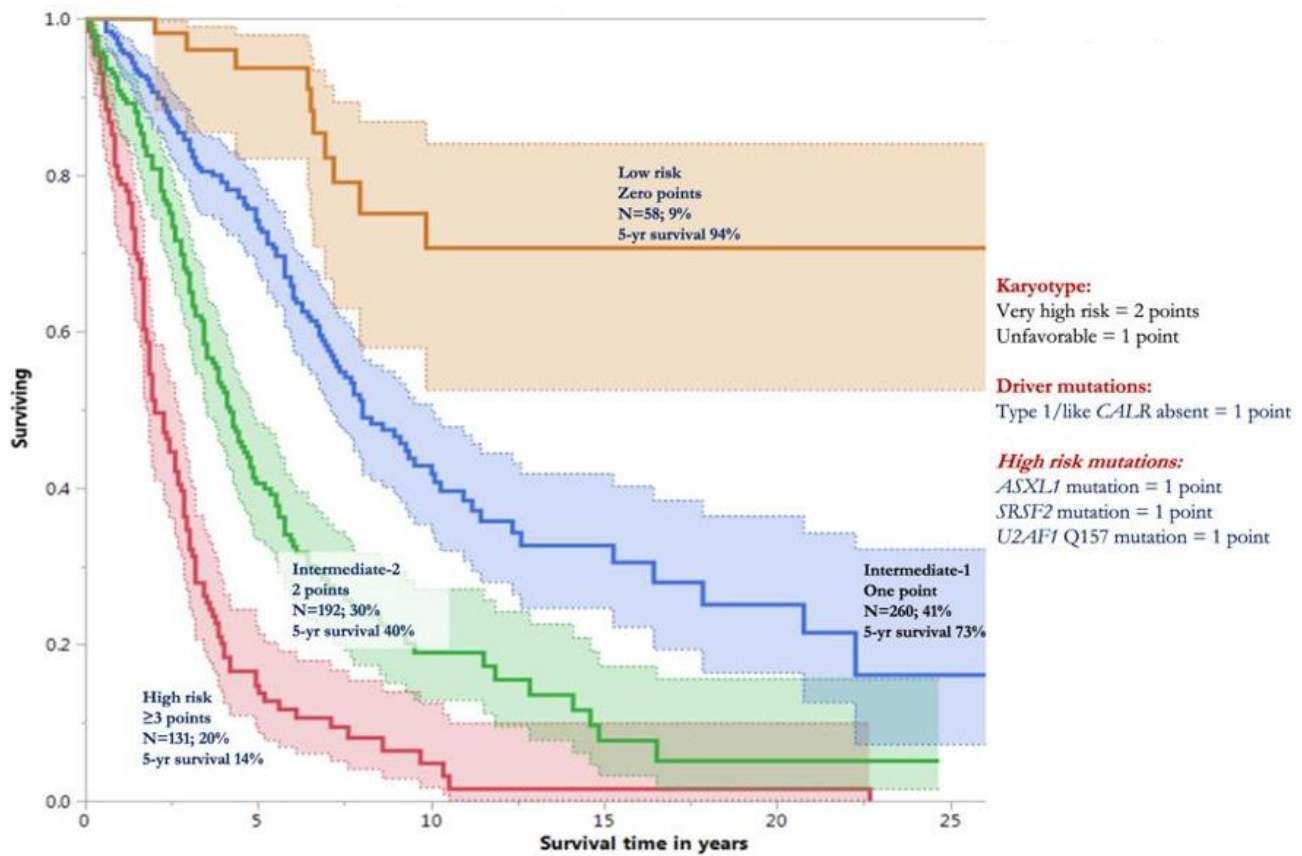


Figure 2 : Courbes de survie en fonction du score pronostic GIPSS, d'après Tefferi et al. (63)
 Le score GIPSS, utilisé dans les SMP de type Myélofibrose primitive, permet de classer les patients en quatre groupes de risque selon la présence de différentes mutations.

Dans les SMP, la présence d'une des mutations *drivers*, *JAK2*, *CALR* ou *MPL* est considérée comme un critère diagnostique majeur. Les mutations *JAK2* sont majoritairement retrouvées dans les Polyglobulies de Vaquez où 99% des patients présentent ces mutations (35). Concernant les autres SMP, les mutations du gène *JAK2* sont identifiées dans 50 à 60% des cas de Thrombocytémie Essentielle (TE) et de MyéloFibrose Idiopathique (MFI), quand les mutations *CALR* et *MPL* sont retrouvées dans 20 à 30% et 5 à 10% des cas, respectivement. Outre ces trois mutations *drivers*, la présence des mutations *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2* et/ou *SF3B1* est considérée comme un critère diagnostique lorsque *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ne sont pas mutés (11). Dans les Syndromes Frontières (SF), d'autres mutations ont été catégorisées comme ayant un rôle diagnostique, notamment *CSF3R*, *SETBP1*, *SF3B1* et *JAK2* (11).

Cependant, la présence isolée de certaines de ces mutations n'est pas forcément le témoin d'une pathologie. En effet, il existe des mutations, retrouvées à des taux relativement bas, et caractéristiques d'une hématopoïèse clonale liée à l'âge, affectant par exemple les gènes *JAK2* ou *DNMT3A*, et pouvant également être retrouvées dans la population exempte de pathologie (35). Cette Hématopoïèse Clonale de Signification Indéterminée (CHIP) a particulièrement été étudiée dans les LAM, mais également dans les SMD (58). Ainsi, *Steensma et al.* ont défini un risque de progression en hémopathie à 1%/an dès lors que les mutations *DNMT3A*, *TET2* ou *ASXL1* ont été identifiées à une fréquence supérieure à 2% et qu'aucune cytopénie et/ou dysplasie n'a été mise en évidence. Ces CHIP peuvent donc définir un état pré-pathologique et leur suivi pourrait permettre une prise en charge précoce.

D'autre part, les mutations identifiées en NGS ont permis d'améliorer plusieurs scores pronostiques. Par exemple, dans les SMD, la mutation *SF3B1* est associée à un pronostic favorable avec une amélioration de la médiane de survie de 40 mois ainsi qu'une diminution du risque d'évolution en leucémie à 10 ans de 80% (59). A l'inverse, une diminution de la survie globale et un risque accru d'acutisation en LAM a été mis en évidence pour les mutations *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53*, *CBL* et *NRAS* (11,60) et ce, indépendamment des résultats de l'IPPS-R (14). Concernant les LAM, l'analyse des données NGS ont permis de catégoriser les patients en risque péjoratif grâce à l'identification de mutations sur les gènes *RUNX1* et *ASXL1*, en l'absence de facteur concomitant de bon pronostic, et sur le gène *TP53*, dans tous les cas de LAM (61). La présence de mutations sur les gènes *NPM1*, *CEBPA* et *FLT3* peut également être mise en évidence par cette analyse. D'autres études ont permis d'intégrer les résultats de NGS dans des scores pronostiques pré-existants.

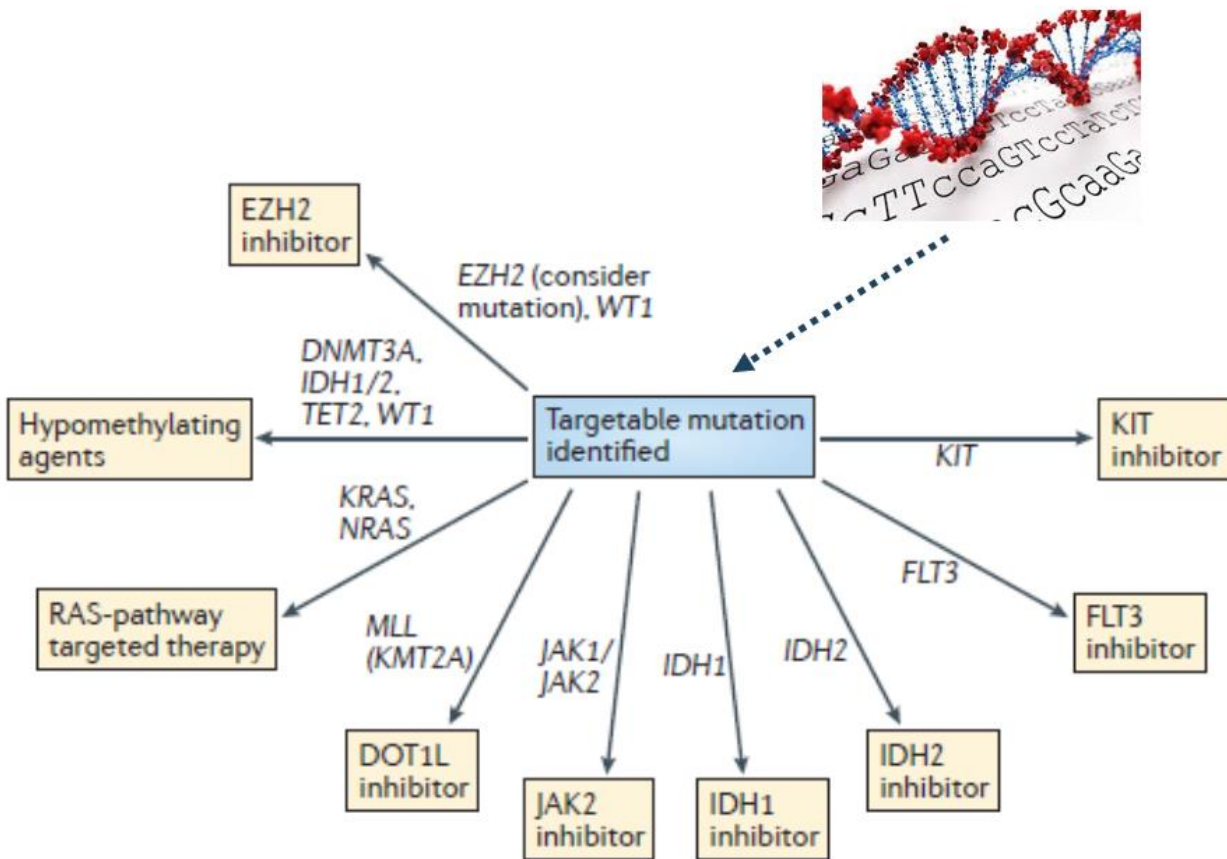


Figure 3 : Cibles thérapeutiques potentielles, d'après Coombs et al. (65)

Une des applications du NGS est l'identification de mutations pouvant être utilisée comme cibles thérapeutiques. Ce schéma répertorie les principales cibles identifiées à ce jour en Hématologie.

Par exemple, dans les LMMC, la création du CPSS-Mol a intégré les mutations des gènes *RUNX1*, *NRAS*, *SETBP1* et *ASXL1* comme marqueurs de mauvais pronostic (62). Dans les MyéloFibroses Idiopathiques (MFI), en plus du résultat du caryotype, le score GIPSS (*Genetically Insipred Prognostic Scoring System*) associe la présence des mutations *CALR*, *ASXL1*, *SRSF2* et/ou *U2AF1* à une diminution de la survie (63) (**Figure 2**). La médiane de survie est évaluée à deux ans en cas de trois mutations associées à un caryotype normal alors qu'elle est de 26 ans sans aucun facteur de risque. D'autres gènes comme *EZH2*, *IDH1* et *IDH2* ont également été identifiés comme diminuant la survie globale dans cette pathologie et intégrés à un autre score pronostique, le *Mutation and karyotype enhanced International Prognosis Scoring System for primary myelofibrosis* (MIPSS70+ version 2.0) (64). Pour certaines de ces mutations, en plus de leur rôle pronostique, un impact thérapeutique est maintenant décrit.

L'adaptation thérapeutique est un enjeu majeur de la médecine personnalisée. L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a permis le développement de thérapies dites ciblées, spécifiques d'anomalies observées dans les cellules malignes (**Figure 3**) (65). En France, une autorisation temporaire d'utilisation est disponible pour l'énasidenib (Idhifa®), l'ivosenib (Tibsovo®) et la midostaurine (Rydapt®) en traitement ciblé des LAM avec mutations *IDH2* (66), *IDH1* (67) et *FLT3* (68), respectivement. D'autres molécules ciblant les mêmes gènes dans d'autres hémopathies (69) ou d'autres gènes tels que *SF3B1* (70,71), *EZH2* (72) et *RAS* (73) sont en cours d'investigation dans les différentes hémopathies myéloïdes. D'autre part, même si elles ne constituent pas de vraie cible thérapeutique, la présence de certaines mutations prédit un taux de réponse supérieur comparé aux patients non porteurs. C'est notamment le cas des mutations touchant le gène *TET2* dans les SMD, qui sont associées à une meilleure réponse aux agents hypométhylants comme l'azacitidine (Vidaza®) (54). De plus en plus d'essais cliniques sont en cours afin d'améliorer la juste prescription dans des pathologies où les traitements n'avaient qu'une efficacité modérée.

Toutes ces avancées procurées par l'analyse NGS ont conduit à mettre en place cette technique au sein du service d'Hématologie Biologique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand en juillet 2017. Ce travail est une étude rétrospective observationnelle sur l'utilisation faite en pratique courante de cette technique par les cliniciens du centre depuis son instauration.

Objectifs de l'étude

Même si le NGS est utilisé depuis de nombreuses années en recherche, son usage dans les laboratoires de Biologie Médicale est assez récent. Nous avons donc assez peu de recul sur les bénéfices d'une telle technique en pratique quotidienne.

Ainsi, l'objectif principal de l'étude est d'évaluer l'impact des mutations somatiques identifiées par NGS sur le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients suspects ou atteints d'hémopathies myéloïdes.

L'objectif secondaire consiste à évaluer la concordance entre les résultats de NGS et le diagnostic final retenu.

Matériel et Méthodes

I. Population étudiée

Cette étude concerne l'ensemble des analyses « NGS myéloïde » effectuées au CHU de Clermont-Ferrand de juillet 2017 à décembre 2019. Les prélèvements inclus ont été réalisés du 15 décembre 2011 au 31 décembre 2019 et concernaient des patients suivis au sein du Groupement Hospitalier de Territoire (GHT) de Clermont-Ferrand ainsi que du Centre Hospitalier de Nevers et de laboratoires privés (centre extérieur).

Toutes les données suivantes ont été extraites du système d'information CrossWay Hôpital® (McKesson, Saint-Ouen-Sur-Seine, France) : les données démographiques, les données cliniques (signes cliniques au diagnostic, données transfusionnelles et diagnostic retenu), les scores pronostiques, les résultats des analyses cytogénétiques effectuées dans les six mois précédents le NGS (caryotype et transcrits de fusion), les données concernant les traitements (traitements et ligne de traitement avant/après NGS) ainsi que les informations liées à la prescription du NGS (diagnostic, pronostic ou cible thérapeutique).

Les données biologiques ont, quant à elles, été extraites à partir du système d'information des laboratoires, Glims® (MIPS, Vincennes, France). Elles comprenaient la nature du prélèvement (sang, moelle osseuse, biopsie ganglionnaire ou cutanée, prélèvement salivaire), les résultats de l'analyse NGS (nombre, type de mutations et Fréquence Estimée du Variant (VAF)) et les résultats de la Numération Formule Sanguine (NFS) (hémoglobine, plaquettes, leucocytes, Polynucléaires Neutrophiles (PNN), myélémie, Polynucléaires Eosinophiles (PNE), Polynucléaires Basophiles (PNB), monocytes, lymphocytes, blastes et dysplasie). Ont également été recueillis les résultats du myélogramme (dysgranulopoïèse, dysérythropoïèse, dysmégacaryopoïèse, hyperplasie d'une lignée myéloïde, mastocytes et blastes) et de l'immunophénotypage (marqueurs exprimés et blastes) réalisés dans les 6 mois précédant le NGS.

Les données ont été saisies de manière anonyme. L'enregistrement des données a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés ainsi que d'une déclaration par l'intermédiaire du correspondant informatique et libertés du CHU de Clermont-Ferrand.

II. Analyse Next Generation Sequencing (NGS)

1. Préparation des échantillons

Tous les échantillons ont été prélevés sur tube EDTA. Selon l'indication, différentes fractions cellulaires ont été isolées : échantillon total, PNN ou cellules mononuclées (isolement sur gradient de Ficoll®). Une extraction d'ADN a été effectuée via le kit Qiaamp DNA Blood Midi Kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les recommandations du fabricant. Un témoin de contamination (eau) est réalisé lors de chaque extraction. Une quantification d'ADN est ensuite effectuée par fluorimétrie à l'aide du kit Qubit® dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Cette étape est encadrée par le passage de deux standards (S1 = 40 et S2 = 20 000 unité de fluorescence). Le NGS est ensuite réalisé à partir d'une quantité cible d'ADN de 200 ng, en utilisant le kit « Myéloïde Solution » (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse).

2. Préparation des bibliothèques d'ADN

Dans un premier temps, une fragmentation enzymatique de l'ADN est réalisée, suivie de la réparation des extrémités de chaque brin et d'une étape de « A-tailing », correspondant à l'ajout de bases A aux extrémités 3'. A chaque extrémité des fragments d'ADN obtenus, une étape de ligation à des adaptateurs indexés est effectuée. Ces derniers contiennent des séquences uniques de 8 nucléotides (index) permettant d'identifier les fragments d'ADN de chacun des patients (chaque patient étant relié à un couple d'index). En plus des index, des séquences permettant l'hybridation à la *flow cell* et d'autres permettant d'initier le séquençage sont également présentes. Suite à cette étape, les adaptateurs non fixés sont éliminés par plusieurs lavages effectués à l'aide de billes magnétiques Agencourt AMPure XP® (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse). Les ADN sont ensuite amplifiés par Polymerase Chain Reaction (PCR) (Mastercycler Nexus®, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pour obtenir des « bibliothèques » et les fragments d'intérêt, d'environ 400 paires de base (pb), sont sélectionnés grâce aux billes Agencourt AMPure XP. Leur taille est contrôlée par électrophorèse sur TapeStation 2000 System® (Agilent Technologies, Les Ulis, France), et un contrôle de la quantité d'ADN est effectué par fluorimétrie. Les bibliothèques ainsi préparées sont ensuite poolées (2×12 échantillons), de façon à obtenir une quantité finale de 1800ng d'ADN, correspondant à une quantité de 150 ng par échantillon. Le pool ainsi créé est lyophilisé à l'aide d'un système de type Speedvac, et conservé à -20°C (ou 4°C si utilisé le lendemain).

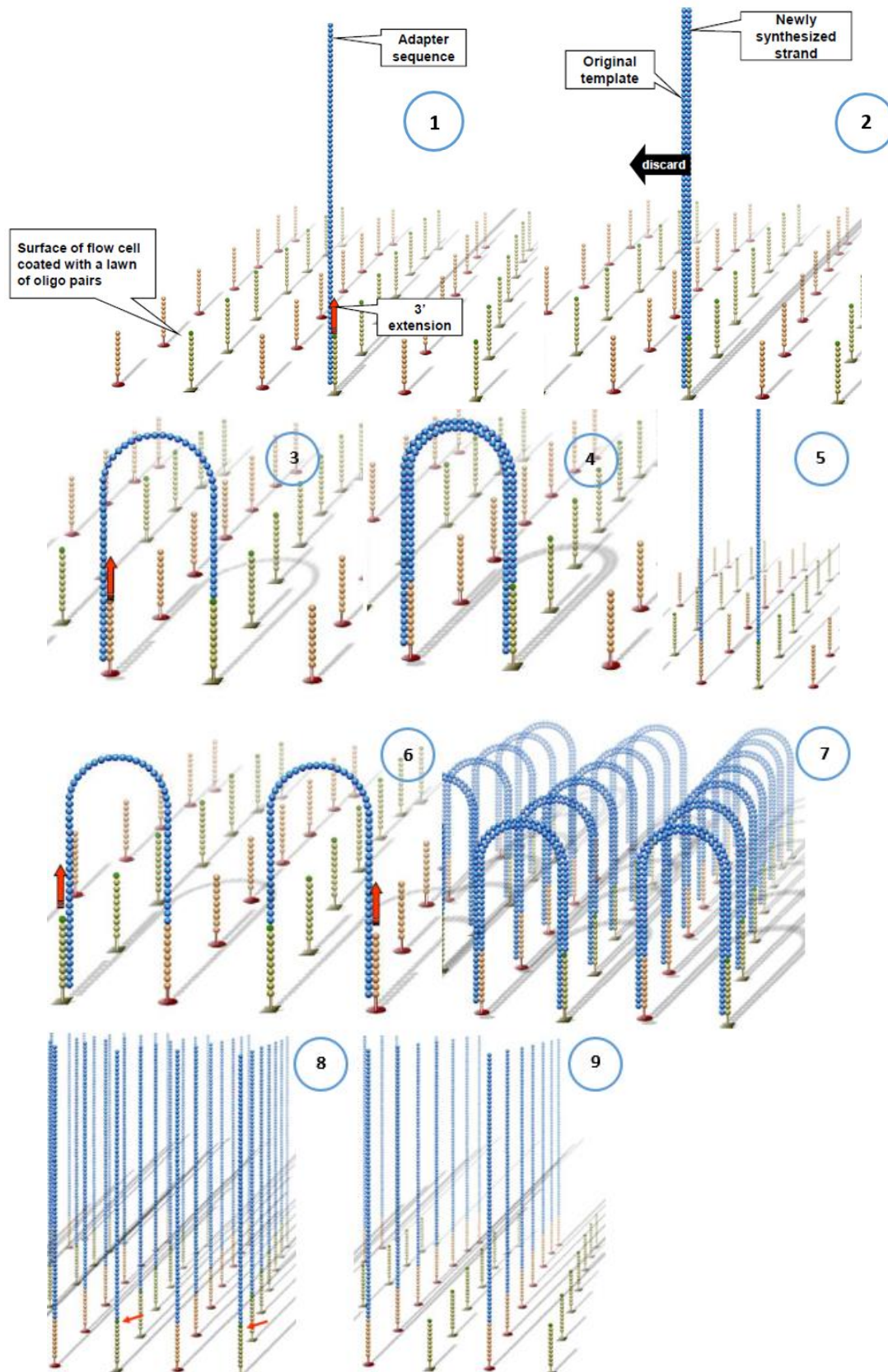


Figure 4 : Technique d'amplification par pont

Les brins d'ADN sont hybridés sur la *flow cell* grâce à leur index et une ADN polymérase permet l'obtention d'un brin complémentaire. Ce néo-brin d'ADN se replie, permettant de s'hybrider à nouveau à la *flow cell*. L'ADN polymérase induit alors la synthèse d'un nouveau brin d'ADN complémentaire pour former un ADN double brin en pont suivie d'une étape de linéarisation.

3. Etape de capture des fragments d'intérêt

Les bibliothèques d'ADN lyophilisées (2 x 12 patients) sont resuspendues puis une dénaturation de 10 minutes à 95°C est réalisée. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite hybridés avec des sondes « MYS Probes » (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse) spécifiques des 30 gènes analysés sur le panel (**Annexe 1**). Suite à cette hybridation, une capture en solution des « couples sonde/ADN » est réalisée en utilisant des billes de Streptavidine Dynabeads® M-270 Streptavidin (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse). Plusieurs étapes de lavage sont ensuite effectuées pour éliminer les fragments d'ADN non capturés avant une nouvelle étape d'amplification par PCR à l'aide du kit KAPA Library Quantification Kits® (Clinisciences, Nanterre, France). Les fragments ainsi obtenus sont de nouveau mis en contact avec des billes magnétiques Agencourt AMPure XP® afin de sélectionner les fragments d'intérêt. A la fin de cette étape, la concentration et la taille des fragments obtenus sont contrôlées par fluorimétrie et électrophorèse avec des valeurs cibles comprises entre 10 ng/μL et 25 ng/μL ainsi qu'une taille de 400 pb environ, respectivement.

4. Amplification par pont

A partir du logiciel Illumina Experiment Manager® (IEM) (Illumina Inc., San Diego, Californie, Etats-Unis), une feuille de travail associant les paramètres de l'analyse ainsi que les échantillons analysés (association index/patient) est créée et va permettre de tracer l'analyse. Le séquençage s'effectue sur un automate de type MiSeq® (Illumina Inc., Paris, France). Il est possible d'analyser 24 patients par série et nous réalisons actuellement une série par mois. Après dénaturation, les fragments d'ADN sont déposés sur une « cassette » contenant tous les réactifs nécessaires au séquençage. Le séquençage est réalisé à partir de 10 pM d'ADN total.

Une fois déposés dans la cassette, les ADN sont acheminés vers la *flow cell* (support solide en verre dépoli) grâce à un système fluidique (**Figure 1**). Des séquences complémentaires de celles présentes aux extrémités des brins d'ADN à séquencer (séquences P5 et P7) permettent d'hybrider les fragments d'ADN sur la *flow cell*. Une fois les ADN fixés, des clusters sont générés grâce à l'action d'une ADN polymérase qui permet la synthèse du brin d'ADN complémentaire au brin hybridé (**Figure 4, point 1**). L'ADN double brin ainsi obtenu est dénaturé et le brin de départ est éliminé par lavage (**Figure 4, point 2**). Le néo brin d'ADN se replie, lui permettant de s'hybrider sur la *flow cell* en formant un pont (**Figure 4, point 3**). L'ADN polymérase induit alors la synthèse du nouveau brin complémentaire pour former un ADN double brin en pont (**Figure 4, point 4**), qui sera dénaturé à son tour afin d'obtenir deux

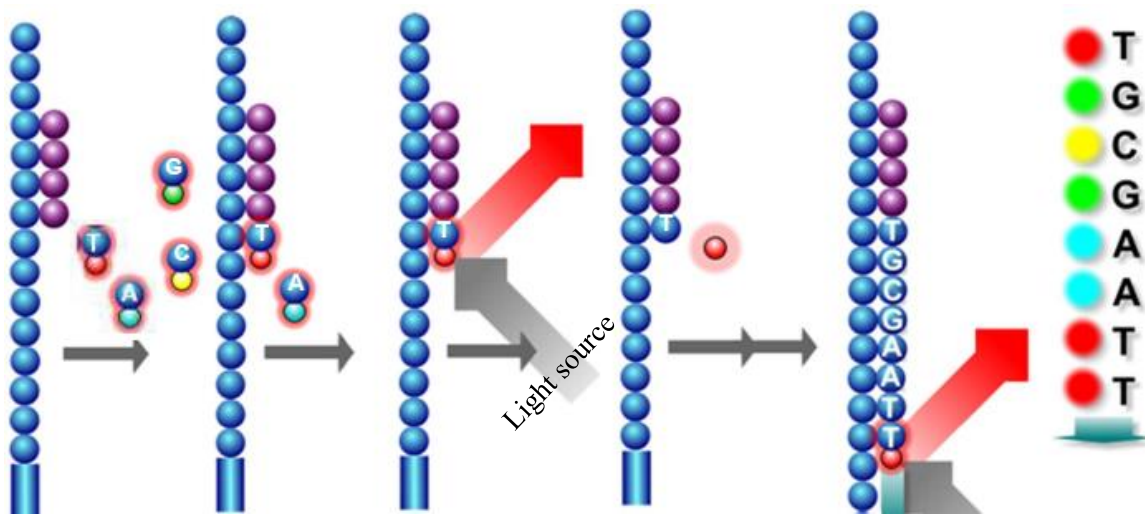


Figure 5 : Séquençage par synthèse nucléotidique et émission spécifique de fluorescence

Chaque base nucléotidique est associée à un fluorophore différent. Au fur et à mesure du séquençage, les bases sont incorporées de façon complémentaire au brin d'ADN et une émission de fluorescence est captée puis convertie en séquence.

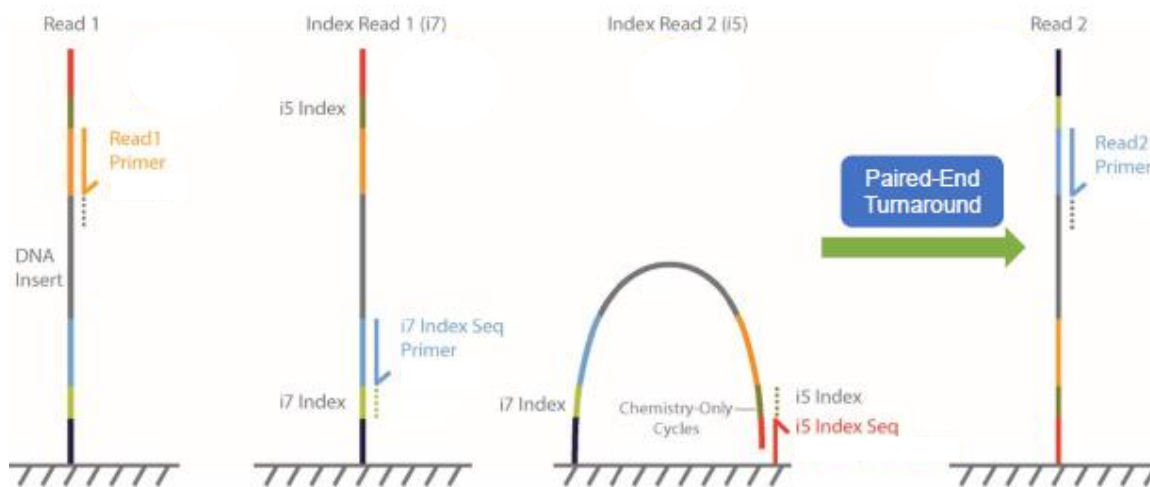


Figure 6 : Séquençage « paired-end »

Une fois le séquençage terminé, le brin néoformé est éliminé puis le séquençage de l'index i7 permet d'identifier le patient. Le *read* de l'index est éliminé et le brin d'ADN de départ se replie pour se fixer sur une autre amorce de la *flow cell*. Une ADN polymérase permet d'obtenir un ADN double brin pour lequel on ne gardera que le brin anti-sens afin de réaliser de nouveau un séquençage par synthèse nucléotidique.

brins d'ADN simple brin toujours maintenus au niveau de la *flow cell* (**Figure 4, point 5**). Ce processus est alors reproduit à partir de ces nouveaux brins d'ADN des millions de fois et simultanément à différents endroits de la *flow cell* avec les différents fragments d'ADN à séquencer afin de former des clusters (**Figure 4, points 6 et 7**). Par la suite, tous les brins d'ADN non-sens sont éliminés par lavage et les séquences reconnaissant les oligonucléotides de la *flow cell* sont bloqués pour éviter d'autres amplifications (**Figure 4, points 8 et 9**).

5. Séquençage par synthèse nucléotidique

L'étape de séquençage est initiée grâce à une amorce « spécifique » qui s'hybride au niveau des adaptateurs (séquence Rd SP) des brins d'ADN simple brin constituant les clusters. A chaque cycle de séquençage, une seule base nucléotidique est additionnée de manière complémentaire à la séquence de départ. Chaque base nucléotidique étant identifiée par un marqueur fluorescent de couleur différente, elle sera identifiée par émission d'un signal fluorescent « lu » à l'aide d'une caméra (**Figure 5**). Une fois le signal fluorescent émis, la conformation de la base lue change, permettant l'incorporation de la base suivante : c'est le séquençage par synthèse. Après le séquençage complet de ce premier brin d'ADN (read), le brin néoformé est éliminé par lavage et une amorce spécifique de l'index (i7Index Seq Primer) permet d'identifier à quel patient appartient ce read ainsi que de libérer le blocage de toutes les séquences de l'adaptateur (**Figure 6**). Le read de l'index est éliminé et le brin d'ADN de départ se replie et se fixe sur la deuxième séquence d'oligonucléotide présente sur la *flow cell*. Un autre index spécifique (i5 Index) est alors séquencé et un ADN double brin est formé par amplification en pont grâce à une ADN polymérase. L'ADN est ensuite linéarisé pour ne garder que le brin anti-sens. Le « deuxième » séquençage peut alors débiter de la même manière que le premier (séquençage « paired-end »). Tous les clusters sont lus simultanément et génèrent des millions de reads représentant tous les fragments présents.

6. Analyse des données et validation technico-biologique

A la fin du séquençage, une analyse bio-informatique est réalisée. Elle comprend plusieurs étapes : le démultiplexage, l'alignement de séquences, l'appel de variants et l'annotation des variants.

Les reads lus par séquençage « paired-end » sont séparés et « rangés » en fonction des couples d'index identifiés afin de regrouper tous les reads d'un même patient, c'est le démultiplexage. Après cette étape, des fichiers « Fastq » sont générés, chacun contenant les

lectures d'un seul échantillon. Ces fichiers sont chargés sur la plateforme SOPHiA DDM® (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse) pour réaliser la suite de l'analyse.

Pour chaque patient, les reads présentant des analogies de séquences sont regroupés en séquence contiguës afin de les aligner par rapport à un génome de référence (GRCh37/hg19).

Les variations identifiées par rapport au génome de référence sont caractérisées grâce à des scores de probabilité de pathogénicité et leur score qualité. L'appel des variants identifie ainsi les mutations avec leur position génomique, la modification engendrée au niveau protéique, le niveau de couverture (i.e le pourcentage de bases lues une fois) et la fréquence estimée des mutations (VAF).

Une étape d'annotation des variants est enfin réalisée. Les mutations retenues lors de l'appel des variants sont gradées de D à A, D correspondant à une mutation probablement bénigne et A à une mutation hautement pathologique.

Un rapport de qualité du séquençage est généré par le logiciel SOPHiA DDM®. Le nombre total de reads du run doit être proche de 50 millions, le taux de séquences correspondant aux régions d'intérêt (« *on* » et « *flank* » *target*) doit être le plus élevé possible (en général > 80%), le nombre de régions dont la profondeur de lecture est insuffisante (< 1000X) ne doit pas être supérieur à 10 régions, le score de qualité, Phred score, doit être supérieur à 30 pour les 150 premiers cycles de séquençages et le Q30, un indicateur évaluant la probabilité d'avoir la mauvaise base, doit être supérieur à 80% pour l'ensemble des bases séquencées (i.e 99.9% de « chance » d'appel de la bonne base lors du séquençage).

L'impact biologique et clinique d'une mutation est évalué à l'aide de différents outils comportant des bases publiques (gnomAD, ClinVar, COSMIC, ExAC, ALAMUT, OMIM) pour les mutations connues ainsi que des sites prédictifs (MutationTaster, Polyphen-2, HSF, SIFT,...) pour les variants inconnus. Cette analyse peut être complétée par une revue bibliographique (Pubmed) et/ou une analyse de la structure et des domaines actifs de la protéine (UniProt par exemple).

Pour chaque gène d'intérêt, ne sont rendues aux cliniciens que les mutations à impact clinique probable ou certain (classées 4 ou 5 (74)) et dont les critères qualité permettent de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un artefact technique. Le seuil de sensibilité de la technique est évalué à 2,5%, mais certaines mutations ayant une VAF inférieure peuvent être rendues au clinicien, selon le contexte clinico-biologique.

Le compte rendu final comporte pour chaque gène muté, le numéro du transcrit de référence utilisé pour chaque gène, le type de mutation selon la nomenclature internationale en vigueur

en indiquant la variation moléculaire et son impact protéique, la fréquence estimée, ainsi qu'une explication sur les conséquences fonctionnelles de cette mutation accompagnée d'une synthèse des données disponibles dans la littérature. Les variants identifiés comme polymorphismes ne sont pas mentionnés dans le compte rendu. Une conclusion générale de l'analyse est réalisée et comporte la synthèse des mutations identifiées, leurs liens avec la pathologie suspectée ou diagnostiquée et les impacts thérapeutiques potentiels.

III. Recueil et méthode d'analyse des données par le clinicien

1. Classification initiale des demandes NGS

En fonction des données recueillies dans le système d'information CrossWay Hôpital® (McKesson, Saint-Ouen-Sur-Seine, France) ou auprès du médecin prescripteur, chaque analyse de NGS a été classée en demande de : (i) diagnostic; (ii) pronostic ou (iii) recherche de cible thérapeutique.

Les données ont également été classées selon la pathologie suspectée ou diagnostiquée : (i) Leucémies Aiguës (LA) ; (ii) Syndromes Myélo-Prolifératifs (SMP) ; (iii) Syndromes Myélo-Dysplasiques (SMD) ; (iv) Syndromes Frontières (SF) ; (v) Autres diagnostiques (A) (**Annexe 2**). Lorsque le NGS a été demandé pour une LA, une précision sur le moment de la demande a été recherchée : NGS fait au diagnostic, à la rechute ou lors du suivi sans rechute.

Le délai entre la demande de NGS et le diagnostic de la maladie a été évalué, et la survenue d'un éventuel décès a été répertoriée.

En cas de demandes multiples de l'analyse NGS chez un même patient, chaque demande a été étudiée de manière indépendante. Un patient peut ainsi présenter plusieurs analyses NGS consécutives avec une indication différente et/ou une évolution de sa pathologie. L'analyse des données a donc été réalisée sur le nombre de prélèvements et non sur le nombre de patients.

2. Données clinico-biologiques recueillies

Afin d'optimiser la prise en charge du patient, le clinicien s'appuie sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques.

Les signes cliniques identifiés lors de la première consultation pour suspicion de pathologie hématologique ont été relevés, notamment, les signes généraux (asthénie, pâleur, céphalées, vertiges, douleurs abdominales, gastriques), les signes cutanés (prurit, lésions, érythrose faciale), les signes infectieux (fièvre, infection opportuniste), les signes cérébraux (neuropathie périphérique, troubles visuels), les signes hématologiques (hépato- et splénomégalie,

hémorragie, thrombose, Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD)), les signes tumoraux (masse) ou d'autres signes cliniques (douleurs osseuses, musculaires, gingivales ou cardiaques).

Les résultats des examens biologiques suivants ont également été recueillis : NFS, myélogramme (dysplasie et/ou hyperplasie de lignée, présence de blastes ou de cellules anormales et conclusion), cytométrie en flux (présence de blastes, marqueurs Clusters de Différenciation (CD) exprimés et conclusion) et explorations cytogénétiques (caryotype et transcrits de fusion).

Les anomalies de la NFS ont été classées selon les recommandations en vigueur. Ainsi, l'anémie est définie comme une concentration en hémoglobine < 13 g/dL chez l'homme et < 12 g/dL chez la femme, la thrombopénie comme une concentration en plaquettes < 150 G/L, la neutropénie comme une concentration en polynucléaires neutrophiles < 1.5 G/L, la pancytopenie comme l'association d'une anémie, d'une thrombopénie et d'une neutropénie avec une leucopénie < 4 G/L, la monocytose comme une concentration en monocytes > 1 G/L et la thrombocytose comme une concentration en plaquettes > 450 G/L.

Les scores pronostiques indépendants du résultat de NGS ont été recueillis ou calculés lorsque non mentionnés dans le dossier : *CMML-specific Prognostic Scoring System* (CPSS) (15) pour les LMMC, IPSS (13) et IPSS-R (14) pour les SMD et ELN 2010 (12) pour les LA. Les scores incluant les résultats du NGS ont également été intégrés : MIPSS70+ v2.0 (64) et GIPSS (63) pour les MFI, *Molecular CMML-specific Prognostic Scoring System* (CPSS-Mol) (62) pour les LMMC et ELN 2017 (61) pour les LA.

Les différentes lignes de traitements, avant et après NGS, ont également été répertoriées dans le but d'évaluer l'identification de cible thérapeutique en NGS (énasidenib (66), ivosénib (67), midostaurine (68) ou vidaza (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03593018)).

Les pathologies retenues en diagnostic final ont été classées selon les mêmes groupes que ceux utilisés pour la demande de NGS (**Annexe 2**).

Le diagnostic final retenu par le clinicien a été considéré comme le gold standard.

3. Classification de l'apport clinico-biologique du NGS

L'apport du NGS a été mesuré en évaluant, pour chaque prélèvement, l'impact des mutations sur le diagnostic final retenu.

Cinq « catégories d'apport » ont été définies lorsqu'au moins une mutation a été détectée en NGS : confirmation du diagnostic, bon pronostic, pronostic péjoratif, impact thérapeutique et sans impact.

Les mutations définies comme confirmation du diagnostic ont été établies selon les recommandations OMS 2017 (mutations *drivers* et mutations associées) (11).

Les mutations identifiées comme de bon et de mauvais pronostics sont celles décrites dans les publications de référence des scores pronostiques MIPSS70+ v2.0 (64), GIPPS (63), CPSS-Mol (62) et ELN 2017 (61) ainsi que selon les recommandations OMS 2017 (11).

Un impact thérapeutique a été retenu comme apport lorsque le NGS a permis l'identification d'une cible thérapeutique.

Une mutation n'appartenant pas à l'une des quatre catégories ci-dessus a été considérée comme sans impact.

Quand aucune mutation n'a été retrouvée en NGS, l'apport a été défini comme aucun variant retrouvé.

4. Méthode d'analyse de la concordance des conclusions du NGS par rapport au diagnostic final retenu

Une comparaison des résultats de NGS avec le diagnostic final retenu a été réalisée indépendamment du motif de demande de l'analyse NGS. Quatre catégories ont été définies : concordance, cohérence, discordance et non interprétable.

Une concordance est retenue si la conclusion de l'analyse NGS est équivalente à celle du diagnostic final retenu.

Une cohérence correspond à une conclusion de l'analyse NGS en inadéquation avec le diagnostic final retenu mais plausible au vu des résultats des autres examens biologiques (myélogramme, cytométrie en flux et cytogénétique).

Une discordance est définie par une inadéquation entre la conclusion de l'analyse NGS et le diagnostic final retenu ainsi qu'avec les résultats des autres tests biologiques.

Non interprétable correspond à : **(i)** une conclusion de l'analyse NGS en inadéquation avec le diagnostic final retenu dans le cas où un nombre insuffisant d'autres examens biologiques ont été effectués dans les délais de l'étude pour pouvoir conclure à un diagnostic, **(ii)** à la présence de deux pathologies hématologiques concomitantes.

5. Analyse statistique

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Stata (version 15, StataCorp, College Station US). Les données catégorielles sont décrites par des effectifs et pourcentages, alors que les données quantitatives sont présentées en termes de médiane et intervalle interquartile. La normalité a été étudiée par le test de Shapiro-Wilk.

Afin de déterminer l'impact des mutations somatiques identifiées par NGS sur le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients suspects ou atteints d'hémopathies myéloïdes, les comparaisons entre groupes ont considéré l'ANOVA ou le test de Kruskal-Wallis pour les données quantitatives, et le test du Chi² ou le test exact de Fisher pour les données catégorielles. L'étude des relations entre variables quantitatives a été réalisée par estimation de coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman, au regard de la distribution statistique des variables à l'étude). La concordance des résultats de NGS avec le diagnostic final retenu a été quant à elle évaluée par le taux de concordance (exprimé en pourcentage) et le test de concordance du kappa.

Les résultats concernant l'indice kappa ont été interprétés au regard des recommandations rapportées dans la littérature (Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research* (1991), Terwee et al. *J Clin Epidemiol* 2007): kappa compris entre 0.2 et 0.4 : faible concordance, entre 0.4 et 0.6 : concordance modérée, entre 0.6 et 0.8 : bonne concordance et kappa supérieur à 0.8 : excellente concordance. Les tests statistiques ont été réalisés en en formulation bilatérale pour un risque d'erreur de première espèce de 5%. Ainsi, une différence a été considérée comme statistiquement significative quand le degré de signification était inférieur à 5%.

Résultats

Tableau 1 : Données clinico-biologiques initiales

	Nombre de prélèvements (n)	Pourcentage (%)
Démographie		
Prélèvements (n)	328	
Patients (n)	288	
Ratio Homme/Femme	1,42	
Age (ans) ; médiane (min-max)	63,50	(3-89)
Service prescripteur		
Hématologie clinique ; n (%)	239	(73%)
Médecine interne ; n (%)	23	(7%)
Réanimation ; n (%)	4	(1%)
CH du GHT ; n (%)	55	(17%)
Centres extérieurs ; n (%)	7	(2%)
Nature du prélèvement		
Sang ; n (%)	202	(61%)
Moelle ; n (%)	114	(35%)
Biopsie ; n (%)	10	(3%)
Salive ; n (%)	2	(1%)
Signes cliniques		
Généraux ; n (%)	38	(12%)
Hématologiques ; n (%)	48	(15%)
Cutanées ; n (%)	15	(5%)
Infectieux ; n (%)	18	(5%)
Tumoraux ; n (%)	8	(2%)
Cérébraux ; n (%)	3	(1%)
Autres signes cliniques ; n (%)	13	(4%)
Pas de signes cliniques ; n (%)	182	(56%)
Non renseigné ; n (%)	3	(1%)
Signes biologiques NFS		
Anémie ; n (%)	207	(63%)
Thrombopénie ; n (%)	161	(49%)
Neutropénie ; n (%)	89	(27%)
Pancytopénie ; n (%)	70	(21%)
Thrombocytose ; n (%)	35	(11%)
Monocytose ; n (%)	74	(22%)
Indication NGS		
LA ; n (%)	98	(30%)
SMP ; n (%)	113	(34%)
SMD ; n (%)	55	(17%)
SF ; n (%)	29	(9%)
A ; n (%)	33	(10%)
Motif NGS		
Diagnostic ; n (%)	144	(44%)
Pronostic ; n (%)	117	(36%)
Recherche de cible thérapeutique ; n (%)	65	(20%)
Décès ; n (%)		
	69	(21%)

CH du GHT : Centre Hospitalier du Groupement Hospitalier de Territoire ; LA : Leucémies Aigues ; SMP : Syndromes Myélo-Prolifératifs ; SMD : Syndromes Myélo-Dysplasiques ; SF : Syndromes Frontières ; A : Autres diagnostics ;

I. Caractéristiques initiales de la cohorte

Sur une période de recueil de deux ans et demi, 328 prélèvements correspondant à 288 patients ont été analysés (**Tableau 1**). L'âge médian était de 63,5 ans (3-89 ans) et cette cohorte était composée de 169 hommes et 119 femmes (ratio homme/femme = 1,42).

Dans la très grande majorité des cas (98%), les patients étaient hospitalisés au sein du GHT de Clermont-Ferrand. Sur les 328 prélèvements, 239 (73%) ont été réalisés par le service d'Hématologie Clinique, 55 (17%) par les Centres Hospitaliers du GHT, 23 (7%) en Médecine Interne, 7 (2%) par des centres extérieurs et 4 (1%) en Réanimation Adulte.

Concernant la nature du prélèvement (328), 202 prélèvements (61%) étaient du sang périphérique, 114 (35%) de la moelle osseuse, 10 (3%) des biopsies et 2 (1%) des échantillons salivaires.

Les demandes de NGS concernaient majoritairement des SMP (34% des prélèvements) puis des LAM (30%), des SMD (17%), des pathologies A (10%) et enfin des SF (9%).

Dans cette cohorte, la majorité des patients ne présentaient pas de signe clinique (56%) et lorsqu'ils étaient présents, 15% étaient des signes hématologiques, 12% des signes généraux, 5% des signes infectieux et cutanés, 4% d'autres signes cliniques, 2% de signes tumoraux et 1% de signes cérébraux.

La cytopénie la plus fréquente était l'anémie (63% de la cohorte), retrouvée dans plus de 70% des cas de SMD, SF, A et LA. Les autres anomalies de la NFS étaient la thrombopénie (49%), la neutropénie (27%), la monocytose (22%), la pancytopénie (21%) et la thrombocytose (11%). Les pancytopénies ont rarement été retrouvées dans les SMP (1%) et les SF (3%), de même que la neutropénie (4 et 7%, respectivement).

L'étude cytologique de la moelle osseuse n'a pas été réalisée pour 72 prélèvements (22%) et aucun immunophénotypage n'a été retrouvé pour 141 prélèvements (43%).

Le caryotype était normal dans 53% des prélèvements et a échoué dans 1% des cas. Il n'a pas été prescrit dans 16% des cas.

Le délai médian entre le diagnostic et la demande de NGS a été estimé à 381 jours. Une tendance non significative à la diminution de ce délai a été observée au fil des années (délai médian en 2017 de 511 jours contre 239 jours en 2019, $p = 0,26$).

La majorité des analyses a été réalisée pour un motif diagnostique. Les analyses demandées dans un but pronostique étaient moins fréquentes dans les groupes LA ($p < 0.001$), SMP ($p < 0.001$) et SF ($p = 0,0016$) par rapport aux demandes diagnostiques, tout comme la recherche de cible thérapeutique pour tous les groupes de pathologies. La demande pronostique a également

Tableau 2 : Données NGS recueillies

	Nombre de prélèvements (n)	Pourcenta ge (%)
Hématopoïèse clonale		
Prélèvements ; n (%)	242	(74%)
Mutations ; n	605	
Nombre de mutation(s) par prélèvement		
1 ; n (%)	61	(25%)
2 ; n (%)	65	(27%)
3 ; n (%)	36	(15%)
4 ; n (%)	39	(16%)
5 ; n (%)	22	(9%)
6 ; n (%)	13	(5%)
7 ; n (%)	2	(0,5%)
8 ; n (%)	3	(1%)
9 ; n (%)	1	(0,5%)
Nombre de mutations par gène		
1 ; n (%)	538	(89%)
2 ; n (%)	51	(8%)
3 ; n (%)	13	(2%)
4 ; n (%)	3	(1%)
Famille de gènes mutée		
Epigénétiques ; n (%)	248	(41%)
Facteurs et cofacteurs de la transcription ; n (%)	85	(14%)
Voies d'activation ; n (%)	82	(14%)
Signaux d'activation ; n(%)	74	(12%)
Splicéosome ; n (%)	71	(12%)
Nucléophosmine	22	(4%)
Suppresseur de tumeur	23	(4%)
Signes cliniques		
Généraux ; n (%)	38	(12%)
Hématologiques ; n (%)	48	(15%)
Cutanées ; n (%)	15	(5%)
Infectieux ; n (%)	18	(5%)
Tumoraux ; n (%)	8	(2%)
Cérébraux ; n (%)	3	(1%)
Autres signes cliniques ; n (%)	13	(4%)
Pas de signes cliniques ; n (%)	182	(56%)
Non renseigné ; n (%)	3	(1%)

été significativement plus fréquente que le motif recherche de cible thérapeutique dans les SMP ($p < 0.001$) et les SF ($p < 0.001$).

Le taux de décès global était de 21% (55 patients), avec un suivi de 6 mois à 4 ans. Une surmortalité significative a été observée dans le groupe LA par rapport à l'ensemble des autres groupes ($p < 0.001$), et par rapport au groupe A ($p = 0.04$).

II. Résultats de l'analyse NGS

1. Cohorte globale

Sur l'ensemble de la cohorte, un total de 605 mutations a été identifié (**Tableau 2**). Au moins une mutation a été retrouvée (Hématopoïèse Clonale : HC) sur 242 prélèvements (74%). Dans 53% de ces prélèvements, un caryotype normal a été rendu. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre l'âge médian de la cohorte et l'âge médian des patients présentant au moins une mutation ($p = 0,13$).

Parmi les prélèvements « mutés », 52% (126/242) présentaient une à deux mutations, 15% (36/242) avaient trois mutations, 16% (39/242) quatre mutations, 9% (22/242) cinq mutations, 5% (13/242) six mutations, 0,5% (2/242) sept mutations, 1% (3/242) huit mutations et un prélèvement présentait neuf mutations.

Les gènes les plus fréquemment mutés sont *TET2* (14%), *ASXL1* (11%) et *DNMT3A* (9%) (**Figure 7**), impliqués tous les trois dans les processus épigénétiques. Ils représentent à eux seuls 41% des mutations ($p < 0,001$ par rapport aux autres types de gènes). Viennent ensuite les mutations touchant des facteurs ou cofacteurs de transcription (14%), celles responsables de modifications de voies d'activation (14%), de modifications du signal d'activation (12%), et enfin celles touchant le spliceosome (12%). Les mutations de gène suppresseur de tumeur représentent seulement 4% des mutations, tout comme les mutations impliquant la nucléophosmine. Aucune mutation n'a été identifiée pour *ABL*, *BRAF* et *HRAS*.

Dans la majorité des prélèvements (89%), chacun des gènes mutés ne porte qu'une mutation. Cependant, certains gènes peuvent être mutés à différentes positions. C'est le cas du gène *TET2* avec respectivement deux et trois mutations dans 30% et 7% des cas respectivement. Il en est de même pour les gènes *KIT* et *CBL*, pour lesquels ont été identifiées jusqu'à 4 mutations par gène sur un même prélèvement.

A l'inverse, les gènes *CSF3R*, *MPL*, *KRAS*, *ETV6*, *SETBP1*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *CALR*, présentent systématiquement des mutations « uniques ».

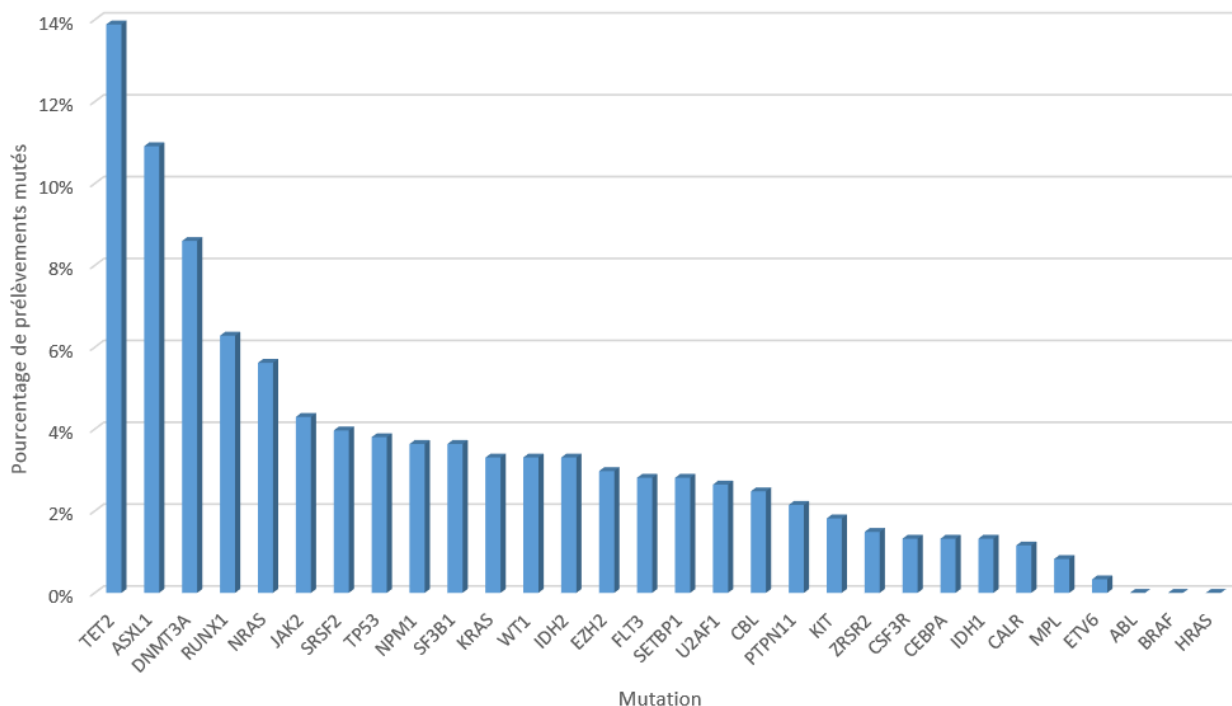


Figure 7 : Distribution des mutations identifiées en NGS (n = 605 mutations) pour l'ensemble de la cohorte (n = 328 prélèvements)

Le pourcentage de prélèvements mutés pour chacun des gènes du panel a été évalué. Environ la moitié des mutations identifiées sont retrouvées sur les gènes *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1* et *NRAS*.

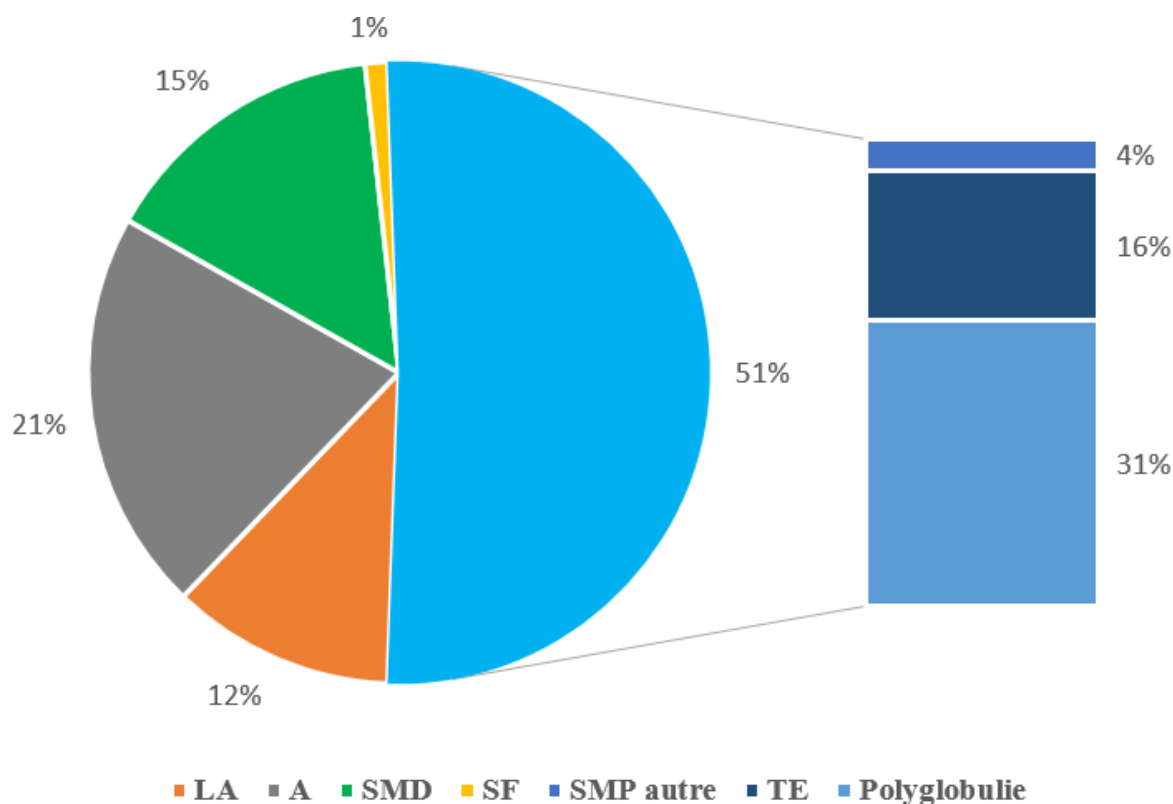


Figure 8 : Répartition des prélèvements sans hématopoïèse clonale identifiée en NGS

La majorité des prélèvements pour lesquels aucun marqueur de clonalité n'a été identifié concerne les patients adressés pour SMP, en particulier les SMP de type Polyglobulie de Vaquez.

LA : Leucémie Aiguë ; A : Autre diagnostic ; SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique ; SMP autres : Syndrome Myélo-Prolifératif autre ; TE : Thrombocyémie Essentielle.

Aucune mutation n'a été identifiée pour 86 prélèvements (26% de la cohorte). Parmi ces derniers, 66% ont eu un caryotype, pour lequel aucune anomalie cytogénétique n'a été identifiée dans 82% des cas. Parmi les caryotypes anormaux, les principales anomalies cytogénétiques identifiées concernaient les chromosomes sexuels.

Au niveau des pathologies lorsqu'aucune mutation n'a été identifiée, un SMP a été conclu pour 44 prélèvements (51%) (**Figure 8**). Plus précisément, 27 prélèvements (31%) concernaient des patients diagnostiqués comme atteints de polyglobulie, 14 (16%) ayant une thrombocyémie essentielle (TE) triple négative et 3 (4%) un autre SMP. Une mutation *JAK2* V617F faible (<1%) a été identifiée par qPCR dans trois prélèvements. Sur les 42 prélèvements restants sans HC, 18 (21%) ont été réalisés chez des patients avec un diagnostic final A, 13 (13%) concernaient des patients ayant un SMD (10 avec caryotype normal), 10 (12%) des patients atteints de LA (5 cas en rémission et 5 cas en suspicion de rechute sans confirmation cytologique) et un prélèvement (1%) un SF.

Plusieurs explorations NGS ont été effectuées pour 35 patients, représentant 74 prélèvements. Chez 63% des patients (22 patients, 46 prélèvements), la nature du prélèvement était différente. Aucune variation significative (< 20%) de VAF concernant les mutations n'a été notée entre les différents prélèvements pour 11 patients (23 prélèvements). Aucune mutation n'a été décrite dans les différents prélèvements de six patients (13 prélèvements).

2. Groupe Syndrome Myélo-Prolifératif (SMP)

Un diagnostic final SMP a été retenu pour 93 prélèvements répartis en 38 polyglobulies (41%), 29 Thrombocytémies Essentielles (TE) (31%), 13 myélofibroses (14%) et 13 SMP autres (14%) (**Figure 9A**). Aucune mutation n'a été mise en évidence pour 44 prélèvements (47%). Une HC a été identifiée pour 49 prélèvements (53%), avec un nombre médian de mutations égal à deux (1-8) pour un total de 105 mutations identifiées.

Les mutations les plus fréquentes ont été détectées sur les gènes *ASXL1* (13%), *TET2* (12%), *JAK2* (12%) et *DNMT3A* (9%) (**Figure 10A**). Des mutations sur les gènes *CALR* et *MPL* ont été identifiées dans respectivement 4 et 5% des cas.

Les mutations épigénétiques étaient les plus fréquentes (n = 44, 42%) suivies des mutations touchant les signaux d'activation (n = 30, 29%), le spliceosome (n = 12, 11%), les voies d'activation (n = 9, 8%), les facteurs de transcription (n = 8, 8%) et les gènes suppresseurs de tumeur (n = 2, 2%).

Les mutations des gènes *JAK2* et *MPL* sont significativement plus fréquentes dans les SMP que dans les autres groupes pathologiques (test de Marascuilo, $p < 0.05$). Toutes les mutations

MPL identifiées dans la cohorte ont été décrites dans le groupe diagnostique SMP (**Figure 11**). Concernant les autres mutations *drivers*, 57% des mutations *CALR* et 50% des mutations *JAK2* ont été rapportées dans ce groupe pathologique.

3. Groupe Syndrome Myélo-Dysplasique (SMD)

Un diagnostic final de SMD a été retenu pour 49 prélèvements. Parmi eux, 73% (n = 36) présentaient une HC sans anomalie cytogénétique pour environ la moitié d'entre eux (52%). Le nombre médian de mutations par prélèvement est semblable à celui de la cohorte (1 à 5 mutations). Les gènes les plus fréquemment mutés dans ce groupe sont *TET2* (22%), *SF3B1* (16%) et *ASXL1* (9%) (**Figure 10B**).

Sur les 77 mutations identifiées, près de la moitié concernent des gènes acteurs de mécanismes épigénétiques (n = 37, 48%). Viennent ensuite des mutations impliquant des membres du spliceosome (n = 18, 23%), puis celles touchant les facteurs et co-facteurs de la transcription (n = 9, 12%), celles responsables de modifications de voies d'activations (n = 6, 8%), celles impliquant des gènes suppresseurs de tumeur (n = 6, 8%) et enfin une mutation touchant un signal d'activation. Aucune mutation n'a été mise en évidence pour 13 prélèvements (27%).

Toutes les mutations d'*ETV6* identifiées dans la cohorte ont été décrites dans le groupe SMD (**Figure 11**). Les mutations *SF3B1* et *ETV6* sont significativement plus fréquentes dans ce groupe de pathologie (test de Marascuilo, $p < 0.05$).

4. Groupe Syndrome Frontière (SF)

Un diagnostic final SF a été retenu pour 38 prélèvements répartis en 33 Leucémies Myélo-Monocytaires Chroniques (LMMC) (87%), 2 Leucémies Myéloïdes Chroniques atypiques (LMCa) (5%) et 3 SF autres (8%) (**Figure 9B**). Une HC a été décrite dans 97% des cas. Le nombre médian de mutations retrouvé par prélèvement était de trois (1-6 mutation), comparable à celui retrouvé pour l'ensemble de la cohorte ($p = 0,18$). Les gènes les plus fréquemment mutés dans ce groupe sont *TET2* (19%), *ASXL1* (17%), *NRAS* (9%), *SRSF2* (9%) et *RUNX1* (8%) (**Figure 10C**). *SETBP1* et *JAK2* sont retrouvés mutés dans 6% des cas, *SF3B1* dans 4% et *DNMT3A* dans 2% des cas. Aucune mutation sur le gène *CSF3R* n'a été rapportée.

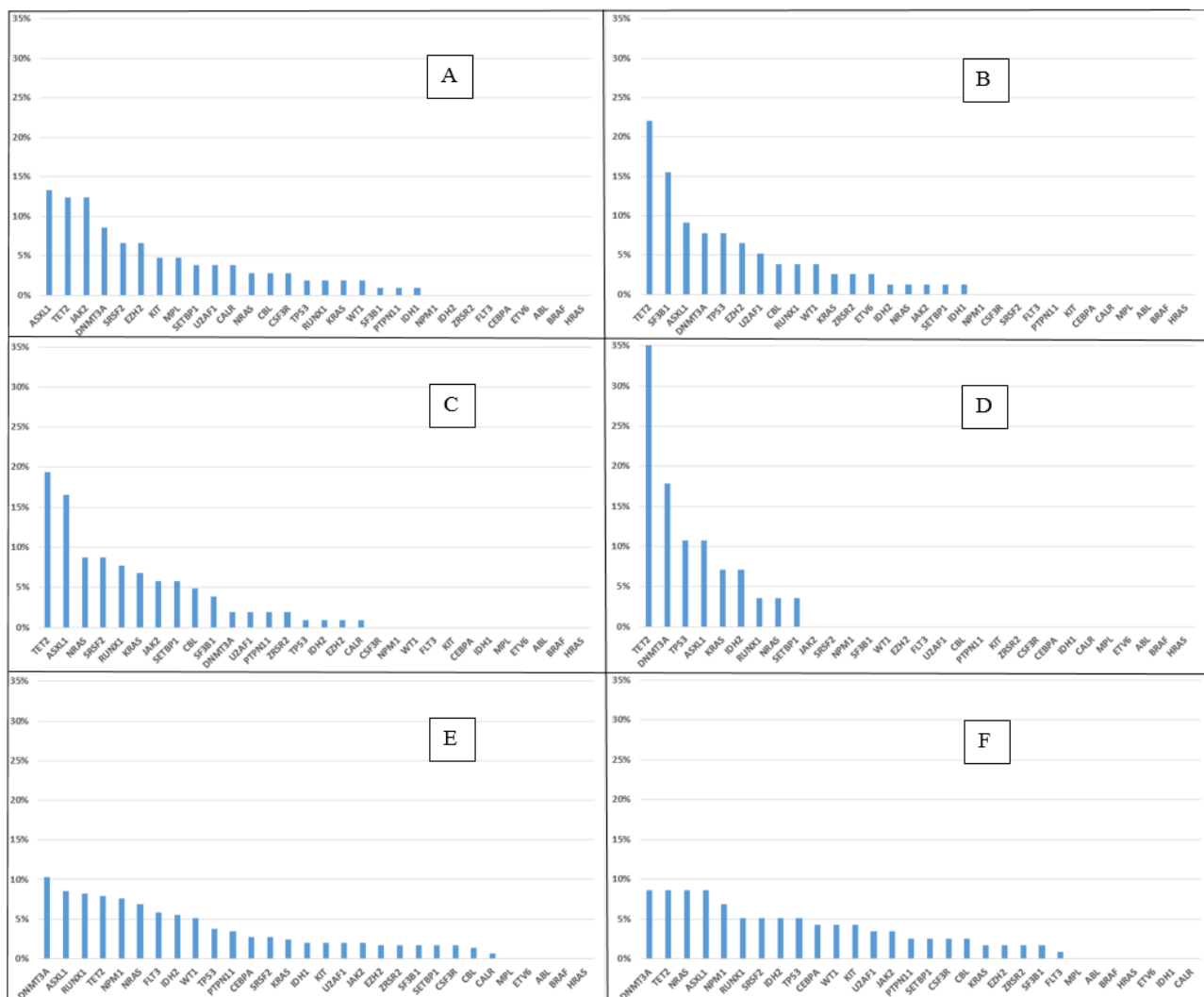


Figure 10 : Répartition des mutations selon le diagnostic final retenu

Le pourcentage de prélèvements mutés pour chacun des gènes du panel a été évalué pour (A) le groupe SMP, (B) le groupe SMD, (C) le groupe SF, (D) le groupe A, (E) le groupe LA « entier » et (F) le groupe LA au diagnostic.

Pour la majorité des groupes, les gènes TET2 et DNMT3A sont parmi les plus fréquemment mutés.

A : groupe Syndrome Myélo-Prolifératif ; B : groupe Syndrome Myélo-Dysplasique ; C : groupe Syndrome Frontière ; D : groupe Autre diagnostic ; E : groupe Leucémie Aiguë (toutes LA) ; F : groupe Leucémie Aiguë au diagnostic.

Concernant les 103 mutations identifiées, les mutations « épigénétiques » sont majoritaires (n = 41, 40%). Une répartition équilibrée entre les mutations touchant les voies d'activation (n = 23, 22%), le splicéosome (n = 17, 16%) et les facteurs de transcription (n = 14, 14%) a été mise en évidence. Les mutations de signaux d'activation ont été retrouvées pour 7 prélèvements (7%) et un prélèvement présentait une mutation sur un gène suppresseur de tumeur. Un prélèvement n'a présenté aucune mutation (3%), le diagnostic final étant une LMMC.

Pour les 33 prélèvements pour lesquels un diagnostic final de LMMC a été retenu, l'intégration des résultats du NGS au score CPSS (CPSS-Mol) a conduit à un reclassement (kappa = 0,1) de 21 cas vers les groupes de pronostic péjoratif (**Tableau 3**). Sur les 3 prélèvements classés en faible risque avec le CPSS, deux ont été reclassés grâce au CPSS-Mol : un dans le groupe *intermédiaire 1* et l'autre en *intermédiaire 2*. Les 16 cas identifiés comme ayant un risque *intermédiaire 1* avec le CPSS ont été reclassés pour la moitié d'entre eux (n = 9, 52%) en *intermédiaire 2* et en haut risque pour un prélèvement. Sur les 13 prélèvements *intermédiaire 2*, 69% (n = 9) ont été reclassés dans le groupe à haut risque.

Plus d'un tiers des mutations des gènes *SRSF2* (38%), *SETBP1* (35%), *KRAS* (35%) et *CBL* (33%) ont été retrouvées dans le groupe SF (**Figure 11**). Le gène *SRSF2* est significativement plus souvent muté dans le groupe SF par rapport aux groupes SMD et A, respectivement (test de Marascuilo, $p < 0.05$).

5. Groupe Autre diagnostic (A)

Sur les 36 prélèvements classés dans la catégorie Autre (16 lymphomes T, 7 lymphomes B, 4 aplasies médullaires et 9 diagnostics autres), une HC a été identifiée pour 18 cas (50%) (**Figure 9B**). Le nombre médian de mutations par prélèvement était d'une mutation (1-6) ($p = 0,03$ avec la cohorte). Les gènes les plus fréquemment mutés sont *TET2* (36%), *DNMT3A* (18%), *TP53* (11%) et *ASXL1* (11%) (**Figure 10D**). Les seules autres mutations retrouvées concernent *KRAS* (7%), *IDH2* (7%), *RUNX1* (4%), *NRAS* (4%) et *SETBP1* (4%).

Sur les 28 mutations identifiées, 73% concernent des modifications des acteurs épigénétiques (n = 20), 11% (n = 3) touchent des voies d'activation et des gènes suppresseurs de tumeur et 7% (n = 2) des facteurs de la transcription. Aucune mutation n'a été identifiée pour 18 prélèvements (50%).

6. Groupe Leucémie Aiguë (LA)

Ce groupe comporte 111 cas de LA, répartis en 63 LA et 48 LA secondaires (**Figure 9C**). La majorité des prélèvements (n = 62, 56%) a été effectuée au moment de la rechute. Les autres

		Groupes de pathologies				
		SMP	SMD	SF	Autres	LA
Gènes	CSF3R	38%	0%	0%	0%	63%
	FLT3	0%	0%	0%	0%	100%
	JAK2	50%	4%	23%	0%	23%
	KIT	45%	0%	0%	0%	55%
	MPL	100%	0%	0%	0%	0%
	ABL	0%	0%	0%	0%	0%
	BRAF	0%	0%	0%	0%	0%
	HRAS	0%	0%	0%	0%	0%
	KRAS	10%	10%	35%	10%	35%
	NRAS	9%	3%	26%	3%	59%
	PTPN11	8%	0%	15%	0%	77%
	ASXL1	21%	11%	26%	5%	38%
	CEBPA	0%	0%	0%	0%	100%
	RUNX1	5%	8%	21%	3%	63%
	ETV6	0%	100%	0%	0%	0%
	SETBP1	24%	6%	35%	6%	29%
	WT1	10%	15%	0%	0%	75%
	DNMT3A	17%	12%	4%	10%	58%
	EZH2	39%	28%	6%	0%	28%
	IDH1	13%	13%	0%	0%	75%
	IDH2	0%	5%	5%	10%	80%
	TET2	15%	20%	24%	12%	27%
	NPM1	0%	0%	0%	0%	100%
	SF3B1	5%	55%	18%	0%	23%
	SRSF2	29%	0%	38%	0%	33%
	U2AF1	25%	25%	13%	0%	38%
	ZRSR2	0%	22%	22%	0%	56%
	CALR	57%	0%	14%	0%	29%
CBL	20%	20%	33%	0%	27%	
TP53	9%	26%	4%	13%	48%	

Figure 11 : Heat map de la répartition des mutations selon les groupes de pathologies du diagnostic final retenu

Le pourcentage de mutation a été évalué dans chacun des groupes définis pour le diagnostic final retenu, et ceci pour chacun des gènes du panel. Certains gènes, comme FLT3 ou NPM1, sont mutés uniquement dans les LA alors que d'autres, comme TET2, sont retrouvés à des fréquences relativement proches entre les différents groupes.

SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif ; SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique ; SF : Syndrome Frontière ; A : Autre diagnostic ; LA : Leucémie Aiguë.

ont été réalisés lors du diagnostic (n = 42, 38%) ou pendant le suivi sans rechute de l'hémopathie (n = 7, 6%).

Une HC a été identifiée pour 101 prélèvements (91%), soit 291 mutations. Le nombre de mutations par prélèvement est significativement plus élevé dans le groupe LA par rapport au reste de la cohorte, avec une médiane de 3 mutations par prélèvement (1-8) ($p = 0,02$). Les mutations des gènes *DNMT3A* (10%), *ASXL1* (9%), *RUNX1* (8%), *TET2* (8%) et *NPM1* (8%) sont les plus fréquentes (**Figure 10E**). Les autres mutations concernent les gènes *FLT3* (6%), les gènes *WT1* et *IDH2* (5%), le gène *TP53* (4%), le gène *CEBPA* (3%) et le gène *IDH1* (2%). Pour les prélèvements effectués lors du diagnostic de LA (116 mutations), les gènes les plus fréquemment mutés sont *DNMT3A*, *TET2*, *NRAS* et *ASXL1* (9% des cas respectivement) (**Figure 10F**). Les mutations du gène *FLT3* ne sont retrouvées que dans 1% des cas au diagnostic de LA.

Les mutations des acteurs épigénétiques sont majoritaires (n = 105/291, 36%). Les autres mutations se répartissent de façon équilibrée entre les gènes codant les facteurs de transcription (n = 52, 18%), ceux impliqués dans les voies d'activation (n = 41, 14%) et les signaux d'activation (n = 36, 12%), les acteurs du spliceosome (n = 24, 8%), la nucléophosmine (n = 22, 8%) et les gènes suppresseurs de tumeur (n = 11, 4%).

L'ensemble des mutations sur les gènes *FLT3*, *CEBPA* et *NPM1* est retrouvée exclusivement dans le groupe LA (**Figure 11**), et plus de trois-quarts des mutations des gènes *IDH1* (75%), *WT1* (75%), *PTPN11* (77%) et *IDH2* (80%) concernent également ce groupe. Les mutations du gène *WT1* sont significativement plus fréquentes dans les LA par rapport aux groupes SF et A, respectivement (test de Marascuilo, $p < 0,05$). De la même manière, le gène *DNMT3A* est plus souvent muté dans les LA par rapport aux SF. Le gène *IDH2* est plus souvent touché dans les LA par rapport aux SMP et *PTPN11* par rapport aux SMD et A.

Pour 45 prélèvements (41%), la présence de mutations sur les gènes *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53* a permis un reclassement de patient initialement classés en faible risque (n = 17) ou risque intermédiaire (n = 18) dans le groupe à haut risque selon la classification ELN 2017.

Parmi les 14 patients pour lesquels plusieurs analyses NGS ont été réalisées (29 prélèvements), 7 (50%) ont présenté une augmentation du nombre de mutations. Pour 4 patients, un prélèvement a été effectué au moment du diagnostic et lors de la rechute, permettant une comparaison des profils de mutations (**Figure 12**) :

- Le patient 176 a perdu toutes ses mutations (*KRAS*, *ASXL1* et *IDH2*) entre le prélèvement diagnostique et celui effectué lors de la rechute

Tableau 3 : Évolution du score pronostic CPSS en CPSS-Mol avec prise en compte des mutations identifiées en NGS dans les LMMC

		CPSS-Mol				Total
		Low	Intermediaire 1	Intermediaire 2	High	
CPSS	Low	1	1	1	0	3
	Intermediaire 1	0	6	9	1	16
	Intermediaire 2	0	0	4	9	13
	High	0	0	0	1	1
	Total	1	7	14	11	33

Le score CPSS a été évalué avant et après NGS (CPSS-Mol). Un seul patient a été identifié à haut risque avant NGS, contre 11 après.

CPSS : CMML Specific Pronostic System ; CPSS-Mol : CMML Specific Pronostic System – Molecular ; LMMC : Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique.

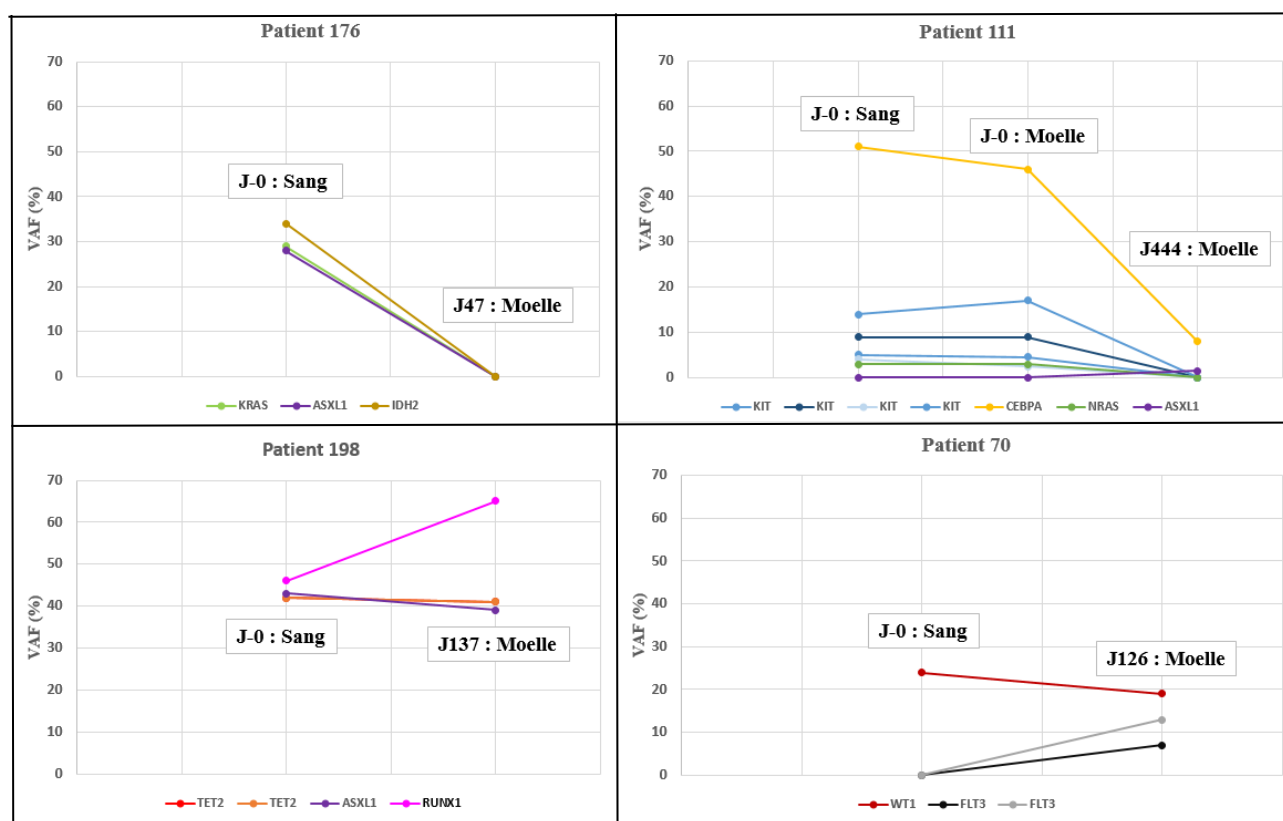


Figure 12 : Évolution des profils mutationnels en fonction des prélèvements répétés chez des patients LAM

Pour n = 4 patients, au moins deux analyses NGS ont été réalisées au diagnostic et à la rechute, permettant de suivre l'évolution des clones.

VAF : fréquence allélique estimée (%) ; ● : prélèvement

- Au diagnostic, le patient 111 était porteur de mutations sur les gènes *KIT*, *CEBPA* et *NRAS* (même profil mutationnel entre sang et moelle). A la rechute, les mutations sur le gène *KIT* ont disparu, le clone *CEBPA* a diminué de façon significative (46% à 8%) et une mutation touchant le gène *ASXLI* est apparue (VAF = 1,5%).

- Concernant le patient 198, les quatre mêmes mutations (*ASXLI*, *RUNXI* et deux mutations sur *TET2*) sont retrouvées au diagnostic et à la rechute. Une variation non significative (<20% VAF) de la mutation *RUNXI* a été observée, les autres mutations n'ayant pas évolué.

- Le patient 70 est porteur d'une mutation sur le gène *WTI* estimée à 24% au diagnostic qui n'a pas évolué lors de la rechute. Cependant, deux mutations touchant *FLT3* sont apparues sur le prélèvement réalisé au moment de la rechute. La présence de ces mutations *FLT3* a été confirmée par technique Sanger (FLT3-ITD).

7. Relation entre l'indication du NGS et le diagnostic retenu final

Un diagnostic final de SMP a été retenu pour 28% de la cohorte (n = 93 prélèvements). Pour la grande majorité des cas, l'indication de départ était également un SMP (n = 91). Seulement une indication initiale de SMD et une indication initiale de SF ont finalement été reclassées en diagnostic retenu final de SMP. A noter que le diagnostic retenu final n'a pas pu être recueilli pour un prélèvement (indication initiale SMP).

Parmi les 15% de prélèvements pour lesquels un diagnostic final SMD a été retenu (n = 49), 88% (n = 43) avaient une indication initiale de SMD. Les prélèvements discordants étaient représentés par des indications initiales de SMP (n = 2), SF (n = 1) ou d'autre pathologie (n = 3).

Le groupe pathologique présentant le plus d'inadéquation entre l'indication initiale et le diagnostic retenu final a été le groupe SF (12% de la cohorte). Plus d'un tiers (37%, n = 14) des cas de SF étaient adressés avec une indication initiale de SMP (n = 10), de SMD (n = 3) ou d'autre pathologie (n = 1).

Concernant le groupe A (11% de la cohorte), nous avons observé une adéquation entre le diagnostic retenu final et l'indication initiale dans 81% des cas. Deux prélèvements avec une indication initiale SMP, deux avec une indication initiale SF ainsi que trois avec une indication initiale SMD ont été reclassés dans le groupe A en diagnostic retenu final.

Enfin, un diagnostic final de LA a été retenu pour 34% (n = 111 prélèvements) de la cohorte. Les prélèvements discordants étaient représentés par des indications initiales de SMP (n = 7), de SMD (n = 5) et de SF (n = 5).

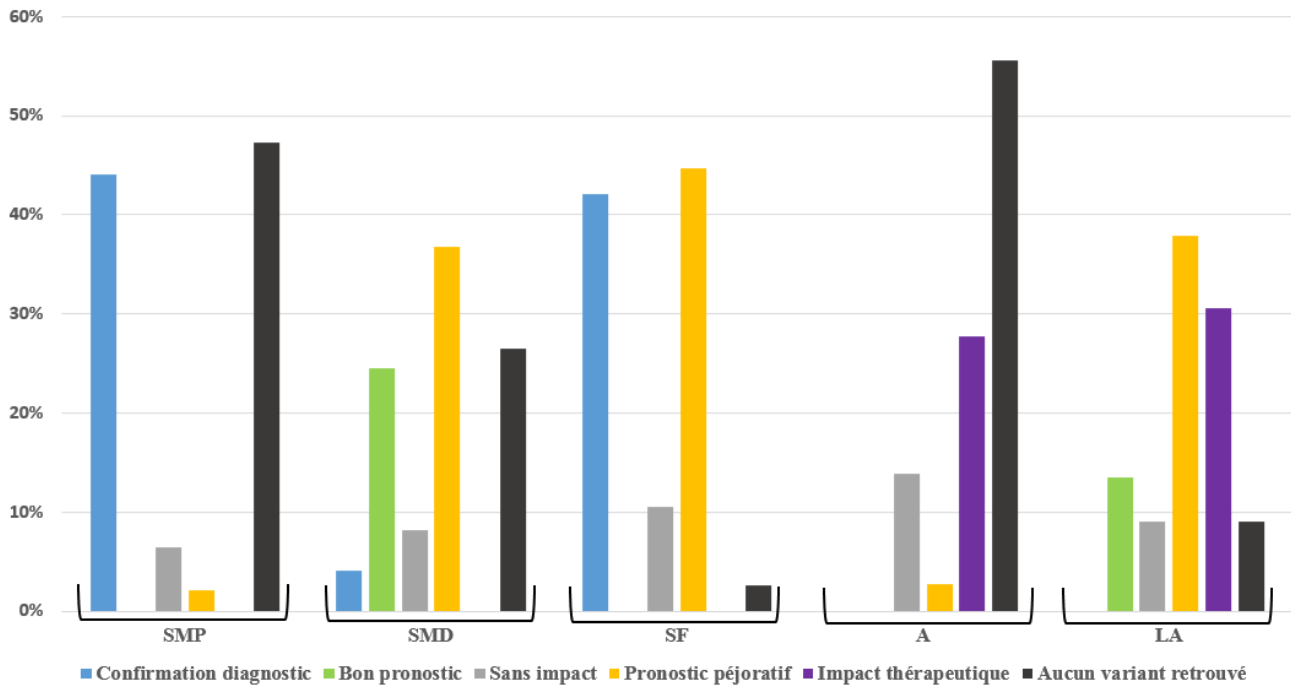


Figure 13 : Analyse de l'apport clinique des résultats de NGS

L'apport du résultat de l'analyse NGS a été évalué pour chaque prélèvement, et ceci pour chacun des groupes définis pour le diagnostic retenu final. Près de la moitié des analyses NGS ont permis un apport pronostique. Un apport diagnostique est plus fréquemment retrouvé pour les groupes SMP et SF alors que l'impact thérapeutique est visible exclusivement dans les groupes A et LA.

SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif ; SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique ; SF : Syndrome Frontière ; A : Autre diagnostic ; LA : Leucémie Aiguë.

III. Analyse de l'apport clinico-biologique du NGS

La majorité des analyses NGS ($n = 136$ prélèvements, 42%) a été réalisée dans un intérêt pronostique. Des mutations associées à un pronostic péjoratif ont été identifiées pour 80 prélèvements (24%), des mutations de bon pronostic pour 27 prélèvements (8%) et des mutations sans impact pour 29 prélèvements (9%). Dans 59 cas (18%), le NGS a permis une confirmation diagnostique. Des mutations ayant un intérêt thérapeutique ont été identifiées pour 44 prélèvements (13%). Aucune mutation n'a été identifiée pour 88 prélèvements (27%). Un prélèvement a été exclu de cette analyse (pas de diagnostic retenu final).

Sur les 93 prélèvements adressés pour SMP, le NGS a permis de confirmer le diagnostic pour 41 prélèvements (44%) (**Figure 13**), contrairement aux autres groupes SMD, A et LA ($p < 0.05$, test de Marascuilo). Le NGS a eu un impact pronostique pour 8 cas (9%), dont 2 prélèvements (2%) avec des mutations de mauvais pronostic. Des mutations sans impact ont été identifiées pour 6 prélèvements (6%). Aucune mutation à impact thérapeutique n'a été observée dans ce groupe. Aucun variant n'a été décrit pour 44 prélèvements (47%).

Concernant les SMD ($n = 49$), l'apport du NGS a été principalement pronostique. Des mutations associées à un pronostic péjoratif ont été observées pour 18 cas (37%), des mutations de bon pronostic pour 12 prélèvements (25%) et des mutations sans impact pour 4 cas (8%). Pour deux prélèvements (3%), le NGS a permis de confirmer le diagnostic. Aucune mutation à visée thérapeutique n'a été observée. Aucun variant n'a été identifié pour 13 prélèvements (27%).

L'intérêt principal du NGS pour le groupe SF ($n = 38$) a été un apport diagnostique ($n = 16$, 42%), ce qui n'a pas été observé dans les groupes SMD, A et LA ($p < 0,05$, test de Marascuilo). Pour 17 prélèvements (45%), le NGS a permis d'identifier des mutations ayant un pronostic péjoratif. Des mutations sans impact ont été retrouvées dans quatre prélèvements (11%) et un prélèvement (3%) ne présentait pas de mutation.

Concernant le groupe Autre diagnostic, une cible thérapeutique a été identifiée pour 10 cas (28%). Une mutation de mauvais pronostic a été retrouvée pour un prélèvement (3%) et cinq prélèvements (14%) portaient des mutations sans impact. Aucune mutation n'a été observée pour 20 cas (56%).

Dans le groupe LA, des mutations ayant un impact péjoratif ont été décrites dans 42 cas (38%). A l'inverse, des marqueurs de bon pronostic ont été identifiés dans 15 prélèvements (14%). Des mutations sans impact connu ont été observées pour 10 prélèvements (9%). Une

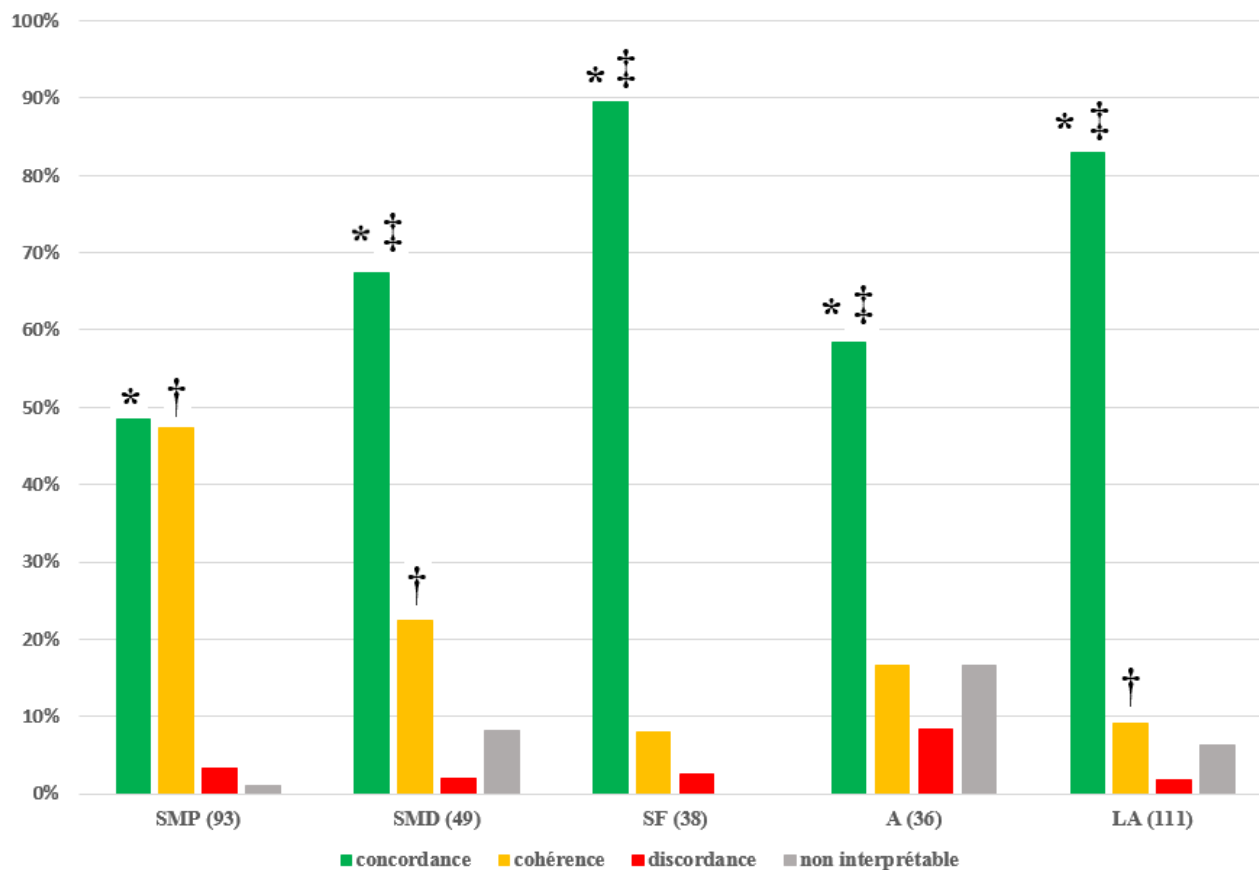


Figure 14 : Analyse de la concordance entre le résultat du NGS et le diagnostic final.

La concordance entre le résultat du NGS et le diagnostic retenu final a été évaluée pour chacun des groupes pathologiques. Une concordance ou une cohérence des conclusions est retrouvée dans chacun des groupes dans plus 90% des cas.

* : $p < 0,05$ entre concordance et discordance ; ‡ : $p < 0,05$ entre concordance et cohérence ;

† : $p < 0,05$ entre cohérence et discordance

SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif ; SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique ; SF : Syndrome Frontière ; A : Autre diagnostic ; LA : Leucémie Aiguë.

cible thérapeutique a été identifiée pour 34 cas (31%). Aucun variant n'a été détecté pour 10 prélèvements (9%).

IV. Analyse de la concordance des conclusions

Indépendamment du motif de demande initiale de l'analyse NGS, une concordance entre les conclusions du NGS et le diagnostic retenu final a été décrit dans 69% des cas ($n = 225/327$). Une cohérence et une discordance de conclusions ont été observées dans 21% ($n = 74$) et 4% ($n = 10$) des cas, respectivement. Enfin, cette analyse de concordance n'a pu être réalisée dans 6% des cas ($n = 18$) car les résultats étaient ininterprétables.

Concernant les patients pour lesquels un diagnostic final de SMP a été retenu, la conclusion du NGS a été concordante dans 48% des cas ($n = 45$) et cohérente dans 47% des cas ($n = 44$) (**Figure 14**). Pour trois prélèvements (3%), nous avons observé une discordance entre les conclusions du NGS et le diagnostic retenu final, probablement en raison des difficultés diagnostiques entre un SMP et un SF. Dans ce groupe, les taux de concordance et de cohérence sont significativement plus élevés que le taux de discordance ($p < 0,001$).

Dans le groupe SMD, une concordance entre les conclusions du NGS et le diagnostic final a été observée pour 67% des prélèvements ($n = 33/49$), ce qui est significativement plus élevé ($p < 0,001$) que le taux de cohérence ($n = 11$, 22%). Pour un prélèvement (2%), une discordance entre la conclusion du NGS et le diagnostic retenu a été observée, également en raison d'une difficulté diagnostique avec les SF. Dans ce groupe, les taux de concordance et de cohérence sont significativement plus élevés que le taux de discordance ($p < 0,001$).

Concernant le groupe SF, la conclusion de NGS a été concordante avec le diagnostic retenu dans 89% des cas ($n = 34/38$) et cohérente dans 8% des cas ($n = 3$). Nous avons noté une discordance pour un seul prélèvement (3%), dans lequel aucune mutation n'a été mise en évidence. Dans ce groupe, la majorité des prélèvements présentent une concordance entre la conclusion du NGS et le diagnostic retenu ($p < 0,001$).

Dans le groupe A, une concordance entre les conclusions du NGS et le diagnostic retenu a été retrouvée pour 21 prélèvements (58%). Les conclusions étaient cohérentes pour 6 prélèvements (17%) et discordantes pour 3 prélèvements (8%). Nous n'avons pu établir ni concordance, ni cohérence, ni discordance pour 6 prélèvements (17%). Une concordance est donc retrouvée dans la majorité des cas ($p < 0,001$).

Concernant les prélèvements pour lesquels un diagnostic final de LA a été retenu, la conclusion du NGS a été concordante dans 83% des cas ($n = 92/111$) et cohérente dans 9% (n

= 10). Pour deux prélèvements (2%), nous avons observé une discordance entre les conclusions du NGS et le diagnostic retenu, en raison de l'identification de mutations plutôt caractéristiques des SMD. Dans ce groupe, le taux de concordance est significativement plus élevé que dans les autres groupes ($p < 0,001$), et le taux de cohérence est significativement plus élevé que le taux de discordance ($p < 0,001$).

Discussion

Cette étude observationnelle rétrospective de juillet 2017 à décembre 2019 a permis de réaliser un état des lieux quant à l'utilisation du NGS dans la prise en charge des patients atteints d'hémopathies myéloïdes au CHU de Clermont-Ferrand. Bien qu'une forte croissance de l'utilisation de cette technique soit observée en France, peu d'études sur ses conséquences en pratique courante ont été menées. Ainsi les objectifs de ce travail étaient de déterminer l'impact des mutations somatiques identifiées par NGS sur le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients suspects ou atteints d'hémopathies myéloïdes. Dans un second temps, la concordance entre les résultats du NGS et le diagnostic final retenu a été évaluée.

Dans cette étude, les demandes d'analyse NGS provenaient majoritairement du service d'Hématologie Clinique (73%), conformément à ce qui a été rapporté dans le Projet de Recherche Médico-Economique intitulé « Réseau de Biologie Innovatrice en onco-Hématologie - Evaluation médico économique des actes innovants en onco-hématologie moléculaire inscrits sur la liste RIHN » (RuBIH2) pour lequel 90% des prescriptions de NGS sont effectuées par un service d'Hématologie Clinique. Le NGS est essentiellement pratiqué en deuxième intention lorsque les techniques classiques n'ont pas permis de répondre aux critères diagnostiques des hémopathies et nécessite une interprétation par un biologiste et un médecin spécialiste de la discipline. C'est pour cela qu'un staff moléculaire a récemment été mis en place, réunissant les acteurs prenant part au NGS (à la fois myéloïde et lymphoïde), permettant une revue des dossiers, à la fois technique et biologique. Les dossiers les plus « critiques » sont ensuite présentés en staff clinique une fois par mois.

Une hématoïèse clonale a été retrouvée pour 74% des prélèvements, avec une médiane de deux mutations par prélèvements. Ceci est cohérent avec les diverses études concernant les hémopathies myéloïdes qui rapportent, en général, moins de mutations que ce qui est observé dans les autres cancers. D'autre part, parmi les hémopathies myéloïdes, les pathologies chroniques présentent moins de mutations que les leucémies aiguës (51,75). Globalement, ce nombre limité de gènes cibles a permis d'améliorer rapidement les connaissances quant à leur rôle dans la physiopathologie.

TET2, *ASXL1* et *DNMT3A* sont les gènes les plus fréquemment mutés dans la cohorte, tel que décrit dans la littérature (76). Cependant, des mutations sur ces gènes peuvent être liées à l'âge (35,77) et être également observées chez des patients sans hémopathie (CHIP), ce qui rend leur interprétation délicate chez les patients de plus de 70 ans où une décision multidisciplinaire reste nécessaire (58).

La majorité des demandes de NGS de cette étude a été faite dans un contexte de SMP et près de la moitié des analyses ont permis de confirmer le diagnostic. Le NGS a donc eu un impact important pour le diagnostic des SMP, en particulier les SMP rares. En effet, il a permis l'identification de mutations clés chez tous les patients « suspects » de leucémie chronique à polynucléaires neutrophiles, avec des mutations touchant les gènes *CSF3R*, *ASXL1* ou *SETBP1* (78,79), et de mastocytose, avec la détection de mutations sur le gène *KIT* (11). Comme attendu, les mutations touchant les gènes *drivers*, *JAK2*, *CALR* et *MPL*, ont été identifiées de façon mutuellement exclusives et ont été retrouvées dans 21% des prélèvements, permettant de confirmer le diagnostic (80). De plus, dans ce travail, les mutations *drivers* ont été la seule anomalie retrouvée pour 38% des prélèvements de SMP et la proportion de ces mutations étaient plus importante dans les MFI que dans les PV ou les TE, ce qui est également cohérent avec la littérature (81). D'autres mutations ont été mises en évidence dans les SMP, comme des mutations de second ordre touchant les gènes *TET2* et *DNMT3A* retrouvées dans 27% et 18% des cas, respectivement. Les mutations sur ces gènes peuvent être à la fois liées à l'âge (75,82), témoigner de l'initiation du SMP lorsqu'elles surviennent avant les mutations *drivers* ou être un témoin de la progression du SMP lorsqu'elles apparaissent secondairement (35). La présence de mutations sur les gènes *ASXL1* (13%), *EZH2* (7%) et *SRSF2* (7%) retrouvées majoritairement dans les SMP non PV et non TE sont associées à un mauvais pronostic, en plus de leur rôle diagnostique. En effet, ces mutations induisent un risque de transformation en MFI ou LAM plus élevé (35,80,83,84). Dans les MFI, l'association des mutations des gènes *ASXL1*, *SRSF2* et *U2AF1* sont importantes dans la décision d'enclencher un traitement par allogreffe (63). Enfin, certains gènes retrouvés mutés dans la phase blastique des SMP comme *TP53*, *NRAS*, *CBL*, *PTPN11* et *RUNX* ont été identifiés dans la cohorte chez des patients en cours d'évolution (85–87).

Malgré la présence d'un nombre relativement important de gènes touchés, 47% des prélèvements pour lesquels un diagnostic final de SMP a été retenu ne présentent aucune mutation. Or, d'après *Vainchenker* et *Kralovics*, seulement 15% des thrombocytoses chroniques et moins de 10% des MFI ne présentent pas de mutations (35), contre 48% des TE, 37% des SMP autres et surtout 71% des polyglobulies dans ce travail. Une des hypothèses pour expliquer ces différences peut être que la recherche de SMP a été effectuée alors que le patient ne présentait pas les critères diagnostiques requis (11). Parmi les 27 prélèvements étiquetés polyglobulie et les 14 prélèvements TE sans mutation, seulement 3 cas et 4 cas, respectivement, ne présentaient pas les critères cytologiques et moléculaires évoquant un SMP. Une autre hypothèse est la composition du panel de recherche utilisée pour le NGS. En effet, les gènes

PPM1D, *MLL3* et *LNK* ont été identifiés comme mutés de manière récurrente dans les SMP, et ne font pas partis du panel utilisé à Clermont-Ferrand (81,88). Cette dernière mutation a également été décrite dans les polyglobulies familiales (89) dans lesquelles on peut également retrouver des mutations germinales impliquant les gènes de la voie de régulation de l'hypoxie, appelés *HIF* (*Hypoxia Inductible Factor*), qui stimulent la prolifération et la différenciation de progéniteurs érythropoïétiques (90).

Les études s'accordent quant à une incidence de 70 à 90% de mutations génétiques récurrentes identifiées dans les SMD (49,52,60). Dans notre cohorte, 73% des prélèvements réalisés chez des patients atteints de SMD présentaient au moins une mutation. Parmi eux, et comme retrouvé dans la littérature (21,22,91), aucune anomalie cytogénétique n'est retrouvée dans la moitié des cas.

Les gènes les plus fréquemment touchés dans notre cohorte sont *TET2* (22%), *SF3B1* (16%) et *ASXL1* (9%). Dans la littérature, les mutations du gène *SF3B1* sont retrouvées dans environ 20% des SMD (92) et l'association entre la présence de ces mutations et certains types de SMD tels que les SMD avec sidéroblastes en couronne, uni ou multi-lignée(s), ou les SMD 5q- est maintenant bien établie (53,93,94). En plus de son rôle diagnostique, la présence d'une mutation sur ce gène est un facteur de bon pronostic (11). Les autres gènes du spliceosome ont été retrouvées à une fréquence moindre qu'annoncée dans la littérature (53), avec aucune mutation identifiée sur le gène *SRSF2*. Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces gènes ne sont pas spécifiques des SMD, et notamment *SRSF2*, qui est majoritairement retrouvé dans les SF (95). Comme attendu, le gène *TET2* a été retrouvé muté dans plus de 20% des cas (96), sans impact pronostique sans autre mutation associée (60,97). Dans ce travail, la présence de mutations au niveau de *TET2* a souvent été accompagnée de mutations touchant d'autres gènes. L'impact de ces associations n'est aujourd'hui pas très connu dans les SMD et des études sont menées afin de comprendre la physiopathologie de ces co-mutations (92).

L'apport du NGS dans ce groupe de pathologie est principalement pronostique (70% des prélèvements). De nombreuses mutations identifiées dans la littérature comme étant de mauvais pronostic (11) sont retrouvées dans notre cohorte telles que les mutations impliquant les gènes *ASXL1*, *RUNX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *NRAS*, *KRAS* et *TP53*. De nombreuses mutations ayant un impact pronostique ont été identifiées et ce, indépendamment des scores IPSS/IPSS-R. C'est par exemple le cas du gène *SRSF2*, évalué dans une méta-analyse de 2018 par *Arbab Jafari* (98). D'autres études ont également permis de distinguer les gènes *TP53*, *ETV6*, *RUNX1*, *EZH2*, *SETBP1*, *IDH2* et *ASXL1* comme des marqueurs indépendants de mauvais pronostic (60,99).

Afin de stratifier au mieux le risque pronostique des patients, ces mutations ont été reliées à d'autres données clinico-biologiques. Ainsi, les mutations sur les gènes *SRSF2*, *U2AF1* et *ASXL1* ont été définies comme des marqueurs indépendants des scores pronostiques si, et seulement si, le pourcentage de blastes médullaires n'excédait pas 5% (100). *Bejar et al* ont également montré que la mutation du gène *SF3B1* était de bon pronostic lorsque le taux de blastes médullaires était inférieur à 5% (101). Toutes ces données ont amené à intégrer la présence de ces mutations au score pronostique pré-existant. *Haferlach et al* ont ainsi ajouté aux critères « conventionnels » de l'IPSS-R (52) l'âge ainsi que 14 gènes dont *EZH2*, *TP53* et *SF3B1* afin de créer quatre groupes pronostiques chez des patients atteints de SMD *de novo* ou secondaire, traités ou non (102). L'amélioration des connaissances concernant les différents marqueurs moléculaires permet de disposer de score pronostique de plus en plus précis.

Aucun patient de l'étude atteint de SMD n'a bénéficié d'un traitement ciblé suite aux résultats du NGS. Bien que de nombreuses études aient identifié certaines mutations comme prédictives de la réponse aux traitements, aucun consensus n'est clairement établi concernant les traitements tels que l'azacitidine, la décitabine ou encore le lenalidomide (92). En revanche, les progrès réalisés dans la compréhension de la physiopathologie des SMD a permis d'identifier des cibles thérapeutiques pour lesquelles des essais cliniques sont actuellement en cours (69,70,103).

Les demandes de NGS concernant les SF ont représenté 12% de la cohorte. Comme attendu, une hématoïèse clonale a été identifiée dans 97% des cas (104). En accord avec les données de la littérature, aucune mutation sur le gène *CSF3R* n'a été identifiée chez les patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique atypique alors que tous les patients présentaient une mutation sur le gène *SETBP1*. Dans ces cas, le NGS a un impact diagnostique primordial, et permet de faire la distinction entre des pathologies qui peuvent être proche au niveau cytologique (11,80,105).

Dans près de 9 cas sur 10, le diagnostic final retenu dans ce groupe était une LMMC. Du fait d'une grande variabilité de présentation clinique et biologique (106), ainsi qu'une faible proportion d'anomalies cytogénétiques dans ce type de pathologie (107), le NGS a permis de confirmer le diagnostic dans près de la moitié des demandes. Les gènes les plus fréquemment mutés ont été *TET2*, *ASXL1*, *NRAS* et *SRSF2*. Ainsi, les mutations sur le gène *TET2* ont concerné 20/33 prélèvements (60%), ce qui est cohérent avec la littérature. En effet, *Patnaik and Tefferi* ont retrouvé des mutations sur le gène *TET2* dans près de 60% des cas, 50% des cas pour le gène *SRSF2*, 40% pour le gène *ASXL1* et 30% pour les gènes *RAS* (104). D'autres études

ont confirmé ces chiffres (108,109). Des co-mutations des gènes *TET2* et *SRSF2* ou *ZRSR2* ont été décrites dans les LMMC (94,108), ce que nous avons retrouvé dans notre cohorte avec plus de la moitié des mutations impliquant les gènes *SRSF2* et *ZRSR2* retrouvées chez des patients mutés pour le gène *TET2* (seulement deux prélèvements ont présenté une mutation isolée sur le gène *TET2*). En plus d'un rôle diagnostique, ces co-mutations impactent le pronostic. Ainsi, en l'absence de mutation *ASXLI*, les mutations du gène *TET2* sont plutôt associées à un pronostic favorable chez les patients atteints de LMMC. Les mutations *ASXLI* sont quant à elles associées à un pronostic défavorable (104,110). En 2016, *Elena et al* ont amélioré le score pronostique existant (CPSS), en prenant en compte la présence de mutations récurrentes sur les gènes *ASXLI*, *NRAS*, *RUNX1* et *SETBP1* (62). Ce nouveau score pronostique, baptisé CPSS-Mol, a permis de mieux stratifier les patients ainsi d'améliorer la prise en charge.

Concernant le patient ne présentant pas de mutation génétique récurrente dans le groupe SF, la demande d'analyse a été faite suite à une allogreffe. Le prélèvement était dépourvu de blastes et l'objectif de ce prélèvement était de mettre en évidence une rechute moléculaire précoce.

Un tiers de notre cohorte concernait des prélèvements réalisés chez des patients atteints de LA. Dans ces pathologies, il est admis que la majorité des patients présente au moins une mutation récurrente, parfois un nombre élevé, ainsi qu'une forte hétérogénéité au niveau des mutations (55,111). Ainsi, notre étude a identifié au moins une mutation génétique dans 91% de prélèvements avec une fréquence de mutation par gène ne dépassant pas les 10%. Contrairement à ce qui a été décrit par le réseau de recherche génomique des cancers (51) et même si toutes les mutations décrites sur ces gènes ont été retrouvées dans ce groupe pathologique, les mutations touchant les gènes *FLT3* et *NPM1* ne font pas parties des gènes les plus représentées de la cohorte. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous avons regroupé les LA *de novo* et les LAM secondaires dans lesquelles ces gènes sont moins fréquemment mutés (112–114). Une autre hypothèse pourrait être que comme la prescription systématique de NGS au diagnostic de LAM est assez récente, notre cohorte comporte un biais de sélection et concerne majoritairement des patients pour lesquels le statut *NPM1/FLT3* a été évalué par technique Sanger et n'a donc pas nécessité d'analyse NGS complémentaire. Malgré cela, une mutation du gène *NPM1* a été retrouvée dans 8% de la cohorte, dont près de 70% a été associé à un bon pronostic (i.e absence de mutation sur le gène *FLT3*). En revanche, ce gène a souvent été retrouvé co-muté avec *DNMT3A* (77%), ce qui a été décrit comme de mauvais pronostic (115).

Les gènes les plus fréquemment mutés dans notre cohorte LAM sont *DNMT3A* (10%), *ASXL1* (9%), *TET2* (8%) et *RUNX1* (8%). Ces trois premiers gènes, regroupés sous le terme DTA, peuvent être liés à l'âge (35,58) et être également observés chez des patients sans hémopathie (CHIP) (77). Comme défini dans les données de la littérature, 10 à 20% des cas de LAM sont mutés sur les gènes *TET2*, *ASXL1* et *RUNX1*, ces deux derniers gènes étant associés à un mauvais pronostic dans la classification ELN 2017 (55,61,116,117). De la même manière, le gène *TP53*, retrouvé muté dans 4% de la cohorte dont la moitié avec un caryotype complexe, est liée à une survie diminuée (114). Ainsi, près de la moitié des analyses effectuées pour ce groupe de pathologie a identifié des mutations de mauvais pronostic conduisant potentiellement à une intensification thérapeutique.

Pour 10 patients atteints de LA, aucune mutation récurrente n'a été identifiée. Cependant, la moitié d'entre eux était en rémission et ne présentait pas de blaste circulant au niveau cytologique, et les autres n'avaient qu'un faible taux de blastes circulants, insuffisant pour évoquer une rechute cytologique. L'absence de blastes dans ces prélèvements peut donc poser la question de la sensibilité de l'analyse.

Au-delà de leur impact pronostique, certaines mutations récurrentes sont plus fréquemment associées à une rechute de la pathologie, comme les mutations du gène *TP53* (55,113). Différents types d'évolution de profils mutationnels lors de rechutes ont été décrits dans cette cohorte. Par exemple, un patient a présenté une mutation au niveau du gène *WT1* au moment du diagnostic, puis, en rechute, deux mutations sur le gène *FLT3* sont apparues en plus de la même mutation du gène *WT1*. Un autre patient a présenté deux gènes mutés au diagnostic, dont l'un a disparu au moment de la rechute, « compensé » par une nouvelle mutation sur un autre gène. Ces derniers profils d'évolution ont été décrits par *Li Ding et al* comme les deux modèles d'évolution d'une LAM (118). Le premier modèle décrit un clone primitif qui évolue lors de la rechute en acquérant d'autres mutations sur différents gènes alors que le deuxième modèle consiste en la résistance au traitement d'un sous-clone qui évolue en acquérant d'autres mutations lors de la rechute.

Actuellement, de nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques dirigées contre des mutations géniques (18). Ainsi, 56% des prélèvements ont été effectués chez des patients en rechute, et près du tiers des prescriptions ont été faites dans l'optique d'identifier des cibles thérapeutiques, comme *IDH1* ou *IDH2* (119), puisque des molécules dirigées contre ces cibles permettent la différenciation des cellules blastiques. De même, la forte fréquence de mutations impliquant le gène *FLT3* a permis le

développement de molécules anti-tyrosine kinase comme la midostaurine. Du fait de problèmes de sélectivité et de toxicité de cette molécule, une deuxième génération d'anti-tyrosine kinase est en cours d'évaluation (18). Malgré cela, un traitement par anti-*FLT3* au diagnostic d'une LAM muté *FLT3* a montré un bénéfice en terme de survie globale (18).

Les mutations somatiques identifiées en NGS peuvent être suivi au cours du temps, et pourraient ainsi être utilisées dans le suivi de la maladie résiduelle (120–122). Bien qu'une multitude de gènes et donc de régions cibles peuvent être séquencés simultanément par NGS, sa limite de sensibilité, aux alentours de 1%, et les potentielles erreurs de séquençage ne permettent pas à cette technique d'être plus efficace aujourd'hui que les techniques de biologie moléculaire (123). Les techniques de PCR en temps réel sont largement utilisées pour la maladie résiduelle mais des techniques plus sensibles telles que la PCR digitale (ddPCR) prennent de plus en plus de place dans le suivi des hémopathies (124). Le NGS pourrait donc être utilisé afin d'identifier les gènes mutés lors du diagnostic et/ou de la rechute et ainsi sélectionner des cibles d'intérêt à quantifier par ddPCR dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle.

Enfin, un certain nombre de prélèvements concernaient des pathologies non myéloïdes, l'objectif principal étant de détecter une cible thérapeutique. Seulement la moitié des prélèvements a présenté au moins une mutation génétique récurrente, ce qui s'explique probablement par le fait que le panel utilisé n'est pas adapté pour des pathologies lymphoïdes. Malgré cela, près de la moitié des patients avec un lymphome T ont présenté une mutation *TET2*, et étaient donc potentiellement éligibles à un traitement par l'azacitidine (Vidaza®).

Par ailleurs, dans un contexte d'aplasie médullaire, l'absence de mutation génétique récurrente est un critère d'exclusion de ce diagnostic (76). Dans l'étude menée ici, tous les prélèvements pour suspicion d'aplasie médullaire ont présenté au moins une mutation sur un gène du panel, ne permettant pas d'exclure le diagnostic d'aplasie médullaire.

Ce travail présente plusieurs limites. Une des limites est liée à la méthodologie de l'étude. En effet, nous nous sommes heurtés à un certain nombre de données manquantes du fait que la demande de NGS n'était pas forcément réalisée en même temps que les autres examens biologiques. Ainsi, le patient pouvait être en rechute lors de l'analyse NGS alors que 2 mois auparavant, le myélogramme ou l'immunophénotypage pouvaient être en faveur d'une rémission. Par conséquent, l'interprétation de l'analyse de concordance a nécessité une revue minutieuse des bilans. Une concordance globale de 70% a tout de même été observée, avec des

discordances majoritairement liées aux difficultés diagnostiques entre les syndromes frontières et les SMP et SMD, et non à un manque de données.

De plus, chaque prélèvement a été considéré comme indépendant avec 328 prélèvements répertoriés pour 288 patients. Un même patient pouvait donc avoir plusieurs prélèvements pouvant être classé dans différents groupes pathologiques en fonction de l'évolution de sa pathologie. Ce risque est limité du fait d'un faible nombre de patients présentant plusieurs prélèvements.

Ce travail a également mis en évidence un nombre important de patients, notamment avec un SMP, pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée en NGS. Pour ces patients, la question du coût de l'analyse se pose du fait d'un apport limité tout comme la question de la juste prescription. A l'heure actuelle, aucune recommandation nationale ou internationale ne cadre l'utilisation de cette analyse.

De plus, le panel utilisé à Clermont-Ferrand est un panel regroupant des gènes impliqués dans les hémopathies myéloïdes dans leur ensemble ce qui peut expliquer, au moins en partie, ce nombre important de patients sans hématoïèse clonale. Des panels plus spécifiques des différents groupes pathologiques sont maintenant accessibles du fait d'une meilleure compréhension de la physiopathologie et de l'identification croissante de mutations de gènes grâce au séquençage du génome entier (*Whole Exome Sequencing* (WES)). De plus en plus de laboratoires travaillent désormais grâce à des panels spécifiques de la pathologie suspectée ou diagnostiquée afin d'affiner leur recherche (125), mais cette solution n'est envisageable que dans des centres ayant un recrutement suffisant. Une autre solution est l'utilisation d'un panel plus élargi, ce qui va être fait dans notre centre, avec notamment l'ajout de gènes comme *IK2F1* ou *LNK* qui permettent de mieux cibler certaines pathologies, en particulier les SMP. L'utilisation du WES est pour l'instant globalement réservée à des applications de recherche, ou à des plateformes spécialisées comme Auragen. Cependant, l'interprétation des données reste difficile. En effet, des variants concernant des gènes encore non explorés en hématologie pourront être identifiés et pourront compliquer l'interprétation biologique des résultats. Actuellement, les analyses WES réalisées sur la plateforme Auragen sont limitées aux patients atteints de LAM en rechute.

Conclusion

La prise en charge de ces hémopathies myéloïdes évolue et, du fait de l'évolution des techniques et des connaissances, tend désormais vers une médecine personnalisée recourant aux thérapies ciblées. Cette optimisation nécessite régulièrement la recherche de mutations génétiques par *Next Generation Sequencing* (NGS).

Cette étude rétrospective (juillet 2017- décembre 2019) observationnelle a pour objectif principal de déterminer l'impact des résultats d'un test NGS myéloïde (MYS Probes®, Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Suisse) sur le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients atteints d'hémopathie myéloïde. L'objectif secondaire a été d'évaluer la concordance des résultats de NGS avec le diagnostic final retenu.

Les analyses NGS effectuées par le service d'Hématologie Biologique du CHU de Clermont-Ferrand ont été recueillies (328 prélèvements ; 288 patients). Dans près de trois-quarts des cas, au moins une mutation a été identifiée par NGS. Les principales mutations retrouvées ont concerné les gènes *TET2*, *ASXL1* et *DNMT3A*. Les mutations des gènes *FLT3*, *CEBPA* et *NPM1* sont exclusivement identifiées dans les Leucémies Aiguës (LA), de même que la mutation du gène *MPL* dans les Syndromes Myélo-Prolifératifs (SMP) et du gène *ETV6* dans les Syndromes Myélo-Dysplasiques (SMD). Ces données sont concordantes avec la littérature. Pour plus de la moitié des prélèvements sans mutation détectable, le diagnostic était un SMP.

Un intérêt pronostique a été majoritairement identifié (33%) et la technique de NGS est de plus en plus étudiée pour suivre la maladie résiduelle et l'évolution clonale dans les LA. Un bénéfice en terme de diagnostic et de thérapeutique a été identifié pour respectivement 18% et 12% des prélèvements. Ces résultats permettent une évolution de la prise en charge chez des patients compliqués à diagnostiquer ou à traiter et chez qui les examens classiques n'ont pas été concluants. Une concordance globale de 70% entre les résultats du NGS et le diagnostic retenu a été retrouvée. Bien que le NGS ne soit pas un examen de première intention, son résultat est majoritairement pris en compte par les cliniciens.

L'intégration du NGS dans la pratique courante de la prise en charge des hémopathies myéloïdes est désormais admise. Une augmentation du nombre de gènes du panel NGS serait utile pour diminuer le nombre de cas non informatifs, en particulier pour les SMP. Une étude médico-économique sur l'utilisation de cette technique serait également intéressante.



Pr Marc BERGER



P2 V. LIVREMI



Références bibliographiques

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* août 2012;13(8):790- 801.
2. Santé Publique France. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim [Internet]. [cité 17 août 2020]. Disponible sur: /import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir
3. Santé Publique France. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2013. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 : tumeurs solides [Internet]. [cité 17 août 2020]. Disponible sur: /notices/survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-france-metropolitaine-1989-2013.-etude-a-partir-des-registres-des-cancers-du-reseau-francim.-partie-1
4. De Angelis R, Minicozzi P, Sant M, Dal Maso L, Brewster DH, Osca-Gelis G, et al. Survival variations by country and age for lymphoid and myeloid malignancies in Europe 2000–2007: Results of EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer.* 1 oct 2015;51(15):2254- 68.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* juin 1982;51(2):189- 99.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* août 1976;33(4):451- 8.
7. Steensma DP. Dysplasia has A differential diagnosis: distinguishing genuine myelodysplastic syndromes (MDS) from mimics, imitators, copycats and impostors. *Curr Hematol Malig Rep.* déc 2012;7(4):310- 20.
8. Fisher MJ, Prchal JF, Prchal JT, D'Andrea AD. Anti-erythropoietin (EPO) receptor monoclonal antibodies distinguish EPO-dependent and EPO-independent erythroid progenitors in polycythemia vera. *Blood.* 15 sept 1994;84(6):1982- 91.
9. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* avr 1962;8:65- 6.
10. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 19 févr 2009;113(8):1619- 30.
11. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues – IARC [Internet]. [cité 17 août 2020]. Disponible sur: <https://www.iarc.fr/fr/news-events/who-classification-of-tumours-of-haematopoietic-and-lymphoid-tissues-3/>
12. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 21 janv 2010;115(3):453- 74.

13. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 15 mars 1997;89(6):2079- 88.
14. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 20 sept 2012;120(12):2454- 65.
15. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespi T, Luño E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. mars 2011;96(3):375- 83.
16. Hehlmann R, Saussele S. Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Haematologica*. 1 déc 2008;93(12):1765- 9.
17. Chomienne C, Cornic M, Castaigne S, Lefebvre P, de Thé H, Dejean A, et al. [Biological parameters of the efficiency of retinoic acid in acute leukemia]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1991;185(6):456- 63.
18. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 17 sept 2015;373(12):1136- 52.
19. Hanfstein B, Müller MC, Hehlmann R, Erben P, Lauseker M, Fabarius A, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*. sept 2012;26(9):2096- 102.
20. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 22 2018;131(12):1275- 91.
21. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. sept 2005;90(9):1168- 78.
22. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 15 déc 2007;110(13):4385- 95.
23. Bene MC. Immunophenotyping of myelodysplasia. *Haematologica*. 1 janv 2003;88(4):363- 363.
24. Porwit A. Role of flow cytometry in diagnostics of myelodysplastic syndromes--beyond the WHO 2008 classification. *Semin Diagn Pathol*. nov 2011;28(4):273- 82.
25. van de Loosdrecht AA, Westers TM. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. juill 2013;11(7):892- 902.
26. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European

- LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. sept 2014;28(9):1793- 8.
27. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, Cali C, Witte BI, Ossenkoppele GJ, et al. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. oct 2014;167(1):100- 9.
 28. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263- 73.
 29. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 28 avr 2005;434(7037):1144- 8.
 30. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet Lond Engl*. 19 mars 2005;365(9464):1054- 61.
 31. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 28 avr 2005;352(17):1779- 90.
 32. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 1 févr 2007;356(5):459- 68.
 33. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLOS Med*. 18 juill 2006;3(7):e270.
 34. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 19 déc 2013;369(25):2379- 90.
 35. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 09 2017;129(6):667- 79.
 36. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 19 déc 2013;369(25):2391- 405.
 37. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N, et al. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol*. 2013;160(4):503- 9.
 38. Cilloni D, Gottardi E, Fava M, Messa F, Carturan S, Busca A, et al. Usefulness of quantitative assessment of the WT1 gene transcript as a marker for minimal residual disease detection. *Blood*. 15 juill 2003;102(2):773- 4; author reply 774.

39. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2009;27(31):5195- 201.
40. Sung PJ, Luger SM. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 21 janv 2017;18(1):1.
41. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1977;74(12):5463- 7.
42. Ilie M, Long É, Hofman V, Lespinet V, Bordone O, Washetine K, et al. Les méthodes de séquençage de « nouvelle génération » (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie. *Rev Francoph Lab*. 1 janv 2014;2014(458):51- 8.
43. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1 nov 1996;242(1):84- 9.
44. McKernan KJ, Peckham HE, Costa GL, McLaughlin SF, Fu Y, Tsung EF, et al. Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res*. sept 2009;19(9):1527- 41.
45. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature*. 6 nov 2008;456(7218):53- 9.
46. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. janv 2016;107(1):1- 8.
47. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet TIG*. sept 2014;30(9):418- 26.
48. Clarke J, Wu H-C, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol*. avr 2009;4(4):265- 70.
49. 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.
50. Patel BJ, Przychodzen B, Thota S, Radivoyevitch T, Visconte V, Kuzmanovic T, et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(12):2815- 23.
51. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 30 2013;368(22):2059- 74.

52. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. févr 2014;28(2):241- 7.
53. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 11 sept 2011;478(7367):64- 9.
54. Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. juin 2014;99(6):956- 64.
55. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2 déc 2016;2016(1):348- 55.
56. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 22 juill 2010;116(3):354- 65.
57. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 7 janv 2016;127(1):29- 41.
58. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2 juill 2015;126(1):9- 16.
59. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 8 déc 2011;118(24):6239- 46.
60. 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*. 30 juin 2011;364(26):2496- 506.
61. 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.
62. Elena C, Gallì A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 8 sept 2016;128(10):1408- 17.
63. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32(7):1631- 42.
64. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 01 2018;36(4):310- 8.

65. Coombs CC, Tallman MS, Levine RL. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol.* mai 2016;13(5):305- 18.
66. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 10 2017;130(6):722- 31.
67. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med.* 21 juin 2018;378(25):2386- 98.
68. Kayser S, Levis MJ. FLT3 tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia: clinical implications and limitations. *Leuk Lymphoma.* févr 2014;55(2):243- 55.
69. Stein EM, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Swords RT, Roboz GJ, et al. Enasidenib (AG-221), a Potent Oral Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) Enzyme, Induces Hematologic Responses in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood.* 2 déc 2016;128(22):343- 343.
70. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, Chan B, Keaney G, Thomas M, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med.* 2018;24(4):497- 504.
71. Saez B, Walter MJ, Graubert TA. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood.* 09 2017;129(10):1260- 9.
72. Nebbioso A, Benedetti R, Conte M, Iside C, Altucci L. Genetic mutations in epigenetic modifiers as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(9):1187- 202.
73. Borthakur G, Popplewell L, Boyiadzis M, Foran J, Platzbecker U, Vey N, et al. Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer.* 15 2016;122(12):1871- 9.
74. Hayes DN, Kim WY. The next steps in next-gen sequencing of cancer genomes. *J Clin Invest.* 2 févr 2015;125(2):462- 8.
75. Bartels S, Schipper E, Hasemeier B, Kreipe H, Lehmann U. Routine clinical mutation profiling using next generation sequencing and a customized gene panel improves diagnostic precision in myeloid neoplasms. *Oncotarget.* 23 mars 2016;7(21):30084- 93.
76. Vantighem S, Peterlin P, Thépot S, Ménard A, Dubruille V, Debord C, et al. Diagnosis and prognosis are comforted by integrated assessment of next-generation sequencing in chronic myeloid malignancies. A real-life study. *Haematologica.* 2 avr 2020;
77. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2477- 87.
78. Patnaik MM, Barraco D, Lasho TL, Finke CM, Reichard K, Hoversten KP, et al. Targeted next generation sequencing and identification of risk factors in World Health Organization defined atypical chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol.* juin 2017;92(6):542- 8.

79. Szuber N, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia: new science and new diagnostic criteria. *Blood Cancer J.* 13 2018;8(2):19.
80. Jang M-A, Choi CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J Intern Med.* 2020;35(1):1- 11.
81. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 11 2018;379(15):1416- 30.
82. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2488- 98.
83. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood.* 10 nov 2011;118(19):5227- 34.
84. Zhang S-J, Rampal R, Manshouri T, Patel J, Mensah N, Kayserian A, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood.* 10 mai 2012;119(19):4480- 5.
85. Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Szuber N, et al. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv.* 27 2018;2(4):370- 80.
86. Venton G, Courtier F, Charbonnier A, D'incan E, Saillard C, Mohty B, et al. Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol.* 2018;93(3):330- 8.
87. Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic J-P, Dawson MA, Chen E, Bareford D, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood.* 8 avr 2010;115(14):2891- 900.
88. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 12 août 2010;116(6):988- 92.
89. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, Feenstra JDM, Cavalloni C, Roncoroni E, et al. LNK mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 7 juill 2016;128(1):144- 5.
90. Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, van Wijk R, Perrotta S, et al. Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. *Hum Mutat.* janv 2014;35(1):15- 26.
91. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 12 déc 2013;122(25):4021- 34.
92. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2020;188(2):224- 39.

93. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 9 juill 2015;126(2):233- 41.
94. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*. 28 août 2014;124(9):1513- 21.
95. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat Res Rev Mutat Res*. sept 2016;769:47- 62.
96. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 28 mai 2009;360(22):2289- 301.
97. Guo Z, Zhang S-K, Zou Z, Fan R-H, Lyu X-D. Prognostic significance of TET2 mutations in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Leuk Res*. 2017;58:102- 7.
98. Arbab Jafari P, Ayatollahi H, Sadeghi R, Sheikhi M, Asghari A. Prognostic significance of SRSF2 mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: a meta-analysis. *Hematol Amst Neth*. déc 2018;23(10):778- 84.
99. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Saeed L, Mudireddy M, Idossa D, et al. Targeted next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes and prognostic interaction between mutations and IPSS-R. *Am J Hematol*. déc 2017;92(12):1311- 7.
100. Nazha A, Bejar R. Molecular Data and the IPSS-R: How Mutational Burden Can Affect Prognostication in MDS. *Curr Hematol Malig Rep*. 1 oct 2017;12(5):461- 7.
101. Bejar R, Papaemmanuil E, Haferlach T, Garcia-Manero G, Maciejewski JP, Sekeres MA, et al. Somatic Mutations in MDS Patients Are Associated with Clinical Features and Predict Prognosis Independent of the IPSS-R: Analysis of Combined Datasets from the International Working Group for Prognosis in MDS-Molecular Committee. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):907- 907.
102. Nazha A, Narkhede MS, Radivoyevitch T, Kalaycio M, Patel BJ, Gerds AT, et al. The Revised International Prognostic Scoring System Molecular (IPSS-Rm), a Validated and Dynamic Model in Treated Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood*. 3 déc 2015;126(23):607- 607.
103. Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Adv*. 23 oct 2018;2(20):2787- 97.
104. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(6):824- 40.
105. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. janv 2013;45(1):18- 24.
106. Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica*. 1 juill 2007;92(7):974- 7.

107. Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 août 2010;28(24):3858- 65.
108. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 11 oct 2012;120(15):3080- 8.
109. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoer C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 1 déc 2009;94(12):1676- 81.
110. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccia N, Esterni B, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. nov 2010;151(4):365- 75.
111. Yu J, Li Y, Li T, Li Y, Xing H, Sun H, et al. Gene mutational analysis by NGS and its clinical significance in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9:2.
112. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, Ahn J-S, Choi SH, Park HJ, et al. The clonal origins of leukemic progression of myelodysplasia. *Leukemia*. 2017;31(9):1928- 35.
113. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Fu B, Tang G, et al. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leuk Res*. mars 2015;39(3):348- 54.
114. 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.
115. Dunlap JB, Leonard J, Rosenberg M, Cook R, Press R, Fan G, et al. The combination of NPM1, DNMT3A, and IDH1/2 mutations leads to inferior overall survival in AML. *Am J Hematol*. 2019;94(8):913- 20.
116. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. janv 2013;27(1):82- 91.
117. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016;30(11):2160- 8.
118. 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.

119. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 3 mai 2013;340(6132):622- 6.
120. Press RD, Eickelberg G, Froman A, Yang F, Stentz A, Flatley EM, et al. Next-generation sequencing-defined minimal residual disease before stem cell transplantation predicts acute myeloid leukemia relapse. *Am J Hematol*. 2019;94(8):902- 12.
121. Hirsch P, Tang R, Abermil N, Flandrin P, Moatti H, Favale F, et al. Precision and prognostic value of clone-specific minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017;102(7):1227- 37.
122. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 29 mars 2018;378(13):1189- 99.
123. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther Adv Hematol*. févr 2016;7(1):3- 16.
124. Wang W-J, Zheng C-F, Liu Z, Tan Y-H, Chen X-H, Zhao B-L, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *Eur J Haematol*. sept 2018;101(3):291- 6.
125. Pine AB, Chokr N, Stahl M, Steensma DP, Sekeres MA, Litzow MR, et al. Wide variation in use and interpretation of gene mutation profiling panels among health care providers of patients with myelodysplastic syndromes: results of a large web-based survey. *Leuk Lymphoma*. juin 2020;61(6):1455- 64.

Annexes

Annexe 1 : Panel myéloïde NGS

Signaux d'activation	Voies d'activation	Facteurs de transcription	Facteurs épigénétiques	Spliceosome	Nucleophosmine	Suppresseur de tumeur
<i>CSF3R</i>	<i>ABL1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>SF3B1</i>	<i>NPM1</i>	<i>TP53</i>
<i>FLT3</i>	<i>BRAF</i>	<i>RUNX1</i>	<i>EZH2</i>	<i>SRSF2</i>		
<i>JAK2</i>	<i>HRAS</i>	<i>ETV6</i>	<i>IDH1</i>	<i>U2AF1</i>		
<i>KIT</i>	<i>KRAS</i>	<i>SETBP1</i>	<i>IDH2</i>	<i>ZRSR2</i>		
<i>MPL</i>	<i>NRAS</i>	<i>WT1</i>	<i>TET2</i>			
<i>CALR</i>	<i>PTPN11</i>		<i>ASXL1</i>			
	<i>CBL</i>					

Annexe 2 : Classification des pathologies

SMP	SMD	SF	A	LA
LMC	Anémie étiologie inconnue	LMMC 0	Aplasie médullaire	LAM 0
Polyglobulie primitive	Neutropénie étiologie inconnue	LMMC 1	Syndrome de Scwachman-Diamond	LAM 1
Polyglobulie secondaire	Dysérythropoïèse étiologie inconnue	LMMC 2	Behcet	LAM 2
MFI	SMD SLD	LMMC secondaire	Troubles neurodégénératifs	LAM 4
Myélofibrose secondaire	SMD MLD	LMCa	Dermatose neutrophilique	LAM 5
TE	SMD RS SLD	SMD/SMP RS T	Déficit humorale	LAM CEBPA
TE triple négative	SMD RS MLD	Syndromes frontières inclassables	Amylose	LAM FLT3
Leucémie chronique à PNN	SMD EB 1		AITL	LAM NPM1
Mastocytose systémique	SMD EB 2		PTCL NOS	LAM FLT3 et NPM1
Syndrome hyperéosinophilique	SMD 5q-		DLBCL	LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
Hyperéosinophilie étiologie inconnue			LZM LLC Lymphome lymphocytaire Myélome Multiple PTI	LAM post chimiothérapie Sarcome granulocytaire

SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif ; SMD : Syndrome Myélo-Dysplasique ; SF : Syndrome Frontière ; A : Autre ; LA : Leucémie Aiguë

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique ; MFI : MyéloFibrose Idiopathique ; TE : Thrombocytémie Essentielle ; PNN : Polynucléaires Neutrophiles ; SMD SLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie unilignée ; SMD MLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie multilignée ; SMD RS SLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie unilignée et excès de sidéoblastes de couronne ; SMD RS MLD : Syndrome Myélo-Dysplasique avec dysplasie multilignée avec excès de sidéoblastes de couronne ; SMD EB : Syndrome Myélo-Dysplasique avec Excès de Blastés ; LMMC : Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique ; LMCA : Leucémie Myélémie Chronique atypique ; SMD/SMP RS T : Syndrome Myélo-Dysplasique/ Myélo-Prolifératif avec Sidéoblastes en couronne et Thrombocytose ; AITL : Lymphome T Angio-Immunoblastique ; PCTL NOS : Lymphome T Périphérique sans signification ; DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules ; LZM : Lymphome de la Zone Marginale ; LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique ; PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique ; LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde.

SERMENT DE GALIEN



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Contexte : A l'ère de la médecine personnalisée, l'adaptation de la prise en charge des hémopathies myéloïdes nécessite de plus en plus d'évaluer les caractéristiques moléculaires précises des cellules malignes. Le *Next Generation Sequencing* (NGS) permet d'analyser, en une seule analyse, plusieurs gènes impliqués dans la physiopathologie de ces hémopathies. Même si l'utilisation de cette technique est courante dans le domaine de la recherche, son emploi dans les laboratoires de Biologie Médicale est assez récent. Ainsi, l'objectif principal de cette étude rétrospective observationnelle a été d'évaluer l'impact des mutations somatiques identifiées par NGS sur le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients suspects ou atteints d'hémopathies myéloïdes au CHU de Clermont-Ferrand. L'objectif secondaire a consisté à évaluer la concordance entre les résultats du NGS et le diagnostic final retenu.

Matériel/méthode : Toutes les analyses NGS (séquenceur Miseq®, Illumina) réalisées de juillet 2017 à décembre 2019 à l'aide d'un panel myéloïde (MYS Probes®, Sophia Genetics) ont été recueillies. Chaque prescription a été classée selon son motif de demande (diagnostic, pronostic ou recherche de cible thérapeutique) et son groupe de pathologie (SMP, SMD, SF, A et LA). L'apport de l'analyse NGS (confirmation diagnostic, bon pronostic, mauvais pronostic, impact thérapeutique ou sans impact) ainsi que la concordance de conclusions entre les résultats du NGS et le diagnostic retenu final (concordance, cohérence et discordance) ont été évalués.

Résultats : 328 prélèvements (288 patients) ont été analysés. Une hématoïèse clonale a été identifiée dans 74% des cas avec les gènes *TET2*, *ASXL1* et *DNMT3A* comme les plus fréquemment mutés. Les patients atteints de LA présentent un nombre de mutations significativement plus élevé, avec des mutations des gènes *FLT3*, *CEBPA* et *NPM1* exclusivement identifiées dans les LA. De même que les mutations des gènes *MPL* dans les SMP et *ETV6* dans les SMD. La moitié des prélèvements sans mutation détecté concernait un SMP. Un tiers des résultats de l'analyse NGS a eu un impact pronostique sur la cohorte, et plus particulièrement dans les groupes SMD, SF et LA. Une confirmation diagnostique a concerné 18% des cas, et majoritairement des prélèvements du groupe SMP. L'identification d'une cible thérapeutique a été constatée pour 12% des prélèvements, essentiellement dans les groupes LA et Autres diagnostics. Une concordance globale de 70% entre les résultats du NGS et le diagnostic retenu final a été retrouvée.

Conclusions : L'intégration du NGS dans la pratique courante de la prise en charge des hémopathies myéloïdes est désormais admise. Une augmentation du nombre de gènes évalué dans le panel clermontois serait utile pour diminuer le nombre de cas non informatifs, en particulier pour les SMP. Une étude médico-économique sur l'utilisation de cette technique serait également intéressante.

Mot-clés :

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| - NGS | - Diagnostic |
| - Hémopathies myéloïdes | - Pronostic |
| - Mutations somatiques | - Cible thérapeutique |

