

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

**Soutenue publiquement le 08/10/2024
Par M. BOURGEOIS Rémi**

**Anomalies d'expression d'antigènes RH et hémopathies
associées aux mutations *MPL*, *CSF3R* ou délétion 1p : mise en
évidence de deux mécanismes différents**

Membres du jury :

Président : Pr. DUPONT Annabelle, PU-PH, Laboratoire d'hématologie CHU de Lille

Directeur, conseiller de thèse : Dr. DELANOE Laure, Biologiste, Laboratoire EFS de Lille

Assesseurs :

Dr. DUPLOYEZ Nicolas, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie CHU de Lille

Dr. WEMEAU Mathieu, PH, Service d'hématologie CH de Roubaix

UFR3S - Pharmacie
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Corinne ROBACZEWSKI
Olivier COLOT
Bertrand DÉCAUDIN
Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen International
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoire-Partenariats
Vice-Doyen Santé numérique et Communication
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Hervé HUBERT
Karine FAURE
Damien CUNY
Vincent DERAMECOURT
Sébastien D'HARANCY
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Vincent SOBANSKI
Anne-Laure BARBOTIN
Valentin ROUSSEL

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté et
Assesseur aux Ressources et Personnels
Responsable des Services
Représentant étudiant
Chargé de mission 1er cycle
Chargée de mission 2eme cycle

Delphine ALLORGE

Anne GARAT

Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE
Philippe GERVOIS
Héloïse HENRY

Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche
 Chargé de mission Relations Internationales
 Chargée de Mission Qualité
 Chargé de mission dossier HCERES

Nicolas WILLAND
 Christophe FURMAN
 Marie-Françoise ODOU
 Réjane LESTRELIN

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87

Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87

Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86

M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

Hospitalo-Universitaire (PHU)

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMAPGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	NDIAYE-BOIDIN	Maguette	Anglais
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

**UFR3S - Pharmacie
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>**

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements :

A ma présidente de jury de thèse,

Madame le Professeur Annabelle Dupont

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider mon jury de thèse, après m'avoir enseigné les fondements de l'hématologie, soyez assurée de ma profonde gratitude.

A mes assesseurs,

Monsieur le Docteur Nicolas Duployez

Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Pour l'honneur que vous me faites en participant à ce jury, pour votre relecture et vos précieux conseils durant la rédaction de cette thèse, soyez assuré de ma profonde considération.

Monsieur le Docteur Mathieu Wemeau

Praticien Hospitalier

Service d'Hématologie Clinique

Centre Hospitalier de Roubaix

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse, soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Laure Delanoe

Biologiste médical

Laboratoire d'immuno-hématologie

Etablissement Français du Sang de Lille

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger ce travail de thèse, je vous en remercie et vous témoigne ma profonde gratitude. Soyez assurée de mes remerciements sincères envers votre accompagnement, votre suivi et votre disponibilité durant toute cette préparation.

A mes grand parents, pour la transmission de vos valeurs et pour tous ces beaux moments passés avec vous qui devraient être éternels.

A mes parents, pour l'éducation que vous m'avez donnée, pour m'avoir soutenu pendant mes études et permis d'arriver là où j'en suis.

A mon frère, pour tous nos moments de complicité, et malgré notre éloignement, tu gardes une place importante dans ma vie et je serai toujours là pour toi.

A Mathilde, pour ton soutien apporté tout au long de ces études, pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien et pour nos belles années et projets à venir.

A mon filleul, à ma marraine, à ma famille, pour leur soutien, leur amour et à tous nos moments heureux passés ensemble.

A ma belle-famille et à mon beau-frère, pour m'avoir accueilli parmi vous.

A mes amis d'enfance (Anaïs, Ju, Max...), à mes amis pharma, pour tous nos bons moments passés ensemble, pour toutes nos soirées et à toutes celles à venir, j'espère vous garder auprès de moi encore longtemps. Heureusement qu'il y a eu le Covid pour la préparation du concours de l'Internat...

Au quatuor de pharma, pour le soutien et nos moments passés pendant nos études.

Aux internes et anciens internes, avec qui j'ai partagé des stages et/ou des soirées (Laura, Grégoire, Ludo, Ambroise, Antoine, Nicow, Thomas ...), pour tous nos agréables moments passés ensemble, nos soirées, et sans oublier nos superbes gardes (dont le fameux Palu post-transfu de Nicow et la mouche tsé-tsé).

Aux enseignants et biologistes, je vous remercie pour la transmission de vos connaissances et de votre savoir.

A Gauthier, à Elisabeth et à Ludovic, je vous remercie grandement pour la relecture de ce travail et la correction de certaines parties.

Liste des abréviations :

A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ala : Alanine
ASXL1 : Additional Sex Combs-Like 1
BOM : Biopsie ostéo-médullaire
C : Cytosine
CALR : Calréticuline
CBL : Casitas B Lineage Lymphoma
CGR : Concentrés de globules rouges
CD : Cluster of differentiation
ChAS : Chromosome Analysis Suite
CLP : Cellule lymphoïde progénitrice
CMP : Cellule myéloïde progénitrice
CN-LOH : Copy neutral loss of heterozygosity
CNRGS : Centre national de référence pour les groupes sanguins
CNV : Copy number variation
CSF3R : Colony Stimulating Factor 3 Receptor
CSH : Cellule souche hématopoïétique
DNMT3A : DNA MethylTransferase 3A
DP : Double population
EMP : Progéniteur érythro-mégacaryocytaire
EPO : Erythropoïétine
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2
FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
G : Guanine
GMP : Progéniteur granulo-monocytaire
ISBT : International society of blood transfusion
JAK2 : Janus Kinase 2
Kb : Kilobase
KRAS : Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LA : Leucémie aigue
LAM : Leucémie aigüe myéloïde
LAP : Leucémie aigue promyélocytaire
LMC : Leucémie myéloïde chronique

LMCa : Leucémie myéloïde chronique atypique
LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique
LMMC-MD : LMMC myélodysplasique
LMMC-MP : LMMC myéloproliférative
LNC : Leucémie chronique à neutrophiles
LOH : Loss of heterozygosity
LT-SCH : Cellule souche hématopoïétique à long terme
Mb : Mégabase
MCPS : Mélange de concentrés plaquettaires standards
MDS : Myelodysplastic syndromes
MDS-biTP53 : SMD avec inactivation biallélique de TP53
MDS-f : SMD avec fibrose
MDS-h : SMD hypoplasique
MDS-IB : MDS with increased blasts
MDS-LB : MDS with low blasts
MDS-SF3B1 : SMD sans excès de blastes et une mutation de SF3B1
MDS-5q : SMD sans excès de blastes et une délétion isolée du 5q
MF : Myélofibrose
MFP : Myélofibrose primitive
MO : Moelle osseuse
MPL : Myeloproliferative leukemia
MPP : Progéniteur multipotent
NCS : Neutropénie congénitale sévère
NF1 : Neurofibromin 1
NGS : Next generation sequencing
NMD : Néoplasie myélodysplasique
NMP : Néoplasie myéloproliférative
NRAS : Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
Pb : Paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction
PDGFRA/B : Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha / Beta
PNN : Polynucléaire neutrophile
PPM1D : Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1D
Pro : Proline
PSL : Produit sanguin labile

PTPN11 : Protein Tyrosine Phosphatase Non Receptor type 11

PV : Polyglobulie de Vaquez

RAI : Recherche d'agglutinines irrégulières

RH : Rhésus

RUNX1 : Runt-Related Transcription Factor 1

SBS : Sequencing by synthesis

SF3B1 : Splicing Factor 3B subunit 1

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMG : Splénomégalie

SMP : Syndrome myéloprolifératif

SMP1 : Small Membran Protein 1

SNP : Single nucleotide polymorphism

SNP-Array : Single nucleotide polymorphism – array

ST-CSH : Cellule souche hématopoïétique à court terme

T : Thymine

TE : Thrombocytémie essentielle

TET2 : Ten-Eleven-Translocation 2

TMEM50A : Transmembrane Protein 50A

TPO : Thrombopoïétine

TP53 : Tumor Protein 53

VAF : Variant allele fraction

Table des figures :

Figure 1 : Les différents systèmes de groupes sanguins.	25
Figure 2 : Le locus RH.....	28
Figure 3 : Mécanismes facilitant les phénomènes de conversion génique dans le système RH.....	28
Figure 4 : Les polypeptides Rh (19).....	30
Figure 5 : La phylogénie des haplotypes RH (19)	33
Figure 6 : Les allèles RHCE (35)	33
Figure 7 : L'hématopoïèse humaine (37)	35
Figure 8 : Le chromosome Philadelphie résultant de la translocation t(9;22)(q34;q11)	37
Figure 9 : Critères diagnostiques de la PV selon la classification OMS 2022 (38)	38
Figure 10 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la PV (46)	39
Figure 11 : Critères diagnostiques de la TE selon la classification OMS 2022 (38) ...	40
Figure 12 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la TE (46)	41
Figure 13 : Critères diagnostiques de la MFP selon la classification de l'OMS 2022 (38).....	42
Figure 14 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la MFP (46)	42
Figure 15 : Critères diagnostiques de la leucémie myélomonocytaire juvénile selon la classification OMS 2022 (38).....	43
Figure 16 : Classification des SMD, d'après la classification OMS de 2022 (38).....	46
Figure 17 : Critères diagnostiques de la LMMC selon la classification OMS 2022 (38)	48
Figure 18 : Réaction positive (a) et réaction négative (b) dans la technique Qwalys®	50
Figure 19 : Réaction négative (a) et réaction positive (b) dans la technique Biorad®	51
Figure 20 : Réaction négative (a) et réaction positive (b) dans la technique manuelle en tube.....	51
Figure 21 : Images de doubles populations dans la technique Qwalys® (a), dans la technique Biorad® (b) et dans la technique manuelle en tube (c).....	52
Figure 22 : Les causes de double population du phénotype RH (67)	53
Figure 23 : Les mécanismes mitotiques à l'origine des CN-LOH (69)	56
Figure 24 : La classification des CN-LOH (69)	57

Figure 25 : Etude des polymorphismes du chromosome 1 par SNP-array (Affymetrix® Chromosome Analysis Suite). La perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copies est identifiée lorsque des déséquilibres sont présents (disparition du signal central) avec un nombre normal de copies du chromosome. ...	62
Figure 26 : Les étapes d'une CN-LOH conduisant à l'apparition d'un clone homozygote pour la mutation MPL (84)	63
Figure 27 : Analyse ciblée du nombre de copies des gènes grâce au logiciel USCS. La délétion du bras court du chromosome 1 incluait la perte d'une région s'étendant au minimum des gènes ID3 à ARID1A, encadrant les gènes RHD et RHCE	66

Table des tableaux :

Tableau 1 : Les haplotypes du système RH et les antigènes exprimés correspondants.	30
Tableau 2 : Tableau récapitulant les phénotypes érythrocytaires, les haplotypes, les mutations détectées par NGS, les anomalies caryotypiques et détectées par SNP-array de Monsieur R, Madame C et Madame V permettant la mise en évidence des CN-LOH et de la délétion du bras court du chromosome 1.....	68

Table des annexes :

Annexe 1 : Fréquences des différents phénotypes RH et génotypes RH dans la population caucasienne (87).....	89
---	----

Table des matières :

INTRODUCTION – OBJECTIFS DE CE TRAVAIL DE THESE	23
I. GENERALITES	25
II. SYSTÈME RH.....	27
A. SYSTEME RH ET POLYPEPTIDES RHESUS.....	27
B. POLYMORPHISME ET VARIANTS DE L'ANTIGENE RH1.....	31
1. <i>Variants RH1 partiels</i>	31
2. <i>Variants RH1 faibles</i>	32
C. POLYMORPHISME RHCE	32
III. HEMOPATHIES MYELOIDES	35
A. GENERALITES	35
B. SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	36
1. <i>Définition</i>	36
2. <i>Classification des syndromes myéloprolifératives</i>	36
a. La leucémie myéloïde chronique.....	37
b. Les SMP <i>BCR::ABL1</i> négatifs.....	37
C. SYNDROMES MYEODYSPLASIQUES	44
1. <i>Définition des SMD</i>	44
2. <i>Physiopathologie des SMD</i>	44
3. <i>Diagnostic des SMD</i>	45
4. <i>Classification des SMD</i>	45
D. SYNDROMES MYEODYSPLASIQUES / SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	46
1. <i>Leucémie myélomonocytaire chronique</i>	46
2. <i>Leucémie myéloïde chronique atypique</i>	48
IV. MATERIELS ET METHODES	49
A. ANALYSES IMMUNO-HEMATOLOGIQUES.....	49
1. <i>Techniques immuno-hématologiques utilisées au laboratoire de l'EFS de Lille pour la mise en évidence de doubles populations</i>	49
a. Technique en microplaque (Qwalys®, EM® Technology)	49
b. Technique de microfiltration en gel (IH500® Biorad) ou microbilles Vision Max®, Ortho)	50
c. Technique manuelle en tube.....	51
2. <i>Les doubles populations</i>	52
B. ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	54
1. <i>Séquençage ciblé de l'ADN et analyse du nombre copies par NGS</i>	54
a. Technologie NovaSeq600 d'Illumina®.....	54
b. Avantages et inconvénients de la technologie Illumina®	55
2. <i>Détection des CN-LOH par SNP-Array</i>	56

a.	Les LOH et les CN-LOH	56
b.	Technologie Cytoscan HD de Thermofisher®	58
c.	Avantages et inconvénients de la technologie SNP-array	59
V.	RESULTATS	61
A.	CN-LOH ASSOCIEE A LA DUPLICATION D'UNE MUTATION ONCOGENE	61
1.	<i>CN-LOH associée à la duplication d'une mutation MPL</i>	61
2.	<i>CN-LOH associée à la duplication d'une mutation CSF3R</i>	64
B.	DELETION DU CHROMOSOME 1P	65
C.	RECAPITULATIF DES RESULTATS	68
VI.	DISCUSSION	69
	CONCLUSION – OUVERTURE SUR LE MEMOIRE DE D.E.S	77
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	79

Introduction – Objectifs de ce travail de thèse

Ce travail de thèse s'intéresse à la mise en évidence, par les techniques immuno-hématologiques de routine, de double population ou d'une perte d'expression d'antigènes du système RH chez des patients présentant des hémopathies myéloïdes. Chez ces patients, les causes fréquentes de double population, telles que la transfusion ou la transplantation, ont été éliminées.

L'altération de l'expression d'antigènes de groupes sanguins érythrocytaires est fréquente dans le cadre des hémopathies malignes. La modification de l'expression des antigènes du système ABO est la plus fréquemment identifiée (1) et a été mise en évidence pour la première fois en 1957 (2). La perte ou l'affaiblissement de l'expression de l'antigène RH1(D) est la deuxième modification la plus fréquemment signalée.

L'objectif de cette thèse est d'identifier et de présenter les mécanismes moléculaires à l'origine de l'observation de double population ou d'une perte d'expression antigénique au niveau du système RH.

Ainsi, à partir de l'analyse de trois patients atteints d'hémopathies myéloïdes et présentant des images de double population ou une perte d'expression antigénique, il a été possible de démontrer, grâce à des analyses moléculaires, l'acquisition d'une anomalie sur le bras court du chromosome 1.

I. Généralités

Les antigènes de groupe sanguin érythrocytaire sont des antigènes exprimés sur la membrane des hématies. En février 2024, l'ISBT recensait 45 systèmes de groupes sanguins contenant 362 antigènes et déterminés génétiquement par 50 gènes (Figure n°1).

Ces antigènes sont capables d'induire la production d'anticorps spécifiques. Une variabilité inter-individuelle au niveau de leur expression existe au sein d'une même espèce ; les groupes sanguins sont donc répartis en systèmes constitués chacun d'antigènes allotypiques.

Le phénotypage érythrocytaire résulte de la combinaison des antigènes érythrocytaires d'un individu et est défini par leur présence ou leur absence dues à des variations héréditaires.

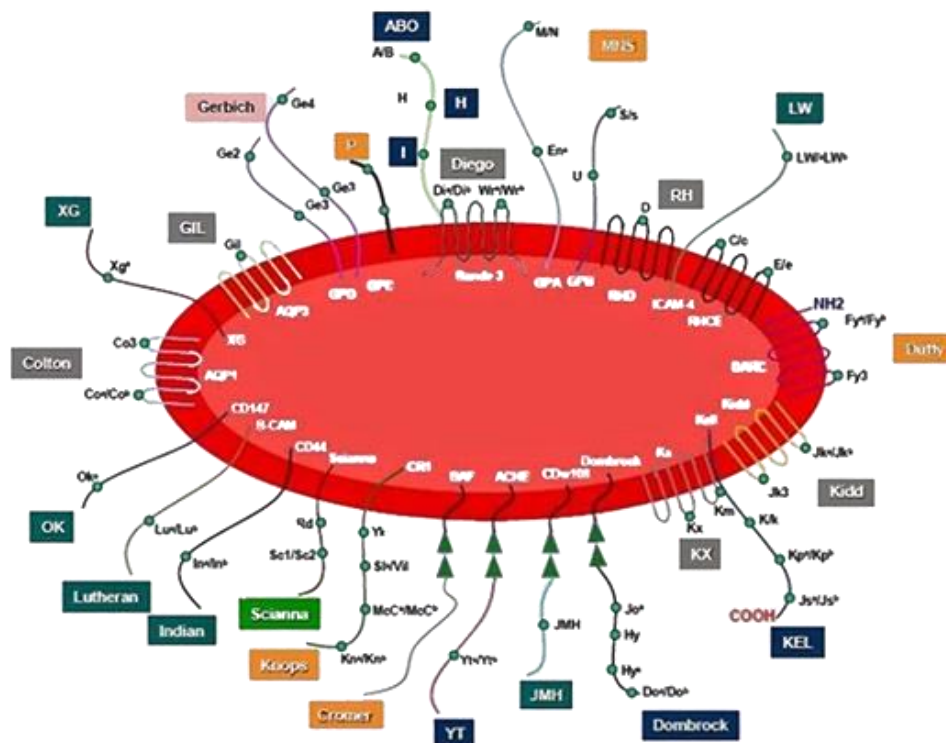


Figure 1 : Les différents systèmes de groupes sanguins.

II. SYSTÈME RH

En 1939, Levine identifiait chez une patiente un anticorps capable d'agglutiner 85% des hématies présentant le même groupe sanguin ABO. À la suite d'une hémorragie de la délivrance, cette patiente avait subi une réaction transfusionnelle sévère après la transfusion de sang de son mari. Le nouveau-né présentait quant à lui une anémie hémolytique (3).

En 1940, Landsteiner et Wiener ont injecté du sang provenant des singes *Macacus Rhesus* à des lapins. Les anticorps développés par les lapins avaient la capacité d'agglutiner 85% des échantillons humains ; ils ont donc été nommés « anticorps anti-Rh ». Les échantillons agglutinés par le sérum étaient nommés « Rh + » et ceux ne réagissant pas « Rh - » (4).

A partir de ces observations, le système RH a été décrit et correspond au système « 004 » de la classification des systèmes de groupes sanguins de l'ISBT (5). Il s'agit, après le système ABO, du système le plus important dans la pratique transfusionnelle car ses antigènes sont très immunogènes et peuvent entraîner des réactions hémolytiques potentiellement sévères aussi bien dans un contexte transfusionnel que dans les incompatibilités fœto-maternelles.

D'après l'ISBT, il existe 56 antigènes dans le système RH (6) mais seuls cinq antigènes sont explorés dans la pratique courante à des fins transfusionnelles : RH1(D), RH2(C), RH3(E), RH4(c) et RH5(e).

A. SYSTEME RH ET POLYPEPTIDES RHESUS

Les antigènes du système RH sont codés par le locus *RH*. Ce locus est constitué de deux gènes : le gène *RHD* et le gène *RHCE*. Chacun de ces gènes possède dix exons et les deux gènes sont organisés en tandem-inversé, c'est-à-dire que leurs extrémités 3' se font face (Figure n°2) (7–9). Le gène *RHD* code pour le polypeptide RhD alors que le gène *RHCE* code, selon sa forme allélique, pour quatre polypeptides : RhCe, RhcE, RhCE et Rhce (10,11).

Les gènes *RHD* et *RHCE*, avec une taille respective de 57295pb et 57831pb, sont localisés sur le chromosome 1, en position 1p34.3-p36.1. Une homologie de séquence de 93,8% est retrouvée entre ces gènes confortant l'idée selon laquelle ces deux gènes dériveraient de la duplication d'un gène ancestral (11–13).

Les gènes *RHD* et *RHCE* sont distants de 30000pb et sont séparés par le gène *TMEM50A* (ou *SMP1*). De plus, le gène *RHD* est encadré par deux boîtes rhésus d'une longueur d'environ 9000pb chacune, présentant une orientation identique et une homologie de 98,6% (13).

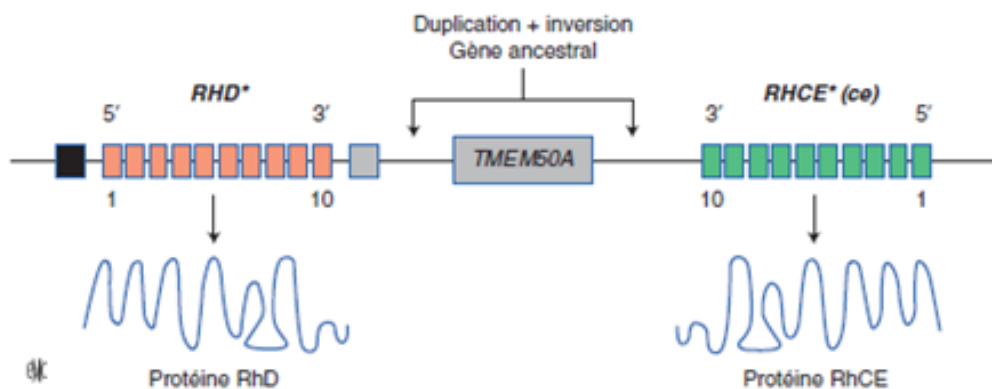


Figure 2 : Le locus RH

Lors de la division cellulaire, du fait de leur position en tandem inversé, les exons homologues des gènes *RHD* et *RHCE*, se retrouvent face à face, facilitant les échanges nucléotidiques (Figure n°3).

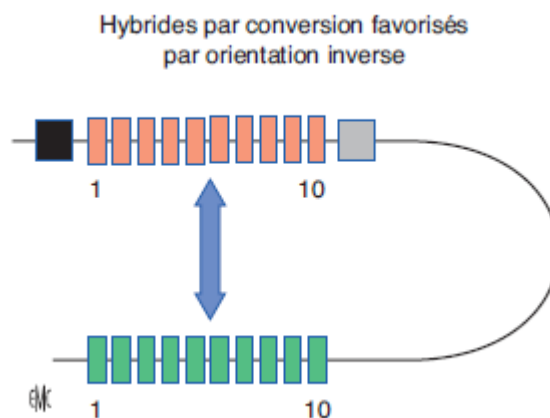


Figure 3 : Mécanismes facilitant les phénomènes de conversion génique dans le système RH

Dans la population caucasienne, les individus présentant le phénotype RH : 1 (D positif) possèdent les gènes *RHD* et *RHCE* au sein du locus *RH* alors que seul le gène *RHCE* est présent chez les individus RH : -1 (D négatif), du fait d'une délétion du gène *RHD* (7,11,14,15).

Dans les populations afro-antillaises, certaines mutations dans le gène *RHD* peuvent entraîner un phénotype RH : -1 alors qu'un transcrit de *RHD* peut être détecté par biologie moléculaire (8,16–18).

Les antigènes RHC/RHc et RHE/RHe étant codés par un gène unique, la protéine traduite résulte d'un épissage alternatif d'un seul transcrit du gène *RHCE* (10,19).

Les antigènes RHC/RHc et RHE/RHe sont antithétiques deux à deux, c'est-à-dire que si l'un des antigènes est absent, l'autre sera forcément présent mais les deux antigènes peuvent coexister (20).

La combinaison des deux gènes *RHD* et *RHCE* forme un haplotype. Il est transmis en un seul bloc lors de la méiose. Chaque individu possède deux haplotypes : un d'origine maternelle et un d'origine paternelle. L'association des deux haplotypes conduit aux différents phénotypes RH (21,22).

Les phénotypes RH sont caractérisés par des fréquences variables et dépendent des différentes populations ; en effet, les fréquences retrouvées dans la population caucasienne sont différentes de celles retrouvées dans la population afro-antillaise ou asiatique (Annexe n°1) (23).

La nomenclature du système RH a évolué selon différentes hypothèses (6). Tout d'abord, Wiener avait émis le postulat de l'existence d'un seul gène au locus *RH*, exprimé dans la terminologie Rh-Hr. Dans cette terminologie, la désignation des groupes sanguins correspondait aux antisérums avec lesquels ils réagissaient (24). Ensuite, afin de prédire la transmission héréditaire des antigènes RH, Fisher et Race ont créé une deuxième nomenclature reposant sur l'existence de trois paires d'allèles liées : la nomenclature DCE (25,26). Enfin, aujourd'hui, la nomenclature internationale et officielle du système RH de l'ISBT repose sur la nomenclature numérique proposée par Rosenfield en 1962 au sein de laquelle chaque antigène est relié à un nombre qui lui est propre (27) (Tableau n°1).

Nomenclature DCE (Fisher-Race)	Terminologie Rh-Hr (Wiener)	Antigènes exprimés
<i>Dce</i>	R^0	RH1(D), RH4(c) et RH5(e)
<i>DCe</i>	R^1	RH1(D), RH2(C) et RH5(e)
<i>DcE</i>	R^2	RH1(D), RH3(E) et RH4(c)
<i>DCE</i>	R^Z	RH1(D), RH2(C) et RH3(E)
<i>dce</i>	r	RH4(c) et RH5(e)
<i>dCe</i>	r'	RH2(C) et RH5(e)
<i>dcE</i>	r''	RH3(E) et RH4(c)
<i>dCE</i>	r^y	RH2(C) et RH3(E)

Tableau 1 : Les haplotypes du système RH et les antigènes exprimés correspondants.

Les polypeptides RhD et RhCE ont une taille de 417 acides aminés, sont très hydrophobes et possèdent douze domaines transmembranaires avec six boucles extracellulaires et cinq boucles intracellulaires (Figure n°4) (28–30). Les régions C et N terminales, en position intracellulaire, sont bien conservées et une homologie de plus de 90% existe entre leurs séquences d'acides aminés (11,12,31).

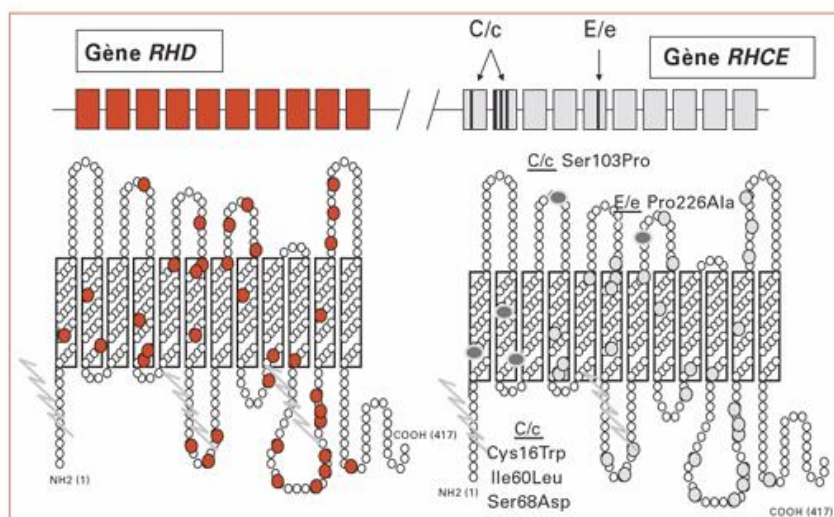


Figure 4 : Les polypeptides Rh (32)

Les polypeptides RhD et RhCE sont spécifiquement retrouvés sur les cellules de la lignée érythrocytaire, peu importe le stade de maturation (33–36) et sont présents quel que soit l'âge de l'individu. En effet, la maturation de ces polypeptides se déroule

durant la vie foetale expliquant leur implication dans les incompatibilités foeto-maternelles (37).

Structurellement, les polypeptides RhD et RhCE s'associent à la protéine RhAG pour former le complexe Rh (38,39). La protéine RhAG est codée par le gène *RHAG*, qui est situé sur le chromosome 6 en position 6p11-21, et possède dix exons (40,41).

Pour former la famille Rhésus, le complexe Rh s'associe aux « Rh accessory proteins » parmi lesquelles figurent la glycoprotéine LW, le CD47, la glycophorine B, la glycoprotéine FY5 et la protéine de bande 3 (42–44). Toutes ces protéines présentent un défaut ou une absence d'expression chez un individu avec un phénotype RH_{null} (45).

Le complexe Rh joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire. En effet, l'absence d'expression des antigènes RH et RhAG dans le phénotype RH_{null} est associée à une morphologie et une fonctionnalité anormale des hématies (46,47).

Les polypeptides Rh, associés à la protéine RhAG, pourraient également jouer un rôle dans le transport d'ammoniac (48).

B. POLYMORPHISME ET VARIANTS DE L'ANTIGENE RH1

Le polymorphisme de l'antigène RH1 est principalement représenté par son expression ou non à la surface des hématies.

Des réarrangements du gène *RHD* sauvage, par conversion génique ou mutations ponctuelles, peuvent conduire à des phénotypes RH1 variants.

1. Variants RH1 partiels

Les variants RH1 partiels sont principalement caractérisés par une anomalie qualitative de l'antigène RH1(D).

L'antigène RH1(D) est constitué d'une mosaïque d'épitopes. L'individu présentant un phénotype RH : 1 partiel possède un antigène RH1 dépourvu de certains épitopes et peut développer des anticorps vis-à-vis des épitopes qu'il n'exprime pas (49,50).

De ce fait, les individus présentant un antigène RH1 partiel sont considérés comme RH : -1 en tant que receveurs. Ils seront considérés comme RH : 1 en tant que donneurs (51).

2. Variants RH1 faibles

Les variants RH1 faibles se caractérisent par une anomalie quantitative de l'antigène RH1(D) (52,53).

Le phénotype RH : 1 faible (ou phénotype RH : W1) se caractérise par la présence de tous les épitopes de l'antigène RH1(D) exprimés plus faiblement (53).

Chez un sujet RH : 1, les hématies possèdent entre 10000 et 30000 sites antigéniques (54,55). Chez un individu présentant un phénotype RH : 1 faible, les hématies expriment moins de 4000 sites antigéniques (56).

En fonction de la sensibilité de la technique analytique utilisée, ce déficit quantitatif peut difficilement, voire, ne pas être détecté (53).

C. POLYMORPHISME RHCE

L'expression des différents antigènes issus des allèles *RHCE* est la conséquence de la modification de l'haplotype ancestral Dce par mutation ou conversion génique (Figure n°5).

L'haplotype DcE est obtenu, à partir de Dce, par une mutation spécifique dans l'exon 5 du gène *RHCE* : 676G>C (Ala226Pro) (19,57).

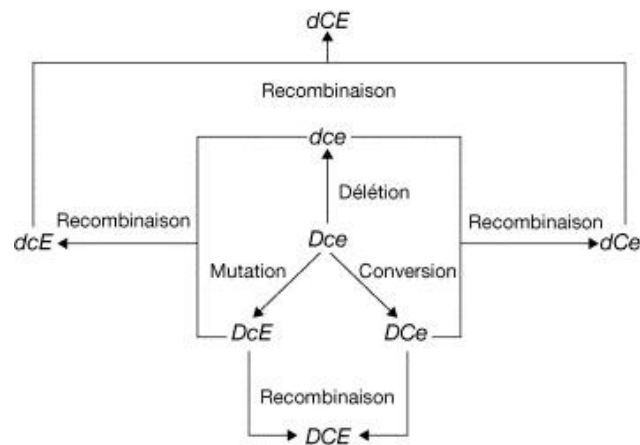


Figure 5 : La phylogénie des haplotypes RH (32)

L'haplotype DCe est obtenu par conversion génique de l'haplotype Dce. En effet, l'exon 2 du gène *RHD* est transféré dans le gène *RHCE*. Il existe différents polymorphismes (mutations dans l'exon 1 et 2 ; insertion d'une séquence nucléotidique dans l'intron 2) au sein de l'haplotype DCe (19) (Figure n°6).

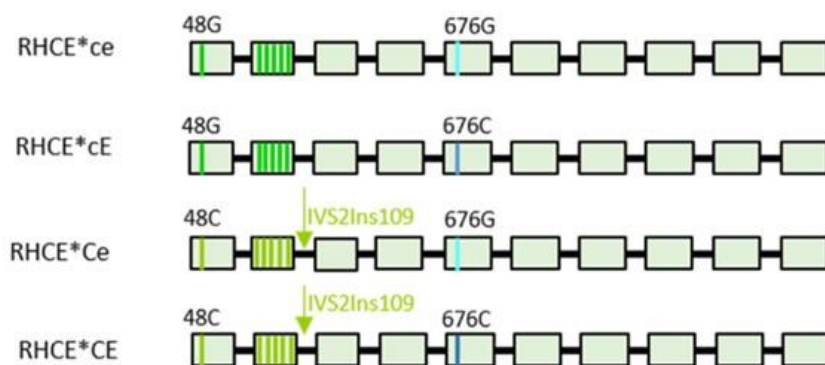


Figure 6 : Les allèles RHCE (58)

III. HEMOPATHIES MYELOIDES

A. Généralités

L'hématopoïèse représente l'ensemble des mécanismes permettant la production de toutes les lignées cellulaires sanguines. Celle-ci se déroule dans les organes hématopoïétiques, principalement la moelle osseuse.

Au cours du développement, les cellules emprunteront l'une des deux voies de différenciation suivantes : la voie de différenciation myéloïde, à partir de la cellule myéloïde progénitrice (CMP), ou la voie de différenciation lymphoïde, à partir de la cellule lymphoïde progénitrice (CLP) (Figure n°7). La lignée érythrocytaire, et donc les hématies, dérive des CMP (59).

Les hémopathies myéloïdes correspondent à des pathologies impliquant la présence d'un clone malin au sein de la lignée érythrocytaire, plaquettaire et/ou granulomonocytaire. Les pathologies impliquant la lignée lymphoïde n'appartiennent donc pas aux hémopathies myéloïdes.

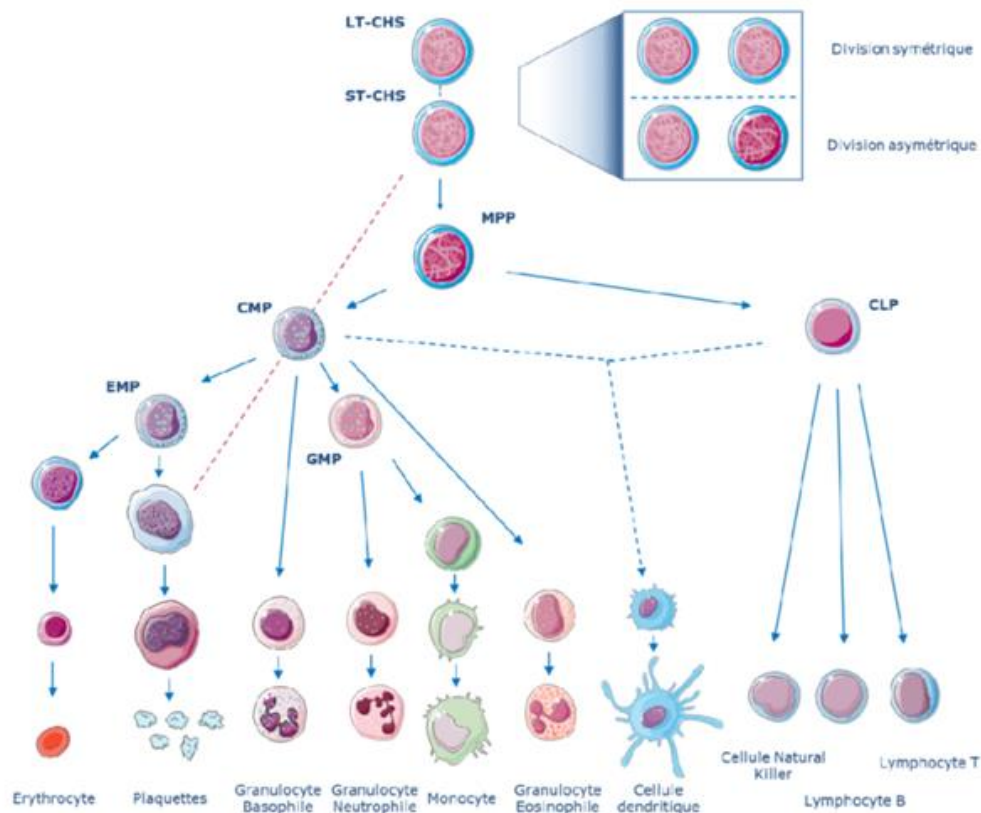


Figure 7 : L'hématopoïèse humaine (60)

Abréviations : Cellule souche hématopoïétique à long terme (LT-CSH), Cellule souche hématopoïétique à court terme (ST-CSH), Progéniteur multipotent (MPP), Progéniteur myéloïde commun (CMP), Progéniteur lymphoïde commun (CLP), Progéniteur érythro-mégacaryocytaire (EMP), Progéniteur granulo-monocytaire (GMP)

Les hémopathies myéloïdes se distinguent selon le caractère aigu ou chronique, et le caractère quantitatif ou qualitatif de la pathologie.

Comme son nom l'indique, les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies myéloïdes évoluant selon un caractère aigu et caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs hématopoïétiques. Elles sont définies par une blastose médullaire $\geq 20\%$. Le diagnostic de LAM peut également se faire, peu importe la blastose médullaire, devant la présence de certaines translocations comme la t(15;17) caractéristique de la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) (61).

Évoluant tous les deux selon un caractère chronique, les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont caractérisés par la prolifération d'une ou de plusieurs lignées cellulaires alors que les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont caractérisés par des cytopénies et des dysplasies.

D'autres hémopathies, telle que la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), sont à la frontière entre le SMP et le SMD.

B. Syndromes myéloprolifératifs

1. Définition

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP), ou néoplasies myéloprolifératives (NMP), sont des pathologies de la cellule souche hématopoïétique (CSH) caractérisées par la prolifération d'une ou de plusieurs lignées myéloïdes matures (62). Une blastose sanguine et médullaire, inférieure à 20%, peut être retrouvée dans les SMP.

2. Classification des syndromes myéloprolifératives

D'après la classification OMS 2022, les SMP sont séparés entre :

- Les SMP *BCR::ABL1* positifs : la leucémie myéloïde chronique (LMC)
- Les SMP *BCR::ABL1* négatifs : la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MFP), la leucémie myélomonocytaire juvénile, la leucémie chronique à éosinophiles et la leucémie chronique à neutrophiles (61).

a. La leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne indolente touchant la CSH caractérisée par la prolifération du tissu myéloïde, en particulier de la lignée granulocytaire (63).

Le diagnostic de la LMC repose sur la détection du chromosome Philadelphie. Ce chromosome résulte de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : la $t(9;22)(q34;q11)$ et conduit à la formation de l'oncogène *BCR::ABL1* responsable de la pathogenèse de la LMC (Figure n°8). La protéine BCR-ABL1 est une tyrosine kinase constitutivement active ayant un rôle dans la prolifération des cellules myéloïdes et dans l'inhibition de l'apoptose (64).

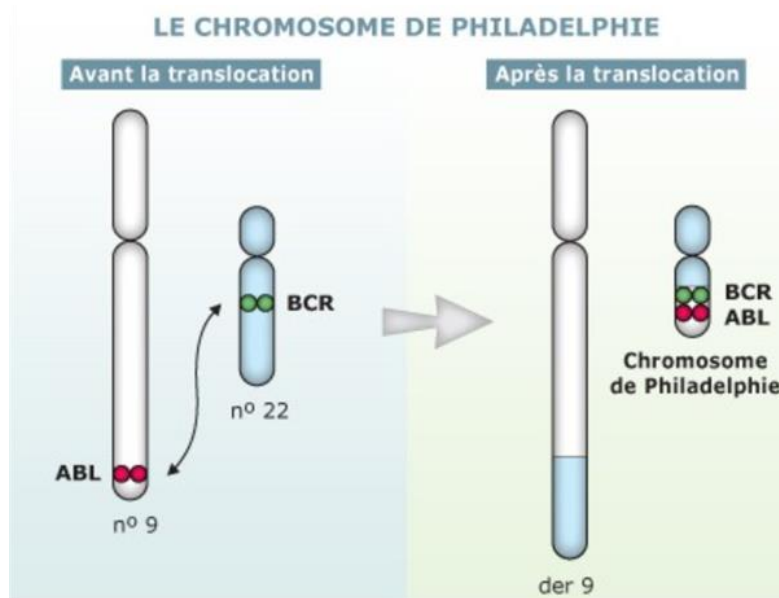


Figure 8 : Le chromosome Philadelphie résultant de la translocation $t(9;22)(q34;q11)$

b. Les SMP *BCR::ABL1* négatifs

Les SMP *BCR::ABL1* négatifs contiennent une mutation, présente au niveau de la CSH, sur des gènes codant des protéines ayant un rôle dans la voie de signalisation JAK/STAT. Respectivement, les mutations acquises sur les gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL* sont les plus fréquentes et entraînent un gain de fonction ; elles sont suffisantes pour initier et favoriser la pathologie. Moins de 10% des patients sont « triple négatifs », c'est-à-dire que ces trois gènes ne sont pas mutés mais une activation

constitutive de la voie JAK/STAT est tout de même retrouvée (65). La voie JAK/STAT a donc un rôle prépondérant dans l'oncogenèse des SMP.

i. Polyglobulie de Vaquez

La polyglobulie de Vaquez (PV) est une hémopathie maligne affectant la CSH caractérisée par la prolifération du tissu myéloïde, en particulier de la lignée érythrocytaire.

Le diagnostic de la PV repose sur la mise en évidence d'une augmentation de l'hémoglobine ou de l'hématocrite, associée à une hyperplasie médullaire des trois lignées cellulaires. La détection d'une mutation du gène *JAK2* est un critère diagnostique majeur de la PV (66) (Figure n°9).

WHO PV criteria
Major criteria
1. Hemoglobin >16.5 g/dL in men
Hemoglobin >16.0 g/dL in women
or,
Hematocrit >49% in men
Hematocrit >48% in women
or,
increased red cell mass (RCM)*
2. BM biopsy showing hypercellularity for age with
trilineage growth (panmyelosis) including
prominent erythroid, granulocytic, and
megakaryocytic proliferation with pleomorphic,
mature megakaryocytes (differences in size)
3. Presence of <i>JAK2</i> V617F or <i>JAK2</i> exon 12
mutation
Minor criterion
Subnormal serum erythropoietin level
Diagnosis of PV requires meeting either all 3 major criteria, or the first 2 major criteria
and the minor criterion†

Figure 9 : Critères diagnostiques de la PV selon la classification OMS 2022 (61)

Le gène *JAK2* est situé sur le chromosome 9 en position 9p24.1 (67) et code pour la protéine JAK2.

La mutation ponctuelle G1849T dans l'exon 14 du gène *JAK2*, entraînant la traduction de la protéine *JAK2* V617F, est une mutation acquise gain de fonction qui permet une hypersensibilité aux cytokines et une indépendance à l'érythropoïétine (EPO) (68).

Aussi, il existe des mutations somatiques gain de fonction dans l'exon 12 de *JAK2* (68).

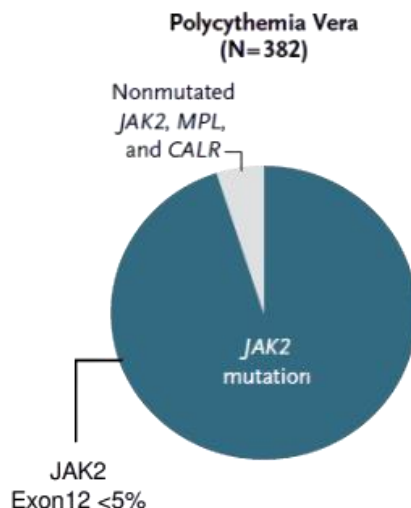


Figure 10 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la PV (69)

La mutation clonale *JAK2* V617F est présente chez 90% des patients (68). Les mutations somatiques dans l'exon 12 de *JAK2* sont retrouvées chez moins de 5% des patients avec une PV (70). Les gènes *CALR* et *MPL* ne sont jamais mutés (65,69) (Figure n°10).

ii. Thrombocythémie essentielle

La thrombocythémie essentielle (TE) est caractérisée par une thrombocytose chronique, associée à la mise en évidence, à la biopsie ostéo-médullaire (BOM), d'une prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec présence de mégacaryocytes matures.

Il est nécessaire d'exclure les autres néoplasies myéloïdes telles que la LMC, la PV, la MFP ou un SMD, ainsi que les causes de thrombocytoses réactionnelles (Figure n°11).

La présence d'une mutation *JAK2*, *CALR*, *MPL* ou d'un autre marqueur clonal doit être mise en évidence (66).

WHO ET criteria
Major criteria
1. Platelet count $\geq 450 \times 10^9/L$
2. BM biopsy showing proliferation mainly of the megakaryocyte lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes with hyperlobulated nuclei. No significant increase or left shift in neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers
3. Not meeting WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i> ⁺ CML, PV, PMF, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
4. Presence of <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , or <i>MPL</i> mutation
Minor criterion
Presence of a clonal marker or absence of evidence for reactive thrombocytosis
Diagnosis of ET requires meeting all 4 major criteria or the first 3 major criteria and the minor criterion

Figure 11 : Critères diagnostiques de la TE selon la classification OMS 2022 (61)

Tout d'abord, le gène *CALR* est situé sur le chromosome 19 en position 19p13.13 (71) et code pour la protéine CALR. La protéine CALR est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique ; elle contrôle le repliement correct des protéines glycosylées et active la voie JAK/STAT via la protéine MPL.

Les mutations de *CALR* résultent d'insertions ou de délétions situées dans l'exon 9 du gène *CALR*, entraînant un décalage du cadre de lecture et sa traduction en une protéine CALR mutante. Ainsi, la présence d'une mutation dans *CALR* permet une croissance cellulaire indépendamment des cytokines grâce à l'activation constitutive et inappropriée de MPL (69).

Par la suite, le gène *MPL* est situé sur le chromosome 1 en position 1p34 (72) et code pour la protéine MPL. La protéine MPL est le récepteur à la thrombopoïétine (TPO). En situation physiologique, la TPO se lie au récepteur et entraîne l'activation de la voie JAK/STAT (65).

La mutation du gène *MPL* entraîne une activation constitutive de ce récepteur et une croissance des lignées cellulaires indépendamment des cytokines telles que la TPO (62). Ainsi, les CSH mutées deviennent hypersensibles aux cytokines impliquées dans l'hématopoïèse (73).

Généralement, les mutations, se situant au niveau de l'exon 10 du gène *MPL*, sont des mutations faux sens et conduisent le plus souvent aux protéines MPL avec les mutations W515K et W515L (65).

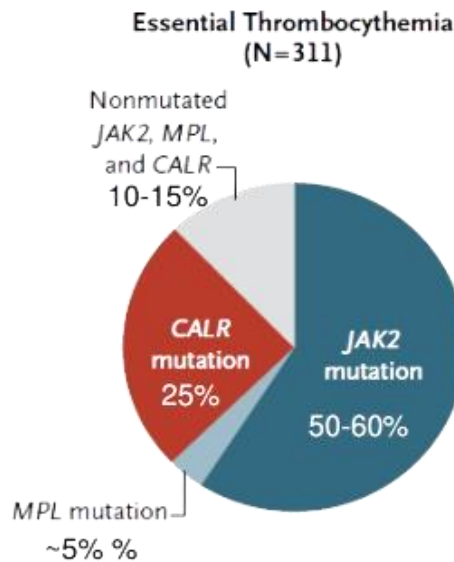


Figure 12 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la TE (69)

La mutation clonale JAK2 V617F est présente chez 50 à 60% des patients (68). Les mutations somatiques dans l'exon 12 de JAK2 ne sont jamais retrouvées (68). 25% des patients présentent une mutation dans le gène *CALR* (69), et 5 à 7% ont une mutation somatique dans le gène *MPL* (65,74). Cependant, 10 à 15% des patients ne présentent pas de mutation de ces trois gènes (Figure n°12).

iii. Myélofibrose primitive

La myélofibrose primitive (MFP) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération myéloïde prédominant sur la lignée mégacaryocytaire, d'une fibrose médullaire et d'une hématopoïèse extramédullaire.

Fréquemment, les patients présentent une splénomégalie (SMG), une érythromylémie, une blastose sanguine et il est possible d'observer des dacryocytes au frottis sanguin (75).

Comme dans la TE, il est nécessaire d'exclure les autres néoplasies myéloïdes et de mettre en évidence une mutation de *JAK2*, *CALR*, *MPL* ou d'un autre marqueur clonal (66) (Figure n°13).

WHO overt PMF criteria

Major criteria

1. Presence of megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2 or 3*
2. Not meeting WHO criteria for ET, PV, *BCR-ABL* 1⁺ CML, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
3. Presence of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker,† or absence of reactive myelofibrosis‡

Minor criteria

Presence of at least 1 of the following, confirmed in 2 consecutive determinations:

- a. Anemia not attributed to a comorbid condition
- b. Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$
- c. Palpable splenomegaly
- d. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range
- e. Leukoerythroblastosis

Diagnosis of overt PMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion

Figure 13 : Critères diagnostiques de la MFP selon la classification de l'OMS 2022 (61)

La mutation clonale *JAK2* V617F est présente chez 50 à 60% des patients (68). Comme dans la TE, les mutations somatiques dans l'exon 12 de *JAK2* ne sont jamais retrouvées (68). 35% des patients présentent une mutation dans le gène *CALR* (69), et 5 à 10% ont une mutation somatique dans le gène *MPL* (65,74) (Figure n°14).

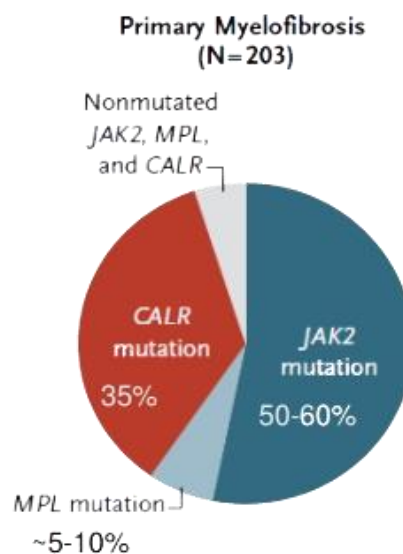


Figure 14 : Fréquence des différentes mutations retrouvées dans la MFP (69)

iv. Autres SMP *BCR::ABL1* négatifs

Il existe d'autres syndromes myéloprolifératifs beaucoup plus rares tels que la leucémie myélomonocytaire juvénile, la leucémie chronique à éosinophiles ou la leucémie chronique à neutrophiles :

- La leucémie myélomonocytaire juvénile se caractérise par une monocytose, une splénomégalie et l'absence de chromosome Philadelphie. Une mutation somatique dans le gène *PTPN11*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1* ou *CBL* est retrouvée chez les patients (66) (Figure n°15).

JMML diagnostic criteria

I. Clinical and hematologic features (all 4 features mandatory)

- PB monocyte count $\geq 1 \times 10^9/L$
- Blast percentage in PB and BM $< 20\%$
- Splenomegaly
- Absence of Philadelphia chromosome (*BCR/ABL1* rearrangement)

II. Genetic studies (1 finding sufficient)

- Somatic mutation in *PTPN11** or *KRAS** or *NRAS**
- Clinical diagnosis of *NF1* or *NF1* mutation
- Germ line *CBL* mutation and loss of heterozygosity of *CBL*†

III. For patients without genetic features, besides the clinical and hematologic features listed under I, the following criteria must be fulfilled:

- Monosomy 7 or any other chromosomal abnormality or at least 2 of the following criteria:
 - Hemoglobin F increased for age
 - Myeloid or erythroid precursors on PB smear
 - GM-CSF hypersensitivity in colony assay
 - Hyperphosphorylation of STAT5

Figure 15 : Critères diagnostiques de la leucémie myélomonocytaire juvénile selon la classification OMS 2022 (61)

- La leucémie chronique à éosinophiles est un SMP rare caractérisé par une prolifération clonale des polynucléaires éosinophiles et de ses précurseurs dans les compartiments sanguin et médullaire (66).
- La leucémie chronique à neutrophiles (LCN) est une hémopathie rare qui se définit par un nombre élevé de polynucléaires neutrophiles matures dans le sang périphérique, associée à une moelle osseuse hyperplasique et une hépatosplénomégalie (76). Le diagnostic de la LNC se réalise par élimination des neutrophilies réactionnelles et des autres SMP. Une mutation du gène

CSF3R est très fréquemment retrouvée et fait partie des critères diagnostiques de cette hémopathie car considérée comme l'anomalie déterminante de la pathologie (66,77).

Le gène *CSF3R* est situé sur le chromosome 1 en position 1p34.3 (78) et code pour la protéine CSF3R. Cette protéine est le récepteur pour le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, CSF3) et a un rôle dans la croissance, la survie et la différenciation des granulocytes (77).

Les mutations activatrices du gène *CSF3R* entraînent une surexpression constitutive du récepteur, une perturbation de sa capacité à réguler la différenciation des granuleux et une augmentation de leur prolifération (77).

C. Syndromes myélodysplasiques

1. Définition des SMD

Les syndromes myélodysplasiques (SMD), ou néoplasies myélodysplasiques (NMD) (61), sont des maladies clonales caractérisées par une différenciation aberrante et une apoptose accrue des lignées myéloïdes conduisant à la présence de dysplasies cellulaires et de cytopénies sanguines (79). Le risque d'évolution vers une LAM est élevé.

2. Physiopathologie des SMD

Dans les SMD, un taux élevé d'apoptose prématurée des cellules issues du clone pathologique est observé conduisant à une hématopoïèse inefficace (80).

Fréquemment, les cellules tumorales présentent des altérations génétiques. En effet, la différenciation aberrante des cellules dans les SMD peut être attribuée à une méthylation anormale de l'ADN et à des mutations touchant les gènes régulant l'épigénétique, tels que les gènes *TET2*, *DNMT3A*, *EZH2* ou *ASXL1* (79).

De plus, une dérégulation des voies de signalisation cellulaire, essentielles au développement hématopoïétique, liée à la mutation des gènes *TP53*, *RUNX1* ou *RAS*, peut-être détectée (79).

3. Diagnostic des SMD

Le diagnostic des SMD repose sur la mise en évidence des dysplasies médullaires d'une ou de plusieurs lignées cellulaires, associées à des cytopénies persistantes.

La clinique est non spécifique et dépend des cytopénies sanguines : syndrome anémique, syndrome infectieux et/ou syndrome hémorragique.

Des anomalies cytogénétiques et moléculaires sont respectivement décelées dans 50% et 80% des SMD (81,82).

La plupart du temps, les anomalies cytogénétiques sont non équilibrées (83).

Pour l'exploration des SMD, des analyses de NGS sont couramment réalisées et les panels de gènes recherchés contiennent, par exemple, les gènes *ASXL1*, *CSF3R*, *RUNX1*, *PPM1D*, *MPL*, *TET2* ou encore *TP53* (84,85).

Cependant, les anomalies cytogénétiques et moléculaires ne sont pas spécifiques car retrouvées dans d'autres hémopathies myéloïdes, telles que la LAM (86).

Pour réaliser le diagnostic de SMD, les autres néoplasies myéloïdes doivent être éliminées. De même, la blastose médullaire ne doit pas excéder 20%. Ainsi, le diagnostic de ce dernier va dépendre d'un faisceau d'arguments cliniques et biologiques, en prenant en compte les anomalies cytologiques, cytogénétiques et moléculaires (87,88).

4. Classification des SMD

Depuis la classification de l'OMS de 2022, une distinction est faite entre les SMD avec des anomalies cytogénétiques et les SMD définis morphologiquement (Figure n°16) (61).

Parmi les SMD définis génétiquement, nous retrouvons :

- Les SMD sans excès de blastes et une délétion isolée du 5q (MDS-5q)
- Les SMD sans excès de blastes et une mutation de *SF3B1* (MDS-*SF3B1*)
- Les SMD avec une inactivation biallélique de *TP53* (MDS-bi*TP53*)

Parmi les SMD définis morphologiquement, nous retrouvons :

- Les SMD hypoplasiques (MDS-h)
- Les SMD sans excès de blastes (MDS-LB)
- Les SMD avec excès de blastes (MDS-IB) :
 - En fonction du nombre de blastes, MDS-IB1 ou MDS-IB2
 - Les SMD avec fibrose (MDS-f)

	Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with defining genetic abnormalities			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and SF3B1 mutation ^a (MDS-SF3B1)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	SF3B1
MDS with biallelic TP53 inactivation (MDS-biTP53)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more TP53 mutations, or 1 mutation with evidence of TP53 copy number loss or cnLOH
MDS, morphologically defined			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic ^b (MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10–19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		

^aDetection of ≥15% ring sideroblasts may substitute for SF3B1 mutation. Acceptable related terminology: MDS with low blasts and ring sideroblasts.

^bBy definition, ≤25% bone marrow cellularity, age adjusted.

BM bone marrow, PB peripheral blood, cnLOH copy neutral loss of heterozygosity.

Figure 16 : Classification des SMD, d'après la classification OMS de 2022 (61)

D. Syndromes myélodysplasiques / syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myélodysplasiques / syndromes myéloprolifératifs (SMD/SMP) sont des néoplasies myéloïdes associant :

- Une composante proliférative : hyperleucocytose, monocytose ou thrombocytose
- Une composante dysplasique : cytopénie mono ou multilignée (61).

1. Leucémie myélomonocytaire chronique

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie myéloïde rare se caractérisant par une monocytose sanguine persistante, associée à la présence de

mutations somatiques dans les gènes impliquant l'épigénétique (tel que le gène *TET2*), le spliceosome ou les gènes de transduction du signal (61).

Aucun signe clinique n'est spécifique de la LMMC.

Fréquemment, une anémie et une thrombopénie sont observées, contrastant avec l'expansion du compartiment granulo-monocytaire (89).

Pour réaliser le diagnostic de LMMC, les autres néoplasies myéloïdes doivent être éliminées et le pourcentage de blastes, sanguin et médullaire, ne doit pas excéder 20%.

En fonction de la valeur de la monocytose, des critères complémentaires doivent s'ajouter aux critères prérequis : la dysplasie d'une ou de plusieurs lignées cellulaires ; une partition anormale des sous-ensembles de monocytes sanguins ; ou, la présence d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires (Figure n°17).

En fonction de la valeur absolue des leucocytes, la LMMC peut être classée en deux sous-types :

- La LMMC myélodysplasique (LMMC-MD) si les leucocytes < 13 G/L
- La LMMC myéloproliférative (LMMC-MP) si les leucocytes ≥ 13 G/L

La blastose, sanguine et médullaire, permet de classer la LMMC en deux sous-groupes :

- La LMMC-1 si la blastose sanguine < 5% et la blastose médullaire < 10%
- La LMMC-2 si la blastose sanguine entre 5 et 19% ou la blastose médullaire entre 10 et 19%

Prerequisite criteria
1. Persistent absolute ($\geq 0.5 \times 10^9/L$) and relative ($\geq 10\%$) peripheral blood monocytosis.
2. Blasts constitute $< 20\%$ of the cells in the peripheral blood and bone marrow. ^a
3. Not meeting diagnostic criteria of chronic myeloid leukaemia or other myeloproliferative neoplasms. ^b
4. Not meeting diagnostic criteria of myeloid/lymphoid neoplasms with tyrosine kinase fusions. ^c
Supporting criteria
1. Dysplasia involving ≥ 1 myeloid lineages. ^d
2. Acquired clonal cytogenetic or molecular abnormality.
3. Abnormal partitioning of peripheral blood monocyte subsets. ^e
Requirements for diagnosis
- Pre-requisite criteria must be present in all cases.
- If monocytosis is $\geq 1 \times 10^9/L$: one or more supporting criteria must be met.
- If monocytosis is ≥ 0.5 and $< 1 \times 10^9/L$: supporting criteria 1 and 2 must be met.
Subtyping criteria
- Myelodysplastic CMML (MD-CMML): $WBC < 13 \times 10^9/L$
- Myeloproliferative CMML (MP-CMML): $WBC \geq 13 \times 10^9/L$
Subgrouping criteria (based on percentage of blasts and promonocytes)
CMML-1: $< 5\%$ in peripheral blood and $< 10\%$ in bone marrow
CMML-2: $5-19\%$ in peripheral blood and $10-19\%$ in bone marrow

Figure 17 : Critères diagnostiques de la LMMC selon la classification OMS 2022 (61)

2. Leucémie myéloïde chronique atypique

Depuis la classification OMS de 2022, la leucémie myéloïde chronique atypique (LMC atypique), renommée SMD/SMP avec neutrophilie, a été classée dans les SMD/SMP (61).

La LMC atypique se caractérise par une polynucléose neutrophile, associée à une myélémie et une moelle osseuse hypercellulaire. Contrairement à la LMC classique, le chromosome Philadelphie n'est pas retrouvé. Une mutation du gène *CSF3R* a été rencontrée chez 59% des patients (77).

IV. MATERIELS ET METHODES

A. ANALYSES IMMUNO-HEMATOLOGIQUES

Le principe d'héماغglutination, c'est-à-dire la reconnaissance spécifique d'antigènes érythrocytaires par des anticorps, est à la base de toutes les analyses immuno-hématologiques. Ces réactions permettent la formation spontanée d'un réseau (si l'anticorps est de type IgM) ou par le biais d'antiglobuline humaine (AgH) (si l'anticorps est de type IgG). La formation de ce réseau permet le rapprochement des hématies et donc leur agglutination macroscopiquement visible.

Dans notre cas, ce sont les antigènes du système RH qui sont reconnus par les réactifs constitués d'anticorps monoclonaux de type IgM (90).

1. Techniques immuno-hématologiques utilisées au laboratoire de l'EFS de Lille pour la mise en évidence de doubles populations

Différentes techniques sont utilisées au laboratoire :

- Les techniques en microplaque
- Les techniques de microfiltration en gel ou en microbilles
- Les techniques manuelles en tube

a. Technique en microplaque (Qwalys®, EM® Technology)

La technique en microplaque Qwalys® repose sur le principe de la magnétaphérèse. En effet, un champ magnétique est appliqué après liaison de particules de fer sur la glycophorine A érythrocytaire. Celui-ci permet d'attirer les hématies au fond du micropuits où se trouve l'anticorps monoclonal IgM. Après agitation, si les antigènes du système RH sont présents, un agglutinat unique et compact est observable (Figure n°18a). A l'inverse, si l'antigène RH est absent, la réaction est négative et la suspension globulaire sera homogène (Figure n°18b).



Figure 18 : Réaction positive (a) et réaction négative (b) dans la technique Qwalys®

La technique Qwalys® est peu couteuse et de cadence élevée. Elle ne nécessite pas de centrifugation des mélanges réactionnels d'où un gain de temps dans la réalisation des analyses.

Cependant, cette technique est moins sensible qu'une technique en filtration pour détecter les anomalies de phénotypage érythrocytaire ; la visualisation des doubles populations n'est donc pas optimale (90).

b. Technique de microfiltration en gel (IH500® Biorad) ou microbilles Vision Max®, Ortho)

Les techniques en microfiltration se réalisent sur des colonnes constituées d'un gel ou de microbilles en verre contenant l'anticorps monoclonal. Après ajout des hématies du patient dans une micro-cupule surmontant la colonne puis centrifugation, les hématies agglutinées avec l'antisérum sont séparées des hématies non agglutinées. La réaction est considérée comme négative si les hématies se situent en bas de colonne et forment un culot uniforme (Figure n°19a). Une réaction est considérée comme positive (4+) lorsqu'une bande en haut du gel est observée (Figure n°19b).



Figure 19 : Réaction négative (a) et réaction positive (b) dans la technique Biorad®

Malgré leur coût plus élevé, ces techniques sensibles et robustes sont très utilisées. Les réactions sont faciles à lire et stables dans le temps (90).

c. Technique manuelle en tube

Les hématies du patient sont préalablement mises en contact avec le réactif contenant les anticorps anti-RH. Après homogénéisation et centrifugation, le culot globulaire est légèrement agité. La réaction est considérée comme négative si la suspension globulaire est homogène et qu'aucun agglutinat n'est observable (Figure n°20a). Si lors du décollement du culot, l'agglutinat ne se dissocie pas, la réaction est considérée comme positive (Figure n°20b).



Figure 20 : Réaction négative (a) et réaction positive (b) dans la technique manuelle en tube.

Malgré sa rapidité et sa sensibilité, cette technique historique n'est pas utilisée en première intention et nécessite du personnel formé et expérimenté réservant cette technique aux seuls laboratoires spécialisés en immuno-hématologie (90).

2. Les doubles populations

Une double population (DP) est observée lorsqu'il existe simultanément des hématies exprimant un antigène et des hématies ne l'exprimant pas. Le pourcentage des hématies au sein de chaque population est très variable selon l'origine. Leur détection est également fonction de la technique utilisée.

Les images de DP se caractérisent par :

- La présence d'agglutinats sur fond d'hématies libres dans les méthodes en microplaque et en tube (Figures n°21a et n°21c)
- La coexistence d'hématies à la base et au sommet de la colonne dans les techniques de microfiltration (Figure n°21b) (90).



Figure 21 : Images de doubles populations dans la technique Qwalys® (a), dans la technique Biorad® (b) et dans la technique manuelle en tube (c).

Les DP peuvent être observées dans différentes situations (Figure n°22) :

- Phénotypage érythrocytaire réalisé en post-transfusionnel (cause la plus fréquente). Les DP peuvent être observées dans les quatre mois suivant une transfusion et nécessitent de connaître les antécédents transfusionnels du patient. En effet, si le patient est RH : 1 et a été transfusé avec des CGR de phénotype RH : -1, une DP sera observée au niveau de l'antigène RH1.

- Lors d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), si le patient présente un phénotype érythrocytaire différent du donneur, une DP transitoire sera observée. Celle-ci va progressivement disparaître parallèlement à la prise de la greffe.
- Chez un patient présentant une hémopathie maligne, il est possible d'observer une DP qui évoluera avec la pathologie et sera le reflet du clone malin : en effet, la DP disparaîtra en cas de rémission et réapparaîtra en cas de récurrence (1,59).
- La présence d'un affaiblissement antigénique
- En cas de gémellité dizygote
- En cas de prélèvement de sang de cordon (par mélange entre le sang maternel et celui du nouveau-né) (90).

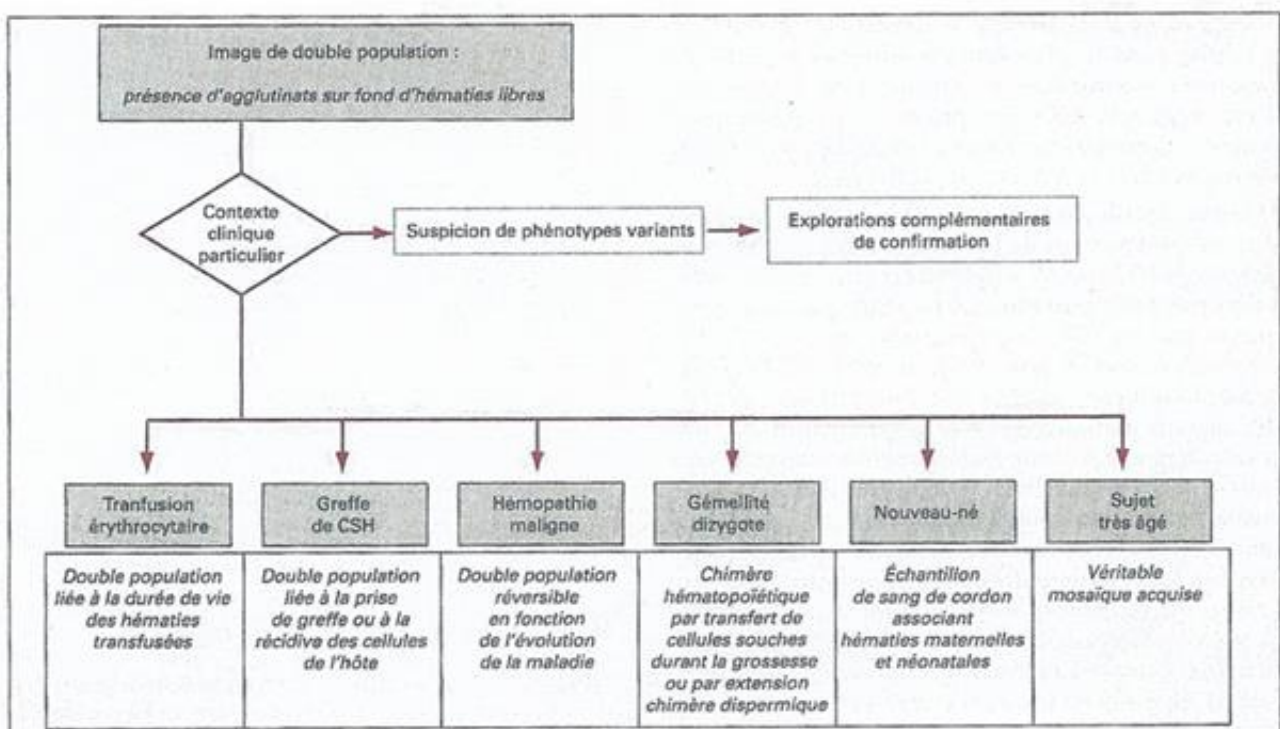


Figure 22 : Les causes de double population du phénotype RH (90)

B. ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Séquençage ciblé de l'ADN et analyse du nombre de copies par NGS

a. Technologie NovaSeq600 d'Illumina®

Un séquençage de l'ADN génomique par technique NGS, basé sur la capture, a été réalisé chez les patients présentant des images de DP ou une perte d'expression des antigènes RH dans les techniques immuno-hématologiques.

Tout d'abord, afin de préparer les banques d'ADN, l'ADN est extrait et fragmenté. Selon la solution d'enrichissement de Twist BioScience®, des adaptateurs sont ajoutés aux fragments d'ADN afin que les fragments soient capturés. La capture de ces fragments permet la reconnaissance des séquences d'intérêt.

Par la suite, les fragments d'ADN sont amplifiés par PCR et permettent l'obtention de la librairie d'ADN.

La préparation de la librairie est primordiale car elle permet de sélectionner les gènes d'intérêt. Dans notre cas, un panel de 154 gènes a été utilisé.

Le séquençage des librairies a été réalisé grâce au séquenceur haut débit NovaSeq600 d'Illumina®.

Il repose sur le principe de séquençage par synthèse (SBS) ; lors de l'incorporation d'une base nucléique sur le brin en cours de synthèse, une fluorescence unique est émise permettant l'identification de celle-ci. Les fluorochromes sont réversibles ; ils sont clivés après l'incorporation de la base permettant l'ajout d'une autre base.

La synthèse nucléique se réalise dans les deux sens (synthèse sens et synthèse anti-sens) afin de vérifier l'absence d'erreur de la Taq polymérase. En effet, la mutation doit être présente sur les deux brins d'ADN pour être prise en compte.

De plus, dans notre cas, la profondeur médiane est à 3600X ce qui signifie que chaque zone est lue 3600 fois. En cancérologie, il est nécessaire que la profondeur soit importante car les mutations sont acquises et plusieurs clones coexistent (91).

Il est possible de mesurer la VAF, correspondant à la fréquence d'un allèle mutant spécifique dans l'échantillon. En pratique, la VAF est calculée en faisant le rapport

entre le nombre de lectures présentant la mutation et le nombre total de lectures. La VAF dépend du nombre de cellules. Ainsi, une VAF > 50% est due : soit, à la présence d'une mutation sur les deux chromosomes (paternel et maternel) ; soit, à la duplication d'un des deux chromosomes (92). Une VAF de 50% peut, quant à elle, être trouvée si l'ensemble des cellules est muté de façon hétérozygote ou si certaines cellules sont mutées de façon homozygote mais que des cellules saines (non mutées) sont présentes dans l'échantillon.

Les données brutes issues du NGS sont analysées à l'aide des logiciels MuTect2 (93) et VarDict (94) et l'appel des variants permet d'identifier les mutations, pathologiques ou non, et les SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Les SNP sont des variations génétiques courantes, basés sur la modification d'un seul nucléotide dans la séquence d'ADN pouvant être présents dans n'importe quelle région du génome.

Grâce à la base de données pour le génome sur le logiciel gnomAD, il est possible d'obtenir les variants pathologiques en excluant les artefacts et les variants non pathologiques.

Il est aussi possible d'analyser le nombre de copies des gènes et ainsi, d'identifier les variations du nombre de copies (CNV).

Pour cela, l'amplification des gènes issus du prélèvement du patient est comparée à celle obtenue pour les autres patients. L'amplification pour un gène donné est aussi comparée avec les amplifications des autres gènes de ce même patient.

L'amplification augmente donc lorsque le prélèvement du patient présente un gain du nombre de copies des gènes et diminue lorsqu'il y a une perte du nombre de copies.

Le logiciel USCS permet de représenter, sur les différents chromosomes, certains gènes à des positions connues. Ainsi, si deux gènes ne sont plus reconnus, il est possible de dire que l'ADN entre ces deux gènes est perdu.

b. Avantages et inconvénients de la technologie Illumina®

Le séquençage NGS est une technique robuste, sensible et ciblée puisqu'il est possible d'amplifier certains gènes ou régions d'intérêt.

La technologie Illumina® permet d'obtenir plus de données précises puisque ce séquençage repose sur le principe du « séquençage par synthèse ».

Enfin, cette technique permet de calculer la VAF d'une mutation et d'identifier les variations du nombre de copies.

Cependant, le séquençage NGS ne permet pas la mise en évidence des pertes d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copie (CN-LOH).

2. Détection des CN-LOH par SNP-Array

a. Les LOH et les CN-LOH

Dans les tumeurs, les LOH acquises sont principalement causées par une perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copie (CN-LOH) ou par une délétion d'une région chromosomique (Figure n°23) (59,95,96).

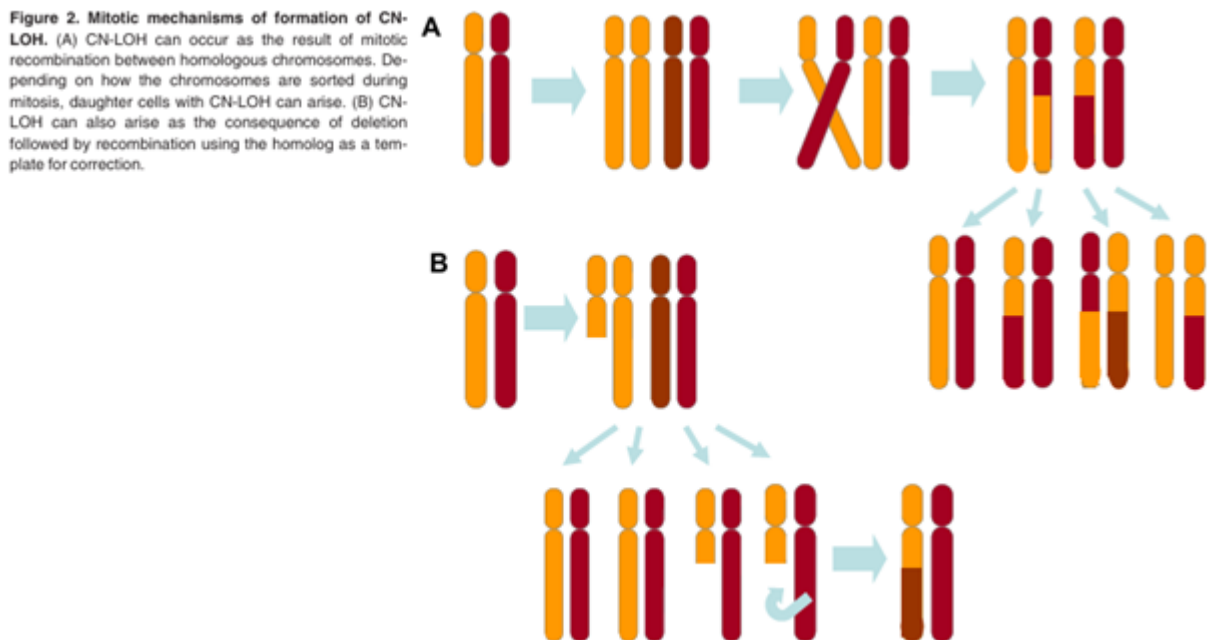


Figure 23 : Les mécanismes mitotiques à l'origine des CN-LOH (92)

Il existe deux types de CN-LOH : les CN-LOH acquises (ou somatiques) et les CN-LOH constitutionnelles (ou germinales) (Figure n°24) (92).

Pour qualifier une CN-LOH, il faut analyser la localisation et la taille de cette anomalie :

- Toutes les CN-LOH télomériques, peu importe leur taille, sont de nature somatique (74,92,95,97).
- Si les CN-LOH sont interstitielles, il faut que celles-ci aient une taille importante pour être qualifiées d'acquises (92,95,98).

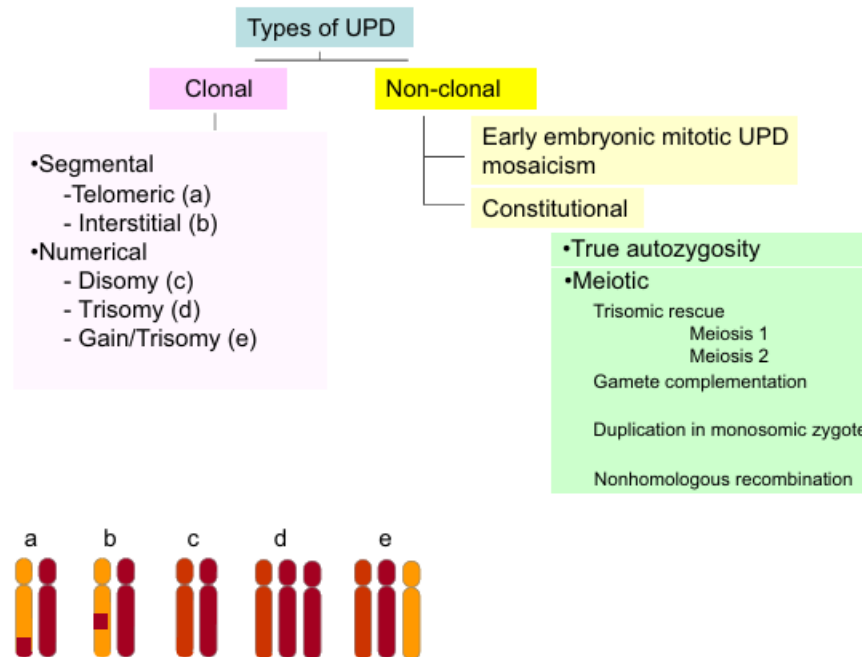


Figure 24 : La classification des CN-LOH (92)

La CN-LOH peut se réaliser de manière aléatoire ; à la suite d'une recombinaison mitotique pour tenter de corriger une perte de matériel chromosomique (95,99) ; ou, pour initier la tumorigenèse (96) ou participer au processus pathologique (100). Ainsi, la CN-LOH, entraînant l'homozygotie de la mutation, pourrait conférer un avantage sélectif en permettant une augmentation de la croissance des cellules présentant le clone tumoral (95,97,101).

L'identification de loci fréquemment touchés par une CN-LOH a facilité la découverte de gènes présentant un risque élevé de mutation biallélique (comme les gènes *FLT3* et *RUNX1*) (101) et de gènes suppresseurs de tumeurs (comme le gène *c-CBL*) (92). Les CN-LOH des chromosomes 9p et 1p ont conduit, respectivement, à la mutation biallélique des gènes *JAK2* (101,102) et *MPL* (103).

Ainsi, les CN-LOH sont des défauts chromosomiques très fréquemment retrouvés dans les hémopathies myéloïdes, tels que les SMP, les SMD, les LAM et les SMP/SMD (comme la LMMC) (95,99,104).

b. Technologie Cytoscan HD de Thermofisher®

Afin d'identifier les CN-LOH, des analyses de SNP-array peuvent être réalisées chez les patients.

Le SNP-array est une technique de cytogénétique moléculaire.

L'ADN génomique est extrait grâce au kit QIAamp Tissue Kit (Qiagen®) (105) puis digéré enzymatiquement.

Après ligation des amorces, les brins sens et anti-sens de l'ADN génomique sont amplifiés par PCR sans sélection préalable des gènes d'intérêt. Les produits de PCR sont fragmentés puis marqués par un fluorochrome (100).

Par la suite, les échantillons sont hybridés, sans compétition, à une sonde complémentaire sur une puce Cytoscan HD (Thermofisher®) (105).

Ces sondes sont informatives car elles sont complémentaires de chaque SNP possible. En effet, les amorces sont conçues pour contenir la base polymorphe en position centrale afin de permettre la détermination de chaque SNP (97).

Physiologiquement, chaque échantillon contient 50% de matériel génétique d'origine maternelle et 50% d'origine paternelle. L'analyse de SNP-array permet la visualisation d'une possible hybridation et d'un possible déséquilibre entre le matériel génétique paternel et maternel.

Après l'hybridation, le signal, représentant le nombre de copies et dépendant du ratio entre le matériel maternel et paternel, est mesuré.

Les données issues de l'hybridation sont analysées grâce au logiciel ChAS (Chromosome Analysis Suite) (Thermofisher®) (105). L'observation du signal de plusieurs sondes évoluant dans le même sens permet de déterminer s'il y a une perte (diminution du signal) ou un gain (augmentation du signal) de matériel chromosomique (99).

Il doit y avoir deux copies : une d'origine paternelle et une d'origine maternelle. La CN-LOH, se définit par la perte de loci hétérozygotes et par l'absence de délétion ou de gain de matériel chromosomique (95). Ainsi, l'examen du signal permet d'identifier la cause de la LOH (97).

Afin de calculer le signal de fond, certaines sondes contiennent des oligonucléotides mal appariés.

c. Avantages et inconvénients de la technologie SNP-array

La technique de SNP-array présente de nombreux avantages :

- Tout d'abord, il s'agit d'une technique robuste, précise, ne dépendant pas de culture cellulaire et permettant l'étude de l'ensemble du génome en une seule technique (99).
- Le SNP-array permet la détection des LOH, des CN-LOH et des anomalies du nombre de copies (92,97,99,101).
- Des CN-LOH sont mises en évidence dans des hémopathies malignes alors que le caryotype est normal et qu'aucun marqueur clonal n'est identifié. Ainsi, le SNP-array permet la détection des lésions qui étaient cryptiques et donc non détectées par caryotype. Le SNP-array est donc une technique plus sensible que le caryotype (92,98,101,106).
- L'utilisation d'algorithmes bio analytiques, associée au SNP-array, a permis un diagnostic plus précis des LOH (92).
- Grâce à sa haute résolution, qui est supérieure à celle du caryotype, le SNP-array permet la détection fiable d'une anomalie acquise de l'ordre de l'exon même si le pourcentage de cellules clonales ne représente que 25 à 50% du nombre total des cellules (92,99).
- Enfin, au vu du nombre très élevé de sondes utilisées, il est possible de détecter des polymorphismes (par utilisation de marqueurs de SNP polymorphes) et de procéder au génotypage de l'échantillon du patient (92).

Cependant, le SNP-array présente aussi quelques inconvénients :

- Tout d'abord, il s'agit d'une technique longue et dont la sensibilité dépend du nombre de cellules clonales présentes dans l'échantillon. En effet, quand le contenu tumoral diminue, le taux de détection des LOH diminue (104).
- Le SNP-array ne permet pas la détection des lésions chromosomiques équilibrées et des mutations (98).
- Enfin, le SNP-array ne fournit pas d'information sur le mécanisme moléculaire à l'origine de la LOH (98).

V. RESULTATS

Dans cette partie, nous allons présenter trois patients (Monsieur R, Madame C et Madame V) qui ont présenté des changements d'expression d'antigènes du système RH en lien avec l'évolution de leur hémopathie myéloïde.

Ces trois cas permettent d'illustrer deux mécanismes moléculaires à l'origine de la perte d'expression d'antigènes du système RH associée aux hémopathies : la CN-LOH, associée à la duplication d'une mutation oncogène (telle que *MPL* ou *CSF3R*) avec la perte de l'allèle normal, et la délétion du chromosome 1p.

A. CN-LOH associée à la duplication d'une mutation oncogène

1. CN-LOH associée à la duplication d'une mutation *MPL*

Monsieur R, patient de 72 ans, diagnostiqué huit années plus tôt, avec une LMMC à caryotype normal et mutation du gène *TET2*, et connu comme étant de phénotype RH : 1,2,-3,4,5, se présente aux urgences pour une hyperleucocytose majeure et une blastose sanguine inférieure à 10%. Lors de son hospitalisation dans le service des Maladies du Sang, les explorations hématologiques ne mettent pas en évidence d'acutisation mais une simple prolifération. Le bilan immuno-hématologique montre, quant à lui, une perte d'expression des antigènes RH1 et RH2.

Sur le plan moléculaire, une analyse par NGS, retrouve deux mutations du gène *TET2* avec des VAF respectives de 46% et 45% : exon3 c.2843delA : p.K948SfsX5 et exon4 c.3415delA : p.I1139LfsX13, ainsi, qu'une mutation du gène *MPL* avec une VAF de 96% : exon10 c.1544G>T.pW515L ; l'analyse du nombre de copies, par SNP-array, montre une CN-LOH acquise de la région 1p36.33-p31.3 de 60,9Mb, ainsi qu'une délétion de la région 13q12.3-q14.3 ; un caryotype, sur prélèvement médullaire, retrouve un clone anormal à 46 chromosomes avec une délétion interstitielle des bras longs des chromosomes 13 en q13q21 dans 20 métaphases analysées : 46,XY,del(13)(q13q21)[20].

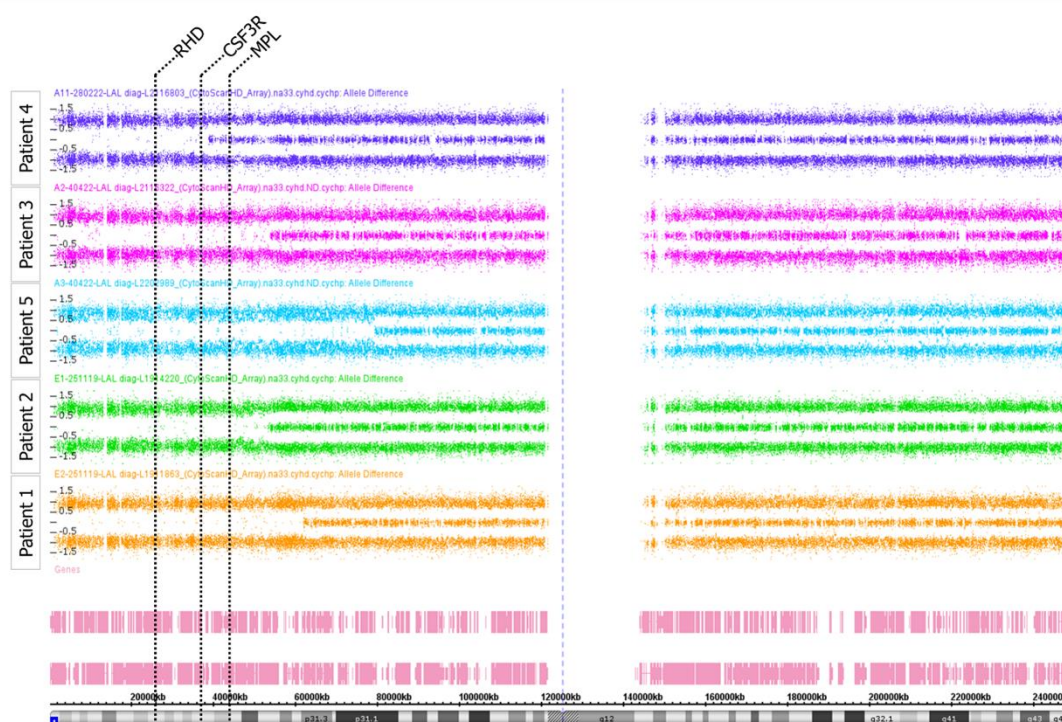


Figure 25 : Etude des polymorphismes du chromosome 1 par SNP-array (Affymetrix® Chromosome Analysis Suite). La perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copies est identifiée lorsque des déséquilibres sont présents (disparition du signal central) avec un nombre normal de copies du chromosome.

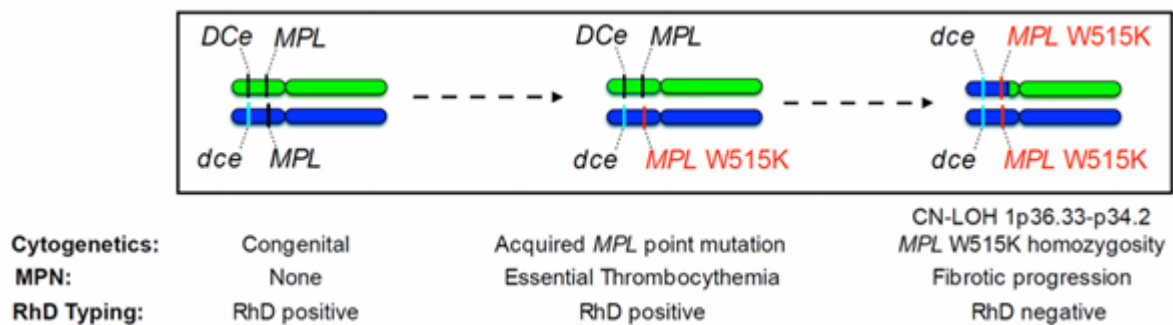
Suite à la perte d'expression des antigènes RH1 et RH2, une analyse des gènes *RHD* et *RHCE* en biologie moléculaire est réalisée. Les résultats sont compatibles avec la prédominance d'un clone leucocytaire circulant exprimant uniquement un haplotype dce chez un individu initialement DCE/dce.

Ce patient, présente donc une perte de l'haplotype DCE, en lien avec la CN-LOH de la région 1p36.33-p31.3 et à l'origine de la perte d'expression des antigènes RH1 et RH2 nouvellement observée par les tests sérologiques de routine (Figure n°25).

La CN-LOH acquise du chromosome 1p permet la duplication d'une région de ce chromosome, concomitamment à la perte de l'allèle normal (92,100). Ici, l'anomalie acquise du chromosome 1p permet la duplication du gène *MPL*.

Le mécanisme moléculaire à l'origine de la perte de l'haplotype RH peut être illustré par la figure n°26. Dans l'exemple ci-dessous, le patient possède les haplotypes RH DCE/dce, le phénotype RH : 1,2,-3,4,5 et deux allèles *MPL* non mutés. Dans le cadre de son SMP, le patient acquiert une mutation du gène *MPL* conduisant à la protéine

MPL W515K. Au fur et à mesure de l'évolution de son hémopathie, une CN-LOH du chromosome 1p a entraîné la duplication de la mutation oncogène MPL W515K et la perte de la région chromosomique contenant l'allèle *MPL* normal et l'haplotype DCe. Ainsi, le patient va présenter une homozygotie pour l'allèle *MPL*, codant pour la protéine MPL W515K, et pour l'haplotype dce. Ce patient présentera donc le phénotype RH : -1,-2,-3,4,5 (si la perte de l'haplotype est totale) ou le phénotype RH : DP1,DP2,-3,4,5 (si la perte de l'haplotype est partielle) (92,107). Cette figure permet de montrer le lien de causalité entre la perte de l'haplotype DCe et l'acquisition de l'homozygotie de la mutation *MPL* observé chez Monsieur R.



*Figure 26 : Les étapes d'une CN-LOH conduisant à l'apparition d'un clone homozygote pour la mutation *MPL* (107)*

Le patient a reçu 17 CGR et 19 MCPS depuis la mise en évidence de la perte d'expression des antigènes RH1 et RH2. Tous les CGR transfusés respectaient le phénotype érythrocytaire acquis de Monsieur R (à savoir RH : -1,-2,-3,4,5). Parmi les 19 MCPS transfusés, 7 étaient phénotypés RH : 1. Dans la pratique transfusionnelle, les MCPS sont poolés à partir de huit couches leucoplaquettaires issus de dons de sang. Les MCPS sont phénotypés pour l'antigène RH1 mais pas pour les autres antigènes du système RH ; une allo-immunisation vis-à-vis d'antigènes du système RH peut donc avoir lieu lors de la transfusion de MCPS mais il s'agit d'un événement rare (108).

Le suivi de la RAI (Recherche d'agglutinines irrégulières) n'a été possible que pendant 51 jours après la première transfusion de MCPS sans mettre en évidence d'allo-immunisation anti-érythrocytaire.

2. CN-LOH associée à la duplication d'une mutation *CSF3R*

Madame C, patiente de 79 ans, est suivie depuis 2015 pour un SMD avec une discrète dysérythropoïèse. Au moment du diagnostic, le caryotype était normal et la patiente était connue avec un phénotype RH : 1,-2,3,4,-5.

Lors d'une hospitalisation en juillet 2021, une DP sur l'antigène RH1 est détectée sans notion de transfusion récente.

Six mois plus tard, lors de sa consultation dans le service des Maladies du Sang, il est remarqué une perte totale de l'antigène RH1 dans les techniques usuelles du laboratoire. Le phénotype acquis RH : -1,-2,3,4,-5 est rare car seul 0,01% de la population caucasienne possède ce phénotype (109) (Annexe n°1) entraînant une absence de CGR compatibles disponibles. Ce changement de phénotype s'accompagne de l'apparition d'une dépendance transfusionnelle.

Sur le plan moléculaire, une analyse par NGS, retrouve une mutation du gène *ASXL1* avec une VAF à 35% : exon12 c.1934dup : p.G646WfsX12, une mutation du gène *CSF3R* avec une VAF à 78% : exon 17 c.2326C>T : p.Q776X, ainsi, qu'une mutation du gène *RUNX1* avec une VAF à 42%: exon 5 c.362T>C : p.L121P ; l'analyse du nombre de copies, par SNP-array, montre une CN-LOH acquise de la région 1p36.33-p34.3 de 37,74Mb ; un caryotype, sur prélèvement médullaire, retrouve une monosomie 7.

Devant l'absence de détection de l'antigène RH1 par les techniques sérologiques de routine, une technique de sensibilisation, basée sur le principe de fixation-élution, a permis de montrer une très faible persistance résiduelle de l'antigène RH1. Cette technique se déroule en deux étapes : la première étape consiste en la « fixation » qui permet la mise en contact des hématies du patient avec un réactif polyclonal anti-RH1 ; la seconde étape consiste en l'élution et l'identification des éventuels anticorps fixé. Cette technique permet de conclure à la présence, ou non, de l'antigène RH1, même en très faible quantité, à la surface des hématies (32).

Une analyse du gène *RHD* a été réalisée au CNRGS (Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins) et retrouvait la présence de l'allèle *RHD*01* devant coder un antigène RH1 commun, concluant à la perte partielle de l'hétérozygotie de l'haplotype DcE.

Cette patiente, très probablement initialement d'haplotypes DcE/dcE, présente donc une perte totale de l'haplotype DcE, en lien avec la CN-LOH de la région 1p36.33-p34.3 et à l'origine de la perte d'expression de l'antigène RH1 nouvellement observée (Figure n°25).

La patiente possède une CN-LOH du chromosome 1p et une mutation du gène *CSF3R* avec une VAF à 78%. Le mécanisme moléculaire à l'origine de la duplication de la mutation oncogène *CSF3R* n'a jamais été décrit mais, étant donné que ce gène est situé sur le chromosome 1p, il est possible de supposer, en se référant à la figure n°26, que la CN-LOH acquise du chromosome 1p, entraînant l'homozygotie de la mutation du gène *CSF3R*, a conduit à la perte de l'haplotype DcE et au phénotype RH acquis.

La patiente a reçu 60 CGR et 23 MCPS depuis la mise en évidence de la perte d'expression de l'antigène RH1. Au vu du phénotype érythrocytaire acquis extrêmement rare dans la population caucasienne, 58 CGR RH : 1 et 22 MCPS RH : 1 ont été transfusés à Madame C. Le suivi de la RAI a été réalisé pendant 625 jours à compter de la première transfusion de MCPS RH : 1 incompatibles sans mettre en évidence d'allo-immunisation anti-érythrocytaire.

B. Délétion du chromosome 1p

Madame V, patiente de 70 ans, diagnostiquée une année plus tôt avec un SMD multiligné à haut risque devant une dysmégacaryopoïèse et une dysérythropoïèse, et connue antérieurement comme étant de phénotype RH : 1,2,-3,4,5, présente le jour de sa consultation dans le service des Maladies du Sang, une DP vis-à-vis des antigènes RH1 et RH2, non constatée auparavant et non expliquée par des transfusions récentes.

Sur le plan moléculaire, une analyse par NGS, retrouve une mutation du gène *PPM1D* avec une VAF à 5% : exon 6 c.1349del : pL450X ; l'analyse du nombre de copies, par SNP-array, montre une délétion du chromosome 1p (emportant les gènes *ARID1A* et *ID3*, et donc les gènes *RHD* et *RHCE*), ainsi qu'une délétion du chromosome 5q ; un caryotype, sur prélèvement sanguin, retrouve un clone anormal avec la délétion des bras longs du chromosome 5 associée à la délétion terminale des bras courts des chromosomes 1 dans 10 métaphases analysées, ainsi que l'évolution d'un sous-clone

ayant acquis une trisomie 8 dans 4 métaphases : 46,XX,del(1)(p34),del(5)(q15q33)[10] / 47,sl,+8[4].

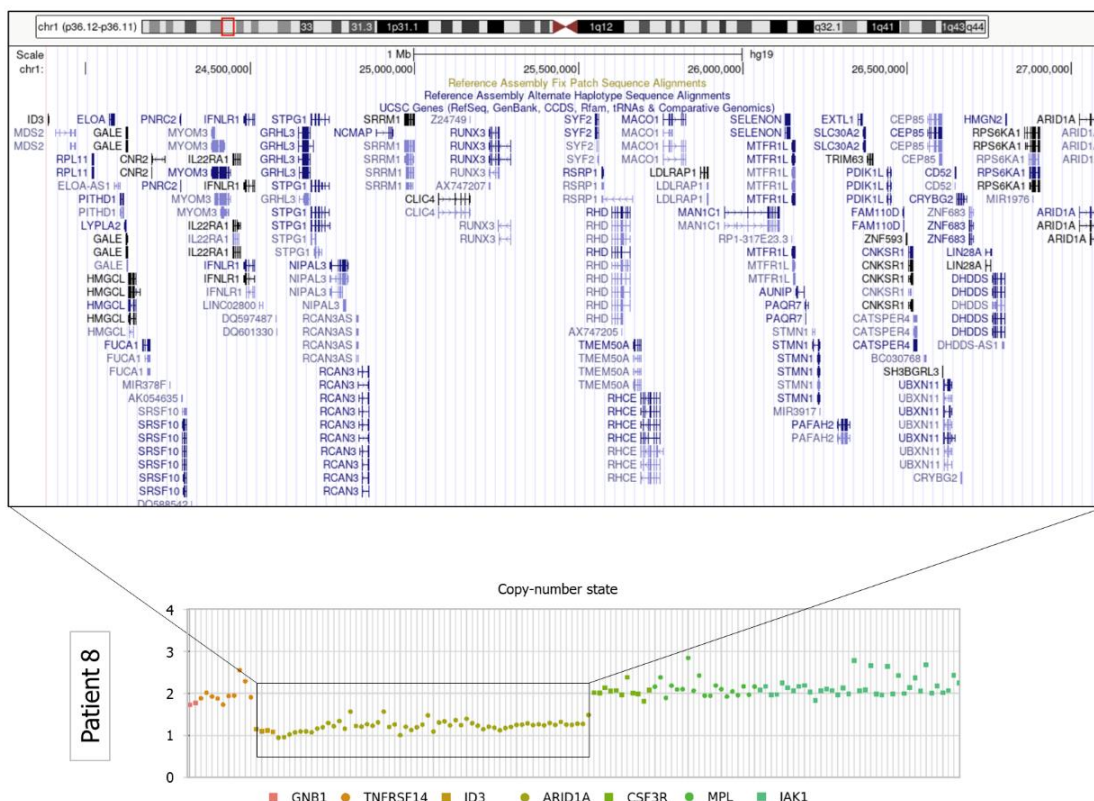


Figure 27 : Analyse ciblée du nombre de copies des gènes grâce au logiciel USCS. La délétion du bras court du chromosome 1 incluait la perte d'une région s'étendant au minimum des gènes ID3 à ARID1A, encadrant les gènes RHD et RHCE

Cette patiente, très probablement d'haplotypes DCE/dce, présente donc une perte partielle de l'haplotype DCE, en lien avec la délétion du chromosome 1p (Figure n°27) et à l'origine de l'apparition des DP nouvellement observées.

En raison d'un score M-IPSS de 6 (risque élevé de transformation en LAM), associé à un bon état physique de la patiente, une allogreffe de CSH avec donneur non apparenté, a été réalisée chez cette patiente. Les analyses réalisées en post-greffe ne détectent pas de mutation significative, résultat cohérent avec la prise de greffe et l'observation du phénotype RH-KEL du donneur, sans DP, près de 11 mois après la greffe.

Avant l'allogreffe de CSH, Madame V présentait des images de DP au niveau des antigènes RH1 et RH2 et a reçu 11 CGR RH : 1,2. Le suivi de la RAI, réalisé pendant 715 jours, à compter de la première transfusion de CGR RH : 1,2 jusqu'à son décès, n'a pas montré d'allo-immunisation anti-érythrocytaire.

C. Récapitulatif des résultats

	Monsieur R	Madame C	Madame V
Pathologie	LMMC	SMD	SMD
Phénotypage érythrocytaire initial	RH : 1,2,-3,4,5	RH : 1,-2,3,4,-5	RH : 1,2,-3,4,5
Haplotypes probables	DCE/dce	DcE/dcE	DCE/dce
Phénotypage érythrocytaire acquis	RH : -1,-2,-3,4,5	RH : -1,-2,3,4,-5	RH : DP1,DP2,-3,4,5
Mutation (VAF en %)	<i>MPL</i> (VAF 96%) <i>TET2</i> (VAF 46% et 45%)	<i>ASXL1</i> (VAF 35%) <i>CSF3R</i> (VAF 78%) <i>RUNX1</i> (VAF 42%)	<i>PPM1D</i> (VAF 5%)
Anomalies en SNP-array	CN-LOH de la région 1p36.33-p31.3 Délétion de la région 13q12.3-q14.3	CN-LOH de la région 1p36.33-p34.3	Délétion du chromosome 1p Délétion du chromosome 5q
Caryotype	46,XY,del(13)(q13q21) [20]	45,XX,-7	46,XX,del(1)(p34),del(5)(q15q33) [10] / 47,sl,+8 [4]
Transfusion CGR / MCPS incompatibles	0 CGR 7 MCPS	58 CGR 22 MCPS	11 CGR 0 MCPS
Allo-immunisation (durée de suivi)	Non (51 jours)	Non (625 jours)	Non (715 jours)
Mécanisme à l'origine de la modification du phénotype RH	CN-LOH du bras court du chromosome 1	CN-LOH du bras court du chromosome 1	Délétion du bras court du chromosome 1

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des phénotypes érythrocytaires, les haplotypes, les mutations détectées par NGS, les anomalies caryotypiques et détectées par SNP-array de Monsieur R, Madame C et Madame V permettant la mise en évidence des CN-LOH et de la délétion du bras court du chromosome 1

VI. DISCUSSION

Nous avons étudié trois patients présentant des images de DP ou de perte d'expression d'un ou de plusieurs antigènes du système RH.

Les principales causes de DP ont été éliminées : les patients n'ont pas reçu de transfusion avant la réalisation des phénotypages érythrocytaires ; la DP n'était pas présente sur les précédentes analyses immuno-hématologiques, éliminant la présence d'un variant ; et, seule Madame V a bénéficié d'une greffe de CSH mais les DP étaient observables avant celle-ci.

Devant ces profils non expliqués, nous avons souhaité en explorer la cause. Ces trois patients étaient atteints d'hémopathies myéloïdes : Monsieur R avait une LMMC, Madame C et Madame V avaient un SMD.

Les examens moléculaires réalisés dans le cadre de ces hémopathies myéloïdes ont permis de mettre en évidence différentes anomalies dont trois directement liées à nos anomalies de phénotypage RH : la mutation des gènes *MPL* et *CSF3R* et la délétion du chromosome 1p.

A partir de ces trois anomalies, nous avons identifié deux mécanismes moléculaires : la CN-LOH (pour Monsieur R et Madame C) et la délétion du chromosome 1p (pour Madame V).

La CN-LOH est un mécanisme bien connu dans les pathologies myéloïdes. Celle-ci, déjà décrite comme étant associée à des mutations du gène *JAK2* (101,102) chez des patients atteints de PV, de TE ou de MFP, est également connue pour être associée à des mutations du gène *MPL* (103).

L'association entre les modifications de phénotype RH et certaines pathologies myéloïdes était déjà décrite (59). La description du mécanisme de la CN-LOH liée à la mutation du gène *MPL* dans les modifications du phénotype RH est plus récente (107) et est liée à la mise au point de techniques de biologie moléculaire comme la SNP-array.

Dans ce travail, nous avons également pu mettre en évidence pour Madame C, l'association entre la mutation du gène *CSF3R* et des anomalies acquises du phénotype RH (perte de l'expression de l'antigène RH1) par le mécanisme de la CN-LOH. A notre connaissance, cette association n'a jamais été décrite dans la littérature. Cela peut s'expliquer par le fait que les mutations du gène *CSF3R* sont moins

fréquentes que celles du gène *MPL*. De plus, les hémopathies associées à la mutation du gène *CSF3R* sont beaucoup plus rares que les hémopathies associées à la mutation du gène *MPL*.

Le second mécanisme identifié correspond à la délétion du bras court du chromosome 1. Ce mécanisme moléculaire n'a, à notre connaissance, jamais été décrit comme pouvant entraîner une modification de l'expression du phénotype RH. En effet, dans la littérature, les LOH acquises du chromosome 1p ont déjà été décrites. Mais le plus souvent chez ces patients, les analyses de cytogénétique retrouvent un caryotype normal ; une délétion du chromosome 1p ne semble donc pas être la cause de la LOH acquise (110,111).

Monsieur R a acquis une mutation du gène *MPL* au cours du développement de sa LMMC. Il s'agit d'une mutation rarement retrouvée dans cette pathologie.

En effet, le premier cas rapporté date de 2019 (112). Dans celui-ci, la VAF était proche de 50% et concomitante à l'observation d'une accélération de la pathologie (majoration de la leucocytose et de la monocytose) ; suggérant une mutation biallélique du gène *MPL* par CN-LOH (112).

La mutation du gène *MPL* est déjà connue pour être associée à un mauvais pronostic dans les SMD et les LAM (113).

Lors de la découverte de la perte d'expression des antigènes RH1 et RH2, Monsieur R présentait une mutation du gène *MPL* avec une VAF de 96% et une accélération de sa pathologie. L'association entre une VAF > 50% pour le gène *MPL* muté, suite à une CN-LOH du chromosome 1p, et l'accélération de l'hémopathie est montrée par de nombreuses équipes (75,103,107,114–117).

Monsieur R présentait, dès son diagnostic, une mutation du gène *TET2*. Ce gène est muté dans 50 à 60% des LMMC (89,118) et fréquemment touché par des CN-LOH (89). Cette mutation, en l'absence d'un gène *ASXL1* muté associé, présente un impact favorable sur la survie globale des patients (118).

Monsieur R présentait également une délétion du bras long du chromosome 13. Il s'agit d'une anomalie cytogénétique n'ayant pas d'impact pronostique identifié dans cette pathologie (118). De même, cette anomalie est rarement retrouvée dans les SMD (fréquence inférieure à 2%) (119).

Madame C a acquis la mutation du gène *CSF3R* au cours de l'évolution de son SMD. Cette mutation n'est pas limitée aux LCN et aux LMC atypiques (120) car elle est retrouvée chez 3% des patients présentant un SMD (121). D'ailleurs, un patient, qui présentait un SMD hypoplasique, a développé une LNC et la mutation du gène *CSF3R* a contribué à la transformation de sa pathologie, à partir du clone fondateur de son SMD (122).

Les neutropénies congénitales sévères (NCS) sont caractérisées par des altérations de la maturation des granulocytes neutrophiles. L'acquisition de mutations, telles que les mutations du gène *CSF3R*, entraîne une progression maligne de la NCS vers le SMD ou la LAM (123,124).

Madame C présentait une mutation du gène *CSF3R* avec une VAF de 78% ; cette mutation était donc présente à l'état homozygote. Cependant, la CN-LOH du chromosome 1p conduisant à la mutation biallélique de *CSF3R* et à une modification du phénotype RH n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Les patients avec un SMD ou une LMMC et présentant une mutation du gène *CSF3R* sont caractérisés par un âge avancé, des taux de mutations somatiques élevés et un pronostic défavorable (125).

Madame C présentait aussi un âge avancé (79 ans au moment de la découverte de la mutation du gène *CSF3R* avec une VAF de 78%), des taux de mutations somatiques élevés (elle présentait des mutations des gènes *ASXL1* et *RUNX1* avec des VAF respectives, de 35 et 42%) et une anomalie cytogénétique (Madame C présentait une monosomie 7). La découverte de la perte de l'antigène RH1 chez Madame C coïncide avec l'aggravation de sa pathologie.

Les mutations *ASXL1* et *RUNX1* sont fréquemment rencontrées dans les SMD, avec des fréquences respectives de 11 et 20% (81). Elles ont des impacts défavorables sur la survie sans progression, sur le pronostic et sur le risque de transformation en LAM (81,84).

La monosomie 7 est une anomalie cytogénétique fréquente dans les SMD (fréquence de 15%) et est associée à un risque plus élevé de progression vers une LAM et à une survie plus courte (119).

Madame V présentait une délétion du chromosome 1p. Cette anomalie cytogénétique, visualisable au caryotype, est peu rapportée dans les SMD et son impact pronostique n'est pas connu (119). Le plus souvent, les LOH acquises du chromosome 1p ne sont

pas dues à une délétion car le caryotype ne rapporte pas d'anomalie de ce chromosome (110,111).

Elle présentait aussi une mutation du gène *PPM1D*. Ce gène est plus fréquemment muté dans les SMD post-traitement (50%) que dans les SMD primaires (10%) (84).

Parallèlement, la patiente présentait une délétion du bras long du chromosome 5 et une trisomie 8. Ces anomalies sont fréquemment rencontrées dans les SMD ; en effet, la délétion du chromosome 5q et la trisomie 8 sont respectivement retrouvées dans 27% et 19% des cas de SMD (119). Cependant, la présence d'un caryotype complexe (présence d'au moins trois anomalies cytogénétiques) est associée à une maladie plus agressive, à un risque plus important de transformation en LAM, à un pronostic plus grave et à une survie plus courte (81,119). Ces différents arguments biologiques et le bon état général de la patiente ont conduit à l'allogreffe de CSH.

La détection des anomalies du phénotype RH chez nos trois patients s'est accompagnée à chaque fois d'une évolution de leur hémopathie : dépendance transfusionnelle pour Monsieur R et Madame C et nécessité d'une allogreffe de CSH pour Madame V. Comme précédemment décrit, l'altération du phénotype RH peut interférer avec les examens de phénotypage érythrocytaire et indiquer une maladie hématologique ou une évolution de celle-ci (59). Les anomalies acquises du chromosome 1p, impliquant le locus *RH*, peuvent conduire à un mosaïcisme RhD acquis (107).

En effet, l'acquisition de nouvelles mutations ou d'anomalies cytogénétiques et l'augmentation de la VAF des mutations oncogènes sont des éléments indiquant une évolution de l'hémopathie et sont associées à un pronostic défavorable (65,73,92,103). Monsieur R et Madame C présentent une CN-LOH du chromosome 1p. Or, cette anomalie est associée à de mauvais résultats cliniques et à un pronostic péjoratif (111) et est fréquemment rencontrée (30%) dans les LAM secondaires à un SMD (110).

Les CN-LOH touchant le chromosome 1p ne sont pas spécifiques des hémopathies ; en effet, ces anomalies acquises sont fréquemment rencontrées dans d'autres pathologies non hématologiques telles que les mélanomes (126), les adénomes parathyroïdiens (127), les cancers du sein (128), les cancers colorectaux (129), les neuroblastomes (130) et les phéochromocytomes (131). Cependant, contrairement aux hémopathies myéloïdes, ces différentes pathologies ne dérivent pas d'une CSH. Les antigènes du système RH n'étant exprimés que sur les hématies, les mutations

présentes dans des pathologies non myéloïdes n'auront pas d'influence sur le phénotype RH.

L'anomalie détectée par les techniques immuno-hématologiques va dépendre de l'expression homozygote ou hétérozygote des haplotypes RH chez le patient.

En effet, si le patient exprime deux haplotypes de façon hétérozygote (par exemple, DCE/DCE), son phénotype sera RH : 1,2,3,4,5. S'il présente une perte partielle de l'haplotype DCE, il présentera le phénotype RH : 1,DP2,3,4,DP5 ; alors que s'il présente une perte totale de cet haplotype, le phénotype deviendra RH : 1,-2,3,4,-5.

Au contraire, si le patient exprime un haplotype de façon homozygote (par exemple, DCE/DCE et phénotype RH : 1,2,-3,-4,5), son phénotype RH restera identique en cas de perte partielle ou totale d'un des deux haplotypes.

Ainsi, en cas de LOH acquise, les anomalies immuno-hématologiques ne pourront être observables que si le patient est hétérozygote pour les haplotypes RH.

Dans la population caucasienne, environ 36% des personnes présentent des haplotypes homozygotes et 64% de la population exprime des haplotypes hétérozygotes (Annexe n°1). Ainsi, en cas d'anomalie acquise du chromosome 1p, au niveau de la région codant le locus *RH*, seule cette proportion de patients hétérozygotes présentera une modification de son phénotype RH.

Associées aux anomalies du phénotype RH, il a été décrit des anomalies des antigènes FY. En effet, le gène codant pour le système Duffy est également situé sur le chromosome 1 (59,132). L'analyse d'autres systèmes de groupes sanguins pourrait être une alternative pour les patients présentant des haplotypes homozygotes mais, en pratique, la sélection des patients à tester dans ces autres systèmes serait très difficile car soumise à des informations cliniques que nous n'avons que très rarement.

Le type d'anomalie du phénotype RH observé (DP ou perte d'expression antigénique) peut s'expliquer par la fréquence de la présence de l'anomalie acquise au sein des CSH clonales du patient (133).

En effet, si une majorité des CSH présente cette anomalie sur le chromosome 1p, les antigènes RH, codés par le locus *RH*, ne seront pas détectés par les techniques immuno-hématologiques de routine. Les antigènes RH, présents en très faible quantité, ne pourront être détectés que par des techniques plus sensibles, reposant sur le principe de la fixation-élution.

Cependant, si seule une proportion des CSH présente cette anomalie chromosomique en 1p, seule une partie des hématies ne présentera pas les antigènes RH codés par l'haplotype RH partiellement perdu, engendrant une image d'affaiblissement ou de DP dans les techniques immuno-hématologiques usuelles (1).

Cela est illustré par le cas de Madame C. Initialement, elle exprimait l'antigène RH1. Au fur et à mesure de l'évolution de sa pathologie, le phénotype érythrocytaire montrait une DP au niveau de l'antigène RH1 puis une perte totale de celui-ci. Les analyses moléculaires du gène *RHD*, quant à elles, ont pu montrer la présence d'un allèle *RHD*01* codant pour un antigène RH1 commun. Ainsi, au fur et à mesure de l'évolution péjorative de son SMD, l'expression de l'antigène RH1 a diminué jusqu'à ne plus être détecté par les techniques usuelles du laboratoire. L'antigène RH1 a pu être détecté par une technique sensibilisée, ce qui nous démontre que la totalité des cellules n'est pas touchée par la mutation.

Cette observation a un intérêt dans la conduite à tenir transfusionnelle et le choix des PSL pour ces patients.

En effet, nous avons pu observer que les trois patients de l'étude ont présenté une augmentation de leur besoin transfusionnel coïncidant avec l'apparition de la modification du phénotype RH.

Devant le peu de recul bibliographique sur une possible allo-immunisation dans ce type de cas, l'attitude transfusionnelle était de respecter le phénotype acquis des patients lors de transfusions de CGR (134,135).

Devant la rareté du phénotype RH acquis dans la population caucasienne (0,01%), aucun CGR compatible n'était disponible pour transfuser Madame C ; elle a donc reçu 58 CGR incompatibles. Madame V a reçu, elle aussi, 11 CGR incompatibles.

Malgré la très forte immunogénicité de l'antigène RH1 (85%) (136), aucune allo-immunisation des patients n'a pu être mise en évidence.

Madame V présentait des DP au niveau des antigènes RH1 et RH2 ; ainsi, une proportion de ses hématies exprimait ces antigènes, empêchant une possible allo-immunisation lors de la transfusion de CGR.

Pour Madame C, malgré l'absence de détection de l'antigène RH1 par les techniques sérologiques de routine, ce dernier a pu être mis en évidence par une technique plus sensible, basée sur la fixation-élution. De même, le gène *RHD* a pu être détecté par PCR. La persistance résiduelle d'une très faible quantité d'antigène RH1 pourrait expliquer l'absence d'allo-immunisation de la patiente malgré l'incompatibilité des

transfusions de CGR. Ce profil peut être rapproché de l'antigène RH1 faible de type Del. Le phénotype Del correspond à une présence très faible d'antigène RH1 à la surface des hématies (<200 antigènes / hématie), non détectée par les techniques usuelles, mais mise en évidence par technique de fixation-élution et par l'absence d'allo-immunisation en cas de transfusion de PSL RH : 1 (23,137–141).

De plus, Madame C a reçu 22 MCPS incompatibles ; ces transfusions peuvent immuniser le patient mais sont moins immunogènes que les CGR (108).

Dans ce travail de thèse, nous ne nous sommes intéressés qu'aux patients atteints d'hémopathies myéloïdes présentant des anomalies au niveau du phénotypage RH. Or, certaines anomalies peuvent être retrouvées chez des patients apparemment en bonne santé ou précédant une hémopathie (59). Il pourrait être intéressant de réaliser des analyses complémentaires chez des patients présentant des DP ou des pertes d'expression des antigènes RH et apparemment en bonne santé afin de détecter les prémices d'une hémopathie ayant acquis des anomalies sur le chromosome 1p.

Conclusion – Ouverture sur le mémoire de D.E.S

L'étude de l'association des mutations retrouvées dans le cadre d'hémopathies myéloïdes et des anomalies d'expression des antigènes RH de nos trois patients nous a permis de caractériser deux mécanismes. Le premier, la CN-LOH du chromosome 1p, retrouvée chez deux patients, est le résultat d'une recombinaison mitotique entre des chromosomes homologues et est associée, dans les hémopathies myéloïdes, à la duplication de mutations oncogènes (ici, mutation des gènes *MPL* et *CSF3R*) avec une perte concomitante de l'allèle normal. Ce mécanisme est associé à la progression de la pathologie et est surtout observé dans les stades avancés des pathologies. Dans le second, la délétion du chromosome 1p, a entraîné la perte du locus *RH* et donc l'absence d'expression des antigènes RH chez un troisième patient. Ce mécanisme n'a jamais été décrit dans la littérature.

Il pourrait être intéressant d'étudier une possible corrélation entre l'évolution de la pathologie et le pourcentage de DP observé par les techniques immuno-hématologiques usuelles.

Parallèlement à l'acquisition d'anomalies sur le chromosome 1p, aucune allo-immunisation n'a été mise en évidence chez nos trois patients.

Enfin, chez les patients présentant une DP inexpiquée et n'ayant pas d'hémopathie diagnostiquée, il pourrait être intéressant d'étudier la valeur prédictive de cette anomalie.

Le travail de mémoire du D.E.S de biologie médicale aura pour intérêt d'étudier une cohorte de patients plus importante et de réaliser une étude rétrospective afin de tenter de répondre aux différentes problématiques de ce travail de thèse telles que la possible allo-immunisation à la suite de la transfusion de produits sanguins ne respectant pas le phénotype acquis ou la corrélation entre l'évolution de la pathologie et le pourcentage de DP observé.

Références bibliographiques

1. Winters JL, Howard DS. Red blood cell antigen changes in malignancy: case report and review. *Immunohematology*. 1 janv 2001;17(1):1-9.
2. Van Loghem JJ, Dorfmeier H, Van Der Hart M. Two A Antigens with Abnormal Serologic Properties. *Vox Sang*. janv 1957;2(1):16-24.
3. Levine P. An Unusual Case of Intra-group Agglutination. *JAMA J Am Med Assoc*. 9 mars 1984;251(10):1316.
4. Landsteiner K, Wiener AS. STUDIES ON AN AGGLUTINOGEN (Rh) IN HUMAN BLOOD REACTING WITH ANTI-RHESUS SERA AND WITH HUMAN ISOANTIBODIES. *J Exp Med*. 1 oct 1941;74(4):309-20.
5. Fisk RT, Foord AG. Observations on the Rh Agglutinin of Human Blood. *Am J Clin Pathol*. 1 nov 1942;12(11):545-52.
6. Bailly P, Charioni J, Roubinet F. Les groupes sanguins érythrocytaires. 404 p.
7. Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron JP, Colin Y. Organization of the Gene (RHCE) Encoding the Human Blood Group RhCcEe Antigens and Characterization of the Promoter Region. *Genomics*. janv 1994;19(1):68-74.
8. Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, et al. Evidence of Genetic Diversity Underlying Rh D-, Weak D (Du), and Partial D Phenotypes as Determined by Multiplex Polymerase Chain Reaction Analysis of the RHD Gene. *Blood*. 1 avr 1997;89(7):2568-77.
9. Suto Y, Ishikawa Y, Hyodo H, Uchikawa M, Juji T. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum Genet*. 25 févr 2000;106(2):164-71.
10. Smythe JS, Avent ND, Judson PA, Parsons SF, Martin PG, Anstee DJ. Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood*. 1 avr 1996;87(7):2968-73.
11. Le van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron JP, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 nov 1992;89(22):10925-9.
12. Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, et al. The Analysis of Nucleotide Substitutions, Gaps, and Recombination Events between RHD and RHCE Genes through Complete Sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. août 2000;274(3):670-83.
13. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 15 juin 2000;95(12):3662-8.
14. Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*. 15 juill 1993;82(2):651-5.

15. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 15 nov 1991;78(10):2747-52.
16. Aubin J, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brossard Y, et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol*. août 1997;98(2):356-64.
17. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 1 janv 2000;95(1):12-8.
18. Blunt T, Daniels G, Carritt B. Serotype Switching in a Partially Deleted RHD Gene. *Vox Sang*. nov 1994;67(4):397-401.
19. Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron JP, Van Kim CL. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet*. sept 1993;5(1):62-5.
20. Daniels G. Human blood groups. 2. ed. Oxford: Blackwell Science; 2002. 560 p.
21. Lewis M, Kaita H, Chown B. The Inheritance of the Rh Blood Groups: I. Frequencies in 1,000 Unrelated Caucasian Families Consisting of 2,000 Parents and 2,806 Children ¹. *Vox Sang*. juin 1971;20(6):500-8.
22. Lawler SD, Bertinshaw D, Sanger R, Race RR. INHERITANCE OF THE *Rh* BLOOD GROUPS: 150 FAMILIES TESTED WITH ANTI- *C-c-C^w-D-E* AND ANTI- *e*. *Ann Eugen*. janv 1949;15(1):258-70.
23. Mak KH, Yan KF, Cheng SS, Yuen MY. Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. *Transfusion (Paris)*. avr 1993;33(4):348-51.
24. Wiener AS, Davidsohn I, Potter EL. HEREDITY OF THE Rh BLOOD TYPES. *J Exp Med*. 1 janv 1945;81(1):63-72.
25. Bodmer WF. Early British Discoveries in Human Genetics: Contributions of R. A. Fisher and J. B. S. Haldane to the Development of Blood Groups.
26. Race RR. An « Incomplete » Antibody in Human Serum. *Nature*. juin 1944;153(3895):771-2.
27. Rosenfield RE, Allen FH, Swisher SN, Kochwa S. A Review of Rh Serology and Presentation of a New Terminology. *Transfusion (Paris)*. 10 sept 1962;2(5):287-311.
28. Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJA, Anstee DJ. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem J*. 1 nov 1990;271(3):821-5.
29. Moore S, Woodrow CF, McClelland DBL. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (*c̄*), (E) and Fya. *Nature*. févr 1982;295(5849):529-31.
30. Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, et al. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci*. août 1990;87(16):6243-7.

31. Kajii E, Umenishi F, Iwamoto S, Ikemoto S. Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. *Hum Genet* [Internet]. mars 1993 [cité 13 mars 2024];91(2). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/BF00222717>
32. Chiaroni J, Ferrera V, Dettori I, Roubinet F. Groupes sanguins érythrocytaires. *EMC - Hématologie*. juin 2005;2(2):53-112.
33. Dunstan RA, Simpson MB, Rosse WF. Erythrocyte antigens on human platelets. Absence of Rh, Duffy, Kell, Kidd, and Lutheran antigens. *Transfusion (Paris)*. 6 mai 1984;24(3):243-6.
34. Dunstan RA. Status of major red cell blood group antigens on neutrophils, lymphocytes and monocytes. *Br J Haematol*. févr 1986;62(2):301-9.
35. Rearden A, Masouredis S. Blood group D antigen content of nucleated red cell precursors. *Blood*. 1 déc 1977;50(6):981-6.
36. Benachi A, Garritsen HSP, Howard CM, Bennett P, Fisk NM. Absence of expression of RhD by human trophoblast cells. *Am J Obstet Gynecol*. févr 1998;178(2):294-9.
37. Gemke RBJJ, Kanhai HHH, Overbeeke MAM, Maas CJ, Gravenhorst JB, Bernini LF, et al. ABO and Rhesus phenotyping of fetal erythrocytes in the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol*. déc 1986;64(4):689-97.
38. Heitman J, Agre P. A new face of the Rhesus antigen. *Nat Genet*. nov 2000;26(3):258-9.
39. Ridgwell K, Spurr NK, Laguda B, MacGeoch C, Avent ND, Tanner MJ. Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem J*. 1 oct 1992;287 (Pt 1)(Pt 1):223-8.
40. Huang CH. The Human Rh50 Glycoprotein Gene. *J Biol Chem*. janv 1998;273(4):2207-13.
41. Matassi G, Chérif-Zahar B, Raynal V, Rouger P, Cartron JP. Organization of the human RH50A gene (RHAG) and evolution of base composition of the RH gene family. *Genomics*. 15 janv 1998;47(2):286-93.
42. Bloy C, Blanchard D, Hermant P, Kordowicz M, Sonneborn HH, Cartron JP. Properties of the blood group LW glycoprotein and preliminary comparison with Rh proteins. *Mol Immunol*. nov 1989;26(11):1013-9.
43. Dahr W, Kordowicz M, Moulds J, Gielen W, Lebeck L, Kröger J. Characterization of the Ss sialoglycoprotein and its antigens in Rhnull erythrocytes. *Blut*. janv 1987;54(1):13-24.
44. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 15 janv 2000;95(2):375-87.
45. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*. mars 2006;20(2):93-110.

46. Nash R, Shojania AM. Hematological aspect of Rh deficiency syndrome: A case report and a review of the literature. *Am J Hematol.* mars 1987;24(3):267-75.
47. Kuypers F, van Linde-Sibenius-Trip M, Roelofsen B, Tanner MJ, Anstee DJ, Op den Kamp JA. Rhnull human erythrocytes have an abnormal membrane phospholipid organization. *Biochem J.* 1 août 1984;221(3):931-4.
48. Marini AM, Urrestarazu A, Beauwens R, André B. The Rh (Rhesus) blood group polypeptides are related to NH₄⁺ transporters. *Trends Biochem Sci.* déc 1997;22(12):460-1.
49. Tippett P, Sanger R. Observations on Subdivisions of the Rh Antigen D. *Vox Sang.* 2 janv 1962;7(1):9-13.
50. Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh Antigen D: Partial D Antigens and Associated Low Incidence Antigens. *Vox Sang.* avr 1996;70(3):123-31.
51. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the *RHD* genotype. *Br J Haematol.* oct 2017;179(1):10-9.
52. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1 janv 1999;93(1):385-93.
53. Jones JW, Lloyd-Evans P, Kumpel BM. Quantitation of Rh D Antigen Sites on Weak D and D Variant Red Cells by Flow Cytometry. *Vox Sang.* sept 1996;71(3):176-83.
54. Rochna E, Hughes-Jones NC. The Use of Purified ¹²⁵I-Labelled Anti-γ Globulin in the Determination of the Number of D Antigen Sites on Red Cells of Different Phenotypes. *Vox Sang.* 12 nov 1965;10(6):675-86.
55. Hughes-Jones NC, Gardner B, Lincoln PJ. Observations of the Number of Available c, D, and E Antigen Sites on Red Cells. *Vox Sang.* sept 1971;21(3):210-6.
56. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 15 avr 2000;95(8):2699-708.
57. Simsek S, De Jong CAM, Cuijpers HThM, Bleeker PMM, Westers TM, Overbeeke MAM, et al. Sequence Analysis of cDNA Derived from Reticulocyte mRNAs Coding for Rh Polypeptides and Demonstration of E/e and C/c Polymorphisms. *Vox Sang.* août 1994;67(2):203-9.
58. Lugdivine F. Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée. 2018;
59. Körmöcz GF, Dauber EM, Haas OA, Legler TJ, Clausen FB, Fritsch G, et al. Mosaicism due to myeloid lineage-restricted loss of heterozygosity as cause of spontaneous Rh phenotype splitting. *Blood.* 15 sept 2007;110(6):2148-57.
60. Matherat G. Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique. 2018.
61. Khoury JD, Solary E, Ablu O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* juill 2022;36(7):1703-19.

62. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 1 juill 2008;112(1):141-9.
63. Roskoski R. Targeting BCR-Abl in the treatment of Philadelphia-chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Pharmacol Res*. avr 2022;178:106156.
64. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. août 2012;12(8):513-26.
65. Luque Paz D, Kralovics R, Skoda RC. Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 20 avr 2023;141(16):1909-21.
66. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
67. Yang SK, Hong M, Zhao W, Jung Y, Tayebi N, Ye BD, et al. Genome-Wide Association Study of Ulcerative Colitis in Koreans Suggests Extensive Overlapping of Genetic Susceptibility With Caucasians: Inflamm Bowel Dis. avr 2013;19(5):954-66.
68. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 23 mai 2013;32(21):2601-13.
69. 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.
70. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, Vannucchi AM, et al. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia*. déc 2011;25(12):1834-9.
71. Dolan M, Mendelsohn NJ, Pierpont ME, Schimmenti LA, Berry SA, Hirsch B. A novel microdeletion/microduplication syndrome of 19p13.13. *Genet Med*. août 2010;12(8):503-11.
72. Puigdecenet E, Espinet B, Villa O, Florensa L, Besses C, Serrano S, et al. Detection of abnormalities of PRV-1, TPO, and c-MPL genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet*. mai 2006;167(1):39-42.
73. Singdong R, Siriboonpiputtana T, Chareonsirisuthigul T, Kongruang A, Limsuwanachot N, Sirirat T, et al. Characterization and Prognosis Significance of JAK2 (V617F), MPL, and CALR Mutations in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev [Internet]*. oct 2016 [cité 27 juill 2024];17(10). Disponible sur: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.10.4647>
74. Pietra D, Rumi E, Brisci A, Passamonti F, Boggi S, Cremonesi L, et al. Loss of Heterozygosity of Chromosome 1p34 and High Mutant Allele Burden in Patients with Post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis Carrying Somatic Mutations of MPL. *Blood*. 16 nov 2008;112(11):176-176.
75. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 1 août 2007;110(3):986-93.

76. Cigudosa JC, Menezes J. Chronic neutrophilic leukemia: a clinical perspective. *OncoTargets Ther.* sept 2015;2383.
77. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic *CSF3R* Mutations in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical CML. *N Engl J Med.* 9 mai 2013;368(19):1781-90.
78. Hall TO, Stanaway IB, Carrell DS, Carroll RJ, Denny JC, Hakonarson H, et al. Unfolding of hidden white blood cell count phenotypes for gene discovery using latent class mixed modeling. *Genes Immun.* sept 2019;20(7):555-65.
79. Issa JPJ. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 9 mai 2013;121(19):3811-7.
80. Karsan A. The biology of myelodysplastic syndromes. 2011;
81. Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther.* 15 août 2010;10(4):309-19.
82. Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, Hasserjian RP, Arango Ossa JE, Nannya Y, et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evid [Internet].* 28 juin 2022 [cité 17 août 2024];1(7). Disponible sur: <https://evidence.nejm.org/doi/10.1056/EVIDoa2200008>
83. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Tuechler H, et al. Coalesced Multicentric Analysis of 2,351 Patients With Myelodysplastic Syndromes Indicates an Underestimation of Poor-Risk Cytogenetics of Myelodysplastic Syndromes in the International Prognostic Scoring System. *J Clin Oncol.* 20 mai 2011;29(15):1963-70.
84. McClure RF, Ewalt MD, Crow J, Temple-Smolkin RL, Pullambhatla M, Sargent R, et al. Clinical Significance of DNA Variants in Chronic Myeloid Neoplasms. *J Mol Diagn.* nov 2018;20(6):717-37.
85. Zhao F, Bosler DS, Cook JR. Designing Myeloid Gene Panels. *Arch Pathol Lab Med.* 1 août 2022;146(8):1004-11.
86. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, DiNardo CD, Godley LA, Iacobucci I, et al. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 24 nov 2022;140(21):2228-47.
87. Ferrera L. Apports de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le pronostic des syndromes myélodysplasiques en pratique hospitalière. Lille; 2023.
88. Niscola P, Gianfelici V, Giovannini M, Piccioni D, Mazzone C, De Fabritiis P. Latest Insights and Therapeutic Advances in Myelodysplastic Neoplasms. *Cancers.* 19 avr 2024;16(8):1563.
89. Itzykson R, Duchmann M, Lucas N, Solary E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int J Hematol.* juin 2017;105(6):711-9.
90. Charioni J, Roubinet F, Bailly P, Mannessier L, Noizat-Pirenne F. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. JOHN LIBBEY EUROTEXT; 2011. 350 p. (Hors collection).

91. Harismendy O, Schwab RB, Alakus H, Yost SE, Matsui H, Hasteh F, et al. Evaluation of ultra-deep targeted sequencing for personalized breast cancer care. *Breast Cancer Res BCR*. 10 déc 2013;15(6):R115.
92. O’Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 8 avr 2010;115(14):2731-9.
93. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, Getz G, Stewart C, Lichtenstein L. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2 [Internet]. 2019 [cité 3 sept 2024]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/861054>
94. Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, McEwen R, et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 20 juin 2016;44(11):e108-e108.
95. Dunbar AJ, Gondek LP, O’Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping Identifies Acquired Uniparental Disomy and Homozygous Mutations, Including Novel Missense Substitutions of *c-Cbl*, in Myeloid Malignancies. *Cancer Res*. 15 déc 2008;68(24):10349-57.
96. Middeldorp A, Van Puijenbroek M, Nielsen M, Corver W, Jordanova E, Ter Haar N, et al. High frequency of copy-neutral LOH in *MUTYH* -associated polyposis carcinomas. *J Pathol*. sept 2008;216(1):25-31.
97. Young BD, Debernardi S, Lillington DM, Skoulakis S, Chaplin T, Foot NJ, et al. A role for mitotic recombination in leukemogenesis. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46(1):90-7.
98. Tiu RV, Gondek LP, O’Keefe CL, Huh J, Sekeres MA, Elson P, et al. New Lesions Detected by Single Nucleotide Polymorphism Array–Based Chromosomal Analysis Have Important Clinical Impact in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 1 nov 2009;27(31):5219-26.
99. Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 1 févr 2008;111(3):1534-42.
100. Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood*. 27 mai 2010;115(21):4157-61.
101. Szpurka H, Gondek LP, Mohan SR, Hsi ED, Theil KS, Maciejewski JP. UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation. *Leukemia*. mars 2009;23(3):610-4.
102. Godfrey AL, Chen E, Pagano F, Ortmann CA, Silber Y, Bellosillo B, et al. JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood*. 27 sept 2012;120(13):2704-7.
103. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 23 mai 2013;121(21):4388-95.
104. Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. SNP Array Karyotyping Allows for the Detection of Uniparental Disomy and Cryptic Chromosomal

Abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. Blagosklonny M, éditeur. PLoS ONE. 21 nov 2007;2(11):e1225.

105. Duployez N, Boudry-Labis E, Roumier C, Boissel N, Petit A, Geffroy S, et al. SNP-array lesions in core binding factor acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 19 janv 2018;9(5):6478-89.
106. Ibrar W, Zhang W, Cox JL, Cushman-Vokoun A, Fu K, Greiner TC, et al. The utility of a myeloid mutation panel for the diagnosis of myelodysplastic syndrome and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm. *Int J Lab Hematol*. déc 2021;43(6):1501-9.
107. Montemayor-Garcia C, Coward R, Albitar M, Udani R, Jain P, Koklanaris E, et al. Acquired RhD mosaicism identifies fibrotic transformation of thrombopoietin receptor-mutated essential thrombocythemia. *Transfusion (Paris)*. sept 2017;57(9):2136-9.
108. Dunbar NM. Does ABO and RhD matching matter for platelet transfusion? *Hematology*. 4 déc 2020;2020(1):512-7.
109. Race RR, Mourant AE. The Rh chromosome frequencies in England. *Blood*. juin 1948;3(6):689-95.
110. Mori N, Morosetti R, Mizoguchi H, Koeffler HP. Progression of myelodysplastic syndrome: allelic loss on chromosomal arm 1p. *Br J Haematol*. juill 2003;122(2):226-30.
111. Hofmann WK, Takeuchi S, Xie D, Miller CW, Hoelzer D, Koeffler HP. Frequent loss of heterozygosity in the region of D1S450 at 1p36.2 in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. oct 2001;25(10):855-8.
112. Geissler K, Jäger E, Gurbisz M. Genotypic and phenotypic evolution in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res Rep*. 2019;12:100185.
113. Bouscary D, Prudhomme C, Quesnel B, Melle J, Picard F, Dreyfus F. *c-mpl* Expression in Hematologic Disorders. *Leuk Lymphoma*. janv 1995;17(1-2):19-26.
114. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. déc 2007;1(6):671-84.
115. Chaligné R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couédic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 15 nov 2007;110(10):3735-43.
116. Pecquet C, Staerk J, Chaligné R, Goss V, Lee KA, Zhang X, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood*. 4 févr 2010;115(5):1037-48.
117. Balduini A, Badalucco S, Pugliano MT, Baev D, De Silvestri A, Cattaneo M, et al. In Vitro Megakaryocyte Differentiation and Proplatelet Formation in Ph-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Distinct Patterns in the Different Clinical Phenotypes. Schulz C, éditeur. PLoS ONE. 15 juin 2011;6(6):e21015.
118. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2024 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. juin 2024;99(6):1142-65.

119. Heim S. Cytogenetic findings in primary and secondary MDS. *Leuk Res.* janv 1992;16(1):43-6.
120. Mohamed A, Gao J, Chen YH, Abaza Y, Altman J, Jennings L, et al. CSF3R mutated myeloid neoplasms: Beyond chronic neutrophilic leukemia. *Hum Pathol.* juill 2024;149:66-74.
121. 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.
122. Baba Y, Nakamaki T, Sakai H, Fukuchi K, Kabasawa N, Hattori N, et al. Chronic neutrophilic leukemia preceded by myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* nov 2023;118(5):636-41.
123. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primer.* 8 juin 2017;3(1):17032.
124. Klimiankou M, Uenalan M, Kandabarau S, Nustede R, Steiert I, Mellor-Heineke S, et al. Ultra-Sensitive CSF3R Deep Sequencing in Patients With Severe Congenital Neutropenia. *Front Immunol.* 28 févr 2019;10:116.
125. Zhang X, Ghiuzeli C, Jou E, Hsu P, Kolitz J, Brody JP. CSF3R T618I mutant myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in the elderly: An age-related disease with unfavorable prognosis. *Leuk Res Rep.* 2022;17:100334.
126. Dracopoli NC, Harnett P, Bale SJ, Stanger BZ, Tucker MA, Housman DE, et al. Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci.* juin 1989;86(12):4614-8.
127. Cryns VL, Yi SM, Tahara H, Gaz RD, Arnold A. Frequent loss of chromosome arm 1p DNA in parathyroid adenomas. *Genes Chromosomes Cancer.* mai 1995;13(1):9-17.
128. Nagai H, Negrini M, Carter SL, Gillum DR, Rosenberg AL, Schwartz GF, et al. Detection and cloning of a common region of loss of heterozygosity at chromosome 1p in breast cancer. *Cancer Res.* 15 avr 1995;55(8):1752-7.
129. Praml C, Finke LH, Herfarth C, Schlag P, Schwab M, Amler L. Deletion mapping defines different regions in 1p34.2-pter that may harbor genetic information related to human colorectal cancer. *Oncogene.* 5 oct 1995;11(7):1357-62.
130. White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, Marshall HN, Fujimori M, et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci.* 6 juin 1995;92(12):5520-4.
131. Benn DE, Dwight T, Richardson AL, Delbridge L, Bambach CP, Stowasser M, et al. Sporadic and familial pheochromocytomas are associated with loss of at least two discrete intervals on chromosome 1p. *Cancer Res.* 15 déc 2000;60(24):7048-51.
132. Maheshwari A, Killeen RB. Duffy Blood Group System. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 21 sept 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580473/>
133. Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood.* 1 juin 2001;97(11):3633-9.

134. Cooper B, Tishler P, Atkins L, Breg W. Loss of Rh antigen associated with acquired Rh antibodies and a chromosome translocation in a patient with myeloid metaplasia. *Blood*. 1 sept 1979;54(3):642-7.
135. Marsh WL, Chaganti RSK, Gardner FH, Mayer K, Nowell PC, German J. Mapping Human Autosomes: Evidence Supporting Assignment of Rhesus to the Short Arm of Chromosome No. 1. *Science*. 8 mars 1974;183(4128):966-8.
136. Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti- D production using frozen/thawed blood. *Transfusion (Paris)*. 2 janv 1981;21(1):64-9.
137. Ji Y, Luo Y, Wen J, Sun Y, Jia S, Ou C, et al. Patients with Asian-type DEL can safely be transfused using RhD-positive blood. *Blood*. 13 janv 2023;blood.2022018152.
138. Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, Nagao N. A D variant, D_{el} ? *Transfusion (Paris)*. 12 nov 1984;24(6):542-542.
139. Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, Nagao N, Shibata H, Okubo Y, et al. Further analysis of D_{el} (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers. *Transfus Med*. sept 1997;7(3):227-31.
140. Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sang*. 1998;75(1):52-7.
141. Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, et al. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J Clin Invest*. 15 juill 1997;100(2):373-9.

Annexe 1 : Fréquences des différents phénotypes RH et génotypes RH dans la population caucasienne (109)

Phénotype	Génotypes	Fréquence (%)
RH : 1,2,-3,-4,5	DCe/DCe	17,68
	DCe/dCe	0,82
RH : 1,-2,3,4,-5	DcE/DcE	1,99
	DcE/dcE	0,34
RH : 1,-2,3,-4,5	Dce/dce	2,00
	Dce/Dce	0,07
RH : 1,2,-3,4,-5	DCE/DCE	<0,01
	DCE/dCE	<0,01
RH : 1,2,3,-4,5	DCe/dce	32,68
	DCe/Dce	2,16
	Dce/dCe	0,05
RH : 1,-2,3,4,5	DcE/dce	10,97
	DcE/Dce	0,73
	Dce/dcE	0,06
RH : 1,2,-3,4,5	DCe/DCE	0,20
	DCE/dCe	<0,01
	DCe/dCE	<0,01
RH : 1,2,3,4,-5	DcE/DCE	0,07
	DCE/dcE	<0,01
	DcE/dCE	<0,01
RH : 1,2,3,4,5	DCe/DcE	11,87
	DCe/dcE	1,00
	DcE/dCe	0,28
	DCE/dce	0,19
	Dce/DCE	0,01
	Dce/dCE	<0,01
RH : -1,2,-3,-4,5	dCe/dCe	0,01
RH : -1,-2,3,4,-5	dcE/dcE	0,01
RH : -1,-2,3,-4,5	dce/dce	15,10
RH : -1,2,-3,4,-5	dCE/dCE	<0,01
RH : -1,2,3,-4,5	dCe/dce	0,76

RH : -1,-2,3,4,5	dcE/dce	0,92
RH : -1,2,-3,4,5	dCe/dCE	<0,01
RH : -1,2,3,4,-5	dcE/dCE	<0,01
RH : -1,2,3,4,5	dcE/dCe	0,02
	dCe/DCE	<0,01

Université de Lille
UFR3S-Pharmacie
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2023/2024

Nom : BOURGEOIS
Prénom : Rémi

Titre de la thèse : Anomalies d'expression d'antigènes RH et hémopathies associées aux mutations *MPL*, *CSF3R* et délétion 1p : mise en évidence de deux mécanismes différents.

Mots-clés : Système RH – Hémopathies myéloïdes – SNP-array – NGS – Double population – CN-LOH – Délétion chromosomique

Observation : Les antigènes RH sont exprimés à la surface des hématies et sont codés par les gènes *RHD* et *RHCE*, situés sur le bras court du chromosome 1. Des modifications de l'expression de ces antigènes ont été identifiées chez des patients atteints d'hémopathies myéloïdes.

Matériels et méthodes : Les anomalies du phénotype RH ont été analysées chez trois patients atteints d'hémopathies myéloïdes (une LMMC et deux SMD). Les doubles populations ou les pertes d'expression antigéniques ont été mises en évidence par les analyses immuno-hématologiques. La technologie NGS a permis la mesure de la VAF des mutations oncogènes et la détermination du nombre de copies des gènes. Le SNP-array a permis la détermination des CN-LOH.

Résultat : Les différentes analyses ont permis la mise en évidence de deux mécanismes moléculaires, conduisant à des anomalies acquises du phénotype RH : la CN-LOH, liée à la mutation des gènes *MPL* et *CSF3R*, et la délétion du chromosome 1p.

Conclusion : L'acquisition de ces anomalies est concomitante avec l'évolution de l'hémopathie des patients. Malgré un besoin transfusionnel accru, aucune allo-immunisation n'a été mise en évidence.

Membres du jury :

Président : Pr. DUPONT Annabelle, PU-PH, Laboratoire d'hématologie CHU de Lille

Assesseurs : Dr. DUPLOYEZ Nicolas, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie CHU de Lille

Membres extérieurs :

Directeur, conseiller de thèse : Dr. DELANOE Laure, Biologiste, Laboratoire EFS de Lille

Assesseur : Dr. WEMEAU Mathieu, PH, Service d'hématologie CH de Roubaix