

Mémoire de Maîtrise en médecine No 868

Recherche de l'expression de la lamine A
et de la progérine chez des patients avec
un syndrome myélodysplasique/syndrome
myéloprolifératif avec thrombocytose

Etudiant

Héloïse Wuthrich

Tuteur

Prof. Anne Angelillo-Scherrer
Service et Laboratoire Central d'Hématologie, CHUV

Co-tuteur

Dresse. Sabine Blum
Service et Laboratoire Central d'Hématologie, CHUV

Expert

Dr Kaveh Samii, MD
Service d'Hématologie
Hôpitaux Universitaires de Genève

Lausanne, décembre 2012

Résumé

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) et myéloprolifératifs (SMP) sont des maladies qui touchent les cellules souches de la moelle hématopoïétique. Les symptômes varient selon le sous-type de SMD ou SMP allant de l'anémie à la polyglobulie, de la leucopénie à la leucocytose et de la thrombopénie à la thrombocytose. Ces syndromes se développent à la suite de mutations acquises qui provoquent des anomalies des cellules souches. En outre, plusieurs études ont mis en évidence des anomalies de processus épigénétiques comme l'hyperméthylation de l'ADN et la déacétylation des histones.

La maladie de Hutchinson-Gilford ou progéria est provoquée par une mutation sur le gène de la lamine A (protéine de l'enveloppe nucléaire) qui a pour conséquence l'augmentation de l'utilisation d'un site de splicing normalement peu utilisé ce qui engendre une protéine anormale, la progérine. Cette protéine a pour effet de modifier les processus épigénétiques. Une étude récente sur des patients souffrant de progéria a révélé la présence d'une thrombocytose chez tous les patients.

Le but du présent travail a été d'étudier l'expression de la lamine A et de la progérine chez les patients souffrant de SMD ou SMP avec une thrombocytose suivis par le Service d'hématologie du CHUV. Nous avons sélectionné parmi les patients souffrant de SMD ou SMP ceux avec une thrombocytose supérieure à 400 G/l au moment du diagnostic. Nous avons ensuite effectué une PCR pour détecter la lamine A et la mutation de la lamine A que l'on trouve dans la progéria. Sur les 33 patients sélectionnés, nous avons pu analyser les échantillons de 18 d'entre eux. Le matériel était issu de cellules mononucléées ou de granulocytes. Les résultats démontrent la présence de la lamine A et l'absence de la mutation trouvée dans la progéria chez 16 patients. Cependant, chez 2 patients, la PCR laisse suspecter la présence de progérine en plus de celle de la lamine A. D'autres investigations seront nécessaires pour confirmer cette dernière observation. S'il s'avère que la progérine est effectivement présente chez ces deux patients, il faudrait étendre l'analyse à d'autres patients avec une hémopathie maligne. Plusieurs publications rapportent l'absence de lamine A dans les cellules hématopoïétiques. Cependant, le présent travail démontre clairement que les cellules mononucléées du sang ou de la moelle osseuse de certains patients avec SMP/SMD expriment la lamine A. Nous n'avons toutefois pas étudié si la lamine A et, éventuellement la progérine, sont exprimées par les cellules hématopoïétiques normales.

En conclusion, ce travail a révélé qu'il serait très intéressant d'étudier le rôle potentiel des lamines nucléaires et en particulier de la lamine A et de la progérine dans l'hématopoïèse et le développement des SMD/SMP et d'autres hémopathies malignes. Il a donc ouvert la voie pour de futurs projets de recherche.

Mots-clés: Thrombocytose, syndrome myélodysplasique, syndrome myéloprolifératif, lamine A, progérine.

Introduction

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) et myéloprolifératifs (SMP) regroupent différentes maladies qui ont pour caractéristique commune des anomalies des cellules souches de la moelle hématopoïétique. L'origine de ces maladies reste encore inconnue mais des mutations génétiques acquises ont déjà été mises en évidence. Ces syndromes touchent en majorité des personnes âgées.

Les syndromes myélodysplasiques comprennent selon la classification de l'OMS 2008 : la cytopénie réfractaire qui comprend une dysplasie sur une lignée: anémie (avec ou sans sidéroblastes en couronne), leucopénie ou thrombopénie; la cytopénie réfractaire avec dysplasie sur plusieurs lignées (bicytopénie ou pancytopénie); le syndrome 5q-; l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB-1 ou AREB-2) et les syndromes myélodysplasiques inclassables. Ces différentes maladies ont en commun une hématopoïèse inefficace et dysplasique due aux multiples dommages de l'ADN. Les patients se présentent le plus souvent avec de simples ou multiples lignées cytopéniques, mais il existe des cas avec thrombocytose, leucocytose et polyglobulie.

Les syndromes myéloprolifératifs regroupent entre autres: la polycytemia vera (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MP). Ils sont caractérisés par une hyperplasie myéloïde prédominante sur une lignée sanguine sans bloc de maturation (à l'inverse des leucémies aiguës). La mutation JAK2V617F est souvent présente (dans 95% des PV et 50% des TE)¹. Ces trois maladies peuvent provoquer une anémie ou une polyglobulie, une neutropénie ou une leucocytose, une thrombopénie ou une thrombocytose, en fonction du diagnostic et du stade de la maladie. Les SMP comprennent d'autres sous types de pathologie comme la leucémie myéloïde chronique, la leucémie myélomonocytaire chronique et d'autres syndromes plus rares qui ne sont pas étudiés dans ce travail.

Le diagnostic de ces différentes maladies est difficile à poser car les symptômes sont très variés et peu spécifiques. Toutes les lignées sanguines peuvent être touchées par les anomalies des cellules souches. Les symptômes se manifestent en fonction de la lignée atteinte. Dans les SMD, les patients se plaignent le plus souvent de fatigue liée à l'anémie chronique. Les infections à répétition et les saignements sont respectivement dus à la neutropénie et à la thrombopénie plus souvent présentes dans les SMD. Les patients souffrant de SMP peuvent présenter de multiples symptômes en fonction du type de SMP ou alors être asymptomatiques (le plus souvent dans les TE). Les thromboses et les hémorragies sont les complications les plus fréquentes des SMP.

Les SMD/SMP peuvent évoluer vers une leucémie myéloïde aiguë avec un pronostic défavorable.

La thrombopénie (plaquettes <150 G/l) est une altération fréquente dans les SMD (30 à 50% des patients)² et SMP.

Dans les SMD, la thrombopénie est attribuée à une production inefficace des plaquettes due au dysfonctionnement des mégacaryocytes mais également à une diminution de la durée moyenne de vie des plaquettes chez certains patients.³ D'autres dysfonctions plaquettaires ont été mises en évidence. Une étude a démontré un défaut d'agrégation des plaquettes chez 70% des hommes et chez toutes les femmes de l'étude.⁴

Les recherches sur les SMP démontrent également des dysfonctions plaquettaires chez les patients. Notamment des anomalies de la structure et de la fonction des plaquettes. Certaines études ont mis en avant la diminution et l'anomalie de certains récepteurs plaquettaires qui jouent un rôle majeur dans la réponse plaquettaire.⁵

Les lamines nucléaires sont des protéines de l'enveloppe nucléaire qui se trouvent sur la membrane interne du noyau cellulaire (lamines A, C, B1 et B2). Ces lamines assurent le maintien de la structure du noyau, la régulation de la transcription, le positionnement des pores nucléaires pour pouvoir contrôler leur fonctionnement et l'organisation de l'hétérochromatine. Les mutations qui peuvent survenir dans les gènes qui codent pour les différentes lamines engendrent les laminopathies. A ce jour nous connaissons 15 maladies qui sont liées à des mutations des protéines de l'enveloppe.⁶ Le syndrome de Hutchinson-Gilford ou progéria est une laminopathie transmise selon le mode autosomique dominant responsable de modifications physiques qui ressemblent à une sénescence accélérée survenant dès la première ou la deuxième année de vie.⁷ Ce syndrome très rare est provoqué dans la majorité des cas par la mutation silencieuse hétérozygote 1824 C>T (Gly608Gly) du gène LMNA (localisé sur le chromosome 1) qui code pour la lamine A (Figure 1).⁸ Cette mutation induit une importante augmentation de l'utilisation d'un site d'épissage (ou splicing) alternatif interne se situant dans l'exon11. L'emploi de ce site d'épissage, sur le pré-mRNA de la LMNA, entraîne l'élimination d'une séquence de 150 nucléotides de l'exon 11, et provoque la production d'une protéine tronquée de 50 acides aminés par rapport à la LMNA, nommée progérine (Figure 1). En raison de la délétion de 150 nucléotides de l'exon 11, la progérine conserve la CAAX box de la lamine A (codée par l'exon 12) ce qui entraîne une farnésylation et une carboxyméthylation permanentes de la progérine en raison du manque de 50 acides aminés essentiels pour une étape de clivage spécifique impliquée dans la maturation de la lamine A.⁹ Cette protéine entraîne des altérations de la membrane nucléaire et affecte d'autres processus cellulaires importants, comme l'interphase de la chromatine, la mitose et la prolifération cellulaire.¹⁰ La progérine altère également la fonction de la lamine B ce qui induit des perturbations épigénétiques. La Figure 1 montre les 3 protéines produites par le gène LMNA.

Les modulations épigénétiques changent l'expression d'un gène sans altérer les séquences de l'ADN. La chromatine formée par les brins d'ADN est condensée avec des protéines nommées histones pour former des nucléosomes. Le remodelage de la chromatine est orchestré par des phénomènes épigénétiques. Suivant la structure de la chromatine la transcription est possible ou non. L'acétylation des histones et la

non-méthylation de l'ADN sont des processus épigénétiques nécessaires pour permettre la transcription génique.

Les anomalies épigénétiques jouent un rôle important dans le développement des SMD et SMP. Dans les SMD, l'hyperméthylation et l'hypométhylation de l'ADN sont des anomalies connues. L'hyperméthylation empêche la transcription de gènes jouant un rôle entre autres dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'apoptose et dans l'adhésion et la motilité.¹¹ L'hypométhylation quand à elle favorise l'expression de gènes du cycle cellulaire et des voies du "cancer".¹² Les modifications des histones comme la déacétylation est aussi un phénomène constaté dans les SMD.¹¹ Selon l'étude de Vigna et al., la dérégulation de certains gènes dont EZH2 causerait des changements épigénétiques qui activeraient des voies oncogènes, ce qui pourrait provoquer le développement des SMD.¹³ De nombreuses études sur les SMP ont également mis en évidence plusieurs altérations épigénétiques qui contribuent à la pathogénèse de ces maladies. Selon Mascarenhas et al., l'initiation et la progression des SMP ne sont pas uniquement causées par l'acquisition de mutations, comme, par exemple, la mutation JAK2V617F, mais aussi dues à des changements épigénétiques. Deux catégories d'anomalies épigénétiques ont été observées. La première est l'altération de gènes qui codent pour des protéines qui influencent la structure de la chromatine (EZH2, TET2, ASXL1, JAK2V617F et d'autres). Les protéines anormales provoquent une hyperméthylation de l'ADN et/ou des modifications des histones. La seconde inclut des gènes dont l'expression est modifiée par des mécanismes épigénétiques. Ces gènes ont un rôle critique dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation (SOCS, SFRP1/2, PRV-1, etc...)¹⁴ Les anomalies épigénétiques sont donc des moteurs de la pathogénèse des SMD et SMP.

L'anomalie de Pelger Huët est une laminopathie associée à des mutations du gène du récepteur de la lamine B.^{15,16,17} Dans les SMD, les cellules sanguines et de la moelle osseuse montrent fréquemment les mêmes anomalies du noyau que l'anomalie de Pelger Huët.

Les fibroblastes dans le syndrome de Hutchinson-Gilford ont des taux de prolifération trop haut avec une augmentation de la production de collagène et une augmentation du renouvellement cellulaire et de la fibrose.¹⁸ Une étude sur des patients atteints de progéria a démontré la présence d'une thrombocytose chez tous les sujets inclus dans l'étude.¹⁹ Sur la base de ces observations, nous avons pensé qu'il serait intéressant de rechercher des mutations de la lamine A chez les patients souffrant de SMD et SMP avec une thrombocytose, en particulier celle engendrant la progérine.

Les différentes causes de thrombocytose

La thrombocytose se traduit par une augmentation du nombre de plaquettes dans le sang (la norme se situant entre 150 et 450 G/l). Elle peut être provoquée par de multiples causes héréditaires ou acquises.

Les thrombocytoses héréditaires ou congénitales sont rares. La thrombocytémie familiale est une des causes de thrombocytose héréditaire. Elle se caractérise par une transmission autosomique dominante avec haute pénétrance et une hémato-poïèse polyclonale. Elle n'affecte que la lignée mégacaryocytaire. Plusieurs mutations ont été mises en évidence sur les gènes de la thrombopoïétine ou du récepteur de la thrombopoïétine (MPL). Ces mutations engendrent soit une forte concentration de thrombopoïétine (si la mutation se situe sur le gène de la thrombopoïétine : avec secondairement une augmentation du nombre de plaquettes) soit une augmentation du compte plaquettaire sans augmentation du taux de thrombopoïétine (si la mutation se trouve sur MPL).²⁰

Les thrombocytoses acquises sont les formes les plus fréquentes. Elles peuvent être primaires ou secondaires. La forme secondaire ou réactionnelle est la plus répandue (>85% de tous les types de thrombocytoses). Cette thrombocytose s'observe dans certaines situations comme une infection, une inflammation chronique, une anémie hémolytique, une carence en fer, un processus néoplasique, une pathologie rénale, après une splénectomie ou après des dommages tissulaires (chirurgie). Ces événements provoquent une augmentation aiguë, transitoire ou prolongée du compte plaquettaire. On observe également des causes plus rares comme la thrombocytose de rebond (récupération après une myélosuppression) qui peut provoquer une forte augmentation des plaquettes. On parle de thrombocytose réactive lorsque la hausse des plaquettes est due à la forte augmentation des cytokines et des lymphokines provoquée par ces différentes causes.²¹ Les cytokines mises en évidence dans l'augmentation des plaquettes sont l'interleukine 6 et le l'interféron gamma. En effet l'administration de facteur de transcription mimant l'interféron gamma conduit à la correction de la thrombocytopenie dans un modèle génétique.²² L'interleukine 6 quand à elle stimule la production de thrombopoïétine par le foie.^{23,24,25} D'autres cytokines comme l'interleukine 1 et 4, la thrombopoïétine, l'interféron gamma et le TNF- α sont impliquées dans la hausse du compte plaquettaire. Les plaquettes retournent à la normale une fois la cause de la thrombocytose résolue.²¹

La splénectomie est une cause connue et prévisible de thrombocytose réactionnelle. La rate joue un rôle majeur dans la destruction des thrombocytes. On observe donc fréquemment une augmentation des plaquettes après une splénectomie. Elle se développe chez 75% des individus ayant subis cette intervention sans qu'il y est une autre cause mise en évidence.²⁶ L'augmentation varie de 30 à 100%. La hausse atteint son maximum entre 7 et 20 jours. Les complications (hémorragies, thromboses) ne surviennent que chez 5% des patients. Ces complications sont le plus souvent liées à un compte plaquettaire supérieur à 600-800G/l. Le nombre des plaquettes retourne à la normale après quelques semaines, mois ou plus rarement après plusieurs années.²⁷

Les thrombocytoses primaires ou autonomes sont dues à certaines hémopathies comme les SMD et les SMP et certains cas de leucémie myéloïde aiguë. Il est très important de distinguer une thrombocytose réactionnelle d'une thrombocytose

primaire car la prise en charge et le traitement est différent. Ces thrombocytoses se distinguent des thrombocytoses réactionnelles par une augmentation des plaquettes qui ne dépend pas des facteurs de croissances. Il faut penser à une thrombocytose autonome en cas de thrombocytose chronique, d'une absence de carence en fer, de rate intacte, de symptômes vasomoteurs et de complications thromboembolique et hémorragique. Un examen complet du sang avec une investigation de la répartition des leucocytes et l'observation du frottis sanguin apportent des informations supplémentaires pour distinguer une thrombocytose primaire d'une secondaire. D'autres examens comme la recherche d'anomalies cytogénétiques et l'analyse de la ponction-aspiration de moelle osseuse avec biopsie ostéo-médullaire permettent d'exclure ou de mettre en évidence une hémopathie.²¹ La Figure 2 résume les différentes causes de thrombocytose primaire.

Hémopathies et thrombocytose

Les hémopathies peuvent provoquer de multiples anomalies sanguines. Certaines de ces hémopathies sont connues pour engendrer des thrombocytoses.

Les SMD provoquent le plus souvent des thrombopénies mais tous les types de SMD peuvent également engendrer des thrombocytoses. On note cependant que certaines catégories de SMD s'associent plus souvent que d'autres à une augmentation du compte plaquettaire.

C'est le cas du syndrome 5q- qui se caractérise par une anémie macrocytaire, des mégacaryocytes hypolobés et un compte plaquettaire normal ou augmenté. Ce syndrome est de bon pronostic avec uniquement 10% des patients qui développe une leucémie myéloïde aiguë. Ce type de SMD représente, selon l'OMS, une entité à part entière qui se définit par une blastose médullaire inférieure à 5% et une délétion sur le long bras du chromosome 5. Si des anomalies chromosomiques supplémentaires sont présentes le pronostic est moins favorable.²⁸

Le syndrome 3q21q26 est rencontré au cours d'une leucémie myéloïde aiguë ou d'un SMD de haut grade. Ce syndrome est caractérisé par une anémie, une leucopénie et un compte plaquettaire normal ou augmenté. Dans la moelle osseuse, on trouve classiquement des mégacaryocytes dysplasiques et hyperplasiques avec une hausse des micromégacaryocytes. Les aberrations chromosomiques provoquées par la mutation engendrent la sur-expression d'un proto-oncogène (EVI1). Les mécanismes ne sont pas encore connus, mais on observe que la différenciation des lignées érythroïdes et myéloïdes est fortement diminuée et que la lignée mégacaryocytaire montre une hyperplasie marquée. Ce syndrome présente des points communs avec le syndrome 5q-. En effet les 2 entités présentent un processus primaire myélodysplasique avec une thrombocytose. En revanche le syndrome 3q21q26 répond mal aux différents traitements et est de mauvais pronostic.²⁹

L'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne est un sous-type de SMD qui peut parfois être associé avec une thrombocytose. Ce syndrome est caractérisé par des changements morphologiques de la moelle avec la présence concomitante d'une augmentation des mégacaryocytes avec thrombocytose, de sidéroblastes en couronnes et moins de 5% de blastes.³⁰ Aujourd'hui il n'est pas clair si cette situation est la conséquence d'une variante d'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronnes, d'une variante de TE ou de deux maladie distincte simultanées (une anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronnes et une TE). Selon Wang et al., la mutation JAK2V617F est présente chez 50% des patients avec une thrombocytose supérieure à 600 G/l. L'hypothèse serait donc que la mutation JAK2V617F engendrerait la prolifération hématopoïétique comme dans les SMP.³¹

Les SMP (PV, TE, MP) provoquent par définition une augmentation d'une lignée cellulaire. Fréquemment cette augmentation se retrouve dans plusieurs lignées. La thrombocytose peut donc être présente dans tous les sous-types de SMP. Dans la thrombocytémie essentielle, l'augmentation du compte plaquettaire est toujours présente.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) fait partie des syndromes myéloprolifératifs. Ce type de leucémie représente environ 15 à 20% des leucémies de l'adulte.³² Elle est caractérisée par une production dérégulée et une prolifération incontrôlable de la lignée myéloïde sans bloc de maturation. Cette maladie est caractérisée par une translocation équilibrée entre le chromosome 22 et le bras long du chromosome 9. Cette translocation provoque la fusion du gène BCR (chromosome 22) et de l'oncogène ABL1 (chromosome 9) qui forme le gène BCR-ABL1. Ce gène de fusion se trouve sur le chromosome 22 qui est alors appelé « chromosome de Philadelphie ». Il est exprimé par une vaste majorité des cellules myéloïdes et quelques cellules lymphoïdes.³³ La mutation est présente chez 95% des patients atteint de LMC.³²

L'oncogène BCR-ABL1 a une activité tyrosine kinase qui conduit à la pathogénèse de la LMC en favorisant la survie, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Cette maladie est typiquement diagnostiquée durant la phase chronique (85% à 90% des cas³²). Sans traitement la maladie évolue généralement vers la phase d'accélération, puis finalement vers la phase blastique (en moyenne 3 à 5 ans après le début de la maladie³²). L'imatinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase (TKI) qui supprime l'activation des voies oncogéniques dans les cellules exprimant la mutation. Il permet une augmentation de la survie, mais pas la guérison.³⁴ Il existe à présent d'autres TKI qui peuvent être administrés en première, deuxième ou troisième ligne.

La LMC peut se présenter avec un compte plaquettaire normal ou augmenté. Un nombre de thrombocytes supérieur à 600 G/l est détecté chez 15 à 30% des patients. La thrombocytose peut aussi être la seule manifestation de la LMC. La biopsie ostéo-médullaire montre une hyperplasie des mégacaryocytes et des granulocytes.³²

Méthode:

Sélection des patients:

Ce travail est une étude rétrospective qui a été approuvée par la Commission cantonale (VD) d'éthique de la recherche sur l'être humain. Pour réunir les différents sujets de l'étude, les dossiers du Service d'hématologie du CHUV ont été consultés afin de sélectionner tous les patients souffrant de SMD ou SMP. Chaque dossier a été ensuite étudié afin d'établir une base de données cliniques. La liste des patients souffrant de SMD/SMP avec tous les paramètres relevés figure dans l'annexe. La Figure 3 illustre la démarche utilisée pour inclure les patients dans l'étude. Le critère d'inclusion des sujets est une thrombocytose supérieure à 400 G/l au moment du diagnostic. La liste des patients retenus pour analyse et certains des paramètres relevés pour chacun d'entre eux figure dans le Tableau 1.

Biologie moléculaire:

Dans la maladie de Hutchinson-Gilford la mutation qui se trouve sur le gène de la lamine A (LMNA) provoque une forte augmentation de l'utilisation d'un site de splicing alternatif habituellement peu utilisé. Le splicing, induit par la mutation, engendre un ARNm tronqué de 150pb et une protéine tronquée de 50 acides aminés, la progérine. La mutation 1824C>T a été recherchée de manière indirecte, en examinant la taille des ARNm produit du gène LMNA, l'ARNm de la progérine étant attendu 150pb inférieur à celui de la LMNA. Dans ce but, l'ADNc obtenu par transcription inverse de l'ARNm des cellules isolées du sang périphérique des patients sélectionnés a été amplifié par une PCR spécifique de la zone d'intérêt sur la LMNA, et le produit de PCR analysé sur gel d'agarose pour la détermination de la taille (510pb pour la lamine A, 360pb pour la progérine).

Les analyses ont été réalisées au laboratoire de biologie moléculaire du service d'hématologie du CHUV sous la responsabilité du Dr Claire Abbal, PhD (cheffe du laboratoire de biologie moléculaire du service d'hématologie du CHUV) avec l'aide de Mme Monica Azevedo, technicienne en analyses biomédicales. Sur les 33 patients retenus pour l'étude, du matériel congelé était conservé au laboratoire pour 22 d'entre eux et 18 ont pu être soumis à l'analyse. Pour 10 patients il y avait de l'ADNc obtenu à partir de cellules mononuclées (matériel précédemment utilisé pour la détection de la mutation BCR-ABL1), prêt à être amplifié par PCR. Pour 8 patients, il y avait des granulocytes lysés dans un tampon pour extraction d'ARN (matériel précédemment utilisé pour la détection de la mutation JAK2). Pour ces 7 patients une extraction d'ARN a été faite, suivie d'une étape de transcription inverse pour obtenir de l'ADNc prêt à être amplifié.

Pour amplifier la région d'intérêt par PCR, nous avons utilisé des primers publiés.³⁵ Les 2 primers utilisés sont localisés sur l'exon 9 et sur l'exon 12 du gène LMNA :

LMNA-RT9F: 5'-GTGGAAGGCACAGAACACCT-3'.

LMNA-RT12R: 5'-GTGAGGAGGACGCAGGAA-3'.

Avec ces primers, la taille attendue du produit de PCR était de:

510 bp, LMNA.

360 bp, progérine.

D'après la littérature³⁶ la lignée cellulaire K562 exprime la lamine A. Comme le laboratoire de biologie moléculaire dispose d'ADNc de K562, nous avons utilisé l'ADNc des cellules de la lignée cellulaire K562 comme contrôle positif. La mise au point de la PCR a été réalisée sur ce matériel. Les conditions optimales ont été les suivantes:

Mix de PCR :

ADNc 100 ng/reaction.

LMNA-RT9F 400 nM.

LMNA-RT12R 400 nM.

dNTPS 0.25 mM.

Top Taq 6.25 U/reaction.

Buffer Top Taq 1X.

H2O qsp 20 ul.

Programme thermique:

1X 95°C, 5 minutes.

35X 95°C, 30 sec; 68°C, 45 sec; 72°C, 2 min.

1X 72°C, 10 min.

Résultats:

Sur gel (Figure 4), on observe une bande unique se positionnant vers les 500-550 bp d'après le marqueur de poids moléculaire qui donne un signal toutes les 50bp (visible de part et d'autre des 4 échantillons de K562 analysés). Le séquençage du produit de PCR (Microsynth SA) a permis de prouver qu'il s'agissait bien de la lamine A. La Figure 5 montre la séquence de la lamine A, la zone délétée dans la progérine et les primers utilisés. Le résultat du séquençage du produit de PCR de 510bp démontrant qu'il s'agit bien de la lamine A constitue la Figure 6.

La Figure 7 affiche les produits des PCR pour les 18 patients analysés. Nous avons utilisés 4 patients contrôles du laboratoire de biologie moléculaire. Chez ces 4 patients, la lamine A est présente sans mutation, comme en témoigne la bande à la

hauteur de 510bp sur le gel (absence d'expression de la progérine : pas de bande à la hauteur de 360bp). Les patients dont les échantillons étaient de l'ARN issus de granulocytes sont tous négatifs pour la mutation de la LMNA. Parmi ces patients, on note toutefois que 3 échantillons présentaient de l'ARN de mauvaise qualité ce qui donne des bandes de poids moléculaire plus faibles que l'on peut attribuer à des produits de dégradation. Les analyses faites sur les échantillons de cellules mononucléées montrent également l'absence de mutation de la lamine A (progérine) chez tous les patients sauf 2. Chez les patients numéro 3 et 18, on note la présence d'une bande au environ des 360pb, qui pourrait correspondre à la progérine (Figure 7). Le Tableau 1 affiche les résultats des analyses ainsi que les patients qui n'ont pas pu être testés pour la mutation.

Discussion/Conclusion:

Nos résultats montrent que la lamine A est présente chez tous les patients testés ainsi que dans le contrôle (lignée cellulaire K652). Il est intéressant de noter que plusieurs publications antérieures ont rapporté que les cellules hématopoïétiques n'exprimeraient pas la lamine A.^{37,38,39} Les articles 37 et 38 ont été publiés il y a 15-20 ans et les méthodes utilisées pour la détection de la lamine A étaient moins sensible que la méthode PCR (par exemple, immunohistochimie, western blot). Ce sont ces 2 références qui sont citées dans la très récente revue de Burke & Stewart publiée dans « Nature Reviews, Molecular Cell Biology ». ³⁹ Nous n'avons cependant pas étudié l'expression de lamine A et de progérine dans les cellules hématopoïétiques normales.

Les échantillons de 3 patients dont l'ARN a été extrait à partir de granulocytes présentent plusieurs bandes dont 1 se situe à la hauteur de 360bp. Cependant, les prélèvements dataient de plusieurs années et nous avons du refaire une extraction d'ADNc à partir d'ARN endommagé. Nous suspectons donc fortement que ces bandes y compris celle à la hauteur de 360bp correspondent à des produits de dégradation.

En revanche, les patients numéro 3 et 18 montrent une bande à la hauteur de 510 bp correspondant à la lamine A et une bande de faible intensité à la hauteur de 360bp pouvant évoquer la présence de progérine dans ces échantillons. Les échantillons à disposition pour ces 2 patients étaient constitués par de l'ADNc. Pour le patient 3, il nous reste à disposition de l'ADN génomique. Nous allons utiliser ce dernier échantillon pour vérifier notre observation.

Il serait intéressant de mettre au point une PCR quantitative pour établir le rapport entre l'expression de la progérine et celle de la lamine A pour mener une étude sur ce sujet dans l'hématopoïèse et les hémopathies malignes en général. En effet, comme la mutation engendrant l'expression de la progérine augmente l'utilisation d'un site d'épissage normalement peu utilisé, il est concevable qu'il existe au niveau des tissus exprimant la lamine A un contrôle du switch d'épissage lamine

A/progérine, ce qui pourrait avoir un impact important sur la survie cellulaire. Une étude de la proportion entre expression de lamine A et de progérine dans l'hématopoïèse normale et les hémopathies malignes constituerait un projet original et la méthodologie à utiliser pourrait en partie se baser sur la publication récente de Lopes-Mejia et al.⁸ La base de données cliniques constituée lors de ce travail de master pourrait être utilisée pour une étude élargie à tous les SMD/SMP étudiés et non seulement restreinte à ceux avec une thrombocytose (cf. annexe). Elargir le champ des recherches à d'autres hémopathies malignes que les SMD/SMP permettrait d'observer si, pour une pathologie donnée, le pourcentage de progérine par rapport à la lamine A augmente, ou au contraire, diminue avec l'évolution de la maladie.

En conclusion, ce travail a révélé qu'il serait très intéressant d'étudier le rôle potentiel des lamines nucléaires et en particulier de la lamine A et de la progérine dans l'hématopoïèse et le développement des SMD/SMP et d'autres hémopathies malignes. Il a donc ouvert la voie pour de futurs projets de recherche.

Références:

1. Jekarl DW, Han SB, Kim M, Lim J, Oh EJ, Kim J, et al. JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia. *The Korean Journal of Hematology*. 2010 mars; 45 (1): 46-50.
 2. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Wart JJJ, Vellenga E, de Wolf JTM. Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndromes and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death. *Leukemia*. 2006; 20 (11): 1937-1942.
 3. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Wart JJJ, Louwes H, Esselink MT, Smit JW, et al. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood*. 2009 may; 105 (9): 3472-3479.
 4. Girtovitis FI, Ntaios G, Papadopoulos A, Ioannidis G, Makris PE. Defective platelet aggregation in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematologica*. 2007; 118 (2): 117-122.
 5. Harrison CN. Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2005: 409-415.
 6. Maraldi NM, Capanni C, Cenni V, Fini M, Lattanzi G. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010 december.
 7. Pollex RL, Hegele RA. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clinical Genetics*. 2004 november; 66(5): 375-81.
 8. Lopez-Mejia IC, Vautrot V, De Toledo M, Behm-Ansmant I, Bourgeois CF, Navarro CL et al. A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Human Molecular Genetics*. 2011 august; 20 (23): 4540-4555.
 9. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2003; 423: 293-298.
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003;300:2055.
- Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*. 2008; 22: 832-853.
- Worman H.J, Fong L.G, Muchir A, Young SG. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J. Clin. Invest*. 2009; 119: 1825-1836.
- Worman HJ, Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res*. 2007; 313: 2121-2133.
- Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*. 2005; 437: 564-568.

Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nature. Cell Biol.* 2008; 10: 452-459.

Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103: 8703-8708.

10. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003; 423: 293-298.

De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003;300:2055.

Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nature. Cell Biol.* 2008; 10: 452-459.

Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 8703-8708.

Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K, Collins FS. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007;104: 4949-4954.

11. Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America.* 2010 april; 24 (2): 317-330.

12. Will B, Zhou L, Vogler TO, Ben-Neriah S, Schinke C, Tamari N, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood.* 2012 july.

13. Vigna E, Recchia AG, Madeo A, Gentile M, Bossio S, Mazzone C, et al. Epigenetic regulation in myelodysplastic syndromes: implications for therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2011 april; 20 (4): 465-493.

14. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clinical epigenetics.* 2011 august; 2 (2): 197-212.

15. Waterham HR, Koster J, Mooyer P, Noort GV, Kelley RI, Wilcox WR, et al. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *American Journal of Human Genetics.* 2003 april; 72 (4): 1013-1017.

16. Cohen TV, Klarmann KD, Sakchaisri K, Cooper JP, Kuhns D, Anver M, et al. The lamin B receptor under transcriptional control of C/EBPepsilon is required for morphological but not functional maturation of neutrophils. *Human Molecular Genetics.* 2008 october; 17 (19): 2921-2933.

17. Hoffman K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, et al. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nature Genetics.* 2002 august; 31 (4): 410-414.

18. Van Berlo JH, Voncken JW, Kubben N, Broers JLV, Duisters R, Van Leeuwen REW, et al. A-type lamins are essential for TGF-beta1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Human Molecular Genetics*. 2005 october; 14 (19): 2839-2849.
19. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith ACM, Perry MB, et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2008 february; 358 (6): 592-604.
20. Zhang B, Ng D, Jones C, Oh ST, Nolan GP, Salehi S, et al. A Novel Splice Donor Mutation in the Thrombopoietin Gene Leads to Exon 2 Skipping in a Filipino Family with Hereditary Thrombocythemia. *Blood*. 2011 december; 118 (26): 6988-6990.
21. Sulai NH, Tefferi A. Why does my patient have thrombocytosis?. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2012 april; 26 (2): 285-301.
22. Huang Z, Richmond TD, Muntean AG, Barber DL, Weiss MJ, Crispino JD. STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2007 december; 117 (12): 3890-3899.
23. Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Négrier S, et al. Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *International Journal of cancer*. 1997 july; 72 (3): 424-430.
24. Barton BE. The biological effects of interleukin-6. *Med Res Rev*. 1996 january; 16 (1): 87-109.
25. Takagi M, Egawa T, Motomura T, Sakuma-Mochizuki J, Nishimoto N, Kasayama S, et al. Interleukin-6 secreting pheochromocytoma associated with clinical markers of inflammation. *Clinical endocrinology*. 1997 april; 46 (4): 507-509.
26. Boxer MA, Braun J, Ellman L. Thromboembolic risk of postsplenectomy thrombocytosis. *Archives of surgery*. 1978 july; 113 (7): 808-809.
27. Khan PN, Nair RJ, Olivares J, Tingle LE, Li Z. Postsplenectomy reactive thrombocytosis. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2009 january; 22 (1): 9-12.
28. Boulwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, Wainscoat JS. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*. 2010 december; 116 (26): 5803-5811.
29. Lin P, Luthra R, Nussenzveig R, Medeiros LJ. JAK2V617F mutation is uncommon in patients with the 3q21q26 syndrome. *Human Pathology*. 2010 may; 41 (5): 758-762.
30. Ziarkiewicz M, Dwilewicz-Trojaaczek J, Pastwinska A, Chmarzynska E, Paszkowska-Kowalewska M, Koperski L, et al. Refractory anaemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T) with superimposed 5q- syndrome. *Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists*. 2010; 61 (2): 105-109.
31. Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*. 2006 september; 20 (9): 1641-1644.

32. Torgerson SR, Haddad RY, Atallah E. Chronic myelogenous leukemia for primary care physicians. *Disease-a-Month*. 2012 april; 58 (4): 168-176.
33. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *The Journal of clinical investigation*. 2010 july; 120 (7): 2254-2264.
34. Quintás-Cardama A, Qiu YH, Post SM, Zhang Y, Creighton CJ, Cortes J, et al. Reverse phase protein array profiling reveals distinct proteomic signatures associated with chronic myeloid leukemia progression and with chronic phase in the CD34-positive compartment. *Cancer*. 2012 april.
35. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 2006 may; 312 (5776): 1059-63.
36. Lin F, Worman HJ. Expression of nuclear lamins in human tissues and cancer cell lines and transcription from the promoters of the lamin A/C and B1 genes. *Experimental cell research*. 1997 november; 236 (2): 378-384.
37. Broers JL, Machiels BM, Kuijpers HJ, Smedts F, van den Kieboom R, Raymond Y, et al. A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol*. 1997 jun; 107 (6): 505-517.
38. Röber RA, Sauter H, Weber K, Osborn M. Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *Journal of Cell Science*. 1990 April; 95 (Pt 4): 587-98.
39. Burke B, Stewart CL. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012 December.

Tables:

Tableau 1: Liste des patients inclus dans l'étude.

No.	Age	Sexe	Type SMD/SMP	Hb diag g/l	Leuco diag G/l	Thrombo diag G/l	Mutation JAK2	Mutation LMNA
1	1932	M	PV	179	11.8	698	positif	négatif
2	1949	M	TE	159	8.1	591	négatif	négatif
3	1941	M	PV	184	24	517	positif	positif?
4	1943	M	TE	168	14.6	734	positif	pas analysé
5	1952	F	TE	147	12.3	1102	?	négatif
6	1922	M	TE	113	8.7	825	positif	négatif
7	1923	M	PV	182	12	429	positif	pas analysé
8	1968	F	TE	143	4.2	769	négatif	négatif
9	1948	M	TE	136	8	746	positif	négatif
10	1926	F	PV	134	14	436	positif	pas analysé
11	1923	M	TE	102	13.4	504	négatif	négatif
12	1965	M	TE	149	7	1011	positif	pas analysé
13	1952	M	PV	212	12.2	473	positif	pas analysé
14	1964	M	TE	139	4	559	négatif	pas analysé
15	1938	F	PV	193	10	621	positif	négatif
16	1962	F	PV	144	22.2	597	positif	pas analysé
17	1955	M	TE	171	11.4	624	positif	négatif
18	1940	M	TE	126	14	663	positif	positif?
19	1943	M	MF	100	25.4	1240	positif	pas analysé
20	1955	M	PV	168	14.3	523	positif	pas analysé
21	1934	F	TE	125	6.2	607	positif	pas analysé
22	1963	F	TE	137	6.6	863	négatif	négatif
23	1922	F	PV	155	8.6	793	positif	négatif
24	1939	F	TE	155	7.8	964	positif	négatif
25	1928	M	PV	192	10.2	578	positif	pas analysé
26	1956	M	PV	183	11.7	563	positif	pas analysé
27	1942	M	TE	144	6.7	504	positif	négatif
28	1939	M	PV	158	7.2	400	positif	négatif
29	1929	F	TE	62	12.8	907	positif	négatif
30	1932	F	TE	132	19	836	positif	négatif
31	1929	F	MF	106	7	501	négatif	pas analysé
32	1954	M	MF	113	12.6	865	négatif	pas analysé
33	1961	M	PV	165	10.8	482	positif	pas analysé

Figures:

Figure 1: Ce schéma illustre 3 différentes formes d'ARNm de LMNA. Le schéma de la progérine montre le site de splicing. Les exons sont représentés par les carrés numérotés et les introns par les lignes.



Lopez-Mejia IC, Vautrot V, De Toledo M, Behm-Ansmant I, Bourgeois CF, Navarro CL et al. A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. Human Molecular Genetics. 2011 august; 20 (23): 4540-4555.

Figure 2: Causes de thrombocytoses primaires (autonomes).

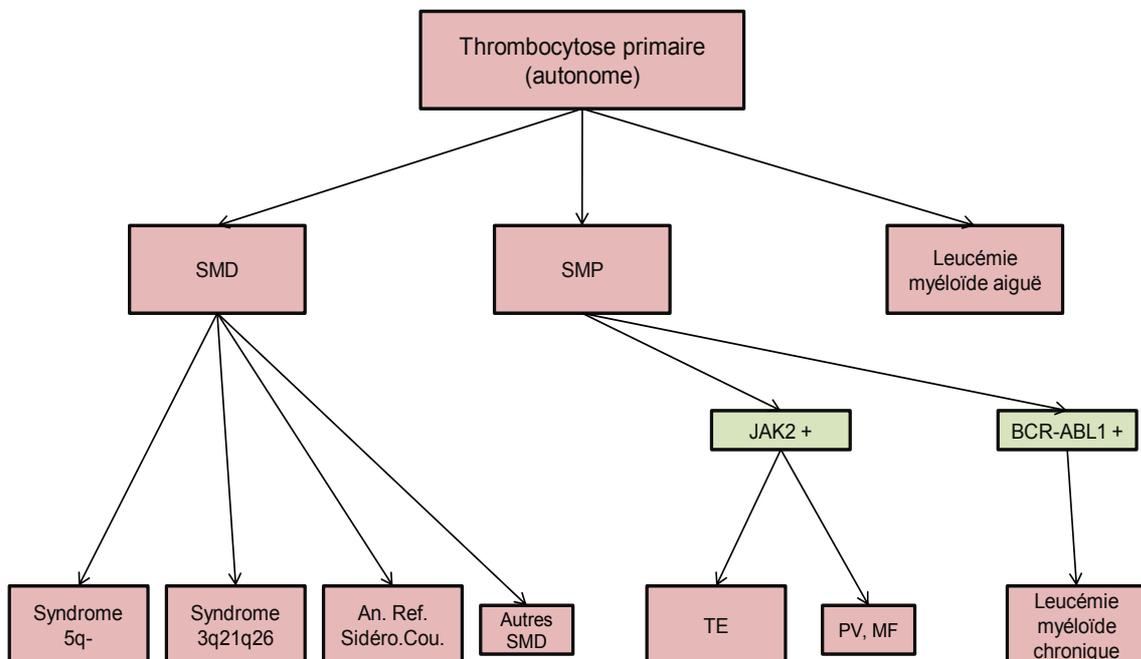


Figure 3: Sélection des sujets de l'étude.

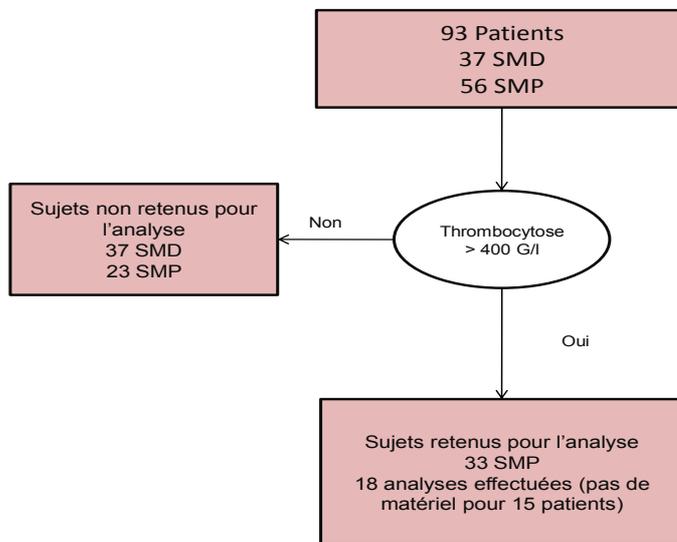


Figure 4: Produit de PCR à partir d'ADNc de K562 (PCR faite en quadruplicat) sur un gel d'agarose 2% (+BET), en incluant un size ladder (50 bp size ladder) introduit de part et d'autre des échantillons. Révélation sous UV et photo.

Les numéros 1 à 4 indiquent les différents échantillons analysés.

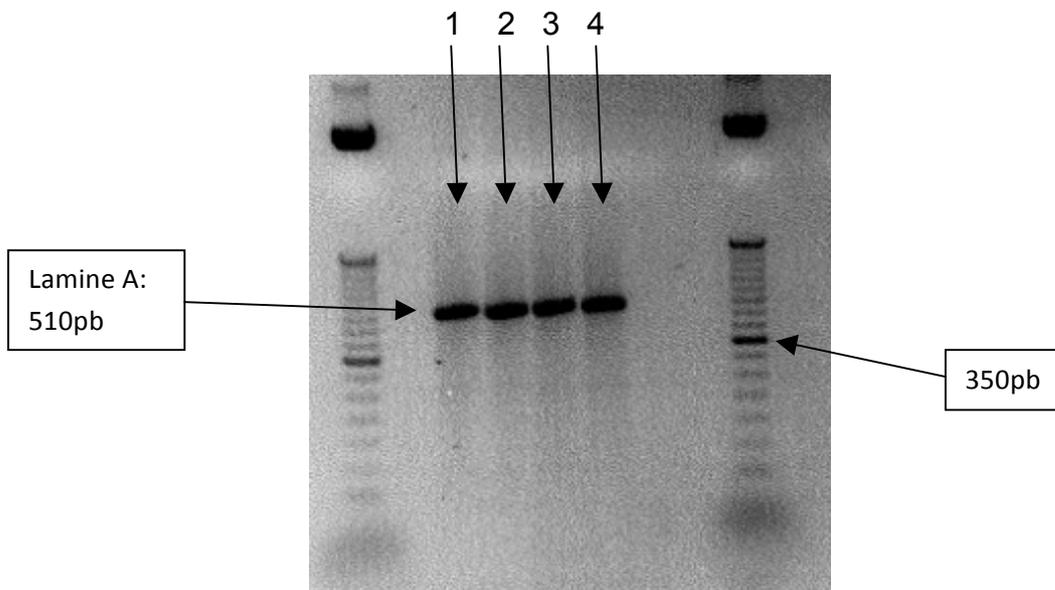


Figure 5: Séquence de la lamine A. En bleu, début de la séquence de la lamine A. En vert, zone de liaison avec les primers. En jaune, zone délétée dans la progérine. En rouge, séquence obtenue avec le primer sens (méthode Sanger). Dans la progéria le C encadré devient un T.

LMNA, transcript variant 1, mRNA. NM_170707.3/gi383792147

```

1  aggaggacct  attagagcct  ttgccccggc  gtcggtgact  cagtgttcgc  gggagcgcgc
61  cacctacacc  agccaacca  gatcccagag  tccgacagcg  cccggcccag  atccccacgc
121  ctgccaggag  caagccgaga  gccagccggc  cggcgcactc  cgactccgag  cagtctctgt
181  ccttcgacc  gagccccgcg  ccctttccgg  gacccctgcc  ccgcgggcag  cgctgccaac
241  ctgccggcca  tggagacccc  gtcccagcgg  cgcgccaccc  gcagcggggc  gcaggccagc
301  tccactccgc  tgtcgccacc  ccgcatcacc  cggctgcagg  agaaggagga  cctgcaggag
361  ctcaatgatc  gcttggcggg  ctacatcgac  cgtgtgcgct  cgctggaaac  ggagaacgca
421  gggctgcgcc  ttcgcatcac  cgagtctgaa  gagggtgtca  gccgcgaggt  gtccggcatc
481  aaggccgcct  acgaggccga  gctcggggat  gcccgaaga  cccttgactc  agtagccaag
541  gagcgcgccc  gcctgcagct  ggagctgagc  aaagtgcgtg  aggagttaa  ggagtgaaa
601  gcgcgcaata  ccaagaagga  gggtgacctg  atagctgctc  aggctcggct  gaaggacctg
661  gaggctctgc  tgaactccaa  ggaggccgca  ctgagcactg  ctctcagtga  gaagcgcacg
721  ctggagggcg  agctgcatga  tctgcggggc  cagggtggcca  agcttgaggc  agccctaggt
781  gaggccaaga  agcaacttca  ggatgagatg  ctgcggcggg  tggatgctga  gaacaggctg
841  cagaccatga  aggaggaact  ggacttccag  aagaacatct  acagtgagga  gctgcgtgag
901  accaagcgc  gtcatgagac  ccgactggtg  gagattgaca  atgggaagca  gcgtgagttt
961  gagagccggc  tggcggatgc  gctgcaggaa  ctgcggggcc  agcatgagga  ccaggtggag
1021  cagtataaga  aggagctgga  gaagacttat  tctgccaagc  tggacaatgc  caggcagtct
1081  gctgagagga  acagcaacct  ggtgggggct  gcccacgagg  agctgcagca  gtcgcgcctc
1141  cgcctcgaca  gcctctctgc  ccagctcagc  cagctccaga  agcagctggc  agccaaggag
1201  gcgaagcttc  gagacctgga  ggactcactg  gcccgtagc  gggacaccag  ccggcggctg
1261  ctggcggaaa  aggagcggga  gatggccgag  atgcgggcaa  ggatgcagca  gcagctggac
1321  gagtaccagg  agcttctgga  catcaagctg  gccctggaca  tggagatcca  cgctaccgc
1381  aagctcttgg  agggcgagga  ggagaggcta  cgctgtccc  ccagccctac  ctgcagcgc
1441  agcctgtggc  gtgcttctc  tcaactatcc  cagacacagg  gtggggcag  cgtcaccaa
1501  aagcgcaaac  tggagtccac  tgagagccgc  agcagcttct  cacagcagc  acgactagc
1561  gggcgcgctg  ccgtggagga  ggtggatgag  gagggaagt  ttgtccggct  gcgcaacaag
1621  tccaatgagg  accagtccat  gggcaattgg  cagatcaagc  gccacaatgg  agatgatccc
1681  ttgctgactt  accggttccc  accaaagttc  accctgaagg  ctgggcaggt  ggtgacgatc
1741  tgggctgcag  gagctggggc  caccacagc  cccctaccg  acctggtgtg gaaggcacag
1801  aacacctggg  gctgcgggaa  cagcctgctg  acggctctca  tcaactccac  tggggaagaa
1861  gtggccatgc gcaagctggt gcgctcagtg actgtggtt aggacgacga ggatgaggat
1921  ggagatgacc tgctccatca ccaccacggc tccactgca gcagctcggg ggaccccgct
1981  gagtacaacc tgcgctcgg caccgtgctg tggggacct gcgggcagcc tgccgacaag
2041  gcatctgcca gcggctcagg agcccaggtg ggcggaccca tctctctg ctctctgccc
2101  tccagtgctc cggtcactcg cagctaccgc agtgtggggg gcagtggggg tggcagcttc
2161  ggggacaatc tggtcaccgg ctctacctc ctgggcaact ccagcccccg aacccagagc
2221  cccagaact gcagcatcat gtaatctggg acctgccagg caggggtggg ggtggaggc
2281  tctggtctc tcctcacctc  atgcccaccc  cctgcccctg  acgtcatggg  agggggcttg
2341  aagccaaaga  aaaataaacc  tttggttttt  ttcttctgta  ttttttttcc  taagagaagt
2401  tttttctac  agtggtttta  tactgaagga  aaaacacaag  caaaaaaaaa  aaaaagcatc
2461  tatctcatct  atctcaatcc  taatttctcc  tcccttctct  ttccctgctt  ccaggaaact
2521  ccacatctgc  cttaaaaacca  aagagggtct  cctctagaag  ccaagggaaa  ggggtgcttt
2581  tatagaggct  agcttctgct  tttctgcctt  ggctgctgcc  ccacccccgg  ggaccctgtg
2641  acatgggtgc  tgagagcag  gcataagagg  ttctccgcca  gcctcctctg  gacggcaggc
2701  tcaactgccg  gccagcctcc  gagagggaga  gagagagaga  gagacagct  tgagccgggc
2761  ccctgggctt  ggctgctgtg  gattocacta  cacctggctg  aggttctct  cctgcccccg
2821  cccccagctc  ccaccctgct  ccccagcccc  ggggtgagtc  cattctccca  ggtaccagct
2881  gcgcttgcct  ttctgtattt  tatttagaca  agagatggga  atgaggtggg  aggtggaaga
2941  agggagaaga  aagggtgagtt  tgagctgcct  tccctagctt  tagaccctgg  gtgggctctg
3001  tgcagtcact  ggaggttgaa  gccaaagtgg  gtgctggggg  gagggagagg  gaggtcactg
3061  gaaaggggag  agcctgctgg  caccaccgct  ggaggaggaa  ggcaagaggg  ggtggagggg
3121  tgtggcagtg  gttttggcaa  acgctaaaga  gcccttgctc  cccatttcc  catctgcacc

```

3181 ccttctctcc tccccaaatc aatacactag ttgtttctac ccttgcaaa aaaaaaaaa

Figure 6: Résultat du séquençage du produit de la PCR de contrôle K-562 (méthode Sanger).

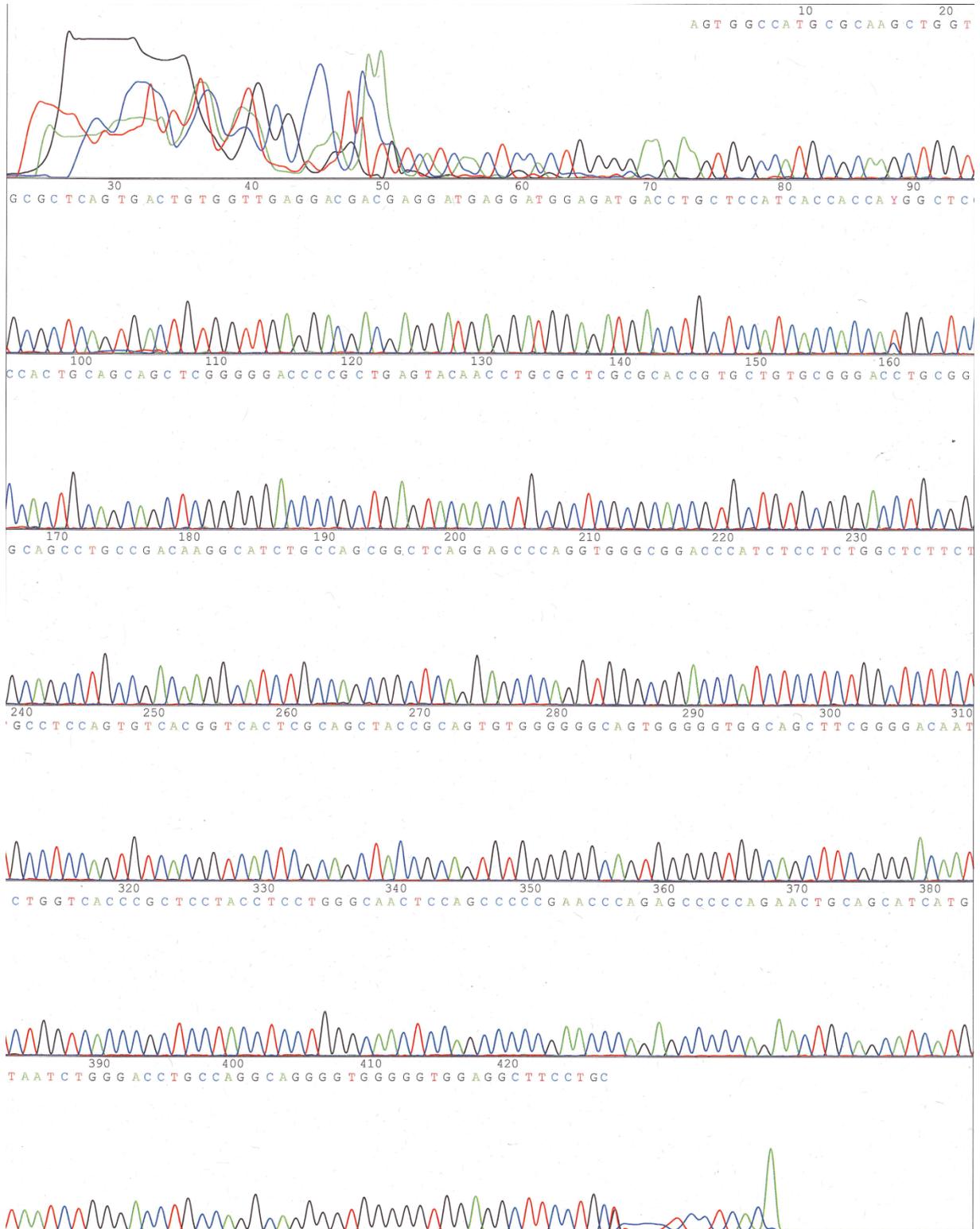
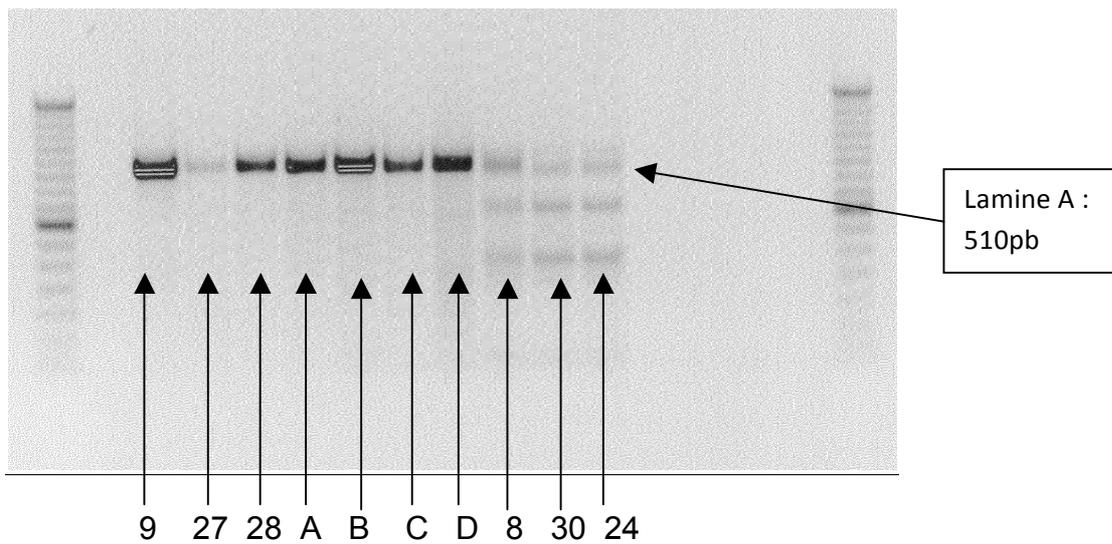
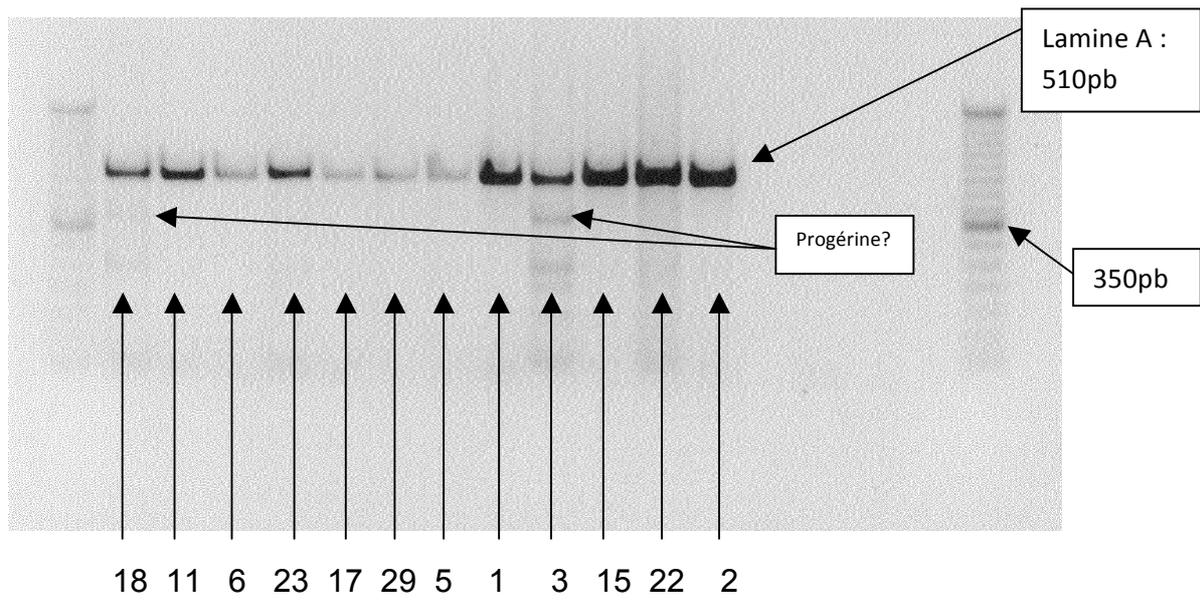


Figure 7: Produit de la PCR des patients analysés.



A, B, C, D: Patients ajoutés comme contrôles (hors sélection).

8, 30, 24: Produit de PCR issue d'ARN de granulocytes de mauvaise qualité.

11, 6, 23, 17: Produit de PCR issue d'ARN de granulocytes.

18, 29, 5, 1, 3, 15, 22, 2, 9, 27, 28: Produit de PCR issue d'ADNc de cellules mononucléés.

Annexe: Base de données patients.

NO.	SEXE	Birth	Date diag.	SMP CLASS.	SMD.FAB	SMD.WHO	SMD.IPSS	TRANSFUSION
34	M	23.08.1957	0.0.2008	###	RAEBT	AREB2	INT.1	oui
35	F	10.08.1939	08.05.2008	###	RA	RA	low risk	non
36	M	28.11.1961	25.09.2001	###	RAEB	AREB2	INT.2	non
37	M	15.06.1931	21.05.1999	PV	CMML	CMML1	low risk	non
38	F	18.01.1953	04.05.2004	###	RAEB	AREB2	high risk	non
39	M	21.05.1940	02.12.2003	###	RAEB	AREB2	INT.2	oui
40	M	09.05.1947	0.2.2009	###	CMML	CMML1	INT.1	non
41	M	15.10.1943	13.04.2010	###	RAEBT	AREB2	INT.2	non
42	M	31.01.1948	0.5.2009	###	CMML	CMML1	INT.1	non
43	F	22.12.1947	10.06.2010	###	###	RCMD	high risk	non
44	M	14.05.1949	0.9.2010	###	RARS	RARS	INT.2	non
45	F	27.04.1942	27.07.2010	###	###	RCMD	INT.2	oui
46	M	24.11.1931	26.07.2007	###	###	RCMDRS	low risk	non
47	M	08.10.1932	08.10.2009	###	RA	RA	low risk	non
48	M	25.03.1943	05.02.2008	###	RA	AREB2	low risk	non
49	M	01.01.1937	0.9.2002	###	###	###	###	non
50	M	21.07.1973	0.6.2006	###	RAEB	AREB2	high risk	oui
51	M	04.07.1933	02.12.2010	###	###	###	###	oui
52	M	24.02.1944	19.03.2010	###	###	AREB1	INT.1	non
53	M	28.03.1939	0.12.2007	###	###	RCMD	###	non
54	F	27.01.1934	0.11.2008	###	###	5q-	low risk	oui
55	F	16.03.1957	15.05.2009	###	CMML	CMML1	INT.1	non
56	M	04.06.1932	20.08.2009	###	###	AREB1	###	non
57	F	22.01.1960	19.01.2011	###	###	AREB1	low risk	non
58	F	25.10.1934	0.0.2009	###	RA	RA	low risk	oui
59	M	27.04.1922	13.03.2007	###	RAEB	AREB1	INT.1	non
60	F	06.01.1935	0.4.2010	###	###	AREB2	INT.1	non
61	M	10.08.1926	0.11.2010	###	CMML	CMML1	low risk	non
62	M	27.05.1934	0.8.2008	###	###	RCMD	INT.1	non
63	M	24.07.1939	0.0.2003	###	###	###	INT.1	non
64	M	09.01.1940	0.0.2004	###	###	sec.	INT.1	non
65	M	30.01.1926	16.09.2008	###	###	5q-	low risk	non
66	F	22.05.1963	25.01.2010	###	###	RCMD	INT.1	oui
67	M	30.01.1942	0.5.2008	###	RA	sec.	INT.2	non
68	M	04.03.1938	07.02.2011	###	###	AREB1	INT.2	non
69	M	20.08.1948	0.0.2001	###	###	RARS	###	non
70	M	01.03.1957	16.10.2002	###	RAEB	AREB2	INT.1	non
71	F	06.11.1934	0.0.2006	TE	###	###	###	non
1	M	16.06.1932	0.3.2009	PV	###	###	###	non
2	M	31.08.1949	0.0.2003	TE	###	###	###	non
3	M	21.03.1941	29.08.2000	PV	###	###	###	non
4	M	27.10.1943	0.0.2002	PV	###	###	###	non
72	M	09.01.1956	05.03.2010	PV	###	###	###	non
73	F	18.09.1947	15.07.2010	PV	###	###	###	non
74	F	04.04.1957	01.02.2007	PV	###	###	###	non
75	M	19.12.1926	0.1.2011	~MP	~CMML	~CMML1	###	non
5	F	23.08.1952	0.0.1993	TE	###	###	###	non
6	M	14.06.1922	0.10.2006	TE	###	###	###	non
76	M	25.06.1947	0.0.1999	TE	###	###	###	non
7	M	20.10.1923	0.2.2001	PV	###	###	###	non
77	M	20.01.1954	0.10.2008	PV	###	###	###	non

NO.	SEXE	Birth	Date diag.	SMP CLASS.	SMD.FAB	SMD.WHO	SMD.IPSS	TRANSFUSION
78	M	02.06.1934	04.12.2007	non-classifiable	###	###	###	non
8	F	03.01.1968	0.10.1998	TE	###	###	###	non
79	F	16.01.1941	03.01.2009	PV	###	###	###	non
9	M	05.03.1948	0.10.2009	TE	###	###	###	non
10	F	10.05.1926	0.0.2009	PV	###	###	###	non
80	M	01.01.1932	0.0.2009	TE	###	###	###	non
81	M	01.01.1963	0.8.2008	PV	###	###	###	non
11	M	09.03.1923	0.0.2002	TE	###	###	###	non
82	F	29.01.1952	0.0.1996	PV	###	###	###	non
83	M	15.02.1950	0.2.2009	PV	###	###	###	non
12	M	12.01.1965	0.5.2008	TE	###	###	###	non
84	M	33.11.1962	0.0.2004	PV	###	###	###	non
85	M	29.03.1963	23.04.2010	PV	###	###	###	non
13	M	21.06.1952	0.2.2009	PV	###	###	###	non
14	M	27.03.1964	0.0.1996	TE	###	###	###	non
15	F	19.08.1938	0.5.2009	MP	###	###	###	non
86	F	31.01.1957	06.09.2007	MP	###	###	###	non
87	M	25.12.1934	08.04.2010	TE	###	###	###	non
16	F	18.04.1962	0.5.2003	PV	###	###	###	non
88	M	02.12.1971	0.1.1996	PV	###	###	###	non
89	M	31.12.1944	0.2.2006	MP	###	###	###	non
17	M	02.04.1955	0.11.2007	TE	###	###	###	non
18	M	17.11.1940	0.4.2000	TE	###	###	###	non
90	F	04.05.1980	0.6.2008	non-classifiable	###	###	###	non
19	M	22.12.1943	0.1.2009	MP	###	###	###	non
20	M	01.05.1955	0.0.1996	PV	###	###	###	non
21	F	29.03.1934	0.0.2009	TE	###	###	###	non
22	F	25.06.1963	16.03.2010	TE	###	###	###	non
23	F	30.10.1922	26.09.1996	PV	###	###	###	non
24	F	06.02.1939	10.04.2007	TE	###	###	###	non
91	M	14.09.1964	0.0.2006	non-classifiable	###	###	###	non
25	M	03.01.1928	0.5.2009	PV	###	###	###	non
26	M	25.03.1956	0.2.2007	PV	###	###	###	non
27	M	19.09.1942	0.0.2004	TE	###	###	###	non
28	M	25.09.1939	0.7.2004	PV	###	###	###	non
29	F	15.07.1929	0.3.2008	TE	###	###	###	non
30	F	05.04.1932	31.08.2006	TE	###	###	###	non
31	F	15.11.1929	0.12.2006	MP	###	###	###	non
32	M	21.09.1954	23.07.2010	MP	###	###	###	non
92	M	11.05.1940	0.0.1988	PV	###	###	###	non
33	M	09.08.1961	0.9.2005	PV	###	###	###	non
93	M	20.06.1935	0.0.1997	PV	###	###	###	non

NO.	LMA.s.	A.LMA	PATHOL BIOP.	FIB BIOP.	CD34	MEDULLO.CELL.	GRANULO.%	MONO,%	ERYTHRO.%
34	oui	2008	hypercell.	oui	pos.	augmenté	45	3	40
35	non	###	normocell	oui	neg.	diminué	36	1.2	58
36	non	###	hypercell.	oui	pos.	diminué	###	###	###
37	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	42	9.2	38
38	non	###	hypercell.	oui	pos.	normal	52	4	5.5
39	oui	2008	hypocell.	non	neg.	diminué	###	###	###
40	non	###	normocell	oui	neg.	normal	32	5.7	46
41	non	###	###	###	###	normal	55	10	10
42	non	###	hypercell.	oui	neg.	###	###	###	###
43	oui	2010	hypercell.	oui	pos.	augmenté	13	2.4	53
44	non	###	hypercell.	oui	pos.	normal	50	0	45
45	non	###	normocell	oui	pos.	diminué	43	2	38
46	non	###	hypocell.	oui	neg.	normal	35	3	43
47	non	###	normocell	oui	neg.	normal	46	5	40
48	non	###	normocell	non	neg.	augmenté	77	5	7
49	oui	2002	###	###	###	###	###	###	###
50	non	###	normocell	non	pos.	###	###	###	###
51	oui	2010	normocell	non	pos.	normal	###	###	###
52	non	###	hypercell.	oui	neg.	normal	37	22	31
53	non	###	###	###	pos.	###	###	###	###
54	non	###	hypocell.	oui	neg.	diminué	###	###	###
55	non	###	hypercell.	oui	pos.	augmenté	51	18	28
56	non	###	hypercell.	non	pos.	augmenté	35	0	55
57	non	###	hypocell.	oui	pos.	normal	53	7.2	24
58	non	###	hypercell.	oui	neg.	diminué	31	5	22
59	non	###	hypocell.	non	pos.	diminué	14	2	44
60	non	###	hypercell.	non	pos.	augmenté	61	3	31
61	non	###	hypercell.	non	neg.	augmenté	50	17	29
62	non	###	normocell	oui	neg.	normal	31	5	33
63	oui	2003	hypercell.	###	###	augmenté	37	1	46
64	oui	2007	hypercell.	oui	neg.	normal	33	7.6	47
65	non	###	normocell	oui	pos.	augmenté	43	4	32
66	non	###	hypocell.	oui	neg.	normal	41	3	40
67	non	###	hypocell.	oui	neg.	diminué	35	2	56
68	non	###	hypercell.	oui	pos.	augmenté	37	0.8	53
69	non	###	hypercell.	non	neg.	augmenté	46	0.8	45
70	non	###	###	###	###	diminué	34	2.8	46
71	non	###	###	###	###	###	###	###	###
1	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	6	40
2	non	###	###	###	###	###	###	###	###
3	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	0.8	45
4	non	###	normocell	oui	neg.	augmenté	50	2	40
72	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	8	27
73	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	60	5	30
74	non	###	###	###	###	###	###	###	###
75	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	15	30
5	oui	2008	###	###	###	diminué	###	###	###
6	non	###	hypercell.	non	neg.	augmenté	30	1	45
76	non	###	###	###	###	###	###	###	###
7	non	###	###	###	###	###	###	###	###
77	non	###	hypercell.	non	neg.	augmenté	35	3	50

NO.	LMA.s.	A.LMA	PATHOL BIOP.	FIB BIOP.	CD34	MEDULLO.CELL.	GRANULO.%	MONO.%	ERYTHRO.%
78	non	###	hypercell.	oui	pos.	augmenté	61	4	24
8	non	###	normocell	non	neg.	normal	###	###	###
79	non	###	###	###	###	###	###	###	###
9	non	###	hypercell.	oui	pos.	augmenté	52	4	25
10	non	###	###	###	###	###	###	###	###
80	non	###	hypercell.	oui	neg.	###	###	###	###
81	non	###	normocell	non	neg.	augmenté	55	4	25
11	non	###	normocell	oui	neg.	###	###	###	###
82	non	###	###	###	###	###	###	###	###
83	non	###	hypercell.	non	neg.	augmenté	51	2	40
12	non	###	normocell	oui	neg.	augmenté	60	1	30
84	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	4	30
85	non	###	normocell	non	neg.	normal	42	3	30
13	non	###	###	###	###	###	###	###	###
14	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	###	###	###
15	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	5	35
86	non	###	hypercell.	oui	neg.	###	###	###	###
87	non	###	###	###	###	###	###	###	###
16	non	###	hypercell.	oui	neg.	normal	50	1	25
88	non	###	hypercell.	non	neg.	normal	###	###	###
89	non	###	hypercell.	oui	neg.	###	###	###	###
17	non	###	normocell	oui	neg.	normal	70	6	20
18	non	###	normocell	oui	neg.	###	###	###	###
90	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	50	5	25
19	non	###	hypercell.	oui	neg.	normal	###	###	###
20	non	###	###	###	###	###	###	###	###
21	non	###	normocell	oui	neg.	normal	35	1	35
22	non	###	hypercell.	oui	neg.	normal	45	4	35
23	non	###	hypercell.	oui	neg.	normal	50	2	30
24	non	###	normocell	non	neg.	normal	45	5	35
91	non	###	###	###	###	###	###	###	###
25	non	###	###	###	###	###	###	###	###
26	non	###	###	###	###	###	###	###	###
27	non	###	normocell	non	neg.	normal	45	3	25
28	non	###	###	###	###	###	###	###	###
29	non	###	normocell	oui	neg.	###	###	###	###
30	non	###	###	###	###	###	###	###	###
31	non	###	hypercell.	oui	neg.	###	###	###	###
32	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	60	4	20
92	non	###	###	###	###	###	###	###	###
33	non	###	hypercell.	oui	pos.	augmenté	55	4	30
93	non	###	hypercell.	oui	neg.	augmenté	45	2	45

NO.	RESERV FER	CELL.MEGACAR.	CELL.ERYT	CELL.GRANULO	MYELOB.%	GRAISSE	SIDc.	SID %
34	augmenté	normal	augmenté	diminué	23	non	oui	75
35	normal	diminué	augmenté	normal	0	oui	non	0
36	###	###	###	###	###	###	###	###
37	normal	augmenté	augmenté	normal	0.8	###	non	0
38	augmenté	normal	diminué	normal	0	oui	non	0
39	augmenté	diminué	diminué	diminué	0	###	non	0
40	augmenté	diminué	augmenté	normal	0	oui	non	0
41	augmenté	augmenté	diminué	normal	10	oui	non	0
42	###	###	###	###	0	###	###	###
43	normal	normal	augmenté	diminué	0	oui	oui	2
44	augmenté	normal	normal	normal	1	non	oui	35
45	augmenté	normal	normal	normal	1	oui	non	0
46	augmenté	normal	augmenté	normal	0.4	oui	oui	5
47	augmenté	normal	normal	normal	0.5	oui	oui	50
48	augmenté	normal	diminué	augmenté	1	oui	non	0
49	###	###	###	###	###	###	###	###
50	###	###	###	###	###	###	###	###
51	normal	diminué	normal	normal	0	oui	non	0
52	normal	normal	normal	diminué	0	oui	non	0
53	###	###	###	###	###	###	###	###
54	normal	###	###	###	###	###	###	###
55	augmenté	normal	normal	normal	1	oui	non	0
56	normal	normal	augmenté	normal	5	oui	oui	10
57	augmenté	normal	normal	normal	0	oui	non	0
58	augmenté	diminué	normal	diminué	0	oui	non	0
59	augmenté	diminué	augmenté	diminué	0	oui	non	0
60	normal	normal	normal	augmenté	5	oui	non	0
61	augmenté	normal	normal	normal	0	oui	non	0
62	augmenté	diminué	augmenté	diminué	0	oui	non	0
63	augmenté	diminué	augmenté	diminué	14	oui	non	0
64	augmenté	normal	augmenté	diminué	0.4	oui	non	0
65	normal	normal	normal	diminué	3	oui	non	0
66	augmenté	diminué	augmenté	diminué	0.3	oui	non	0
67	augmenté	normal	normal	normal	0	oui	oui	5
68	augmenté	augmenté	augmenté	diminué	1.6	oui	oui	15
69	augmenté	augmenté	augmenté	diminué	0	oui	oui	0
70	augmenté	diminué	augmenté	diminué	0.4	oui	non	0
71	###	###	###	###	###	###	###	###
1	diminué	augmenté	normal	normal	1	oui	non	0
2	###	###	###	###	###	###	###	###
3	normal	augmenté	augmenté	diminué	1.2	oui	non	0
4	augmenté	augmenté	augmenté	normal	2	oui	non	0
72	diminué	augmenté	normal	normal	0.5	non	non	0
73	augmenté	augmenté	normal	normal	1	oui	non	0
74	diminué	###	###	###	###	###	###	###
75	normal	normal	normal	normal	1	non	non	0
5	###	augmenté	diminué	normal	###	###	###	###
6	diminué	augmenté	augmenté	diminué	0	oui	non	0
76	###	###	###	###	###	###	###	###
7	###	###	###	###	###	###	###	###
77	diminué	augmenté	augmenté	normal	0	oui	non	0

NO.	RESERV FER	CELL.MEGACAR.	CELL.ERYT	CELL.GRANULO	MYELOB.%	GRAISSE	SIDc.	SID %
78	normal	augmenté	normal	normal	0	oui	non	0
8	normal	augmenté	normal	normal	0	non	non	0
79	###	###	###	###	###	###	###	###
9	normal	augmenté	normal	normal	0.5	oui	non	0
10	###	###	###	###	###	###	###	###
80	###	###	###	###	0	###	###	###
81	normal	normal	normal	normal	0	oui	non	0
11	###	###	###	###	###	###	###	###
82	###	###	###	###	###	###	###	###
83	diminué	augmenté	augmenté	normal	0	oui	non	0
12	augmenté	augmenté	normal	normal	0	oui	non	0
84	augmenté	normal	augmenté	diminué	0.5	oui	non	0
85	normal	normal	normal	diminué	0.5	oui	non	0
13	###	###	###	###	###	###	###	###
14	###	augmenté	normal	normal	###	non	non	0
15	diminué	augmenté	normal	augmenté	1	oui	non	0
86	###	###	###	###	###	###	###	###
87	###	###	###	###	###	###	###	###
16	augmenté	augmenté	normal	normal	0.5	oui	non	0
88	normal	normal	normal	normal	0.8	oui	non	0
89	###	###	###	###	###	###	non	0
17	augmenté	augmenté	normal	normal	0	oui	non	0
18	###	###	###	###	###	###	###	###
90	diminué	augmenté	normal	normal	0	oui	non	0
19	###	###	###	###	###	###	###	###
20	###	###	###	###	###	###	###	###
21	augmenté	augmenté	normal	normal	0	oui	non	0
22	normal	augmenté	augmenté	diminué	0	oui	non	0
23	normal	normal	normal	normal	0.5	oui	non	0
24	augmenté	augmenté	augmenté	normal	0	oui	non	0
91	###	###	###	###	###	###	###	###
25	###	###	###	###	###	###	###	###
26	###	###	###	###	###	###	###	###
27	augmenté	augmenté	normal	diminué	0	oui	non	0
28	###	###	###	###	###	###	###	###
29	###	###	###	###	###	###	###	###
30	###	###	###	###	###	###	###	###
31	###	###	###	###	###	###	###	###
32	augmenté	augmenté	normal	normal	0.5	oui	non	0
92	###	###	###	###	###	###	###	###
33	augmenté	augmenté	normal	normal	2	oui	non	0
93	normal	augmenté	augmenté	normal	0.5	oui	non	0

NO.	ANI	POI	Hypochro.	MIC	Hyperchro.	MAC	OVA	ERYTHROBLASTE	FRA	POC	GB hypogran.	PsP
34	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
36	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
37	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
41	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
42	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
43	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
44	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
48	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
49	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
50	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
51	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
52	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
54	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
55	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
56	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
57	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
58	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
59	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
60	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
62	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
63	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
64	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
65	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
66	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
67	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
68	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
69	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
70	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
75	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
76	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
7	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
77	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

NO.	ANI	POI	Hypochro.	MIC	Hyperchro.	MAC	OVA	ERYTHROBLASTE	FRA	POC	GB hypogran.	PSP
78	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
9	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
10	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
80	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
11	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
82	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
14	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
15	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
86	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
87	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
17	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
18	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
21	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
91	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
25	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
26	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
29	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
30	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
31	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###
33	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
93	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0

NO.	ERYTH.DPS.	LEUCO.DPS.	THROM.DPS.	HB.g/l	LEUCO.G/l	THROM.G/l	BLASTE. %	CHROMOSOME
34	diminué	diminué	diminué	74	0.8	24	0%	5q-
35	normal	normal	diminué	119	4.9	98	0%	normal
36	diminué	diminué	diminué	50	3.5	18	25%	trisomie 8
37	normal	augmenté	normal	157	18.8	184	0%	multiples
38	diminué	normal	diminué	93	4	24	0%	multiples
39	diminué	diminué	diminué	132	3.9	124	0%	normal
40	diminué	diminué	diminué	83	4.3	61	0%	trisomie 8
41	diminué	diminué	normal	88	1	129	0%	-7
42	normal	normal	normal	139	8.2	48	0%	normal
43	diminué	diminué	diminué	131	8	61	35%	-7
44	diminué	augmenté	diminué	100	14	140	2%	.-7/autre
45	diminué	diminué	diminué	71	1.7	18	0%	-7
46	diminué	diminué	diminué	118	1.8	95	0%	.-y
47	diminué	normal	normal	108	7.3	198	0%	normal
48	normal	normal	normal	76	16	190	0%	normal
49	diminué	augmenté	diminué	101	1.3	19	0%	trisomie 8
50	diminué	normal	normal	81	2.6	107	1%	t 1,3
51	diminué	diminué	diminué	85	6	38	80%	-7
52	diminué	diminué	normal	110	3.8	125	0%	normal
53	normal	normal	diminué	154	5.2	97	0%	normal
54	diminué	diminué	diminué	59	4.7	384	0%	5q-
55	diminué	augmenté	diminué	73	32	39	0%	normal
56	normal	normal	augmenté	128	4.3	30	2%	pas fait
57	diminué	augmenté	augmenté	82	0.4	71	0%	normal
58	diminué	normal	normal	80	3.8	216	0%	normal
59	diminué	diminué	diminué	104	1	75	0%	normal
60	diminué	augmenté	diminué	107	14.1	43	2%	normal
61	diminué	augmenté	diminué	100	12.2	141	0%	normal
62	diminué	diminué	diminué	135	5.2	59	0%	trisomie 8
63	diminué	normal	diminué	99	1.4	12	0%	normal
64	diminué	diminué	normal	126	3.2	155	0%	del.11q23
65	diminué	diminué	normal	104	3.4	210	0%	5q-
66	diminué	diminué	diminué	103	3.8	33	0%	normal
67	diminué	diminué	diminué	143	3.4	84	0%	-7
68	diminué	diminué	normal	67	4.1	121	3%	multiples
69	diminué	normal	augmenté	94	6.3	294	0%	pas fait
70	normal	augmenté	normal	85	3.8	35	0%	normal
71	normal	augmenté	augmenté	134	12.6	135	0%	pas fait
1	augmenté	augmenté	augmenté	179	11.8	698	0%	.-y
2	augmenté	normal	augmenté	159	8.1	591	0%	pas fait
3	diminué	augmenté	augmenté	184	24	517	0%	pas fait
4	normal	augmenté	augmenté	168	14.6	734	0%	pas fait
72	normal	augmenté	augmenté	218	13.9	286	0%	trisomie 8
73	normal	augmenté	augmenté	168	10.5	366	0%	normal
74	normal	normal	augmenté	196	6.4	267	0%	pas fait
75	normal	normal	diminué	130	4	72	0%	divers 1-2
5	diminué	diminué	augmenté	147	12.3	1102	0%	multiples
6	diminué	augmenté	augmenté	113	8.7	825	0%	divers 1-2
76	diminué	diminué	normal	147	2.6	331	0%	pas fait
7	diminué	normal	normal	182	12	429	0%	pas fait
77	augmenté	normal	normal	224	6.3	166	0%	normal

NO.	ERYTH.DPS.	LEUCO.DPS.	THROM.DPS.	HB.g/l	LEUCO.G/l	THROM.G/l	BLASTE. %	CHROMOSOME
78	augmenté	augmenté	normal	159	16.8	344	0%	normal
8	normal	normal	augmenté	143	4.2	769	0%	pas fait
79	augmenté	augmenté	augmenté	212	14.4	353	0%	pas fait
9	diminué	augmenté	augmenté	136	8	746	0%	normal
10	augmenté	augmenté	augmenté	134	14	436	0%	pas fait
80	diminué	normal	normal	78	16	454	0%	normal
81	normal	augmenté	normal	183	10.7	198	0%	pas fait
11	normal	augmenté	normal	102	13.4	504	0%	pas fait
82	augmenté	normal	normal	149	9.5	211	0%	pas fait
83	diminué	augmenté	normal	185	20	159	0%	normal
12	normal	augmenté	augmenté	149	7	1011	0%	pas fait
84	augmenté	normal	normal	161	5.5	201	0%	normal
85	normal	normal	normal	146	5.8	262	0%	normal
13	diminué	normal	diminué	212	12.2	473	0%	pas fait
14	diminué	diminué	augmenté	139	4	559	0%	normal
15	normal	augmenté	augmenté	193	10	621	0%	normal
86	diminué	diminué	diminué	111	4	51	1%	multiples
87	normal	normal	augmenté	133	7.7	382	0%	pas fait
16	diminué	normal	augmenté	144	22.2	597	0%	normal
88	diminué	normal	normal	121	4.5	257	0%	normal
89	diminué	augmenté	normal	84	8.1	216	0%	normal
17	normal	augmenté	normal	171	11.4	624	0%	pas fait
18	diminué	normal	augmenté	126	14	663	0%	normal
90	normal	normal	normal	142	8.5	316	0%	normal
19	diminué	normal	augmenté	100	25.4	1240	0%	pas fait
20	diminué	normal	normal	168	14.3	523	0%	pas fait
21	normal	normal	augmenté	125	6.2	607	0%	normal
22	normal	normal	augmenté	137	6.6	863	0%	normal
23	normal	normal	normal	155	8.6	793	0%	normal
24	normal	normal	augmenté	155	7.8	964	0%	normal
91	diminué	normal	augmenté	143	15.1	310	0%	pas fait
25	diminué	normal	normal	192	10.2	578	0%	pas fait
26	normal	normal	augmenté	183	11.7	563	0%	pas fait
27	diminué	normal	normal	144	6.7	504	0%	normal
28	normal	normal	augmenté	158	7.2	400	0%	pas fait
29	diminué	normal	normal	101	9.7	491	0%	trisomie 8
30	diminué	normal	normal	136	11.3	605	0%	pas fait
31	diminué	augmenté	augmenté	106	7	501	0%	pas fait
32	diminué	normal	augmenté	113	12.6	865	0%	.-y
92	diminué	normal	normal	159	4.4	335	0%	pas fait
33	diminué	normal	normal	165	10.8	482	0%	normal
93	diminué	augmenté	augmenté	163	10.4	289	0%	normal

NO.	PROGRESSION GEN.	MUTATION JAK2	CHIMIO	Grefe	REMISSION COMPLETE
34	non	###	lenalid/revilmide	non	non
35	non	###	non	non	non
36	oui	###	allogrefe	allogène periph	non
37	oui	oui	letalir	non	non
38	non	###	allogrefe	allogène periph	non
39	non	###	autogrefe	auto.periph	oui
40	non	###	non	non	non
41	non	###	5-azacitidine	non	non
42	non	non	allogrefe	allogène periph	oui
43	oui	###	5-azacitidine	non	non
44	non	###	5-azacitidine	non	non
45	non	###	5-azacitidine	non	non
46	non	###	non	non	non
47	non	non	non	non	non
48	non	###	ARA-c/idarubicin	non	oui
49	non	###	non	non	oui
50	non	###	ARA-c/idarubicin	allogène periph	non
51	non	###	5-azacitidine	non	non
52	non	###	5-azacitidine	non	non
53	non	###	non	non	non
54	non	###	lenalid/revilmide	non	non
55	non	non	lenalid/revilmide	allogène periph	non
56	non	###	5-azacitidine	non	non
57	non	###	ARA-c/idarubicin	non	non
58	non	###	non	non	non
59	non	###	5-azacitidine	non	non
60	non	###	5-azacitidine	non	non
61	non	###	non	non	non
62	non	###	non	non	non
63	non	###	ARA-c	non	oui
64	oui	###	letalir	non	non
65	non	###	lenalid/revilmide	non	non
66	non	###	5-azacitidine	non	non
67	oui	###	5-azacitidine	non	non
68	non	###	5-azacitidine	non	non
69	###	oui	lenalid/revilmide	non	non
70	non	###	allogrefe	allogène periph	oui
71	###	non	letalir	non	non
1	non	oui	letalir	non	non
2	###	non	letalir	non	non
3	###	oui	letalir	non	non
4	###	oui	letalir	non	non
72	non	oui	letalir	non	non
73	non	oui	letalir	non	non
74	###	oui	letalir	non	non
75	non	oui	autre	non	non
5	non	###	ARA-c	non	non
6	non	oui	letalir	non	non
76	###	non	letalir	non	non
7	###	oui	letalir	non	non
77	non	non	letalir	non	non

NO.	PROGRESSION GEN.	MUTATION JAK2	CHIMIO	Grefe	REMISSION COMPLETE
78	non	oui	non	non	non
8	###	non	interferon	non	non
79	###	oui	non	non	non
9	non	oui	letalir	non	non
10	###	oui	letalir	non	non
80	non	oui	letalir	non	non
81	###	non	non	non	non
11	###	non	non	non	non
82	###	oui	non	non	non
83	non	oui	letalir	non	non
12	###	oui	non	non	non
84	non	non	non	non	non
85	non	oui	non	non	non
13	###	oui	letalir	non	non
14	non	non	letalir	non	non
15	non	oui	letalir	non	non
86	oui	oui	TAD	non	non
87	###	oui	non	non	non
16	non	oui	letalir	non	non
88	non	oui	letalir	non	non
89	non	oui	non	non	non
17	###	oui	autre	non	non
18	non	oui	letalir	non	non
90	non	oui	non	non	non
19	###	oui	non	non	non
20	###	oui	letalir	non	non
21	non	oui	non	non	non
22	non	non	non	non	non
23	non	oui	letalir	non	non
24	non	oui	non	non	non
91	###	oui	non	non	non
25	###	oui	letalir	non	non
26	###	oui	letalir	non	non
27	non	oui	letalir	non	non
28	###	oui	non	non	non
29	non	oui	letalir	non	non
30	###	oui	letalir	non	non
31	###	non	letalir	non	non
32	non	non	letalir	non	non
92	###	non	letalir	non	non
33	non	oui	letalir	non	non
93	non	###	letalir	non	non

NO.	STATUS POST REMISSION	SMD PRIM/SEC	PATHOL BASE SI SEC	CHIMIO BASE	MOTIF CONSULTATION
34	###	1	###	###	SMD
35	###	1	###	###	pancytopénie
36	###	1	###	###	SMD
37	###	1	###	###	monocytose
38	###	1	###	###	pancytopénie
39	récidive	1	###	###	SMD
40	###	1	###	###	pancytopénie
41	###	1	###	###	pancytopénie
42	dur	1	###	###	SMD
43	###	2	ca.mammaire	VP16	SMD
44	###	2	lymph.non-hodg.	cyclophosph.	SMD
45	###	2	divers	VP16	pancytopénie
46	###	1	###	###	pancytopénie
47	###	1	###	###	a.sidérob.
48	dur	1	###	###	leucémie
49	dur	1	###	###	leucémie
50	###	2	seminome	cyclophosph.	SMD
51	###	1	###	###	leucémie
52	###	1	###	###	SMD
53	###	1	###	###	SMD
54	###	1	###	###	pancytopénie
55	###	1	###	###	SMD
56	###	1	###	###	SMD
57	###	1	###	###	SMD
58	###	1	###	###	a.hémolytique
59	###	1	###	###	SMD
60	###	1	###	###	thrombopénie idio
61	###	1	###	###	pancytopénie
62	###	1	###	###	thrombopénie idio
63	dur	1	###	###	leucémie
64	###	2	ca.mammaire	cyclophosph.	pancytopénie
65	###	1	###	###	pancytopénie
66	###	1	###	###	pancytopénie
67	###	2	LMA	plusieurs	leucémie
68	###	1	###	###	SMD
69	###	1	###	###	SMD
70	dur	1	###	###	SMD
71	###	###	###	###	SMP
1	###	###	###	###	a.ferriprive
2	###	###	###	###	a.ferriprive
3	###	###	###	###	SMP
4	###	###	###	###	SMP
72	###	###	###	###	SMP
73	###	###	###	###	SMP
74	###	###	###	###	autre
75	###	1	###	###	thrombopénie idio
5	###	###	###	###	SMP
6	###	###	###	###	thrombopénie idio
76	###	###	###	###	autre
7	###	###	###	###	autre
77	###	###	###	###	SMP

NO.	STATUS POST REMISSION	SMD PRIM/SEC	PATHOL BASE SI SEC	CHIMIO BASE	MOTIF CONSULTATION
78	###	###	###	###	autre
8	###	###	###	###	SMP
79	###	###	###	###	autre
9	###	###	###	###	SMP
10	###	###	###	###	SMP
80	###	###	###	###	SMP
81	###	###	###	###	SMP
11	###	###	###	###	SMP
82	###	###	###	###	autre
83	###	###	###	###	SMP
12	###	###	###	###	SMP
84	###	###	###	###	SMP
85	###	###	###	###	autre
13	###	###	###	###	SMP
14	###	###	###	###	SMP
15	###	###	###	###	SMP
86	###	###	###	###	pancytopénie
87	###	###	###	###	autre
16	###	###	###	###	SMP
88	###	###	###	###	hypersplénisme
89	###	###	###	###	SMP
17	###	###	###	###	SMP
18	###	###	###	###	SMP
90	###	###	###	###	SMP
19	###	###	###	###	SMP
20	###	###	###	###	SMP
21	###	###	###	###	SMP
22	###	###	###	###	a.ferriprive
23	###	###	###	###	SMP
24	###	###	###	###	SMP
91	###	###	###	###	SMP
25	###	###	###	###	SMP
26	###	###	###	###	SMP
27	###	###	###	###	SMP
28	###	###	###	###	SMP
29	###	###	###	###	a.ferriprive
30	###	###	###	###	SMP
31	###	###	###	###	SMP
32	###	###	###	###	SMP
92	###	###	###	###	SMP
33	###	###	###	###	SMP
93	###	###	###	###	SMP

NO.	SYMPT.A.	INF. Fr	T°	DIATHESE H	THROMBO-EMB.	AUTRE SYMPT	EG	ADP	FOIE	RATE
34	non	resp.	oui	non	non	non	ok	0	ok	ok
35	non	non	non	non	non	non	d.	0	ok	ok
36	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
37	non	non	non	non	plusieurs	non	d.	0	ok	X
38	###	###	###	###	non	###	###	###	###	###
39	oui	resp.	non	non	non	non	###	###	###	###
40	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
41	non	non	oui	non	AVC	non	###	###	###	###
42	non	autre	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
43	oui	non	non	non	AIT	oui	d.	0	ok	ok
44	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
45	oui	non	non	non	plusieurs	perte poids	ok	0	ok	ok
46	non	non	non	epistaxie	non	non	ok	0	ok	ok
47	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
48	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
49	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
50	non	resp.	oui	non	non	non	ok	0	ok	ok
51	oui	resp.	oui	non	AVC	oui	ok	0	<2cm	<2cm
52	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
53	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
54	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
55	oui	non	non	non	plusieurs	oui	ok	0	ok	X
56	non	non	non	musculaire	non	non	ok	0	ok	ok
57	###	###	###	###	non	###	###	###	###	###
58	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
59	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
60	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
61	non	non	non	epistaxie	non	non	ok	0	ok	ok
62	non	non	non	non	plusieurs	non	ok	0	ok	ok
63	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
64	non	non	non	non	plusieurs	non	ok	0	ok	ok
65	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
66	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
67	non	resp.	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
68	oui	non	non	non	artérielle	non	ok	0	ok	ok
69	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
70	non	non	non	trbl vue	autre	non	ok	0	ok	ok
71	oui	non	non	non	artérielle	non	ok	0	ok	<2cm
1	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
2	non	non	non	post-op	non	non	ok	0	ok	ok
3	non	non	non	non	plusieurs	non	ok	0	ok	ok
4	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
72	non	non	non	non	AIT	non	ok	0	ok	ok
73	non	non	non	non	TVP jambe	oui	ok	0	ok	ok
74	oui	non	non	non	non	non	ok	0	ok	<2cm
75	non	non	non	non	non	oui	ok	0	>2cm	ok
5	###	###	###	###	TVP jambe	###	###	###	###	###
6	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
76	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
7	non	non	non	non	TVP jambe	non	ok	1	ok	ok
77	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok

NO.	SYMPT.A.	INF. Fr	T°	DIATHESE H	THROMBO-EMB.	AUTRE SYMPT	EG	ADP	FOIE	RATE
78	non	non	non	non	TVP jambe	non	ok	0	ok	<2cm
8	non	non	non	non	plusieurs	non	ok	0	ok	ok
79	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	<2cm
9	oui	non	non	pétéchie	non	non	ok	0	<2cm	ok
10	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
80	non	non	non	GI	AVC	oui	ok	0	ok	ok
81	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
11	non	non	non	epistaxie	plusieurs	non	d.	0	ok	ok
82	non	non	non	non	plusieurs	non	ok	0	ok	<2cm
83	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	<2cm
12	non	non	non	non	non	oui	ok	0	ok	ok
84	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
85	non	non	non	non	periph.	oui	ok	0	ok	ok
13	non	non	non	non	artérielle	oui	ok	0	ok	ok
14	non	non	non	non	non	oui	ok	0	ok	ok
15	non	non	non	hematurie	non	oui	ok	0	ok	ok
86	non	non	non	non	non	oui	ok	0	>2cm	<2cm
87	non	non	non	non	non	oui	ok	0	ok	ok
16	oui	non	non	pétéchie	non	oui	ok	0	ok	ok
88	non	non	non	non	EP	non	ok	0	ok	ok
89	oui	non	non	non	non	oui	d.	0	ok	>2cm
17	non	non	non	trbl vue	plusieurs	oui	ok	0	ok	ok
18	non	non	non	non	AIT	non	ok	0	ok	ok
90	non	non	non	non	autre	non	ok	0	ok	ok
19	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
20	non	non	non	non	non	oui	ok	0	<2cm	<2cm
21	oui	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
22	non	non	non	non	non	oui	ok	0	<2cm	ok
23	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
24	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
91	non	non	non	non	autre	non	ok	0	ok	ok
25	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
26	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	>2cm	ok
27	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
28	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
29	non	non	non	GI	non	non	ok	0	ok	ok
30	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
31	non	non	non	non	non	non	ok	0	>2cm	<2cm
32	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
92	non	non	non	non	AVC	non	ok	0	ok	ok
33	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	ok
93	non	non	non	non	non	non	ok	0	ok	<2cm