THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

THÈSE EN VUE DU
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de

Mémoire en vue de l'obtention du

DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES

de biologie médicale

présentée par

Marc Le Mouël

né le 08 janvier 1989 à Rennes

Apport de l'immunophénotypage monocytaire sanguin dans le diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique

Thèse soutenue à Rennes
le 26 Mai 2016

devant le jury composé de :

Olivier FARDEL
PU-PH, CHU Rennes / *Président*
Thierry FEST
PU-PH, CHU Rennes / *Juge*
Mikael ROUSSEL
PH, CHU Rennes / *Juge*
Stanislas NIMUBONA
PH, CHU Rennes / *Juge*
Cédric PASTORET
AHU, CHU Rennes / *Directeur de thèse*

LISTE DES ENSEIGNANTS CHERCHEURS DE LA FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES (ANNEE 2015-2016)

PROFESSEURS

BOUSTIE Joël
BURGOT Gwenola
DONNIO Pierre Yves
FAILI Ahmad
FARDEL Olivier
FELDEN Brice
GAMBAROTA Giulio
GOUGEON Anne
LAGENTE Vincent
LE CORRE Pascal
LORANT (BOICHOT) Elisabeth
MOREL Isabelle
SERGENT Odile
SPARFEL-BERLIVET Lydie
TOMASI Sophie
URIAC Philippe
VAN DE WEGHE Pierre
VERNHET Laurent

PROFESSEURS ASSOCIES

BUREAU Loïc
DAVOUST Noëlle

PROFESSEUR EMERITE

CILLARD Josiane

MAITRES DE CONFERENCES

ABASQ-PAOFAI Marie-Laurence
ANINAT Caroline
AUGAGNEUR Yoann
BEGRICHE Karima
BOUSARGHIN Latifa
BRANDHONNEUR Nolwenn
BRUYERE Arnaud
BUNETEL Laurence
CHOLLET-KRUGLER Marylène
COLLIN Xavier
CORBEL Jean-Charles
DAVID Michèle
DELALANDE Olivier
DELMAIL David
DION Sarah
DOLLO Gilles
GILOT David
GOUAULT Nicolas
HITTI Eric
JEAN Mickaël
LECUREUR Valérie
LE FERREC Eric

MAITRES DE CONFERENCES (suite)

LE PABIC Hélène
LEGOUIN-GARGADENNEC Béatrice
LOHEZIC-LE DEVEHAT Françoise
MARTIN-CHOULY Corinne
MINET Jacques
MOURET-PLEIBER Liza
NOURY Fanny
PINEL-MARIE Marie-Laure
PODECHARD Normand
POTIN Sophie
RENAULT Jacques
ROUILLON Astrid

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

GICQUEL Thomas

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, Monsieur Cédric Pastoret,

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ta disponibilité, ta réactivité, malgré tes nombreuses charges. Je t'exprime mes sincères remerciements.

A mon président de thèse, Monsieur Olivier Fardel,

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A l'ensemble des membres de mon jury, Messieurs Fardel Olivier, Fest Thierry, Roussel Mikael, Nimubona Stanislas et Pastoret Cédric,

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A l'ensemble du personnel des laboratoires d'hématologie, d'immunologie, de cytométrie en flux du CHU de Rennes,

Et tout particulièrement, Roussel Mikael, Godard Marthe, Ly-Sunnaram Béatrice, Goustille Julien, Decaux Aurélie, Mingam Anna, Le Priol Jérome, Zaïdi Ahmed, Dumontet Erwan, Pawloski Maxime, Cottard Antoine, Courtellemont Laura, Mottais Fabien.

Un grand merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail.

Je dédie cette thèse :

A mes parents,

Tout simplement, merci pour tout.

A ma grande sœur Edwige, mon petit frère Erwan, et mes deux mamies,

A Sally,

A mes ami(e)s :

Ceux du collège,

Ceux du lycée,

Ceux de la faculté,

Ceux de l'internat,

Ceux du football club Martignolais, et sans oublier le fameux trio de compères

A mes anciens co-internes,

Avec qui j'ai partagé ces belles années d'internat.

Et enfin, mention spéciale à mes collègues de baby foot,

Avec qui les plus belles parties endiablées de l'ouest ont été disputées, les murs de l'internat s'en souviendront: la motte (le sempiternel n°2), l'excellent michto (encore désolé), Ménard café, le petit prince du bab' Edouard Garrot, les Dr Cavey, Cottard et Gourmelen, et tous les autres...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 11

GENERALITES 13

1. LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE 13
   1.1. Historique et évolution des classifications 13
   1.2. Définition de la LMMC 14
   1.3. Epidémiologie 17
   1.4. Physiopathologie 17
   1.5. Présentation clinique 25
   1.6. Diagnostic biologique 26
   1.7. Diagnostic différentiel 29
   1.8. Classifications pronostiques 30
   1.9. Thérapeutique 37

2. APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DE LA LMMC 41
   2.1. Les sous-types monocytaires 41
   2.2. Cytométrie conventionnelle 42
   2.3. La formule sanguine par HematoFlow™ (Beckman Coulter) 45

OBJECTIFS DU TRAVAIL 50

MATERIELS ET METHODES 51

1. PATIENTS ET ECHANTILLONS 51
   1.1. Etude rétrospective monocentrique 51
   1.2. Etude prospective 52

2. IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE SANGUIN 52
   2.1. HematoFlow 52
   2.2. Cytométrie conventionnelle 53

3. ANALYSE STATISTIQUE 58

RESULTATS 59

1. ETUDE RETROSPECTIVE : EVALUATION DE L'INTERET D'HEMATOFLOW POUR LE DIAGNOSTIC DE LMMC 59
   1.1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients 59
   1.2. Augmentation du pourcentage de monocytes CD16-négatifs chez les patients LMMC 61
   1.3. Performances statistiques du paramètre pourcentage de MO1 par HematoFlow. 62

2. ETUDE PROSPECTIVE 64
   2.1. Distribution, droite de régression linéaire, corrélation et concordance de la quantification des MO1 par HF par rapport à la CMF conventionnelle. 64
   2.2. Intérêt diagnostique de la quantification des MO1 66

DISCUSSION 69

CONCLUSION 75

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 76

LISTE DES ABREVIATIONS 81

ANNEXES 83

LISTE DES ANNEXES

1. LETTRE A L'EDITEUR 83
2. MATRICE DE COMPENSATION DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE SANGUIN PAR CMF CONVENTIONNELLE 86
3. DELAI OPTIMAL DE REALISATION DU MARQUAGE EN CMF CONVENTIONNELLE ET VIABILITE DU PARAMETRE MO1 87

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Fresque historique de la LMMC ____ *14*
Figure 2 : Les mutations d'ASXL1 ou d'EZH2 entrainent une perte de la régulation négative de la transcription (14) ____ *19*
Figure 3 : Déméthylation de l'ADN et rôle de TET2, modifiée de Abdel-Wahab O et al. (15) ____ *21*
Figure 4 : Mutations retrouvées au sein de deux cohortes de patients LMMC (10) ____ *24*
Figure 5 : Implication de TET2 dans le développement de la LMMC (15) ____ *25*
Figure 6 : Un monocyte de morphologie normale (1), un promonocyte (2) et un monoblaste(3) (grossissement X100, coloration May-Grünwald-Giemsa) ____ *27*
Figure 7 : Impact pronostique de la mutation d'ASXL1 chez les patients LMMC (30) ____ *33*
Figure 8 : Influence des formes prolifératives versus dysplasiques (a) et des mutations de la voie RAS (b) sur la survie de patients LMMC (16) ____ *35*
Figure 9 : Intégration du profil mutationnel dans la démarche diagnostique et thérapeutique de la LMMC, modifié de Sallman DA et al. (10) ____ *40*
Figure 10 : Représentation des 3 sous-types de monocytes, selon l'expression du CD14 et du CD16 (MO1=monocyte classique, MO2=monocyte intermédiaire, MO3=monocyte non classique) (2) ____ *43*
Figure 11 : Pourcentage de MO1 au sein des différentes catégories de patients de la cohorte learning (LMMC = 96,6% ; patients sains et jeunes (Co) = 86,1% ; patients sains (aged-Co) = 84% ; monocytoses réactionnelles = 79,1% ; hémopathies non LMMC = 84,4%) ____ *44*
Figure 12 : Courbe ROC représentant la sensibilité et la spécificité du pourcentage de MO1 dans le diagnostic de la LMMC ____ *45*
Figure 13 : Stratégie de fenêtrage HematoFlow ____ *48*
Figure 14 : Fenêtres monocytaires d'intérêt de l'HF ____ *49*
- monocytes totaux (CD36-positifs) ____ *49*
- monocytes CD16-négatifs (M-) versus monocytes CD16-positifs (M+) ____ *49*
Figure 15 : Stratégie de fenêtrage et quantification des sous-types monocytaires par CMF conventionnelle ____ *56*

Figure 16 : Distribution du pourcentage de MO1 au sein des groupes contrôle et LMMC ; la ligne grise représente le seuil de 94% de MO1 61
Figure 17 : Histogrammes représentant les populations monocytaires d'un patient LMMC (a) et celles d'un patient contrôle (b) 62
Figure 18 : Courbe ROC du paramètre pourcentage de MO1 par HF 63
Figure 19 : Droite de régression linéaire (pourcentage de MO1 par CMF en fonction du pourcentage de MO1 par HF) 64
Figure 20 : Représentation de Bland Altman, différences entre les couples de mesures, en fonction de la moyenne du couple de mesure 66
Figure 21 : Critères OMS des patients du groupe LMMC 68
Figure 22 : Limites d'HematoFlow et du CD36 70
Figure 23 : Infiltrations cutanées, au niveau de la jambe droite 72
Figure 24 : Aspects histologique et immunohistochimique de la biopsie cutanée ; MGG : May Grunwald Giemsa ; MPO : myéloperoxydase 72
Figure 25 : Intégration de l'immunophénotypage monocytaire sanguin et du profil mutationnel dans la démarche diagnostique de la LMMC 74

TABLEAUX

Tableau 1 : Différences entre les critères de la LMMC dans la classification FAB et OMS 2008 16
Tableau 2 : Causes de monocytoses sanguines (22) 30
Tableau 3 : Différents scores pronostiques de la LMMC, modifié de Patnaik MM et al. (33) 36
Tableau 4 : Panel d'Ac utilisés pour le marquage par CMF conventionnelle, en comparaison au panel CytoDiff ™ 55
Tableau 5 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients de l'étude rétrospective 60
Tableau 6 : Résumé du paramètre pourcentage de MO1, chez les patients des groupes contrôle et LMMC, au seuil de 94% 63
Tableau 7 : Concordance entre la quantification des MO1 par la technique HF et CMF 65
Tableau 8 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients de l'étude prospective 67

INTRODUCTION

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie clonale, incluse dans la classification OMS 2008 dans le groupe des syndromes myélodysplasiques/néoplasies myéloprolifératives (1). Elle est caractérisée par une monocytose persistante dans le sang périphérique (monocytes >1G/L depuis plus de 3 mois), associée à des signes de dysplasie au myélogramme sur une ou plusieurs lignées. Le pronostic de cette pathologie est péjoratif, avec une survie médiane de 20 à 40 mois, selon les séries et un risque d'évolution en leucémie aigue myéloblastique dans 15 à 20 % des cas.

La LMMC reste un défi diagnostique car il n'existe pas de signes objectifs spécifiques de cette entité parmi les critères OMS. En effet, les étiologies des monocytoses sont nombreuses et l'interprétation de signes minimes de dysplasie, dans la tranche d'âge des patients atteints de LMMC (médiane de 65-75 ans), requiert une grande expertise cytologique. De plus, l'absence des signes de dysplasie n'exclut pas le diagnostic. Enfin, il n'existe pas d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires pathognomoniques de la maladie.

Dans ce contexte, un nouveau marqueur diagnostique, basé sur la quantification des monocytes n'exprimant pas le CD16 en cytométrie en flux, a été récemment publié par Selimoglu-Buet *et al* (2). Ainsi, un pourcentage de monocytes CD16-négatifs supérieur ou égal à 94% des monocytes totaux présente une excellente spécificité et sensibilité (respectivement 95.1% et 90.6%) pour le diagnostic de LMMC. Dans notre laboratoire, la stratégie de rendu en routine des numérations formules sanguines, utilise le couple analyseur DXH800 – cytométrie en flux avec la solution HematoFlow^{TM} (Beckman Coulter, Brea, CA). Cette stratégie permet d'obtenir sur une formule de routine le pourcentage de monocytes CD16-négatifs. L'objectif principal de ce travail est de démontrer l'intérêt de l'HematoFlow pour le diagnostic de LMMC.

Dans une première étude rétrospective, comparant les échantillons sanguins de monocytoses réactionnelles et de LMMC avérées, nous avons étudié le taux de monocytes

CD16-négatifs rendu par HematoFlow, afin d'étudier l'intérêt de ce dernier dans le diagnostic de la LMMC. Ces données ont été publiées sous forme d'e-letter (Annexe 1), en réponse à l'article princeps : *http://www.bloodjournal.org/content/125/23/3618.e-letters*

Dans un second temps, sur une cohorte prospective, nous avons étudié la corrélation entre la technique HematoFlow, et la cytométrie en flux conventionnelle, technique de référence mise en place au laboratoire, pour la quantification des monocytes CD16-négatifs. Enfin, nous avons évalué la pertinence de l'association des deux techniques pour le diagnostic de LMMC.

GENERALITES

1. LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE

1.1. Historique et évolution des classifications

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) a été décrite pour la première fois par Saarni et Linman en 1971 (3). Ils constatent chez des patients atteints de leucémies aigues myéloblastiques (LAM) à composante monocytaire, l'existence d'anomalies qualitatives de l'hématopoïèse. Avant de déclarer la LAM, 36% de ces patients présentaient une monocytose périphérique, et 31% passèrent par un stade de phase pré-leucémique (présence d'un contingent blastique dans le sang périphérique, parfois associé à une myélémie). En 1975, la première cohorte de patients atteints de LMMC a été décrite, comprenant 18 patients ayant une monocytose inexpliquée, des cytopénies et une splénomégalie (4). Cinq de ces patients survivront plus de 5 ans, sans aucun traitement. Cette information a donc amené à penser, que la chimiothérapie intensive n'était pas nécessaire pour cette population. Suite à ce constat, cette pathologie sera plutôt considérée comme un stade pré-leucémique.

Dans les suites de ces différents travaux, le groupe Français-Américain-Britannique (FAB) (5), reconnait comme entité distincte la LMMC en 1976. Ensuite, c'est en 1982, que ce même groupe intègre la LMMC dans les syndromes myélodysplasiques (SMD), devant la fréquence de signes de dysmyélopoïèse dans cette pathologie. Cependant, devant l'hétérogénéité clinique de la pathologie, deux sous-types sont alors créés, en fonction du chiffre des leucocytes dans le sang périphérique. Cette dichotomie a pour but de mieux différencier le caractère myélodysplasique, du caractère myéloprolifératif de la pathologie. Ainsi les patients avec un compte de leucocytes $\leq 13 \times 10^9 L^{-1}$ seront classés dans la sous-catégorie des SMD-LMMC, et ceux avec un chiffre de leucocytes $> 13 \times 10^9 L^{-1}$ seront catégorisés dans les SMP-LMMC (syndrome myéloprolifératif).

Cette double composante révèle l'hétérogénéité clinique et biologique de cette pathologie, expliquant le reclassement de la LMMC dans le groupe des syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs (SMD/SMP), dans la classification OMS

2001. Il sera renommé syndromes myélodysplasiques/néoplasies myéloprolifératives (SMD/NMP) dans l'actuelle classification 2008 (1) (Figure 1).

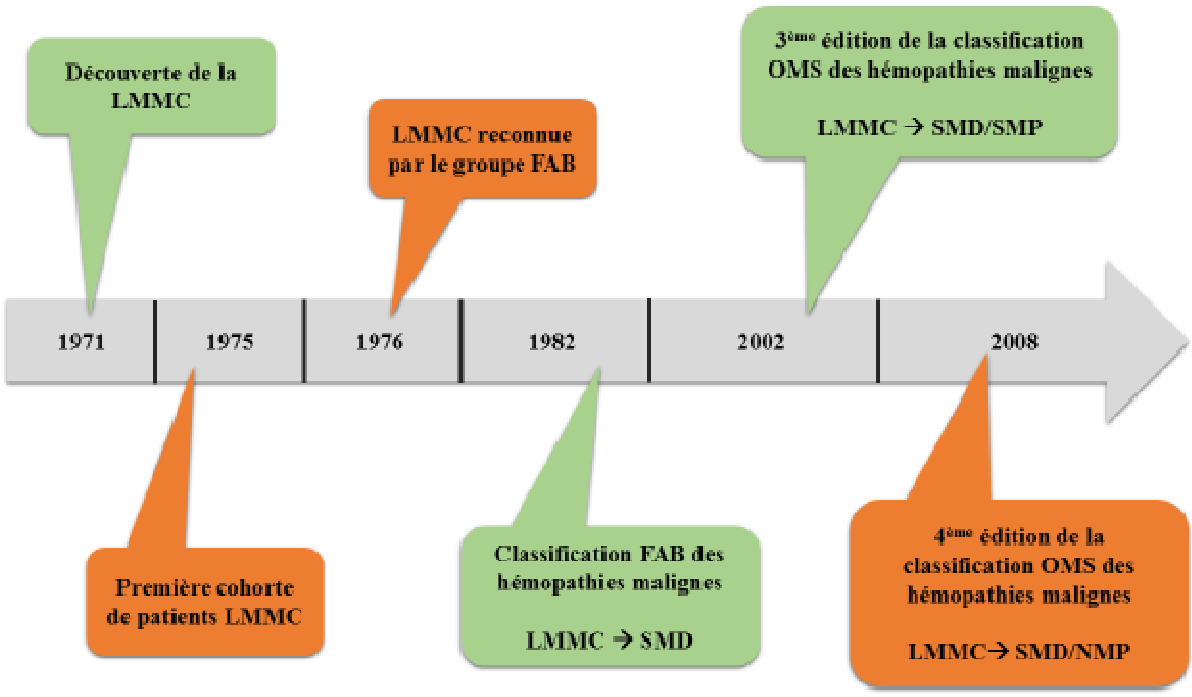


Figure 1 : Fresque historique de la LMMC

1.2. Définition de la LMMC

La LMMC est une hémopathie clonale de la cellule souche hématopoïétique. Elle est caractérisée par une composante, à la fois myélodysplasique et myéloproliférative, et ayant tendance à évoluer en LAM. La classification OMS 2008 des tumeurs du tissu hématopoïétique et lymphoïde classe donc la LMMC, parmi les SMD/NMP. Cette entité comprend également la LMC atypique (leucémie myéloïde chronique, BCR-ABL1 négative), la leucémie myélomonocytaire juvenile, les anémies réfractaires avec ring-sidéroblastes et thrombocytose (RARS-T, entité provisoire), et les autres SMD/NMP inclassables. Ces pathologies ont donc en commun, une composante myélodysplasique et myéloproliférative. L'OMS définit alors différents critères diagnostiques, dans le but de bien les différencier. Pour la LMMC, ces critères sont les suivants :

1. Monocytose sanguine périphérique persistante (> 1.10^9/L)
2. Absence de chromosome Philadelphie ou de réarrangement BCR-ABL1 (dans le but d'éliminer une LMC avec une présentation trompeuse)
3. Absence de réarrangement du Platelet-Derived Growth Factor Receptors alpha et beta (PDGFRA et PDGFRB, notamment s'il existe une hyperéosinophilie)
4. Moins de 20% de blastes (myéloblastes, monoblastes et promonocytes) dans le sang périphérique et la moelle osseuse(MO)
5. Dysplasie sur au moins une des lignées myéloïdes. Si les signes de myélodysplasies sont minimes voir absents, le diagnostic de LMMC peut tout de même être retenu si les critères suivants sont retrouvés :
    - Anomalies clonales acquises cytogénétiques ou moléculaires de la lignée hématopoïétique, *ou*
    - Monocytose persistante, depuis plus de 3 mois, *et*
    - Exclusion des autres causes de monocytoses (cancer, infection, inflammation…)

Il est décrit différents sous types de LMMC, en fonction du nombre de blastes dans le sang périphérique ou la MO :

- LMMC 1 : < 5% de blastes dans le sang et < 10 % dans la MO
- LMMC 2 : 5 à 19 % de blastes dans le sang et/ou 10 à 19 % de blastes dans la MO, ou présence de blastes présentant des corps d'Auer
- LMMC-1 ou LMMC-2 avec éosinophilie, si le compte des polynucléaires éosinophiles (PNE) dans le sang est supérieur à 1.5×10^9/L

Le tableau suivant (Tableau 1) résume les principales différences entre la définition FAB et OMS de la LMMC.

FAB 1982	OMS 2008
SMD	**SMD/NMP**
Monocytose sanguine > 1G/L	**Monocytose sanguine > 1G/L**
Blastes médullaires < 20 %	**Blastes médullaires < 20 %**
Blastes sanguins < 5%	**Absence de chromosome Philadelphie ou de gène de fusion BCR-ABL1**
	Absence de réarrangement du PDGFRA, PDGFRB
	Signe de dysplasie sur au moins une lignée
	Si absence de dysplasie, diagnostic de LMMC si : **- Anomalies clonales acquises cytogénétiques ou moléculaires de la lignée hématopoïétique, *ou*** **- Monocytose persistante depuis plus de 3 mois, *et*** **- Exclusion des autres causes de monocytoses**
Sous-types de LMMC : **- SMD-LMMC si leucocytes sanguins ≤ 13 G/L** **- SMP-LMMC si leucocytes sanguins > 13 G/L**	**Sous-types de LMMC :** **- LMMC1 si blastes sanguins < 5%, blastes médullaires < 10%** **- LMMC2 si blastes sanguins 5–19%, blastes médullaires 10–19%, ou présence de corps d'Auer** **- LMMC-1 ou LMMC-2 avec éosinophilie, si PNE sanguins > 1.5 G/L**

Tableau 1 : Différences entre les critères de la LMMC dans la classification FAB et OMS 2008

1.3. Epidémiologie

La LMMC est une maladie rare, dont l'incidence est mal connue du fait de l'évolution des critères diagnostiques, au cours des classifications successives. L'incidence de la LMMC, dans la population de plus de 60 ans, serait de 3 cas pour 100 000 habitants par an. La classification FAB considère que la LMMC représente 12% des SMD, ce qui correspond à une incidence de 0.5 cas pour 100000 habitants par an, tout âge confondu. L'âge médian du diagnostic est situé entre 65 et 75 ans (pic observé vers 70 ans). La LMMC est exceptionnelle avant 50 ans. Elle touche de façon préférentielle les hommes, puisque deux hommes pour une femme sont atteints (6).

L'étiologie de cette pathologie est le plus souvent inconnue. Toutefois, elle peut être secondaire à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie, dans le traitement d'un cancer. Plus rarement, elle peut être secondaire à des expositions à différents toxiques, sans réelle certitude étiologique. Les toxiques incriminés sont le benzène et les autres hydrocarbures aromatiques, les produits utilisés dans l'agriculture, tels que les pesticides (7) (8)…

1.4. Physiopathologie

Les anomalies génétiques sont fréquentes chez les patients atteints de LMMC. En effet, des anomalies clonales cytogénétiques sont observées chez 20 à 40 % des patients (9). Les altérations fréquemment retrouvées, bien que non pathognomoniques de la LMMC, sont la trisomie 8, la monosomie 7 (del7q), des anomalies récurrentes sur le bras court du chromosome 12, et la trisomie 10. Les anomalies cytogénétiques sont le plus souvent retrouvées chez les patients avec une hyperleucocytose sanguine, une blastose médullaire, et chez qui on observe des signes de dysérythropoïèse ou de dysgranulopoïèse. Ces différentes observations ont permis de classer les patients LMMC en 3 groupes de risques cytogénétiques (*cf. classifications pronostiques*).

Par ailleurs, des anomalies moléculaires sont également très souvent retrouvées. L'avènement du séquençage nouvelle génération (NGS) a permis d'identifier des aberrations

moléculaires, chez près de 90% des patients atteints de LMMC (10). Celles-ci peuvent être classées en 4 catégories :

- Mutations impliquant les gènes de l'épigénétique, tels que EZH2, ASXL1, TET2, DNMT3A, IDH1 et IDH2, divisées en deux sous-groupes (11)
    - celles affectant la méthylation de l'ADN : TET2, DNMT3A, IDH1 et IDH2
    - celles affectant la régulation des modifications de la chromatine (modification des histones) : ASXL1 et EZH2
- Mutations impliquant les gènes du spliceosome, tels que SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2, SF3A1, PRPF40B, U2AF2 et SF1 (12)
- Mutations impliquant les gènes de réparation de l'ADN, tel que TP53
- Mutations impliquant les gènes de la régulation cellulaire, ou les gènes codant pour des facteurs de transcription, ou des récepteurs tyrosine kinase, tels que JAK2, KRAS, NRAS, CBL, FLT3 et RUNX1 (13)

Les mutations concernant les gènes de l'épigénétique sont fréquemment retrouvées chez les patients LMMC. En premier lieu, TET2 (Ten Eleven Translocation 2) et ASXL-1 (Additional Sex combs Like 1). L'épigénétique est un terme désignant les différents mécanismes intervenant dans la régulation de l'expression des gènes. Les histones y jouent un rôle primordial. Ce sont des petites protéines riches en acides aminés basiques (chargés positivement), étroitement liées à l'ADN (chargé négativement). L'ensemble ADN et histone constitue l'unité de base de la chromatine, le nucléosome. Ces derniers peuvent être acétylés, dans ce cas l'interaction entre les nucléosomes diminue, ceci entraine la décondensation de la chromatine, qui peut alors être transcrite.

Par ailleurs, les histones peuvent également être mono, di ou triméthylés, au niveau des acides aminés lysine ou arginine. Selon les résidus méthylés, ou le nombre de groupement ajouté, ce processus est soit associé à une activation, ou bien à une répression de la transcription. Les enzymes responsables de ces additions de groupements sur les histones sont les enzymes du complexe polycomb. Aussi, EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) et ASXL1 sont deux protéines appartenant à ce complexe enzymatique.

1.4.1. ASXL1 et EZH2

Tout d'abord, ASXL1 est un des membres importants de ce complexe polycomb. Il est l'homologue humain d'Asx (Drosophila Additional sex combs), mis en évidence chez la drosophile. En coopération avec EZH2, il se lie à d'autres membres de ce complexe polycomb, notamment à PRC-2 (Polycomb Repressor Complex 2). Cela induit alors la méthylation de l'histone 3, provoquant ainsi par compaction de la chromatine, la répression de la transcription *(*Figure 2*)*. Les mutations d'ASXL1 entraînent donc une perte de la régulation négative de la transcription, et agissent principalement au niveau de la différenciation granulo-monocytaire. Ainsi, 40 à 50 % des patients LMMC sont porteurs d'une mutation d'ASXL-1 (10). En outre, on observe également fréquemment des mutations d'ASXL1 dans les SMD et les néoplasies myéloprolifératives.

Cependant les mécanismes par lesquelles ces mutations induisent un processus leucémogène, ne sont pas encore clairement définis. Par contre, l'intérêt de rechercher ces anomalies moléculaires est majeur, car l'existence d'une mutation non-sens ou frameshift (décalage du cadre de lecture) d'ASXL1, a un impact pronostique. Les mutations d'EZH2 sont également retrouvées, mais en fréquence moins importante.

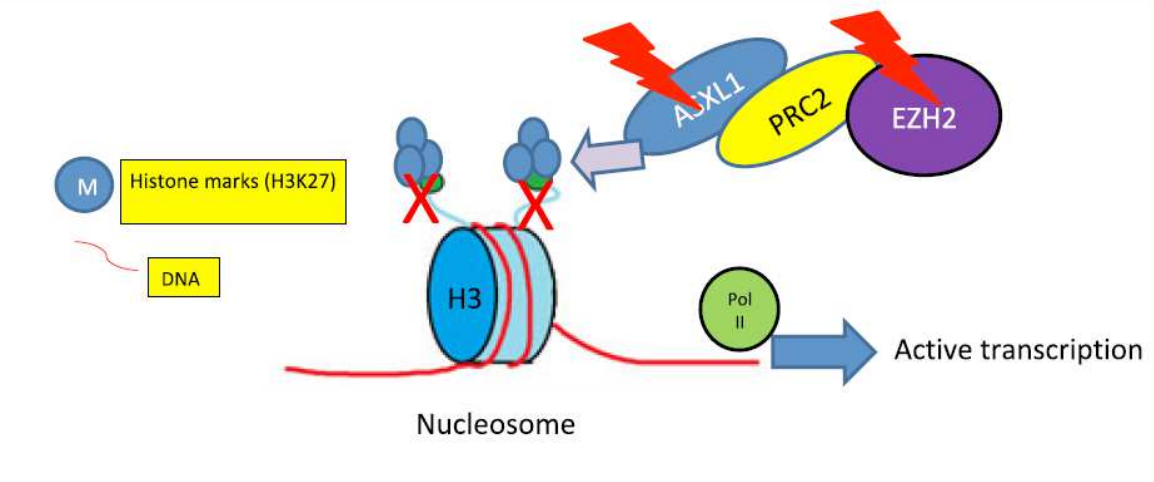


Figure 2 : Les mutations d'ASXL1 ou d'EZH2 entrainent une perte de la régulation négative de la transcription (14)

1.4.2. TET2

Par ailleurs, l'autre gène de l'épigénétique fréquemment muté dans la LMMC est TET 2. En effet, des anomalies sont retrouvées chez 50 à 60 % des patients (10). Il appartient à la famille de gènes TET, comprenant TET 1, 2, 3. Ces 3 gènes codent pour des protéines enzymatiques qui peuvent convertir la 5-methylcytosine (5mC) en 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). Par conséquent, la DNMT1 (DNA methyltransferase 1), dont le rôle est de méthyler la 5mC, ne peut plus remplir sa fonction, car elle ne reconnaît pas la 5hmC. Aussi, la 5hmC a la capacité de se déméthyler de manière passive (15). Il s'en suit donc une déméthylation de l'ADN (Figure 3).

La méthylation de l'ADN joue un rôle sur divers processus cellulaires, tels que la synchronisation de la réplication du chromosome chez les bactéries, la réparation des mésappariements dans l'ADN, et aussi sur le niveau d'expression du gène. La mutation de TET2 entraîne donc une perte de fonction du gène, et par conséquent un excès de méthylation de l'ADN. Les conséquences sur l'hématopoïèse sont les suivantes :

- Augmentation de l'auto renouvellement des CSH (cellules souches hématopoïétiques)
- Expansion des CSH et des progéniteurs myéloïdes

TET2 est donc un bon candidat de gène intervenant dans le processus de leucémogénèse, en interférant avec la régulation de la chromatine, notamment en perturbant la méthylation de celle-ci (Figure 3).

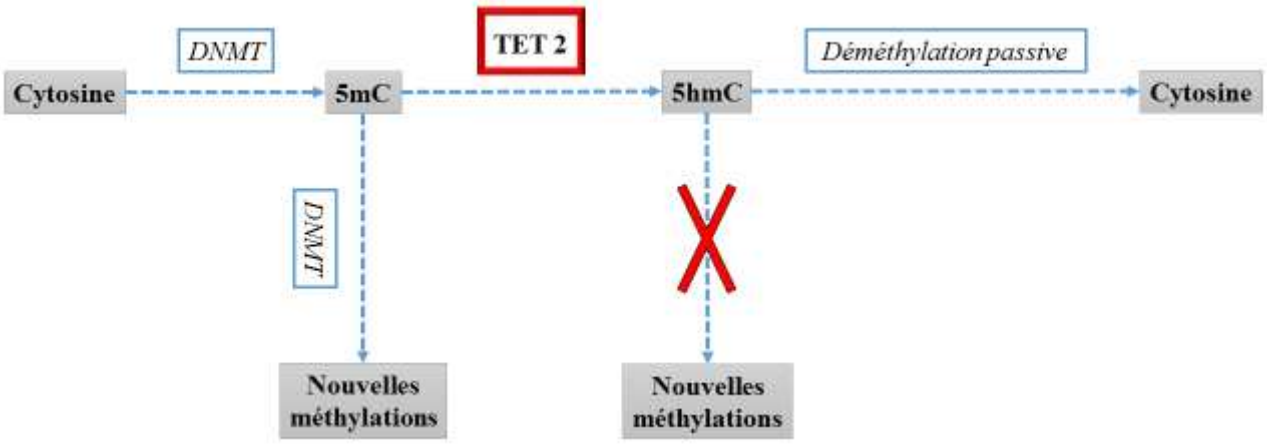


Figure 3 : Déméthylation de l'ADN et rôle de TET2, modifiée de Abdel-Wahab O et al. (15)

1.4.3. SRSF2

D'autre part, en plus des mutations épigénétiques, principalement TET2 et ASXL1 décrites ci-dessus, des anomalies des gènes codant pour des protéines ayant une activité sur l'épissage des ARN pré-messagers sont fréquemment retrouvées dans la LMMC. L'épissage est un processus par lequel les ARN pré-messagers sont clivés, les introns (éléments non codants) sont éliminés. L'épissage a lieu dans le noyau de la cellule et donne donc naissance à un ARN messager (ARNm) dit mature, constitué des seuls exons. Cet ARNm est alors exporté dans le cytoplasme, où il est traduit en une protéine. Ce processus d'épissage a lieu au niveau d'un organite appelé spliceosome. Les différentes particules du spliceosome sont appelées small nuclear RiboNucleoProteins (snRNP), petit ARN autour duquel sont associées différentes protéines.

Ainsi, le gène codant pour la protéine Serine/arginine-Rich Splicing Factor 2 (SRSF2) est en effet muté dans 40 à 50 % des LMMC (10). Celle-ci est responsable du recrutement et de la fixation sur leur site d'épissage de deux snRNP (U1 et U2).

1.4.4. La voie RAS

En outre, des mutations affectant les voies de transduction du signal RAS (Rat viral oncogene homolog) sont fréquentes dans les formes de LMMC prolifératives. La voie RAS est une voie de signalisation intracellulaire. La famille des proto-oncogènes RAS comprend trois gènes bien caractérisés HRAS, NRAS et KRAS (Harvey Rat viral oncogene homolog ; Neuroblastoma Rat viral oncogene homolog ; Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog). Ces 3 gènes codent pour des protéines qui sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique. Les protéines RAS font parties de la famille des GTPases (Guanosine Triphosphate hydrolase), et jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires, vers le noyau. Cette voie intervient sur la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Leur activation est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

Aussi, Ricci *et al*. (16) ont montré que les mutations de la voie RAS impliquant KRAS et NRAS, sont plus fréquemment retrouvées chez les patients SMP-LMMC (*p-value* = 0.033). La conclusion de cet article dit que les mutations de la voie RAS seraient un évènement moléculaire secondaire, qui contribuerait au développement de la maladie, sous son aspect myéloprolifératif, et seraient associées à un moins bon pronostic (*p-value* = 0.003).

1.4.5. RUNX1

De plus, des mutations portant sur RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) sont également fréquentes dans la LMMC (environ 20 %) (10).

RUNX1 est un facteur de transcription essentiel pour l'hématopoïèse, puisqu'il régule l'expression de plusieurs gènes clés, tels que ceux codant pour le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), l'IL-3 (Interleukine 3), la myéloperoxydase, le TCR (T Cell Receptor).

Kuo *et al*. (17) montrent dans une étude, qu'il n'y a pas de différence dans les courbes de survie entre un patient muté, et non muté pour RUNX1. Cependant, le risque d'acutisation vers une LAM serait plus important chez les patients mutés (16/30 *versus* 17/51). Le temps moyen d'acutisation chez ces patients est de 6.8 mois contre 28.3 chez les patients sans mutation (*p-value* = 0.022).

1.4.6. GM-CSF et LMMC

Enfin, des études ont montré une hypersensibilité de la cellule souche hématopoïétique au GM-CSF chez les patients atteints de LMMC (18).

1.4.7. Fréquence des anomalies moléculaires retrouvées

En définitive, bien qu'il n'existe pas d'anomalie moléculaire pathognomonique de la LMMC, des anomalies récurrentes sont tout de même observées. A ce jour, deux grandes cohortes de patients atteints de LMMC, ont bénéficié d'un séquençage de ces gènes d'intérêt. Elles sont décrites dans les études de Meggendorfer *et al*. et Itzykson *et al*. , comprenant respectivement 312 et 275 patients (10). La fréquence des mutations retrouvées dans ces deux cohortes sont résumées dans la figure suivante (Figure 4).

On retrouve donc par ordre de fréquence, des mutations impliquant TET2, SRSF2 (non testé dans l'étude de Meggendorfer *et al*.), et ASXL1, pour le trio de tête des mutations retrouvées le plus fréquemment dans la LMMC.

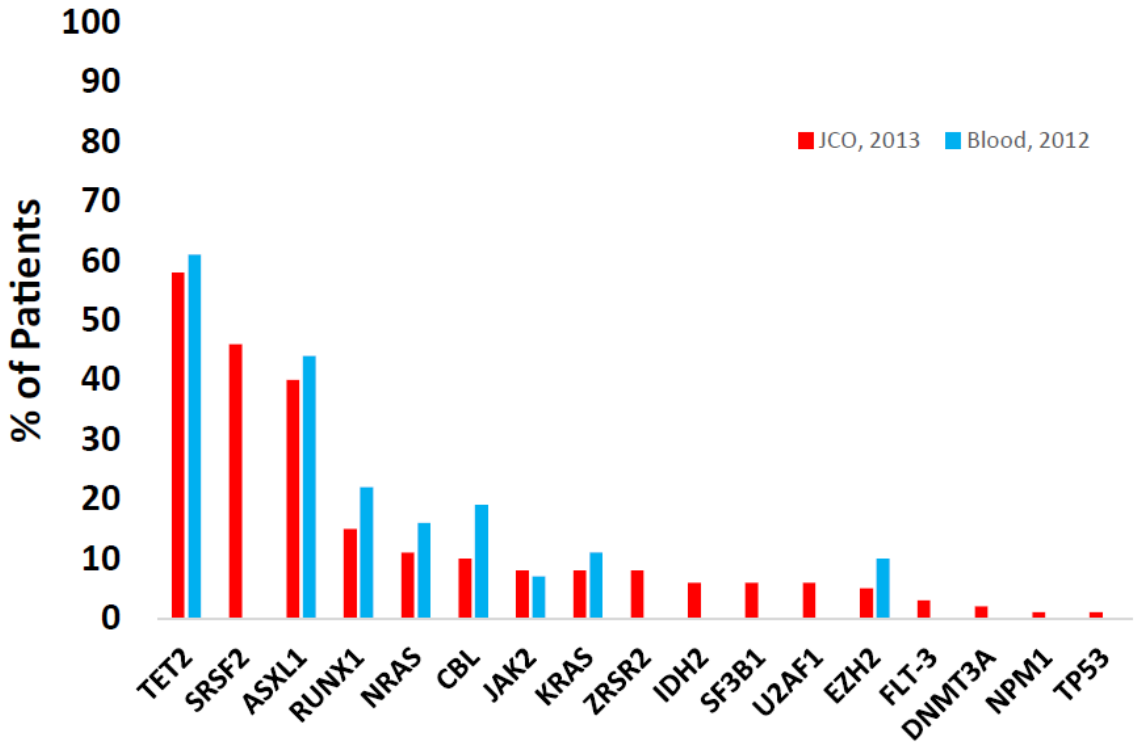


Figure 4 : Mutations retrouvées au sein de deux cohortes de patients LMMC (10)

1.4.8. Genèse de la pathologie

La séquence d'apparition des anomalies moléculaires acquises est importante dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Ainsi, l'acquisition d'une mutation portant sur TET2 ou ASXL1, au sein d'une cellule souche hématopoïétique, semble être un évènement inaugural et primordial (mutation « driver »), quant au développement de cette maladie clonale. Un second évènement moléculaire surviendrait, impliquant SRSF2, ou un autre gène codant pour une protéine du spliceosome. Enfin, une troisième mutation impliquant la voie de transduction du signal (dans approximativement 30 à 40 % des cas), incluant une hypersensibilité du clone au GM-CSF aboutirait à l'apparition de la maladie et à la myéloprolifération (19) (Figure 5). Aussi, des études récentes ont également mises en évidence que la LMMC pouvait être une pathologie secondaire à un SMD, par apparition de nouvelles mutations (20).

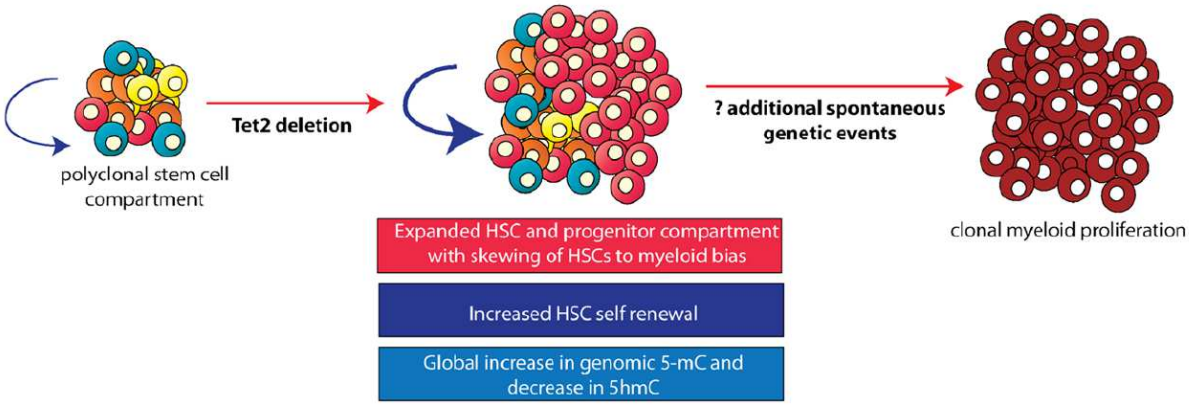


Figure 5 : Implication de TET2 dans le développement de la LMMC (15)

1.5. Présentation clinique

La LMMC peut être asymptomatique, découverte sur un bilan biologique systématique révélant une monocytose et une hyperleucocytose. Les symptômes les plus fréquents sont les signes généraux : la fatigue, l'altération de l'état général, la fièvre. Les syndromes tumoraux et les signes d'insuffisance médullaire accompagnent le versant myéloprolifératif, ou myélodysplasique de la pathologie.

Parmi les signes d'insuffisance médullaire, le syndrome anémique est le plus fréquent, altèrant la qualité de vie du patient. Les différentes manifestations cliniques de l'anémie sont la pâleur cutanéo-muqueuse, l'asthénie, la tachycardie. Le risque, chez ce type de patient âgé, est que le syndrome anémique soit insuffisamment pris en compte, du fait de nombreuses comorbidités liées à l'âge (insuffisances respiratoire, cardiaque et pathologies vasculaires). Les manifestations hémorragiques dues à une thrombopénie peuvent être observées. Les infections peuvent être imputables à une neutropénie mais également à des dysfonctionnements immunitaires. En effet, des signes de pathologies dysimmunitaires peuvent être associées à la LMMC, telles que des vascularites, des colites inflammatoires, des arthropathies inflammatoires et des polychondrites. Les infections graves, souvent fatales dans ce contexte, sont les complications à redouter.

Les syndromes tumoraux sont plus fréquents chez les patients présentant une hyperleucocytose. La splénomégalie et l'hépathomégalie concernent jusqu'à 50% de ces patients. Les adénopathies sont plus rarement observées. On peut constater des épanchements des séreuses dans les formes très prolifératives. L'atteinte cutanée est fréquente, correspondant à un infiltrat nodulaire spécifique par les cellules myéloïdes.

1.6. Diagnostic biologique

Le diagnostic de la LMMC est difficile car les critères positifs de la classification OMS ne sont pas spécifiques et le bilan doit exclure les autres syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques.

1.6.1. Numération formule sanguine

Par définition, la numération formule sanguine (NFS) retrouve une monocytose >1G/L. Le taux de monocytes est habituellement compris entre 2 et 5G/L, mais peut atteindre des taux très important jusqu'à 100G/L. Les monocytes représentent habituellement plus de 10% des leucocytes. Cytologiquement, les monocytes sont de morphologie mature, parfois atypiques. Les promonocytes et monoblastes peuvent être présents mais la somme de leur pourcentage ne doit pas dépasser 20% dans le sang ou la moelle osseuse, permettant alors de retenir le diagnostic de LAM. Par conséquent, la distinction entre monocytes et promonocytes est cruciale pour le diagnostic mais requiert une expertise cytologique importante. Un monocyte de morphologie normale est typiquement décrit comme une cellule de taille moyenne à grande, avec une chromatine dense, un noyau avec des circonvolutions et des replis, le cytoplasme est de couleur grisâtre, dit en « ciel d'orage ». Pour les promonocytes, les granulations cytoplasmiques sont un peu plus visibles que pour un monocyte, la chromatine est moins dense parfois nucléolée. Le noyau, quant à lui, présente moins de circonvolutions que pour un monocyte mature. Le cytoplasme peut présenter un léger liseré basophile en périphérie. Les monoblastes sont de grandes cellules à chromatine décondensée, à noyau sans circonvolution arrondi, nucléolé, à cytoplasme basophile (Figure 6).

Une hyperleucocytose est retrouvée dans plus de 50% des cas, non seulement du à la monocytose mais également à une neutrophilie, et à la présence fréquente d'une myélémie n'excédant pas 10% des leucocytes. Un taux de leucocytes normal ou légèrement diminué (avec neutropénie) est plus rarement observé. Des signes de dysgranulopoïèse à type d'hypogranulation sont fréquemment décrits. Une anémie et/ou une thrombopénie sont fréquentes.

Enfin, la présence de plus de 1,5 G/L de polynucléaires éosinophiles doit faire obligatoirement rechercher les réarrangements impliquant les gènes PDGFR alpha ou beta.

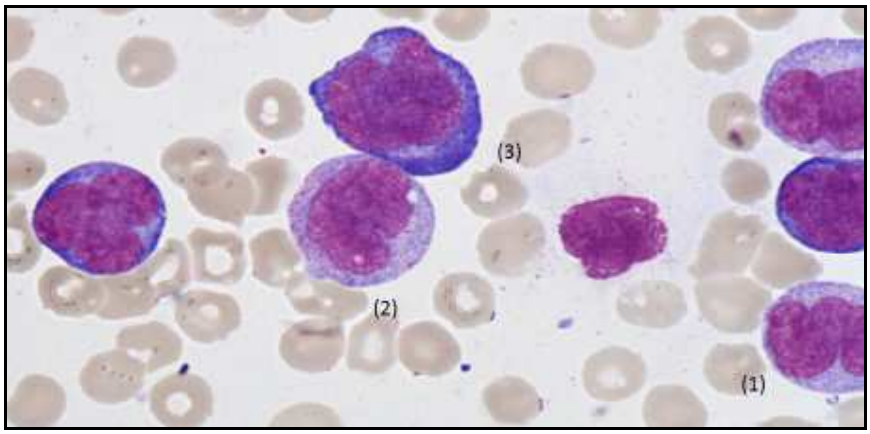


Figure 6 : Un monocyte de morphologie normale (1), un promonocyte (2) et un monoblaste(3) (grossissement X100, coloration May-Grünwald-Giemsa)

1.6.2. Le myélogramme

Il est le plus souvent hypercellulaire, avec une hyperplasie de la lignée granulo-monocytaire, et avec des signes quasiment constants de dysgranulopoïèse (dégranulation, noyau hypolobé). Des signes de dysmégacaryocytopoïèse (micromégacaryocytes, anomalie de lobulation du noyau) et de dysérythropoïèse (anomalie nucléaire, deshémoglobinisation, sidéroblastes en couronne…), sont fréquents.

La composante monocytaire est en général excédentaire (> 20 %), bien que difficile à apprécier (difficulté de différencier la lignée granuleuse dysplasique des monocytes). La blastose médullaire est quantifiée de la même manière que pour le sang, en additionnant les monoblastes aux promonocytes. Une blastose < 10 % classe le patient en LMMC-1, alors qu'un pourcentage entre 10 et 19 % est synonyme de LMMC-2.

La réalisation de cytochimie butyrate estérase peut être contributive pour quantifier la lignée monocytaire plus précisément.

1.6.3. La biopsie ostéo-médullaire (BOM)

La BOM n'est pas systématiquement recommandée en France, contrairement aux Etats-Unis, où elle est réalisée. Si elle est réalisée, elle revient hypercellulaire. Une fibrose réticulinique est observée dans 30 % des cas. Des nodules, composés de cellules dendritiques plasmocytoïdes, sont observés dans 20 % des cas (1).

1.6.4. Le caryotype

Le caryotype conventionnel permet de rechercher des anomalies cytogénétiques. On recherchera notamment une trisomie 8, une monosomie 7 (del7q), ou un caryotype complexe, classant alors les patients à haut risque cytogénétique. De plus, il pourra permettre d'éliminer une LMC, en l'absence de translocation t(9 ; 22) (chromosome de Philadelphie).

1.6.5. La biologie moléculaire

L'absence de transcrits BCR-ABL1 est indispensable au diagnostic, pour exclure le diagnostic de LMC.

Récemment, les progrès du séquençage haut débit ont permis de mettre en évidence des mutations à impact pronostique (ASXL1, voie de signalisation RAS), et d'autres altérations présentant un intérêt diagnostique (TET2/SRSF2/ZRSR2). En effet, Malcovati et son équipe (21) ont montré que l'association de deux mutations impliquant TET2 et SRSF2, ou TET2 et ZRSR2 (Zinc finger RNA-binding motif and Serine/arginine Rich 2) était hautement spécifique de la LMMC. La combinaison de ces deux mutations a une spécificité de 98.4%, chez les patients de cette étude (Figure 9).

1.7. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel initial des monocytoses sanguines est très vaste, compte tenu de la nature même du monocyte. C'est une cellule sanguine éphémère (temps de passage sanguin de deux à trois jours), qui est destinée à une activité immunitaire intra-tissulaire, après migration, et différenciation macrophagique ou histiocytaire. Les causes de monocytoses peuvent donc être multiples et ce signe n'est pas spécifique de la pathologie. Les monocytoses sont souvent associées à une hyperleucocytose globale, dans un contexte inflammatoire biologique, et clinique subaigu ou chronique.

Il existe donc de nombreuses autres causes de monocytoses, dites réactionnelles (infections virales, état inflammatoire chronique tel que le cancer, ou d'autres pathologies telles que la tuberculose, la brucellose, la leishmaniose, l'endocardite bactérienne, la sarcoïdose). La monocytose est également un signe précoce de régénération de la moelle osseuse (MO), pouvant faire suite à un traitement médicamenteux (notamment suite à une chimiothérapie aplasiante) ou à une infection. Le tableau suivant (tableau 2), décrit les différentes causes de monocytoses possibles.

Causes de monocytoses sanguines
▪ Infections : parasitoses (protozoaires : malaria, Kala-Azar, trypanosomiase), rickettsiose, endocardite bactérienne subaiguë, tuberculose, brucellose
▪ Pathologies inflammatoires chroniques : par exemple les entéropathies inflammatoires chroniques, maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé…), sarcoïdose, cancers…
▪ Maladies de surcharge lipidique : maladie de Gaucher…
▪ Hémopathies malignes : syndromes myéloprolifératifs, la LMC, LMMC, LAM myélomonocytaire
▪ Association avec d'autres lymphopathies : lymphome de Hodgkin, lymphome non hodgkinien
▪ Intoxication au tétrachloréthane
▪ Récupération hématologique postchimiothérapie

Tableau 2 : Causes de monocytoses sanguines (22)

1.8. Classifications pronostiques

L'évaluation pronostique des patients atteints de LMMC, se base sur la survie globale, ainsi que sur le risque d'acutisation en LAM. Différents paramètres sont pris en compte, pour tenter de stratifier au mieux les patients. Tout d'abord, l'évaluation du risque peut se faire grâce à la cytogénétique. Par ailleurs, de nombreux scores clinico-biologiques ont été développés. Enfin, plus récemment, la découverte d'anomalies moléculaires, ayant un impact pronostique, a permis la création de nouveaux scores.

1.8.1. Définition du risque cytogénétique

Le registre Espagnole des SMD (23), a récemment étudié 414 patients LMMC, qui ont bénéficié d'une analyse cytogénétique conventionnelle au diagnostic. Dans ce travail, 110/414 patients (27%) étaient porteurs d'une anomalie cytogénétique. Des analyses multivariables se basant sur des courbes de survie, et un risque d'acutisation en LAM, ont permis de stratifier les patients dans 3 catégories de risques cytogénétiques différentes.

- Haut risque : Trisomie 8, anomalie du chromosome 7, caryotype complexe (plus de 3 anomalies caryotypiques)
- Faible risque : Caryotype normal, délétion du chromosome Y
- Risque intermédiaire : Toutes les autres anomalies chromosomiques non décrites dans les deux groupes précédents

Ces trois groupes ont des courbes de survie différentes. La survie globale à cinq ans est respectivement de 4%, 35%, et 26%. La survie moyenne, selon le risque cytogénétique, est respectivement de 11 mois, 37 mois, 18 mois.

1.8.2. Evolution des scores clinico-biologiques

L'IPSS (International Prognostic Scoring System) a été développé en 1997, pour une population de patient SMD, et incluant la LMMC. Il catégorise les patients en 4 sous-groupes de risques (faible, intermédiaire 1 et 2, élevé), en lien avec la survie globale. Il tient compte du risque cytogénétique, du pourcentage de blastes médullaires, du nombre de cytopénie. Cependant, l'IPSS permet d'évaluer le risque, seulement chez les patients avec une LMMC non proliférative, c'est-à-dire avec moins de 13G/L de leucocytes dans le sang. Son intérêt est donc limité dans le pronostic de la LMMC (24).

Onida *et al*. (25) ont donc créé un score spécifique de la LMMC. Le MDAPS (MD Anderson Prognostic Scoring System), basé sur le taux d'hémoglobine, la quantification de la

myélémie, le taux de lymphocytes dans le sang, et le pourcentage de blastes dans la MO. Ce modèle identifie 4 catégories de risques, avec des médianes de survie respectivement de 24, 15, 8 et 5 mois pour un risque faible, intermédiaire-1, intermédiaire-2 et élevé. Cependant, le MDAPS a été analysé sur 212 patients LMMC dans le registre de Dusseldorf. Il a été montré dans ce travail, que la quantification de la myélémie, n'avait pas de valeur pronostique. En outre, il a été mis en évidence qu'un taux élevé de LDH (lactate déshydrogénase), un taux d'hémoglobine < 9 g/dL, ainsi qu'un taux de plaquettes < 100 G/L, étaient de mauvais pronostique.

L'équipe de Germing *et al*. (26), définit alors le score de Dusseldorf. Celui-ci classifie les patients en 3 catégories de risques. La survie moyenne est de 93 (risque faible), 26 (intermédiaire) et de 11 mois (élevé). Par ailleurs, Germing *et al*. ont également réalisé une étude prospective sur 266 patients LMMC-1, et 73 patients LMMC-2. La médiane de survie était de 20 mois contre 15 mois respectivement (27).

En 2013, le CPSS (CMML-specific Prognostic Scoring System) a été développé à partir d'une cohorte de 558 patients, et validé sur 274 patients (28). Le sous-type FAB, le sous-type OMS, le risque cytogénétique, le besoin transfusionnel sont les quatre facteurs pronostiques pris en compte. Quatre groupes sont ainsi définis : Risque faible, intermédiaire-1, intermédiaire-2 et élevé, avec des survies médianes respectivement de 72, 31, 13 et de 5 mois. Mais, le défaut principal de ce score, est la prise en compte de la place de la LMMC au sein de la classification FAB. En effet, ce document n'est plus considéré à ce jour, comme référentiel.

En 2013 également, l'institut de recherche de la Mayo clinic développe un score. Mais, celui-ci ne tient toujours pas compte des anomalies moléculaires pronostiques. C'est le MPM (Mayo Prognostic Model), proposé par Patnaik *et al* (29). Un point est attribué pour la présence d'un des quatre critères suivants :

- Monocytose sanguine > 10G/L
- Présence de blastes circulants dans le sang
- Un taux d'hémoglobine < 10g/dL
- Un taux de plaquettes < 100G/L

Ce modèle stratifie les patients en 3 groupes de risques : Faible (0), intermédiaire (1) et élevé (≥2), associés respectivement à une médiane de survie de 32, 18 et 10 mois.

1.8.3. ASXL1

Par la suite, les récentes découvertes moléculaires seront prises en compte. Ainsi, l'avènement du NGS n'a pas seulement permis de mieux comprendre la physiopathologie de la LMMC, mais également d'intégrer ces nouvelles données au sein de nouveaux scores pronostiques.

Tout d'abord, les mutations non-sens et frameshift (décalage du cadre de lecture) d'ASXL1 méritent d'être recherchées car elles aggravent le pronostic (Figure 7). Les mutations faux-sens n'ayant pas d'impact pronostique (30).

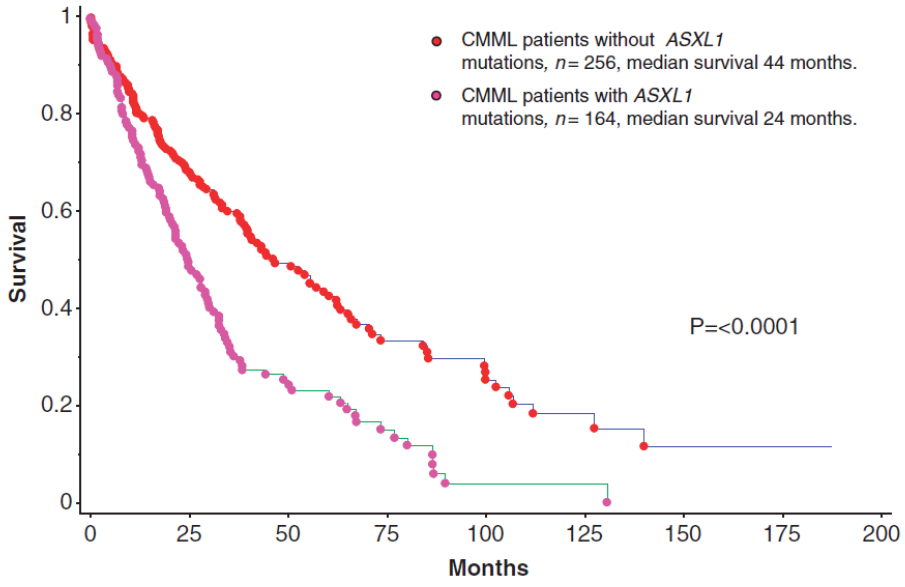


Figure 7 : Impact pronostique de la mutation d'ASXL1 chez les patients LMMC (30)

C’est donc suite à ces découvertes que le GFM (Groupe Français des Myélodysplasies) et la Mayo clinique proposeront deux scores similaires, intégrant tous deux la recherche de la mutation d’ASXL1.

Premièrement, le score du GFM proposé à partir d’une série de 312 patients LMMC comprends les critères suivants (31) :

- Leucocytose > 15 G/L (3 points)
- Mutations d’ASXL1 (2 points)
- Âge > 65 ans (2 points)
- Plaquettes < 100G/L (2 points)
- Hémoglobine < 10g/dL pour les femmes et < 11 g/dL pour les hommes (2 points)

Ce modèle stratifie les patients en 3 groupes de risque, avec une médiane de survie correspondante. Le risque faible (0-4 points), pour lequel la médiane de survie n’a pas pu être déterminée chez les patients de ce groupe (non atteinte). Le risque intermédiaire (5-7 points), avec une médiane de survie de 38.5 mois. Le risque élevé (8-12 points), avec une médiane de survie de 14.4 mois.

D’autre part, le Mayo Pronostic Model, décrit précédemment, est contradictoire avec les résultats de ce travail du GFM, car il n’intègre pas les mutations d’ASXL1. La Mayo clinic, tente alors de clarifier la place d’ASXL1 au sein de ce score pronostique. Sur une cohorte de 466 patients, ils confirment l’impact pronostique des mutations non-sens et frame-shift d’ASXL1. Un nouveau score, le Mayo Molecular Model (MMM) est donc créé. Les facteurs pronostiques sont identiques au mayo pronostic model, excepté qu’il intègre la mutation d’ASXL1 (30). Quatre groupes de risques sont ainsi définis. Le risque élevé (> 3 facteurs de risques), le risque intermédiaire-2 (2 facteurs de risques), le risque intermédiaire-1 (1 facteur de risque), le risque faible (absence de facteur de risque). Avec respectivement, des survies médianes de 16, 31, 59, 97 mois.

Enfin, dans cet article il est également démontré la supériorité du score MMM vis-à-vis de celui du GFM, pour stratifier les patients faibles risques. Dans cette même étude, il est mis en

évidence que SETBP1 (SET Binding Protein 1) n'a pas d'impact sur les courbes de survies (30). De plus, ni ASXL1, ni SETBP1 ne prédisent le risque d'acutisation en LAM.

1.8.4. Autres mutations pronostiques

Dans les LMMC, les formes prolifératives ont un plus mauvais pronostic, que les formes dysplasiques. Les mutations affectant la voie RAS sont fréquentes, dans les formes prolifératives, et leur valeur pronostique se précise (NRAS, KRAS) (Figure 8) (16).

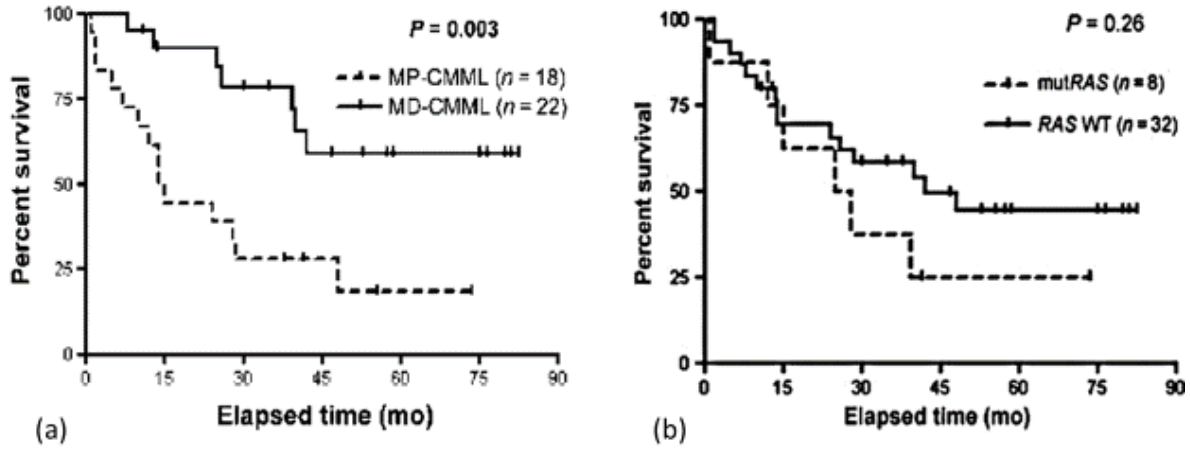


Figure 8 : Influence des formes prolifératives versus dysplasiques (a) et des mutations de la voie RAS (b) sur la survie de patients LMMC (16)

La découverte d'une mutation NPM1 ou FLT3 ITD peut faire suggérer une forme frontière avec une LAM, et peut conduire à envisager un traitement par chimiothérapie intensive. La présence de mutations du gène TET2 (au moins en l'absence de mutation d'ASXL1) semble associée à une meilleure réponse à l'azacitidine (32).

Par ailleurs, les mutations de RUNX1 n'auraient pas d'impact sur la survie moyenne, mais entraineraient un délai d'acutisation en LAM plus rapide. Enfin, plus le nombre global de gènes mutés est important, plus l'impact pronostique est péjoratif.

1.8.5. Synthèse

Scores pronostiques LMMC (année)	Facteurs de risque (points)	Médiane de survie en fonction du groupe de risque, en mois (points)				Commentaire
		Faible	Int-1	Int-2	Elevé	
IPSS (1997)	1. Risque cytogénétique (0,5 point si intermédiaire) (1 point si élevé) 2. Blastose médullaire (%) (0,5 point si 5-10%) (1,5 point si 11-20%) 3. Cytopénies (0,5 point si ≥2 cytopénies)	68,4 (0)	42 (0,5-1)	13,2 (1,5-2)	4,8 (2,5-3)	Non adapté pour les formes prolifératives
Mayo pronostic model (2013)	1. Monocytose sanguine > 10 G/L (1) 2. Blastose sanguine (1) 3. Hémoglobine < 10 g/dL (1) 4. Plaquettes < 100 G/L (1)	32 (0)		18,5 (1)	10 (≥2)	Mutations d'ASXL1 non prises en compte
GFM (2013)	1. Age > 65 ans (2) 2. Leucocytose > 15 G/L (3) 3. Anémie (2) 4. Plaquettes < 100 G/L (2) 5. Mutation d'ASXL1 (2)	Non atteint (0-4)		38,5 (5-7)	14·4 (>7)	
MMM (2014)	1. Monocytose sanguine > 10 G/L (1) 2. Blastose sanguine (1) 3. Hémoglobine < 10 g/dL (1) 4. Plaquettes < 100 G/L (1) 5. Mutation d'ASXL1 (1)	97 (0)	59 (1)	31 (2)	16 (>3)	Les mutations d'ASXL1 et de SETBP1 ne prédisent pas le risque de transformation en LAM

Tableau 3 : Différents scores pronostiques de la LMMC, modifié de Patnaik MM et al. (33)

1.9. Thérapeutique

Il manque clairement des données dans la littérature, concernant la thérapeutique de la LMMC. En effet, la plupart des essais cliniques concernant des patients LMMC, intègrent également des patients SMD, ce qui est problématique, car l'évaluation n'est pas optimale du fait de différences certaines, entre ces deux pathologies.

Mais il est tout de même consensuel que l'attitude thérapeutique doit être guidée par certains points clés. Premièrement, seulement l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est éventuellement curative. Par contre, elle nécessite l'existence d'un donneur, l'âge du patient doit être inférieur à 70 ans. La balance bénéfice risque doit être finement analysée (absence de comorbidité majeure) car la mortalité est élevée. Par ailleurs, le traitement symptomatique à savoir les transfusions de culots globulaires, le traitement par antibiothérapie large spectre des infections, et les transfusions de plaquettes, restent le plus souvent indispensables.

1.9.1. Traitements symptomatiques

Lorsque l'anémie est symptomatique et qu'elle interfère avec la qualité de vie du patient, on préfère utiliser des agents stimulants l'érythropoïèse, telle que l'érythropoïétine recombinante (EPO). Les transfusions globulaires vont rarement corriger, dans la durée, l'hémoglobine au-dessus de 10 g/dL (taux à partir duquel, les symptômes liés à l'anémie sont négligeables). La réponse thérapeutique est à évaluer à partir de 12 semaines de traitement. Environ 50 à 60 % des patients y sont répondeurs (32). En cas de réponse, le traitement doit être ajusté de façon à maintenir un taux d'hémoglobine entre 10,5 et 12g/dL, selon les recommandations de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).

L'EPO n'a actuellement pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe dans la LMMC, mais fait l'objet d'une recommandation d'utilisation par la haute autorité de santé (HAS).

Si l’anémie persiste, malgré l’instauration d’un traitement par EPO, la transfusion de culot globulaire est alors envisageable. Son objectif est de maintenir un taux d’hémoglobine au-dessus de 8 g/dL. Il faudra alors penser à mettre en place un traitement chélateur du fer, pour éviter toute surcharge chez ces patients, qui seront amenés à être multi transfusés.

La transfusion plaquettaire doit être à envisager, seulement en cas de force majeure, car les risques d’inefficacités sont élevés, du fait de l’allo-immunisation rapide. Les indications de la transfusion plaquettaire sont l’existence d’un saignement chez le patient thrombopénique, un geste opératoire, ou la prophylaxie d’un traitement fortement thrombopéniant. Le seuil de transfusion plaquettaire étant fixé à 10 G/L, en l’absence de facteur de risque, dans ce dernier cas (recommandations de l’ANSM et de l’HAS).

Enfin, la survenue d’infections graves est la complication la plus redoutable, parfois fatale. Les patients doivent être traités par une antibiothérapie large spectre.

1.9.2. Traitements freinant l’évolutivité de la maladie

En l’absence de signe de myéloprolifération majeure (leucocytes <13G/L, absence de splénomégalie), l’azacitidine (AZA, nom de spécialité Vidaza®), bénéficie d’une AMM pour la LMMC de type 2 avec plus de 10 % de blastes médullaires.

L’AZA est un analogue de la cytidine, et pourrait exercer ses effets antinéoplasiques par des mécanismes multiples, comprenant une cytotoxicité directe à l'encontre des cellules hématopoïétiques anormales de la MO, et une hypométhylation de l'ADN (agent hypométhylant).

L’AZA agit lentement. Aussi, la réponse thérapeutique peut n’être obtenue qu’après 6 cures de traitement. Il est donc recommandé de ne pas conclure à un échec thérapeutique avant la sixième cure.

Fenaux *et al*. ont démontré au cours de l'essai AZA-01 (inclusion de 22 patients LMMC), un avantage de survie chez les patients ayant reçu de l'AZA, vis-à-vis de ceux ayant reçu une chimiothérapie d'induction (24.5 mois contre 15 mois respectivement) (34). D'autres études ont par la suite corroborées la supériorité de l'AZA, vis-à-vis de la chimiothérapie d'induction dans la LMMC (35).

L'AZA est donc devenu un traitement de référence chez les patients LMMC en l'absence de signe de myéloprolifération (leucocytose < 13 G/L, absence de splénomégalie, de localisations viscérales...).

La décitabine qui est un autre agent hypométhylant, a montré des taux de réponses similaires à l'AZA dans la LMMC, et elle n'apporte pas de supériorité chez les patients non répondeurs à l'AZA (36).

Par ailleurs, Bejar *et al*. ont montré que la présence d'une mutation de TET2 semblait être corrélée à une bonne réponse aux agents hypométhylants (37). Cependant, l'évaluation de l'effet de la mutation de TET2, sur la réponse aux agents hypométhylants, doit encore être évaluée.

En présence de myéloprolifération (leucocytose>13G/L, hépatosplénomégalie), le traitement cytoréducteur de référence reste l'hydroxyurée, bien que son efficacité soit limitée. Dans ce contexte, un essai randomisé de phase 3 est en cours en France. La décitabine est comparée à l'hydroxyurée. Si la conclusion de cet essai aboutit à une supériorité de la décitabine, les agents hypométhylants pourront également être considérés comme traitement de référence, au sein de cette population de LMMC myéloprolifératives

1.9.3. Traitement curatif

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement éventuellement curatif, mais reste une option thérapeutique seulement pour une minorité des patients.

En définitive, la classification pronostique est indispensable car elle va orienter la conduite à tenir en terme de thérapeutique. De plus, l'intégration de la biomoléculaire à la démarche diagnostique et thérapeutique est maintenant bien acquise, en témoigne la figure suivante (Figure 9).

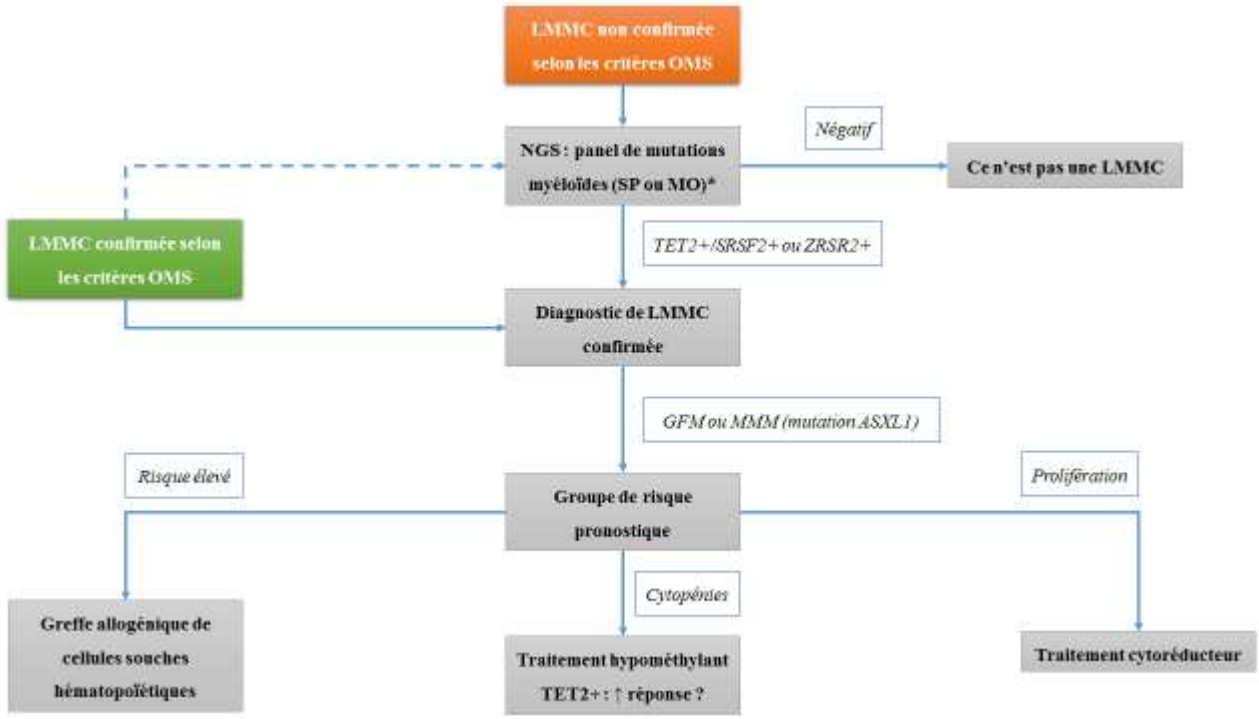


Figure 9 : Intégration du profil mutationnel dans la démarche diagnostique et thérapeutique de la LMMC, modifié de Sallman DA et al. (10)

** Un profil mutationnel par NGS est recommandé pour les suspicions et les cas confirmés de LMMC*

2. APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DE LA LMMC

Comme décrit précédemment, la LMMC est une pathologie de diagnostic difficile et de pronostic sombre.

Récemment, Selimoglu-Buet *et al*. (2), ont montré l'intérêt de l'immunophénotypage monocytaire sanguin pour le diagnostic de LMMC.

2.1. Les sous-types monocytaires

La nomenclature définit trois types de monocytes sur le plan phénotypique (38). L'expression à leur surface, de marqueurs antigéniques membranaires (CD = Cluster de différenciation), tels que le CD14 et le CD16 permet de les classer. Il est alors décrit les monocytes dits classiques CD14+/CD16- (MO1), les intermédiaires CD14+/CD16+ (MO2) et les non classiques CD14low/CD16+ (MO3). Le CD14 est le récepteur du lipopolysaccharide bactérien. Le CD16 est un récepteur de faible affinité de la partie FC des immunoglobulines de type G.

Les monocytes classiques constituent dans des conditions normales, la majorité du pool des monocytes totaux (environ 85%). Ces différentes catégories de monocytes se différencient dans leurs fonctions, par leurs expressions de récepteurs de cytokines, et leur activité de phagocytose. Aussi, les monocytes classiques CD16-négatifs expriment fortement le CCR2 (récepteur membranaire de la cytokine CCL2) et faiblement le CX3CR1 (récepteur membranaire de la fractalkine). C'est l'inverse pour les monocytes CD16-positifs (intermédiaire et non classique). CCL2 et la fractalkine sont deux chimiokines qui vont conditionner la migration des monocytes (par exemple au niveau d'un site inflammatoire).

Les monocytes non classiques n'ont pas ou peu de fonction phagocytaire, mais essentiellement un rôle dans la réponse inflammatoire (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que le Tumor Necrosis Factor (TNF), les interleukines 1 et 12). Les

monocytes classiques sont dédiés à la phagocytose, et n'ont pas ou peu de fonction dans l'inflammation. Les monocytes intermédiaires correspondent à des monocytes transitionnels, et ont à la fois une fonction de phagocytose, et un rôle dans l'inflammation (39).

2.2. Cytométrie conventionnelle

L'équipe de Selimogu-Buet *et al*. (2) a étudié la répartition des différents sous-types monocytaires, par cytométrie en flux, dans le sang des patients atteints de LMMC. Cette étude a montré qu'un pourcentage de monocytes classiques CD14+/CD16- (MO1) supérieur ou égal à 94% des monocytes totaux permettait de distinguer les cas de LMMC des autres causes de monocytoses avec une excellente spécificité et sensibilité (respectivement 95.1% et 90.6%).

Dans cette étude, l'immunophénotypage monocytaire était réalisé sur sang total anticoagulé à l'EDTA. Au minimum, 50000 monocytes étaient analysés. Les monocytes totaux étaient caractérisés par leur expression du CD14 après avoir exclu les autres populations leucocytaires. Les lymphocytes B sont exclus grâce à un anticorps (Ac) anti CD 24, les polynucléaires et les immatures granuleux grâce à un Ac anti CD 16, les cellules NK grâce à un Ac anti CD 56, les lymphocytes T grâce à un Ac anti CD 2.

Les sous-populations monocytaires ont alors été quantifiées à partir d'un graphe bi-paramétrique CD14/CD16, permettant de distinguer les monocytes classiques (MO1) des monocytes intermédiaires (MO2) et non classiques (MO3) (Figure 10).

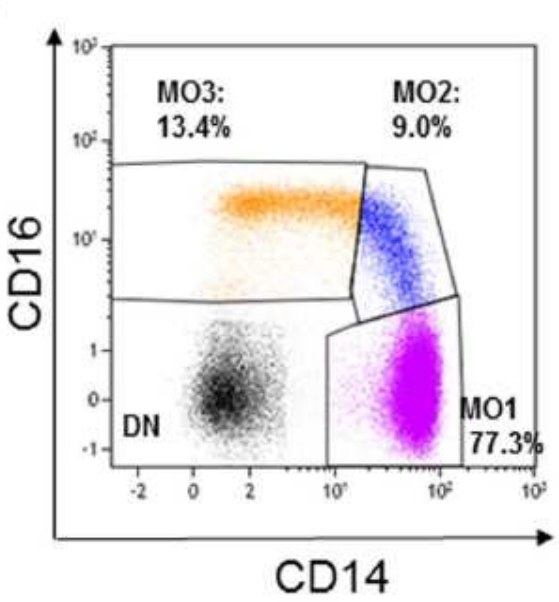


Figure 10 : Représentation des 3 sous-types de monocytes, selon l'expression du CD14 et du CD16 (MO1=monocyte classique, MO2=monocyte intermédiaire, MO3=monocyte non classique) (2)

Dans cette étude, 2 cohortes de patients, dite « learning, » et « validation » ont été testées. Ces 2 cohortes comprennent i) des patients récemment diagnostiqués LMMC, non traités, ii) des patients présentant une monocytose réactionnelle, iii) une autre hémopathie que la LMMC, iv) des sujets sains (Co) et des sujets sains d'âge comparable aux patients LMMC (aged-Co).

Il est mis en évidence, que le pourcentage de MO1 est augmenté de façon statistiquement significative chez les patients LMMC, vis-à-vis de toutes les autres catégories de patients (Figure 11).

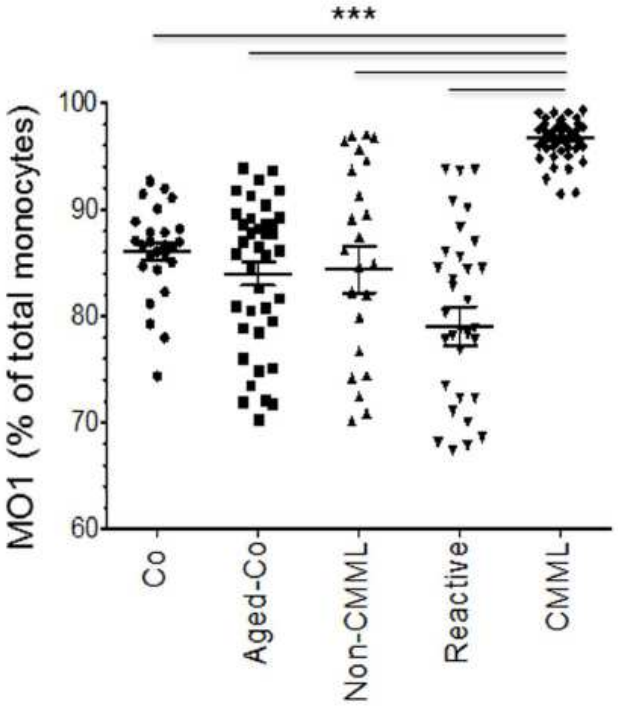


Figure 11 : Pourcentage de MO1 au sein des différentes catégories de patients de la cohorte learning (LMMC = 96,6% ; patients sains et jeunes (Co) = 86,1% ; patients sains (aged-Co) = 84% ; monocytoses réactionnelles = 79,1% ; hémopathies non LMMC = 84,4%)

La performance statistique de ce nouveau marqueur de la LMMC permet d'en faire un élément clé dans le diagnostic de la pathologie. Pour un seuil de MO1 ≥ 94%, la sensibilité et la spécificité de ce marqueur sont respectivement.de 90.6% et 95.1%. L'aire sous la courbe (AUC) de la courbe ROC (Receiver Operator Characteristic) est de 0.971 (Figure 12).

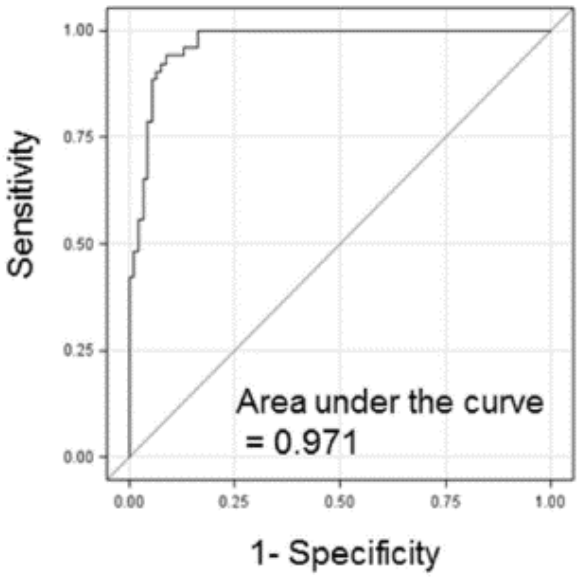


Figure 12 : Courbe ROC représentant la sensibilité et la spécificité du pourcentage de MO1 dans le diagnostic de la LMMC

Ce travail apporte un outil diagnostique objectif pour le diagnostic de LMMC qui doit être intégré dans l'algorithme décisionnel devant une monocytose persistante.

2.3. La formule sanguine par HematoFlow™ (Beckman Coulter)

2.3.1. Description

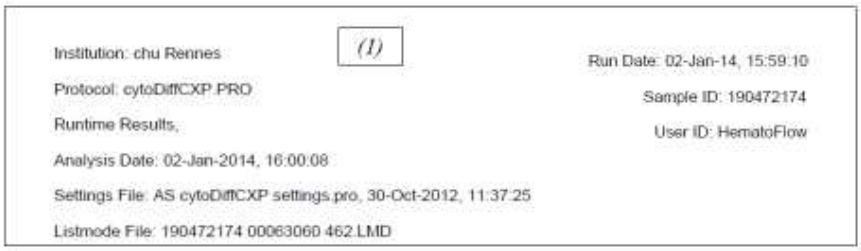
HematoFlow (HF) est une solution de rendu de formule sanguine utilisant la cytométrie en flux, compatible avec un rendu rapide au sein d'un laboratoire d'hématologie automatisée. Elle consiste en une combinaison d'un analyseur d'hématologie, le DxH800, avec la cytométrie en flux. L'étape de cytométrie est déclenchée par un algorithme décisionnel, basé sur les alarmes qualitative ou quantitative de l'analyseur DXH800. Par exemple, dans notre laboratoire, toutes monocytoses supérieures à 1,5G/L nécessitent la réalisation d'une formule en cytométrie en flux. Le marquage des leucocytes sanguins, avec un cocktail de 6 anticorps couplés à 5 fluorochromes différents (CytoDiff ™, Beckman Coulter), est réalisé sur un préparateur automatique FP1000. Le cocktail d'anticorps (CytoDiff) comprend :

- Un anti CD36 (clone F16.152), conjugué au FITC (fluorescein isothiocyanate)
- Un anti CD2 (clone 39C1.5), et un anti CD294 (CRTH2) (cloneBM16) conjugué au PE (phycoerythrin)
- Un anti CD19 (clone J4.119), conjugué à l'ECD (PE-Texas Red)
- Un anti CD16 (clone 3G8), conjugué au PE-cyanine 5 (PC5)
- Un anti CD45 (clone J.33), conjugué au PC7 (PEcyanine7)

Les échantillons, ainsi marqués, sont ensuite analysés sur le cytomètre FC500 (Beckman Coulter). Le système d'analyse permet, par une stratégie de fenêtrage automatique[1], basée sur l'exclusion successive des différentes sous-populations leucocytaires, d'obtenir une formule à 13 paramètres (Figure 13) (40) (41). Les 10 paramètres quantifiés sont les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes B, les lymphocytes non-B (T/NK) exprimant ou non le CD16, les monocytes exprimant ou non le CD16, la myélémie, les blastes (B, T, monoblastique ou non-B/non-T).

---

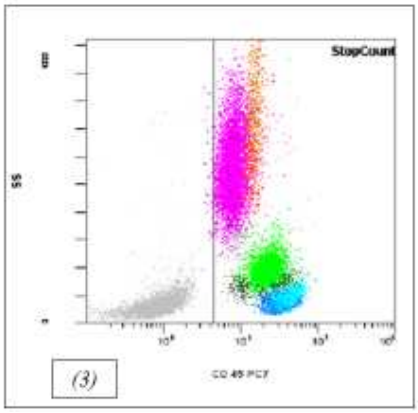
[1] ***Fenêtrage automatique : Sélection des différentes populations leucocytaires par l'automate, ne pouvant être modifiée par l'utilisateur***

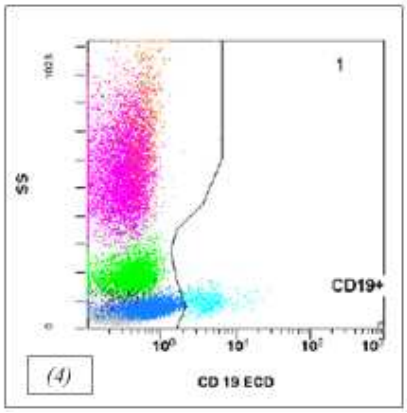


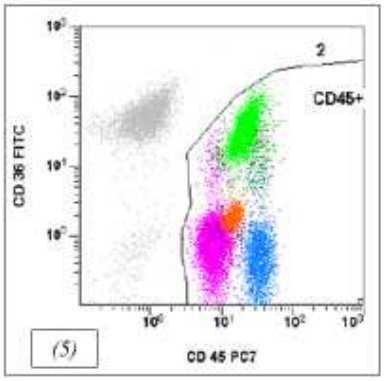
(2)

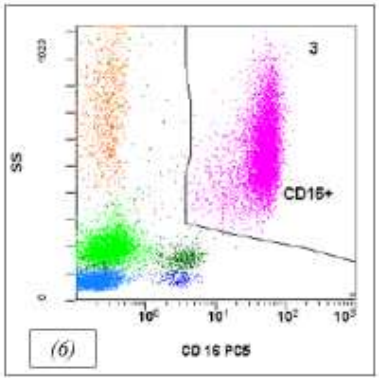
[CD45+ OR CD19+] Legend

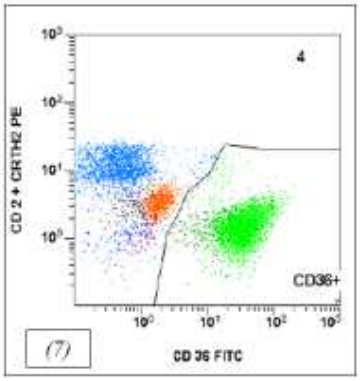
Color	Name	% Gated
	Lymph.B	3.77
	T-	17.35
	T+	0.87
	Lymph.T&NK	18.22
	Lymph.Total	21.99
	M-	23.81
	M+	2.64
	Mono.Total	26.45
	Imm Gran	0.51
	Eosino.Total	5.29
	Neutro.Mature	44.92
	Neutro.Total	45.43
	Xb	0.02
	Xt	0.01
	Xm	0.00
	Xn	0.01
	Baso.Total	0.80
	Total WBC	100.00

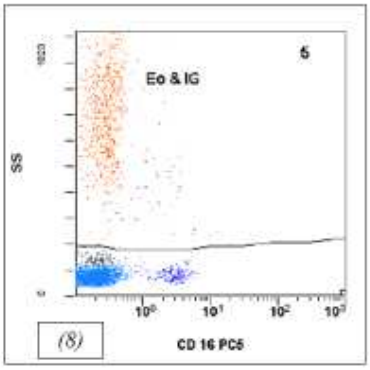


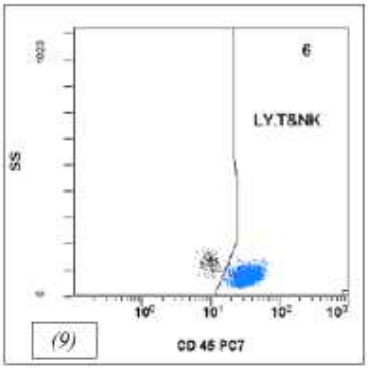


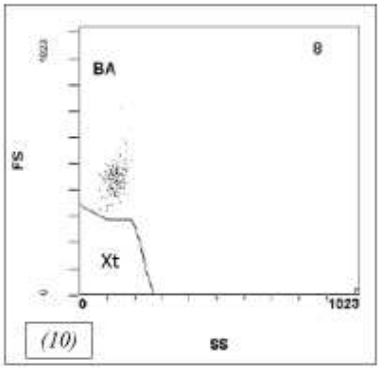


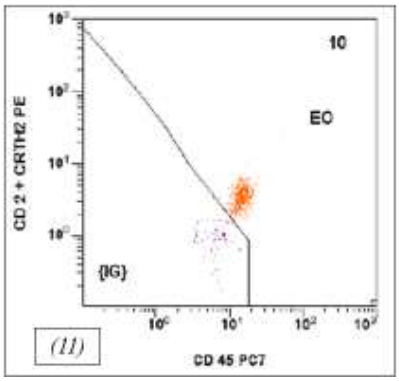


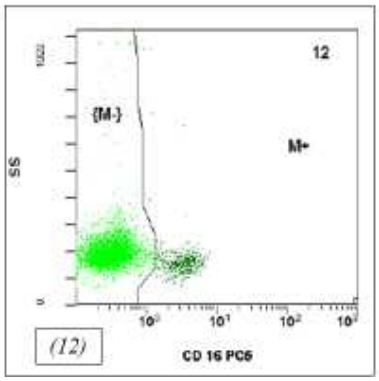












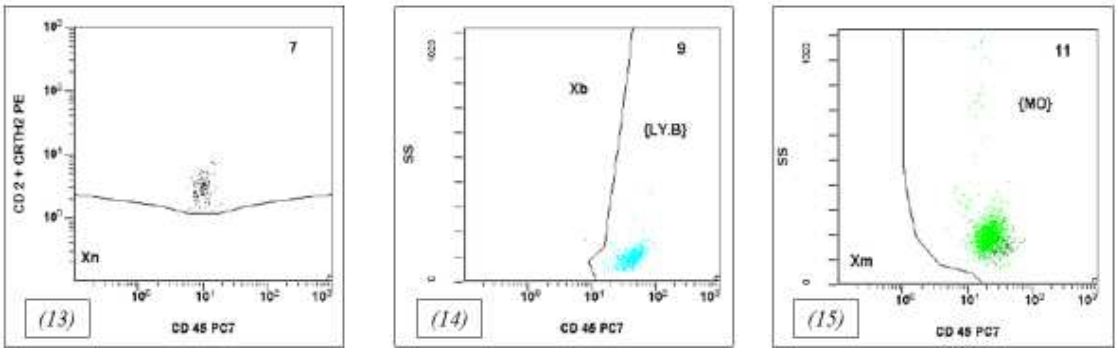


Figure 13 : Stratégie de fenêtrage HematoFlow

- *Date et heure de réalisation de l'analyse, identification de l'échantillon (1)*
- *Pourcentage des différents sous-types leucocytaires (2)*
- *Gate représentant les différentes populations leucocytaires, SS/CD45 (3)*
- *Exclusion des lymphocytes B, CD19+ (4)*
- *Exclusion des débris cellulaires, autres cellules non leucocytaire, CD45- (5)*
- *Exclusion des polynucléaires neutrophiles, CD16+ (6)*
- *Exclusion des monocytes, CD36+ (7)*
- *Exclusion des immatures granuleux et des polynucléaires éosinophiles, SS fort (8)*
- *Exclusion des lymphocytes T et cellules NK (9)*
- *Exclusion des polynucléaires basophiles et quantification des blastes T (Xt) (10)*
- *Séparation des polynucléaires éosinophiles et des immatures granuleux (11)*
- *Séparation des monocytes classiques des non classiques (12)*
- *Quantification des blastes non déterminés (Xn) (13)*
- *Quantification des blastes B (Xb) (14)*
- *Quantification des blastes monocytaires (Xm) (15)*

2.3.2. HF et sous-types monocytaires

De façon intéressante, HF nous donne la possibilité de quantifier le pourcentage de monocytes CD16-négatifs sur une simple formule sanguine. Cela, grâce à la présence dans le CytoDiff, d'un Ac anti CD36, et d'un anti CD16. L'antigène CD36 humain, appartient à la famille des récepteurs « scavenger » (éboueurs) de classe B. Le CD36 a initialement été identifié comme une glycoprotéine membranaire plaquettaire, également connu sous le nom de glycoprotéine IV. C'est un récepteur de la thrombospondine-1 (TSP-1). Le CD36 est donc

exprimé sur les plaquettes, mais aussi sur les monocytes et macrophages matures, les cellules endothéliales et sur certaines cellules dendritiques dérivées de macrophages.

La présence d'un Ac anti CD36, nous renseigne sur le pourcentage de monocytes totaux. Cela, après exclusion des lymphocytes B par le CD19, des plaquettes et débris sur le graphe bi-paramétrique CD36/CD45, et des neutrophiles par le CD16. La région « CD36+ » sur le graphe bi-paramétrique CD2+CRTH2/CD36 permet de quantifier les monocytes par leur expression du CD36. Ensuite, les monocytes CD16-négatifs et CD16-positifs sont quantifiés sur le graphe bi-paramétrique SS (Side Scatter[2])/ CD16. Ainsi, HF permet de différencier les MO1, des autres types de monocytes (Figure 14).

Au vu de l'intérêt de la quantification des monocytes CD16-négatifs pour le diagnostic de LMMC, HematoFlow pourrait être un outil efficace, disponible sur une simple formule sanguine, permettant de différencier une LMMC d'une monocytose réactionnelle, ou d'une autre hémopathie.

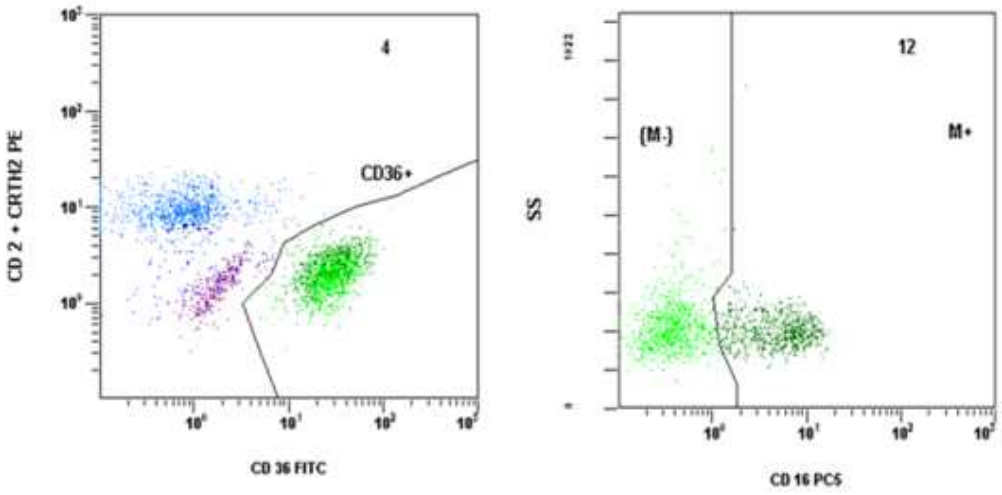


Figure 14 : Fenêtres monocytaires d'intérêt de l'HF
- monocytes totaux (CD36-positifs)
- monocytes CD16-négatifs (M-) versus monocytes CD16-positifs (M+)

---

[2] ***Side Scatter : Reflète la granulosité cellulaire***

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'intérêt de la quantification des monocytes CD16-négatifs (MO1), par la solution HematoFlow, dans le diagnostic de la LMMC.

Dans la première partie de ce travail, consistant en une étude rétrospective, nous avons comparé la quantification des MO1 par HematoFlow, d'échantillons diagnostiques de patients atteints de LMMC avérée, à des patients présentant une monocytose réactionnelle. Le seuil le plus discriminatif entre les patients LMMC, et les autres causes de monocytoses a été défini par la courbe ROC. Les performances de l'HF pour ce seuil de positivité ont été calculées, afin de déterminer la place de ce nouveau paramètre de routine, dans l'algorithme diagnostique des monocytoses.

L'objectif secondaire était de comparer la quantification des monocytes CD16-négatifs en Hematoflow, par rapport à la technique de référence, la cytométrie en flux conventionnelle.

Pour cela, nous avons mis en place la quantification des monocytes CD16-négatifs, au sein du laboratoire d'Hématologie du CHU de Rennes, selon la méthode détaillée dans l'article de Selimoglu-Buet *et al*. La corrélation du pourcentage de MO1 quantifié par les 2 méthodes, ainsi que la concordance entre HF et la CMF, pour le diagnostic positif de LMMC, ont été évaluées de façon prospective, sur une série de patients explorés au CHU de Rennes pour une monocytose.

Finalement, nous avons évalué la pertinence de l'association des deux techniques pour le diagnostic de LMMC.

MATERIELS ET METHODES

1. PATIENTS ET ECHANTILLONS

1.1. Etude rétrospective monocentrique

Cette étude basée sur l'analyse rétrospective de données biologiques, déjà générées par le laboratoire, a bénéficié d'un avis favorable du comité d'éthique du CHU de Rennes.

Un premier groupe de 42 patients présentant une LMMC avérée a été constitué de façon rétrospective de 2011 à 2015, grâce au système informatique du laboratoire. L'extraction de ces patients a été permise par le classement « LMMC » sur le compte rendu des myélogrammes, réalisés au laboratoire entre 2011 et 2015. Ces patients devaient présenter, selon les critères OMS, une monocytose persistante > 1G/L, associée à un myélogramme en faveur du diagnostic, et l'absence de détection de transcrits BCR-ABL1. Pour ces patients, les fichiers PDF des graphes d'HematoFlow disponibles ont permis de retrouver la quantification des monocytes (% total), la valeur absolue de la monocytose à partir de la leucocytose (DXH800), et le pourcentage des monocytes CD16-négatifs. En effet, nos procédures de validation technique de la NFS imposent une formule leucocytaire par HF systématique, pour toutes les monocytoses ≥ 1.5G/L, sans antécédent connu, nous permettant d'effectuer ce recueil rétrospectif.

En parallèle, nous avons constitué un groupe contrôle (CTL) de 95 patients présentant une monocytose sanguine (> 1G/L), mais ne remplissant pas les critères OMS de définition de la LMMC : absence de signes compatibles avec le diagnostic de LMMC au myélogramme, ou monocytose transitoire. Les patients de ce groupe CTL ont tous bénéficier d'une formule leucocytaire par HF.

Pour ces 2 groupes, les caractéristiques cliniques (âge, sexe, présence d'un syndrome tumoral, évolution) et biologiques (numération sanguine, le pourcentage et la valeur absolue des monocytes ainsi que le pourcentage de monocytes CD16-négatifs) ont été recueillies.

1.2. Etude prospective

Le pourcentage de monocytes CD16-négatifs (MO1) d'un groupe de 49 patients présentant une monocytose chronique, explorés dans le cadre d'une consultation d'Hématologie, au sein du CHU de Rennes ou du CH de Saint-Malo, a été analysé de façon prospective par les 2 techniques (HF et CMF). Ces patients ont été classés, selon les critères OMS, en deux groupes, LMMC ou non LMMC. Au sein de ces deux groupes, les pourcentages de MO1 obtenus, ont étés comparés pour valider les résultats de l'HF par rapport à la méthode de référence par CMF. De plus, les résultats obtenus par les 2 techniques ont été confrontés au reste du bilan clinico-biologique, afin d'évaluer l'intérêt de ces 2 techniques pour le diagnostic de LMMC.

2. IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE SANGUIN

2.1. HematoFlow

Cette formule leucocytaire par HF est réalisée sur le même prélèvement (sang total anticoagulé à l'EDTA) que celui servant à la NFS standard (automate DXH 800, Beckman Coulter).

Les patients étudiés ont donc bénéficié d'une numération sanguine (DXH 800, Beckman Coulter) et d'une formule leucocytaire par HF (préparateur d'échantillons FP1000 et cytomètre de flux FC 500 ; Beckman Coulter).

Pour ce faire, chaque échantillon de sang total anticoagulé à l'EDTA, est préparé à l'aide d'un automate (FP1000, Beckman Coulter). La préparation des échantillons se fait selon une procédure dite « lyse, no wash ». Celle-ci consiste, à incuber pendant 15 minutes, 100 µL de sang avec 10 µL du cocktail d'Ac CytoDiff ™ (Beckman Coulter) (Tableau 4). Cette étape est suivie par une lyse des globules rouges, à l'aide du réactif Versalyse (Beckman Coulter), pendant 10 min.

Nous avons donc vu, précédemment, que l'HF nous donne accès au pourcentage de MO1 (par la présence d'un Ac anti CD36 et d'un anti CD16). Ce pourcentage est donc relevé, pour chacun des patients, et une analyse statistique de ce marqueur est alors réalisée.

2.2. Cytométrie conventionnelle

2.2.1. Mise en place du marquage au laboratoire d'Hématologie

Comme pour toutes réalisations d'un nouveau marquage en cytométrie en flux conventionnelle (CMF), la mise en place au laboratoire de l'immunophénotypage monocytaire sanguin, a nécessité de répondre à certaines questions pré-analytiques, notamment concernant le délai de réalisation du marquage, garantissant un rendu de résultat fiable. Par ailleurs, il a fallu effectuer certains réglages au niveau du cytomètre de flux.

2.2.2. Réglages du cytomètre de flux

Tout d'abord, il est bon de rappeler que les signaux de fluorescences, émis par les différents fluorochromes couplés aux Ac, suite à la stimulation par la lumière du laser, sont séparés par des filtres optiques, puis collectés par des photomultiplicateurs (PMT). Ces données sont amplifiées, numérisées puis traitées par un système informatique.

Il a donc fallu réaliser un réglage au niveau des PMT du cytomètre. Celui-ci a pour but, de délimiter précisément, les évènements cellulaires dits positifs (leucocyte exprimant le marqueur antigénique reconnu par l'Ac couplé au fluorochrome), des négatifs. Cette étape indispensable, est rendue possible, par l'emploi d'une suspension de billes, sur lesquelles sont greffées des Ac du même isotype, que ceux utilisés dans le panel de marquage. Ces Ac reconnaissent donc ceux du panel, et miment un antigène membranaire. Nous pouvons ainsi, pour chaque Ac du panel, définir le réglage du PMT nous garantissant la meilleure séparation entre les évènements positifs et négatifs.

D’autre part, les fluorochromes utilisés n’ont pas forcément une raie d’émission fine mais un spectre plus ou moins large. Il en résulte que certains fluorochromes vont émettre un signal dans des longueurs d'ondes captées par un PMT, qui ne lui est pas destiné. Ce phénomène parasite doit être corrigé, et cela nécessite la mise en place d'une matrice de compensation. Cette dernière, consiste en une soustraction du signal de fluorescence parasite perçu en trop par un PMT. La matrice de compensation de notre marquage est décrite en annexe (Annexe 2).

2.2.3. Réalisation du marquage

L’immunophénotypage des monocytes sanguins, par CMF conventionnelle est réalisé à partir du même tube de sang, que celui servant à la NFS (et à l’HF). Il est donc réalisé sur sang total, anticoagulé à l’EDTA. Les leucocytes sont marquées (200 µL de sang total), avec différents Ac (10 µL de chaque solution d’Ac), couplés à différents fluorochromes (Tableau 4). Puis, une étape de lyse des globules rouges (lyse, no wash) est effectuée (Versalyse, Beckman Coulter). Le tube est alors passé dans le cytomètre de flux (Navios, Beckman Coulter). Le cytomètre compte alors 50000 évènements monocytes (CD14+) par échantillon. Les données du cytomètre de flux sont alors analysées, grâce au logiciel Kaluza software (Beckman Coulter).

CMF CONVENTIONNELLE						
Antigène	**CD24**	**CD14**	**CD56**	**CD2**	**CD16**	**CD45**
Fluorochrome	**PE**	**ECD**	**PC5.5**	**PC7**	**AA750**	**KO**
Clone	**PE ALB9**	**RM053**	**N901**	**39C1.5**	**3G8**	**J.33**
Fournisseur	**Beckman Coulter**					
HF (Cytodiff TM)						
Antigène	**CD36**	**CD2**	**CD294**	**CD19**	**CD16**	**CD45**
Fluorochrome	**FITC**	**PE**		**ECD**	**PC5**	**PC7**
Clone	**F16.152**	**39C1.5**	**BM16**	**J4.119**	**3G8**	**J.33**
Fournisseur	**Beckman Coulter**					

Tableau 4 : Panel d'Ac utilisés pour le marquage par CMF conventionnelle, en comparaison au panel CytoDiff ™

2.2.4. Quantification des monocytes CD16-négatifs

Ce marquage mis en place au laboratoire, permet d'apprécier le pourcentage de MO1. Les leucocytes sont marqués avec un Ac anti-CD45,-CD24, -CD14, -CD16, -CD56, -CD2. Nous utilisons une stratégie d'exclusion des gates leucocytaires, pour identifier différencier les sous-types de monocytes. Les sous-types monocytaires MO1, MO2, MO3 sont séparés grâce au CD14 et au CD16. La fraction de chaque sous-type est alors quantifiée, la stratégie de fenêtrage est détaillée dans la figure suivante (Figure 15).

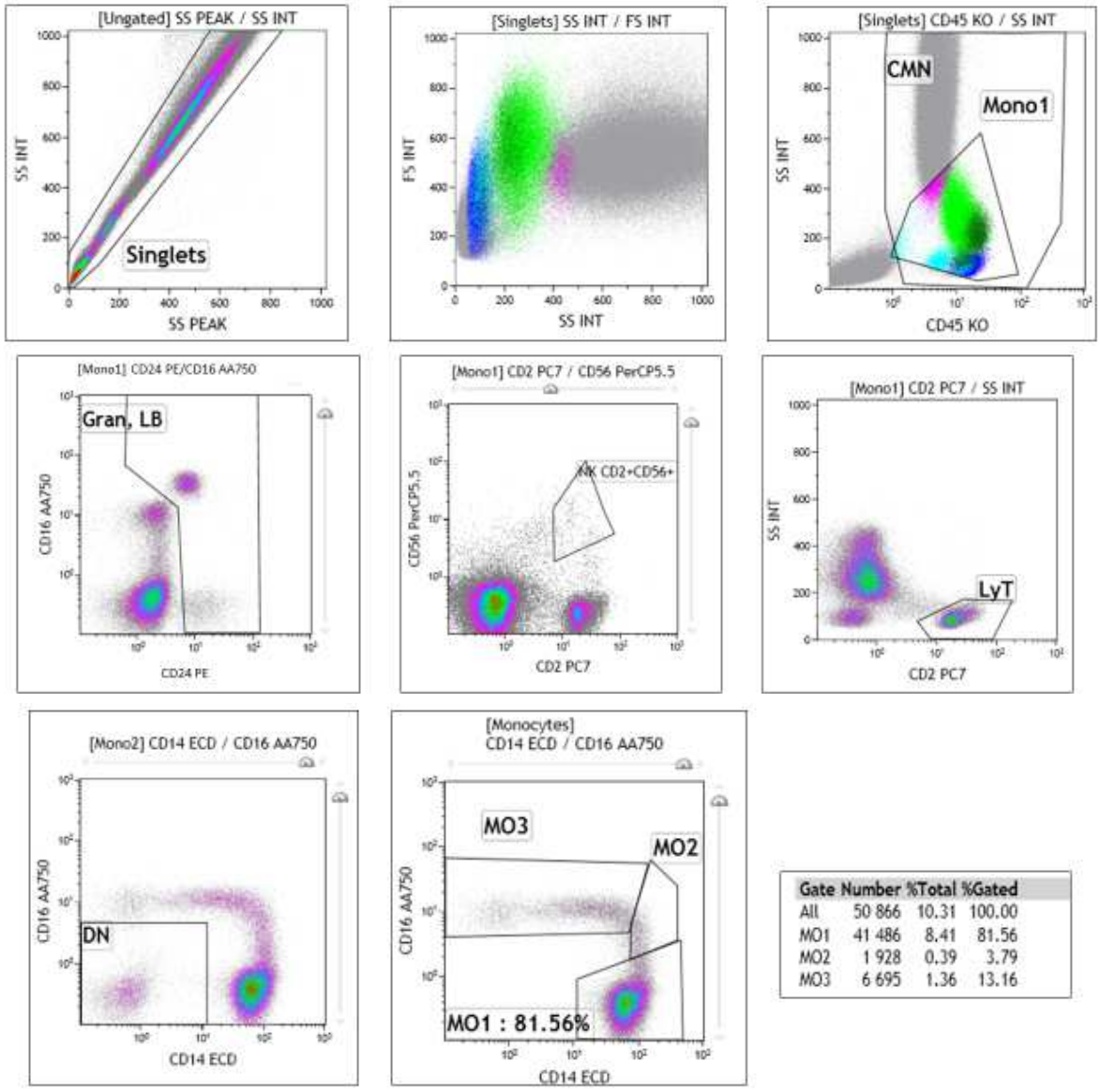


Figure 15 : Stratégie de fenêtrage et quantification des sous-types monocytaires par CMF conventionnelle

- *Exclusion des doublets de cellules*
- *Représentation des populations leucocytaires side-scatter/forward-scatter (SS/FS)*
- *Sélection des monocytes (cellules CD45+/SS intermédiaires)*
- *Exclusion des granulocytes et des lymphocytes B*
- *Exclusion des cellules NK*
- *Exclusion des lymphocytes T*
- *Exclusion des cellules résiduelles CD14-/CD16-*
- *Quantification des différents sous-types monocytaires CD14+/CD16- (MO1, classique), CD14+/CD16+ (MO2, intermédiaire) et CD14low/CD16+ (MO3, non-classique*

2.2.5. Délai optimal de réalisation du marquage et viabilité du paramètre MO1

Pour la mise en place de l'immunophénotypage monocytaire sanguin, par CMF conventionnelle au laboratoire, il a fallu déterminer le délai optimal de réalisation de l'analyse. Pour cela, nous avons étudié la viabilité du paramètre monocyte CD16-négatif. Nous avons réalisé chez un patient présentant une monocytose chronique, et ayant un pourcentage de monocytes CD16-négatifs ≥ 94%, un marquage à JO (date du prélèvement), J+1, J+2. Nous intégrons à ce marquage, un marqueur de viabilité (DAPI Sigma D9542-IMG, 10 microlitres), afin d'apprécier la mortalité cellulaire. Ce dernier, entraine une fluorescence chez les cellules mortes ou mourantes, en se fixant à leurs acides nucléiques.

Le délai de réalisation de cet immunophénotypage par CMF conventionnelle, a été fixé à 24h. En effet, au-delà de ce délai, la quantité de cellules mortes ou mourantes augmente, et le pourcentage de MO1 devient biaisé et ininterprétable (Annexe 3).

3. ANALYSE STATISTIQUE

Les variables quantitatives continues sont représentées par la moyenne des valeurs (minimum ; maximum) et sont comparées par un test de Student (une *p-value* < 0.01 est considérée comme significative). Les variables qualitatives représentées par le nombre de patients concernés N (pourcentage) sont comparées avec le test de Chi^2. Le logiciel GraphPad a été utilisé pour l'analyse statistique et la réalisation des graphiques et des courbes ROC.

L'étude rétrospective évaluait l'intérêt d'HematoFlow pour le diagnostic de LMMC. La quantification du pourcentage de MO1 par HF, sur la population de patients LMMC, a été comparée à la population de monocytoses réactionnelles, grâce à un test de Student de comparaison des moyennes, sur deux populations d'échantillons indépendantes. De plus, la réalisation d'une courbe ROC a permis de définir le meilleur seuil de pourcentage des MO1 pour le diagnostic de LMMC (Index de Youden). L'aire sous la courbe ROC a été mesurée. Pour ce seuil, la sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative ont été calculées.

La deuxième partie de l'étude comparait les pourcentages de MO1 retrouvés par HF et la technique de référence publiée, la CMF. Un test de Student de comparaison des moyennes, sur échantillons appariés, est réalisé (une *p-value* < 0.01 est considérée comme significative).
La corrélation entre les résultats obtenus par HF et CMF, est étudiée par la réalisation de la droite de régression linéaire et le calcul du coefficient de corrélation de Pearson (r). Le calcul du coefficient Kappa de Cohen, permet d'apprécier la concordance entre les deux techniques. Un coefficient Kappa ≥ 0.6 est synonyme d'une bonne concordance entre les valeurs d'HF et de CMF. Une représentation de Bland-Altman, comparant la différence observée entre les 2 techniques, par rapport à la moyenne du pourcentage de MO1 retrouvée par les 2 techniques, permet de mesurer l'existence d'un biais systématique (moyenne des différences).

RESULTATS

1. ETUDE RETROSPECTIVE : EVALUATION DE L'INTERET D'HEMATOFLOW POUR LE DIAGNOSTIC DE LMMC

1.1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients

Entre 2011 et 2015, 42 patients identifiés comme des LMMC au diagnostic, avaient des données d'HF disponibles. L'âge moyen de ces patients de 72 ans (16-90) n'était pas significativement différent du groupe de 95 patients contrôles (monocytoses non LMMC) avec une moyenne de 63 ans (13-92).

Pour les données de la numération sanguine, les taux d'hémoglobine, de leucocytes et de monocytes n'étaient pas significativement différents. Alors que le groupe LMMC présentait un taux de plaquette significativement abaissé, par rapport au groupe contrôle, avec une moyenne respectivement de 134 G/L et 229 G/L. Les LMMC retenues étaient pour 88% des LMMC de type 1, et 12% des LMMC de type 2. Un syndrome tumoral a été retrouvé chez 11 patients, dont 2 atteintes cutanées (Tableau 5).

	LMMC	CONTRÔLE	
Nombre	**42**	**95**	
Âge moyen (min ; max)	**72 (16 ; 90)**	**63 (13 ; 92)**	**p = 0,06**
Sexe (nombre ; pourcentage)			
- homme	**32 (76%)**	**66 (69%)**	**p = 0.055**
- femme	**10 (24%)**	**29 (31%)**	**p = 0.059**
Hémoglobine g/dL, moyenne (min ; max)	**11,13 (2,7 ; 16,4)**	**10,5 (6,6 ; 14,9)**	**p = 0,17**
Plaquettes G/L, moyenne (min ; max)	**133,7 (18 ; 498)**	**229 (26 ; 776)**	**p < 0,001**
Taux moyen de leucocytes sanguins (min ; max)	**24,2 (5,1 ; 209,7)**	**21,3 (5,6 ; 52,5)**	**p = 0,53**
Monocytes G/L, moyenne (min ; max)	**5,42 (1,09 ; 56,62)**	**2,21 (1,51 ; 4,28)**	**p = 0,06**
Types de LMMC (nombre ; pourcentage)			
-Type 1	**37 (88%)**		
-Type 2	**5 (12%)**		
Syndrome tumoral (nombre ; pourcentage)	**9 (21%)**		
Atteinte cutanée (nombre ; pourcentage)	**2 (4,7%)**		
Décès (nombre ; pourcentage)	**12 (28,6%)**		

Tableau 5 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients de l'étude rétrospective

1.2. Augmentation du pourcentage de monocytes CD16-négatifs chez les patients LMMC

Le pourcentage de monocytes CD16-négatifs (MO1) quantifié par HF est significativement supérieur dans le groupe LMMC, par rapport au groupe contrôle avec une moyenne respectivement de 95.25% et de 87.43% ($p < 0,001$) (Figure 16). La figure suivante (Figure 17) représente les histogrammes d'intérêt d'une flow-page d'un patient LMMC et celle d'un patient contrôle.

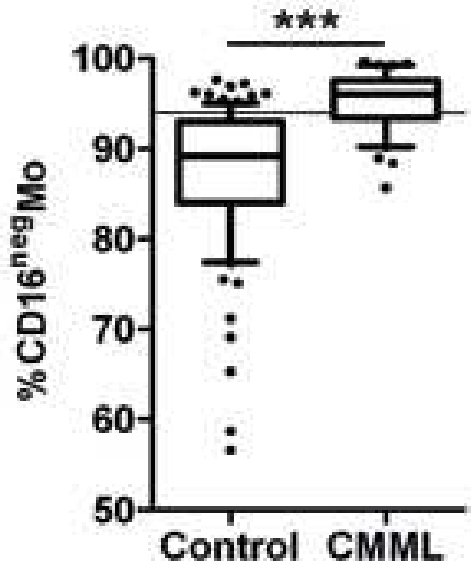


Figure 16 : Distribution du pourcentage de MO1 au sein des groupes contrôle et LMMC ; la ligne grise représente le seuil de 94% de MO1

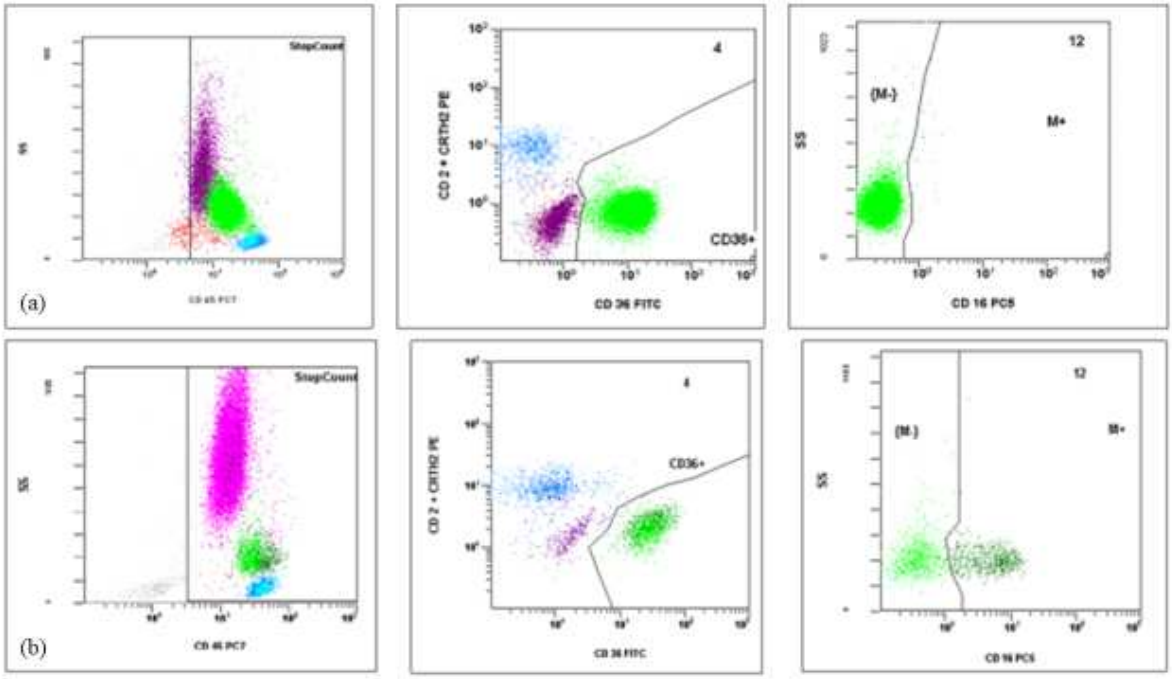


Figure 17 : Histogrammes représentant les populations monocytaires d'un patient LMMC (a) et celles d'un patient contrôle (b) ; pourcentages de MO1 respectivement de 99,823 et de 56,6 %

1.3. Performances statistiques du paramètre pourcentage de MO1 par HematoFlow

Pour étudier le potentiel du taux de MO1, rendu par HF, comme marqueur de la LMMC, nous avons réalisé une courbe ROC (Figure 18). Celle-ci, nous a permis de déterminer un seuil, où la relation entre la sensibilité et la spécificité du paramètre MO1, est optimale. Aussi, nous avons déterminé un seuil de MO1 ≥ à 94%, où la performance de ce marqueur diagnostique est la plus élevée.

A ce seuil, la sensibilité du paramètre est de 70%, la spécificité de 88% (Tableau 6). L'AUC de la courbe ROC est de 0.865. En comparaison, l'AUC du paramètre diagnostique de la LMMC dans la classification OMS (monocytose > 1G/L) est de 0.630. La VPP (Valeur Prédictive Positive) et la VPN (Valeur Prédictive Négative) sont respectivement de 73% et de 86%.

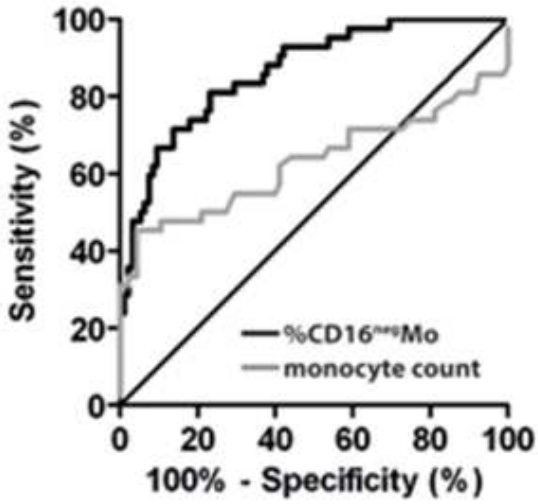


Figure 18 : Courbe ROC du paramètre pourcentage de MO1 par HF

	CONTRÔLE	LMMC
MO1 < 94%	**84**	**13**
MO1 ≥ 94%	**11**	**29**
TOTAL	**95**	**42**

Tableau 6 : Résumé du paramètre pourcentage de MO1, chez les patients des groupes contrôle et LMMC, au seuil de 94%

2. ETUDE PROSPECTIVE

2.1. Distribution, droite de régression linéaire, corrélation et concordance de la quantification des MO1 par HF par rapport à la CMF conventionnelle.

Il n'existe pas de différence significative au seuil alpha 1% entre la quantification des MO1 par la technique HF par rapport à celle obtenue avec la CMF sur les 49 échantillons étudiés dans la cohorte prospective (p = 0,06).

La quantification des MO1 en HF est bien corrélée à la quantification par la CMF conventionnelle avec un coefficient de Pearson r = 0,72 (p < 0,001). La droite de régression linéaire montre que les séries de valeurs sont liées par une relation de type affine (y = 0,8 x + 17) (Figure 19).

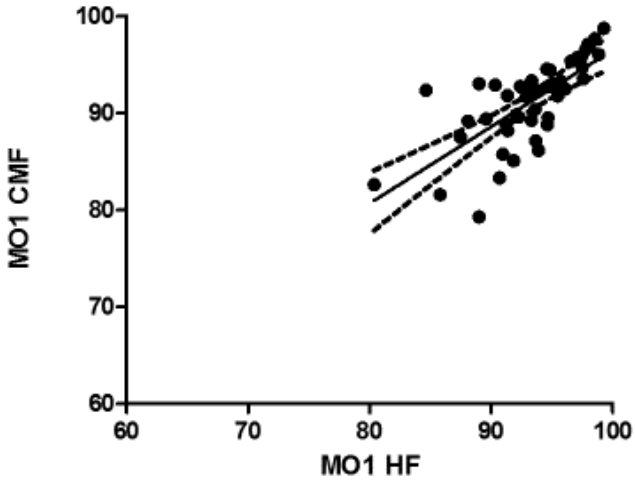


Figure 19 : Droite de régression linéaire (pourcentage de MO1 par CMF en fonction du pourcentage de MO1 par HF) :

- *Equation de la droite de régression : y = 0,8x + 17*
- *Coefficient de corrélation de Pearson : r = 0,72*

Il est également important de s'assurer de la concordance de ces données. Le calcul du coefficient Kappa (k) de Cohen est calculé à partir du tableau suivant (Tableau 7). Ce dernier confirme la concordance forte entre ces deux séries de données (k > 0,6).

	HF+ (MO1 ≥ 94%)	**HF- (MO1 < 94%)**	**TOTAL**
CMF+ (MO1 ≥ 94%)	**8**	**0**	**8**
CMF- (MO1 < 94%)	**7**	**34**	**41**
TOTAL	**15**	**34**	**49**

Tableau 7 : Concordance entre la quantification des MO1 par la technique HF et CMF

- *Coefficient Kappa de Cohen= 0.61*

La représentation de Bland-Altman a permis de comparer les couples de mesures HF et CMF, et ainsi d'apprécier le biais entre ces derniers (Figure 20). On retrouve un biais égal à – 1,482 qui nous informe qu'HF a tendance à surestimer le pourcentage de monocytes CD16-négatifs par rapport à la CMF. La majorité des points est bien contenue à l'intérieur de l'intervalle de confiance.

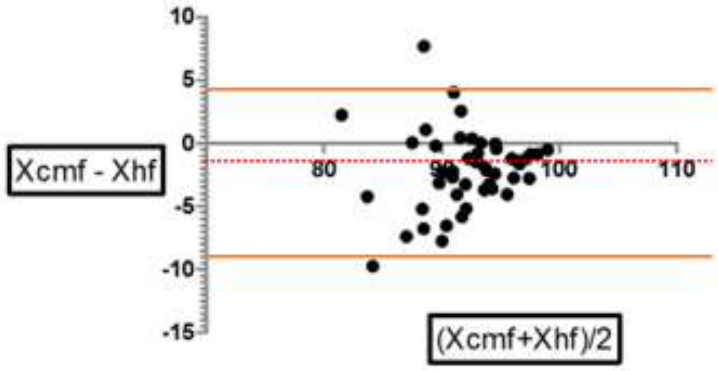


Figure 20 : Représentation de Bland Altman, différences entre les couples de mesures, en fonction de la moyenne du couple de mesure

- *Biais (moyenne des différences, ligne en pontillés) = -1,482*
- *La ligne supérieure et la ligne inférieure représentent l'intervalle de confiance à 95% (-8 ; 4)*

2.2. Intérêt diagnostique de la quantification des MO1

Sur ces 49 patients, 11 (22 %) remplissaient les critères OMS de la LMMC. La quantification des MO1 par les deux techniques met en évidence 8 doubles positifs (MO1 HF et CMF ≥ 94 %) sur les 11 patients du groupe LMMC, alors qu'aucun double positif n'est retrouvé dans le groupe non LMMC. Aussi, trois patients du groupe LMMC présentent une quantification de MO1 inférieure à 94% par HF et CMF. L'âge des patients classés en LMMC était significativement plus élevé que ceux du groupe non-LMMC. Le sex ratio était en faveur du sexe masculin dans les 2 groupes (1,8 et 1,9 respectivement). A nouveau, les plaquettes étaient significativement diminuées dans le groupe LMMC avec un taux de 155G/L et 306G/L respectivement pour le groupe LMMC et non-LMMC (p = 0,008). Ces différentes données sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 8).

	LMMC	NON LMMC	
Nombre (pourcentage)	**11 (22%)**	**38 (78%)**	
HF+/CMF+ ***HF-/CMF-*** ***HF+/CMF-***	**8** **3** **0**	**0** **31** **7**	
Âge moyen (min ; max)	**78 (66 ; 90)**	**64 (4 ; 93)**	**p < 0,001**
Sexe (nombre ; pourcentage) ***- homme*** ***- femme***	 **7 (64%)** **4 (36%)**	 **25 (66%)** **13 (34%)**	 **p = 0.6** **p = 0.5**
Hémoglobine g/dL, moyenne (min ; max)	**12,2 (8,4 ; 17,4)**	**10,3 (6,9 ; 13,6)**	**p < 0,01**
Plaquettes G/L, moyenne (min ; max)	**155 (16 ; 709)**	**306 (25 ; 910)**	**p = 0,008**
Taux moyen de leucocytes sanguins (min ; max)	**12,8 (4,5 ; 51,5)**	**18,12 (6,4 ; 65,3)**	**p = 0,13**
Monocytes G/L, moyenne (min ; max)	**3,9 (1,4 ; 18,5)**	**2 (1,17 ; 4,12)**	**p = 0,17**
% myélémie, moyenne (min ; max)	**2,45 (0 ; 16)**	**2,46 (0 ; 13)**	**p = 0,88**
Blastes circulants, moyenne (min ; max)	**0 (0 ; 0)**		
Syndrome tumoral (nombre ; pourcentage)	**2 (14%)**		

Tableau 8 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients de l'étude prospective

Les critères OMS des 11 patients du groupe LMMC sont décrits dans la figure suivante (Figure 21). On constate que 3 patients du groupe LMMC présentent une autre cause possible de monocytose, à savoir, une sarcoïdose et deux cancers solides. Ce sont également ces 3 patients qui présentaient un pourcentage de M01 inférieur à 94% par HF et CMF.

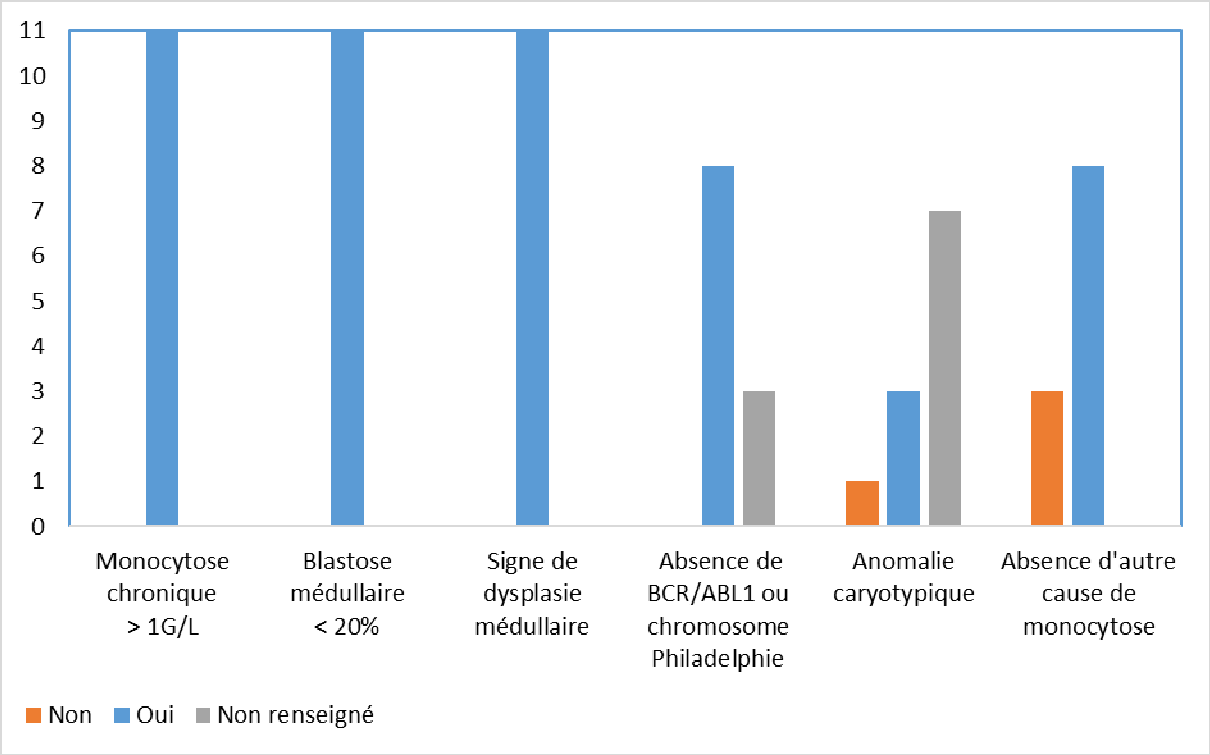


Figure 21 : Critères OMS des patients du groupe LMMC

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons démontré l'intérêt de la quantification des monocytes CD16-négatifs (MO1) en HematoFlow pour le diagnostic de LMMC. Il est tout d'abord intéressant de noter que le même seuil de 94% de MO1, utilisé pour identifier les patients LMMC dans l'étude princeps en CMF conventionnelle (2), a également été retrouvé pour HF. Ceci facilite la validation biologique de ce paramètre en HF et en CMF avec un raisonnement identique. Ainsi, un pourcentage de monocytes CD16-négatifs supérieur ou égal à 94% en HF présente une spécificité de 88%, ce qui est particulièrement intéressant pour le diagnostic de LMMC, manquant actuellement de critères objectifs.

Nous notons cependant que les performances diagnostiques de la quantification des MO1 en HF sont légèrement moins avantageuses que la CMF conventionnelle. Il est possible d'émettre diverses hypothèses pour expliquer cette différence. Premièrement, les panels d'anticorps utilisés et la stratégie d'identification de la population monocytaire totale diffèrent entre les 2 techniques. En CMF, les monocytes sont caractérisés par leur expression du CD14, alors que l'expression du CD36 est utilisée dans la solution HF. L'utilisation du CD36 peut présenter des limites pour la caractérisation des monocytes. D'abord, il existe d'exceptionnels déficits en CD36 qui sont asymptomatiques, et pouvant être révélés fortuitement en HF (42) (Figure 22 a). Moins exceptionnellement, les plaquettes exprimant le CD36 peuvent se fixer sur les polynucléaires et ne pas être éliminées sur le graphique biparamétrique CD45/CD36. Dans ce cas, ces cellules avec satellitisme plaquettaire expriment artéfactuellement le CD36, et en l'absence de CD16 sont comptabilisées parmi les MO1 (Figure 22 b). D'autre part, nous avons vu que l'immunophénotypage par HF analysait moins de cellules monocytaires que la CMF conventionnelle (20000 événements CD45+ pour HF contre 50000 évènements CD14+ pour la CMF). Enfin, la stratégie de fenêtrage de l'HF est automatique, ne permettant pas de retraiter les graphiques, même si le biologiste identifie une erreur de caractérisation d'une sous population leucocytaire, pouvant fausser le résultat du pourcentage de MO1 en HF.

Cependant, HF apporte un argument fort pour le diagnostic de LMMC, sur une simple formule sanguine, réalisée dans la routine du laboratoire. Ce paramètre est donc très

intéressant pour l'évaluation des monocytoses persistantes. Il permet d'évoquer le diagnostic de LMMC et de proposer un bilan hématologique plus exhaustif pour confirmer cette suspicion.

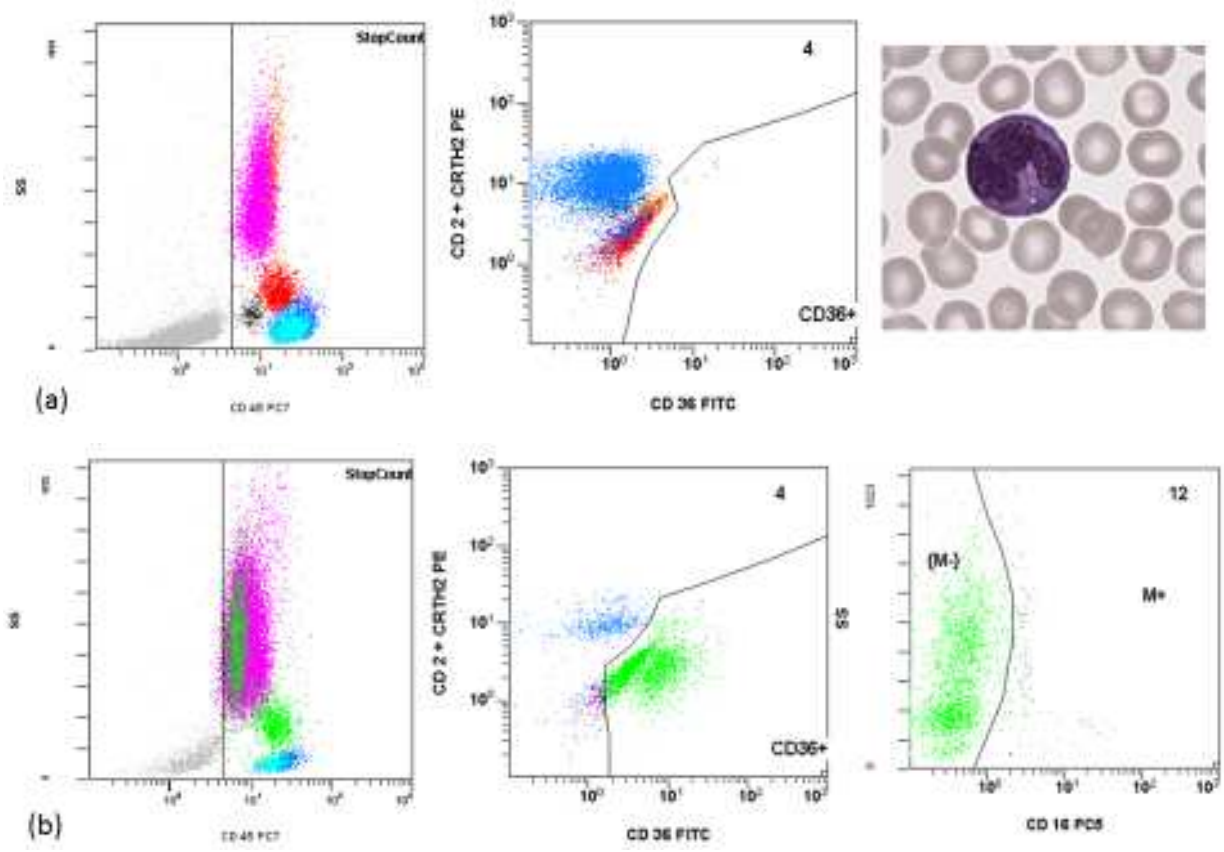


Figure 22 : Limites d'HematoFlow et du CD36
- (a) monocytes n'exprimant pas le CD36
- (b) satellitisme plaquettaire autour des polynucléaires neutrophiles entrainant une erreur dans la quantification des MO1

Pour illustrer l'intérêt de l'HematoFlow dans le diagnostic, nous rapportons un cas pour lequel la quantification des MO1 par HF à apporter un argument pour la LMMC, dans une situation clinique complexe :

Monsieur L, âgé de 85 ans, a consulté en Avril 2015, pour altération de l'état général, avec asthénie. L'examen clinique retrouvait un syndrome tumoral avec des infiltrations cutanées

violacées, d'apparition récente, au niveau de la jambe droite (Figure 23), et une adénopathie supra-centimétrique inguinale droite, sans hépatosplénomégalie. Dans les antécédents du patient, on note une thrombopénie auto-immune. Le bilan biologique retrouvait une bicytopénie avec une anémie (hémoglobine : 10,6 g/dL) et une thrombopénie à 125 G/L. Une hyperleucocytose modérée à 14 G/L avec une monocytose à 2,7 G/L, et une myélémie à 3 % sont retrouvées. La biopsie cutanée réalisée en première intention retrouvait un infiltrat monomorphe dermo-hypodermique de cellules blastiques, exprimant faiblement la myéloperoxydase (MPO), le lysozyme, CD4 et CD56, faisant suspecté le diagnostic de sarcome granulocytaire de type monoblastique (Figure 24). Le pourcentage de monocytes CD16-négatifs en HF était de 96,5% apportant un argument pour le diagnostic de LMMC. Le myélogramme associé, retrouvait des signes de dysmyélopoïèse, et un contingent monocytaire à 15% avec une blastose quantifiée à 8%. L'ensemble de ce bilan évoquait donc une LMMC1, en acutisation blastique, sous la forme d'un sarcome granulocytaire cutané. De façon intéressante, l'analyse moléculaire de la biopsie cutanée par séquençage haut débit a permis d'identifier l'association typique des mutations LMMC (TET2 et SRSF2) ayant une spécificité importante pour le diagnostic de LMMC (21). On retrouve également une mutation touchant la voie RAS, de mauvais pronostic, associée à une leucocytose > 13G/L (SMP-LMMC, classification FAB). La mutation de NPM1 peut faire suggérer une acutisation vers une LAM.

Ainsi, ce cas illustre bien l'intérêt des nouveaux marqueurs, à la fois cytométriques (MO1) et moléculaires, pouvant être intégrés dans la démarche diagnostique d'une monocytose, apportant des arguments objectifs et spécifiques pour le diagnostic de LMMC.



Figure 23 : Infiltrations cutanées, au niveau de la jambe droite

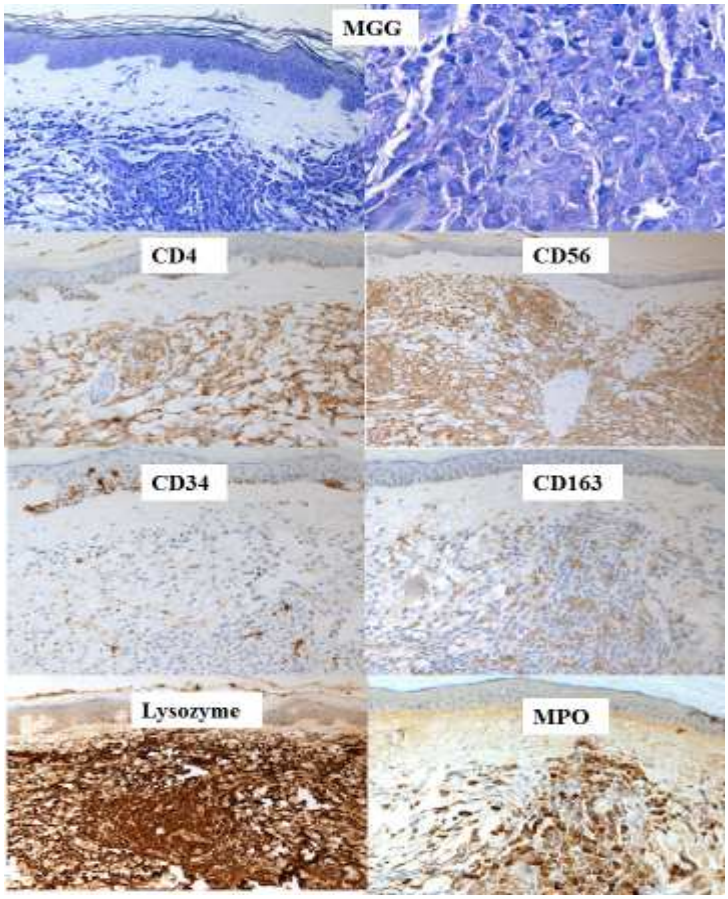


Figure 24 : Aspects histologique et immunohistochimique de la biopsie cutanée ; MGG : May Grunwald Giemsa ; MPO : myéloperoxydase

Dans la deuxième partie du travail, nous avons montré que la quantification des MO1 par HF était bien corrélée à celle réalisée par CMF. Les 2 techniques montrent des résultats concordants pour le diagnostic de LMMC. Le premier avantage de ce travail a été la mise en place de la quantification des monocytes CD16-négatifs en cytométrie conventionnelle au CHU, et de proposer cette analyse aux cliniciens du réseau BREHAT (Bretagne Expertise Hématologie). Une analyse de la stabilité du paramètre, au cours du temps, a montré que les échantillons devaient impérativement parvenir au laboratoire de cytométrie, la journée du prélèvement, car un délai de traitement > 24H pouvait entrainer un biais important dans le rendu du résultat de l'analyse (Annexe 3). Aussi, on constate, grâce à la représentation de Bland-Altman, qu'HF aurait tendance, par rapport à la CMF conventionnelle, à surestimer le pourcentage de MO1 (biais = -1,482). C'est d'ailleurs ce biais qui pourrait expliquer l'existence de 7 patients HF+/CMF-, au sein du groupe non LMMC de la cohorte prospective. Aussi, les 3 patients du groupe LMMC de la cohorte prospective présentant une quantification de MO1 < 94 % par HF et CMF étaient atteints d'une pathologie chronique pouvant expliquer la monocytose chronique (cancers solides et sarcoïdose). Les signes de dysmyélopoïèse n'étant pas rares chez la personne âgée, la recherche d'anomalies cytogénétiques et moléculaires, non réalisée chez ces 3 patients, aurait pu être contributive pour confirmer ou infirmer le diagnostic de LMMC.

Chacune des deux techniques, a ses avantages. L'HF dans le diagnostic de la LMMC est moins performant que la CMF, mais il propose une stratégie de fenêtrage automatique, ce qui lui confère un avantage en terme de reproductibilité. En effet, cela implique que les populations leucocytaires sont toujours séparées de manière identique. De plus, l'HF est intégré, au sein du laboratoire d'hématologie, à la chaine d'automate de routine. Cela permet; un rendu rapide, et n'impose pas une plateforme de cytométrie en flux spécialisée. Il est bon, à nouveau de préciser, que l'HF, peu coûteux en prélèvement, est réalisé sur le même tube de sang, que celui servant à la NFS standard.

L'immunophénotypage par CMF conventionnelle est quant à lui, plus performant en terme de sensibilité et de spécificité. C'est la méthode de référence. De plus, il a l'avantage non négligeable, de déclencher systématiquement une congélation de cellules sanguines, qui pourront faire l'objet *a posteriori*, en accord avec le clinicien, d'une analyse NGS des gènes

d'intérêt diagnostiques et pronostiques de la LMMC. Cependant, la CMF conventionnelle nécessite une plateforme de cytométrie en flux spécialisée et du personnel qualifié.

Ce double immunophénotypage monocytaire sanguin, nous apporte clairement un argument de poids en cas de double positivité, dans le diagnostic de la LMMC. En cas de double négativité, il faudra s'assurer de l'absence d'autres causes éventuelles de monocytoses. Il est également important d'interpréter ces résultats, en gardant à l'esprit les critères OMS de définition de la LMMC.

A l'issue de ce travail, je propose d'intégrer l'immunophénotypage monocytaire sanguin et le séquençage dans la démarche diagnostique et thérapeutique de la LMMC (Figure 25).

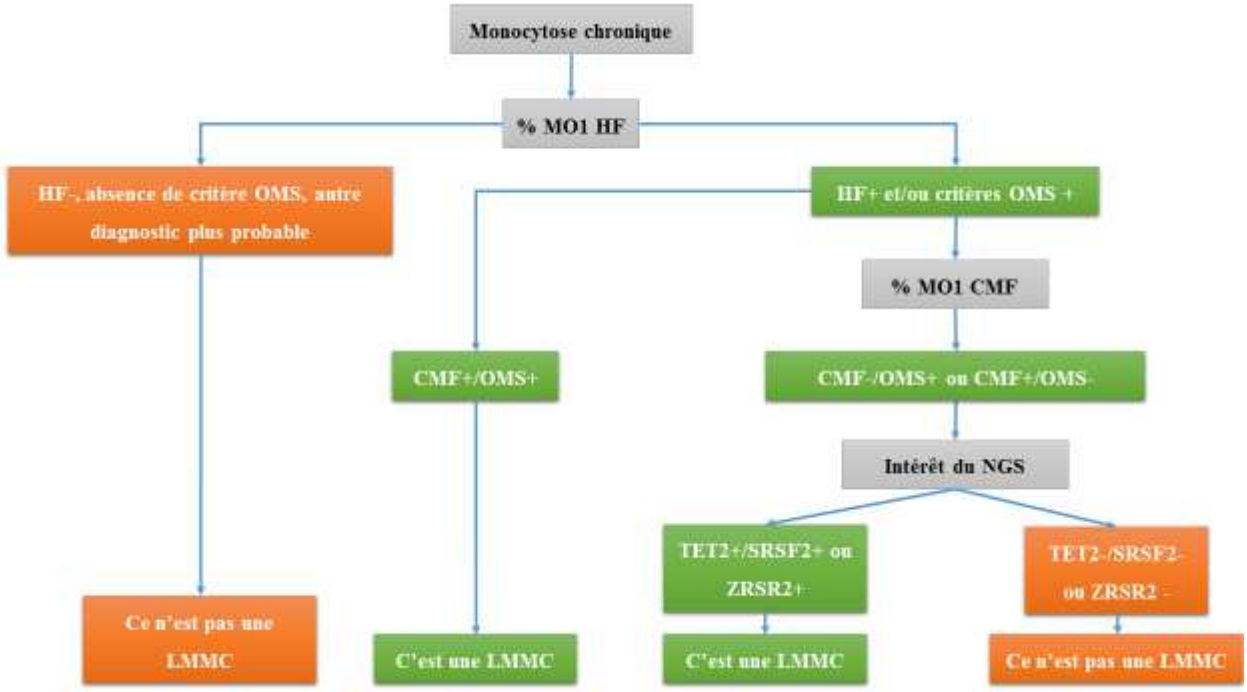


Figure 25 : Intégration de l'immunophénotypage monocytaire sanguin et du profil mutationnel dans la démarche diagnostique de la LMMC

CONCLUSION

Un pourcentage de monocytes CD16-négatifs supérieur ou égal à 94% des monocytes totaux est un marqueur diagnostique pour la LMMC avec une excellente spécificité. Classiquement, ce pourcentage est quantifié en CMF conventionnelle. Notre travail a permis de démontrer que ce pourcentage MO1 évalué sur une simple formule sanguine de routine par la stratégie HF, permettait également le diagnostic de LMMC avec le même seuil de 94%. Les résultats d'HF et de la CMF conventionnelle montrent une bonne corrélation, permettant l'utilisation de ces 2 techniques.

L'immunophénotypage des monocytes sanguins, en cytométrie conventionnelle, mais également, sur une simple numération formule sanguine, par la stratégie HematoFlow, doit maintenant faire partie de la démarche diagnostique devant une monocytose persistante, dans le but de poser le diagnostic de LMMC. Cependant la place de la quantification des MO1 dans la démarche diagnostique d'une monocytose persistante n'est pas clairement établie. Nous proposons de positionner ce marqueur facilement accessible en routine, en première intention dans le bilan de monocytose. Sa positivité permettrait de réaliser un bilan médullaire exhaustif, cytologique, cytogénétique pour rechercher les critères OMS de la LMMC. En cas de difficulté diagnostique, l'existence de mutations associées à cette pathologie recherchée par séquençage haut débit (TET2, SRSF2, ZRSR2) peut apporter un argument supplémentaire pour la LMMC. Ces nouveaux marqueurs révolutionnent la prise en charge de la LMMC qui posait jusqu'alors d'importants problèmes diagnostiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Swerdllow SH, Harris NL. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France : IARC Press, 2008; 2008.

2. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 4 juin 2015;125(23):3618-26.

3. Saarni MI, Linman JW. Myelomonocytic leukemia: Disorderly proliferation of all marrow cells. Cancer. 1 mai 1971;27(5):1221-30.

4. Geary CG, Catovsky D, Wiltshaw E, Milner GR, Scholes MC, van Noorden S, et al. Chronic Myelomonocytic Leukaemia. Br J Haematol. 1 juill 1975;30(3):289-302.

5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. août 1976;33(4):451-8.

6. Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. Leukemia. juill 2008;22(7):1308-19.

7. Takahashi K, Pemmaraju N, Strati P, Nogueras-Gonzalez G, Ning J, Bueso-Ramos C, et al. Clinical characteristics and outcomes of therapy-related chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 17 oct 2013;122(16):2807-2811; quiz 2920.

8. Kim KB, Faderl S, Hwang CS, Khuri FR. Chronic myelomonocytic leukaemia after platinum-based therapy for non-small cell lung cancer: case report and review of the literature. J Clin Pharm Ther. 1 août 2006;31(4):401-6.

9. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespí T, Luño E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica. mars 2011;96(3):375-83.

10. Sallman DA, Padron E. Transformation of the Clinical Management of CMML Patients Through In-Depth Molecular Characterization. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. juin 2015;15 Suppl:S50-55.

11. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. Leukemia. 1 juill 2013;27(7):1504-10.

12. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, et al. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. Am J Hematol. mars 2013;88(3):201-6.

13. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. Blood. 6 oct 2011;118(14):3932-41.

14. Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. Br J Haematol. mai 2014;165(3):273-86.

15. Abdel-Wahab O, Tefferi A, Levine RL. Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Hematol Oncol Clin North Am. oct 2012;26(5):1053-64.

16. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 avr 2010;16(8):2246-56.

17. Kuo M-C, Liang D-C, Huang C-F, Shih Y-S, Wu J-H, Lin T-L, et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. Leukemia. août 2009;23(8):1426-31.

18. Padron E, Painter JS, Kunigal S, Mailloux AW, McGraw K, McDaniel JM, et al. GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 20 juin 2013;121(25):5068-77.

19. Blood Journal | Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias [Internet]. [cité 20 déc 2015]. Disponible sur: http://www.bloodjournal.org/content/121/12/2186.long?sso-checked=true

20. Padron E, Yoder S, Kunigal S, Mesa T, Teer JK, Al Ali N, et al. ETV6 and signaling gene mutations are associated with secondary transformation of myelodysplastic syndromes to chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 5 juin 2014;123(23):3675-7.

21. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Porta MGD, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. Blood. 28 août 2014;124(9):1513-21.

22. Leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic et thérapeutique - revmed [Internet]. [cité 26 avr 2016]. Disponible sur: http://www.revmed.ch/rms/2013/RMS-N-395/Leucemie-myelomonocytaire-chronique-diagnostic-et-therapeutique

23. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. Blood. 12 déc 2013;122(25):4021-34.

24. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 15 mars 1997;89(6):2079-88.

25. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. Blood. 1 févr 2002;99(3):840-9.

26. Germing U, Strupp C, Aivado M, Gattermann N. New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia? Blood. 15 juill 2002;100(2):731-3.

27. Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. Haematologica. juill 2007;92(7):974-7.

28. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 11 avr 2013;121(15):3005-15.

29. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. Leukemia. juill 2013;27(7):1504-10.

30. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. Leukemia. nov 2014;28(11):2206-12.

31. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 juill 2013;31(19):2428-36.

32. ConsensusGFM2015.pdf [Internet]. [cité 24 avr 2016]. Disponible sur: http://www.gfmgroup.org/fichiers/ConsensusGFM2015.pdf

33. Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. Br J Haematol. mai 2014;165(3):273-86.

34. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol. mars 2009;10(3):223-32.

35. Fianchi L, Criscuolo M, Breccia M, Maurillo L, Salvi F, Musto P, et al. High rate of remissions in chronic myelomonocytic leukemia treated with 5-azacytidine: results of an Italian retrospective study. Leuk Lymphoma. mars 2013;54(3):658-61.

36. Adès L, Sekeres MA, Wolfromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. Leuk Res. juin 2013;37(6):609-13.

37. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. Blood. 23 oct 2014;124(17):2705-12.

38. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood. 21 oct 2010;116(16):e74-80.

39. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. juill 2003;19(1):71-82.

40. Allou K, Vial J-P, Béné MC, Lacombe F. The routine leukocyte differential flow cytometry HematoFlow^{TM} method: A new flagging system for automatic validation. Cytometry B Clin Cytom. 1 nov 2015;88(6):375-84.

41. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. Refining the white blood cell differential: The first flow cytometry routine application. Cytometry A. 1 juin 2010;77A(6):552-63.

42. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, et al. Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. J Clin Invest. mars 1995;95(3):1040-6.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA750 : APC-Alexa 750

Ac : Anticorps

AG : Antigène

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

AR : Anémie Réfractaire

AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes

AREB-t : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes en transformation

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ASIA : Anémie réfractaire sidéroblastique idiopathique acquise

ASLX1 : Additional Sex combs Like 1

Asx : Drosophila Additional sex combs

AUC : Area under curve

AZA : Azacitidine

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

CCR2 : Récepteur membranaire de la cytokine CCL2

CD : Cluster de différenciation

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMF : Cytométrie en Flux

CPSS : CMML-specific Prognostic Scoring System)

CRDM : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée

CRU : Cytopénie Réfractaire avec dysplasie Unilignée

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CX3CR1 : récepteur membranaire de la fractalkine

DNMT : DNA methyltransferase

ECD : PE-Texas Red

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPO : Erythropoïétine recombinante

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

FAB : Français-Américain-Britannique

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FL : canal de fluorescence

FS : Forward-Scatter

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GFM : Groupe Francais des Myélodysplasies

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GTPase : Guanosine Triphosphate hydrolase

HAS : Haute Autorité de Santé

HF : HematoFlow™

HRAS : Harvey Rat viral oncogene homolog;

IL : Interleukine

IPSS : International Prognostic Scoring System

KO : Krome Orange

KRAS : Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog

LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique

LDH : Lactate Déshydrogenase

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LMMC : Leucémie Myélomonocytaire Chronique

LMMJ : Leucémie Myélomonocytaire Juvénile

MDAPS : MD Anderson Pronostic Scoring System

MMM : Mayo Molecular Model

MO1 : Monocytes classiques

MO2 : Monocytes intermédiaires

MO3 : Monocytes non classiques

MPM : Mayo Prognostic Model

NFS : Numération Formule Sanguine

NGS : Next Generation Sequencing

NMP : Néoplasie Myéloproliférative

NR : Neutropénie Réfractaire

NRAS : Neuroblastoma Rat viral oncogene homolog

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC5 : PE-Cyanine 5

PC5-5 : : PE-Cyanine 5-5

PC7 : PE-Cyanine7

PDGFRA et PDGFRB : Platelet-Derived Growth Factor Receptors Alpha et Beta

PE : Phycoerythrin

PH : Philadelphie

PMT : Photomultiplicateur

PNE : Polynucléaire Eosinophile

PRC-2 : Polycomb Repressor Complex 2

RARS : Anémie réfractaire avec Ring sidéroblastes

RARS-T : Anémie réfractaire avec Ring sidéroblastes et Thrombocytose

RAS : Rat viral oncogene homolog

ROC : Receiver Operator Characteristic curve

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

SETBP1 : SET Binding Protein 1

SFH : Société Française de l'Hématologie

SMD : Syndrome Myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératif

SMD/NMP : Syndrome Myélodysplasique/Néoplasie Myéloproliférative

SMD/SMP : Syndrome Myélodysplasique/Syndrome Myéloprolifératif

snRNP : Small nuclear Ribonucleotid Protein

SRSF2 : Serine/arginine-Rich Splicing Factor 2

SS : Side-Scatter

TCR : T Cell Receptor

TET 2 : Ten Eleven Translocation 2

TNF : Tumor Necrosis Factor

TR : Thrombopénie Réfractaire

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

ZRSR2 : Zinc finger RNA-binding motif and Serine/arginine Rich 2

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

ANNEXES

1. LETTRE A L'EDITEUR

E-letter, Blood, 4 juin 2015

http://www.bloodjournal.org/content/125/23/3618.e-letters

CD16^{neg} monocytes obtained on a routine complete blood count as a CMML diagnostic marker

Cedric Pastoret, [1] Marc Le Mouel, [1] Thierry Lamy, [2] Thierry Fest[1] and Mikael Roussel[1]

Laboratory of Hematology, University Hospital of Rennes

[1] CHU de Rennes, Pôle Biologie, Rennes, France

[2] CHU de Rennes, Service d'Hématologie Clinique, Rennes, France

We read with interest the article by Selimoglu-Buet and colleagues validating the fraction of CD16^{neg}-monocytes (%CD16^{neg}Mo) as a diagnostic criteria in chronic myelomonocytic leukemia (CMML).[1] In our institution, we implemented the Hematoflow (HF) (Beckman Coulter, Brea, CA) as part of the complete blood count (CBC) workflow.[2,3] The HF uses a cocktail of antibodies, including CD36 and CD16, to report a 5-part differential and cell subsets such as CD16^{pos}- and CD16^{neg}- monocyte. Here, we would like to report our experience in identifying CMML patients with the %CD16^{neg}Mo, on the basis of a regular CBC.

We identified retrospectively, over a period of 4 years, 42 CMML patients with a HF at diagnosis. We set up a control group with 95 patients with monocytosis (>1x10^9/L) lacking CMML criteria. The mean count of monocyte was at 5.42x10^9/L (95% confidence interval (CI) 2.42-8.42) and at 2.21x10^9/L (95%CI 2.08-2.33) for CMML and control groups, respectively. We found an optimal %CD16^{neg}Mo cutoff at 94% to discriminate CMML from control patients (sensitivity at 70.45%, specificity at 88.17% and area under the curve (AUC) at 0.865) (Figure 1A). By comparison the AUC was at 0.630 for monocyte. Accordingly, the mean %CD16^{neg}Mo was significantly higher in CMML samples (Figure 1B). With this

threshold, a positive predictive value at 73.81% and a negative predictive value at 86.32% were calculated.

Interestingly, we found the same cut-off than Selimoglu-Buet and colleagues. However, our lowest performances can be explained by *i*) the use of CD14 rather than CD36 as monocytes markers, *ii*) the higher number of monocytic cells analysed (50,000 $CD14^{pos}$ cells *versus* 20,000 total $CD45^{pos}$), and *iii*) the automatic gating strategy of HF.[4] Nevertheless, we showed that this new diagnosis marker proposed by Selimoglu-Buet and colleagues can be obtained on the basis of a regular CBC when using HF.

Reference

1. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015.

2. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. Refining the white blood cell differential: the first flow cytometry routine application. *Cytometry A*. 2010;77(6):552–563.

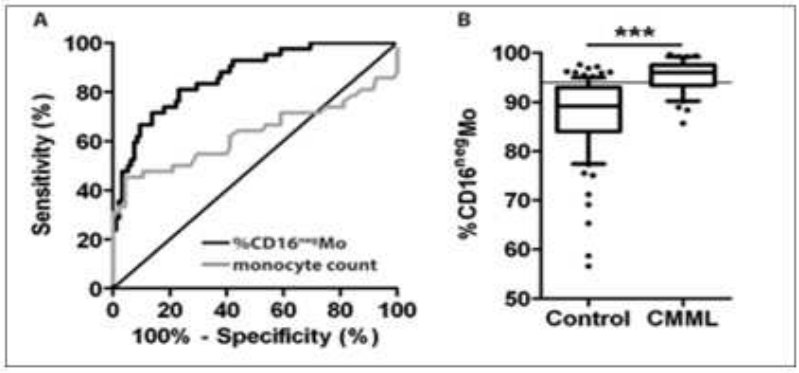
3. Roussel M, Davis BH, Fest T, Wood BL, on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH). Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods. *Cytometry A*. 2012;81A(11):973–982.

4. Cottard A, Wagner-Ballon O, Le Priol J, et al. Improvement of the leukocyte differential performed by flow cytometry using the advanced 2.0 version of the CytoDiff CXP software. *Cytometry A*. 2014;85(8):653–657.

Figure 1: CD16^{neg} monocytes as a CMML diagnostic marker

A- ROC are shown for %CD16^{neg}Mo (black) and for the monocyte count (gray).

B- %CD16^{neg}Mo for control and CMML groups. The mean percentage is at 95.25% (95%CI 94.22-96.29) and at 87.43% (95%CI 85.84-89.02%) for CMML and control, respectively. A line represents the treshold at 94%. *** p<0.001



2. MATRICE DE COMPENSATION DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE SANGUIN PAR CMF CONVENTIONNELLE

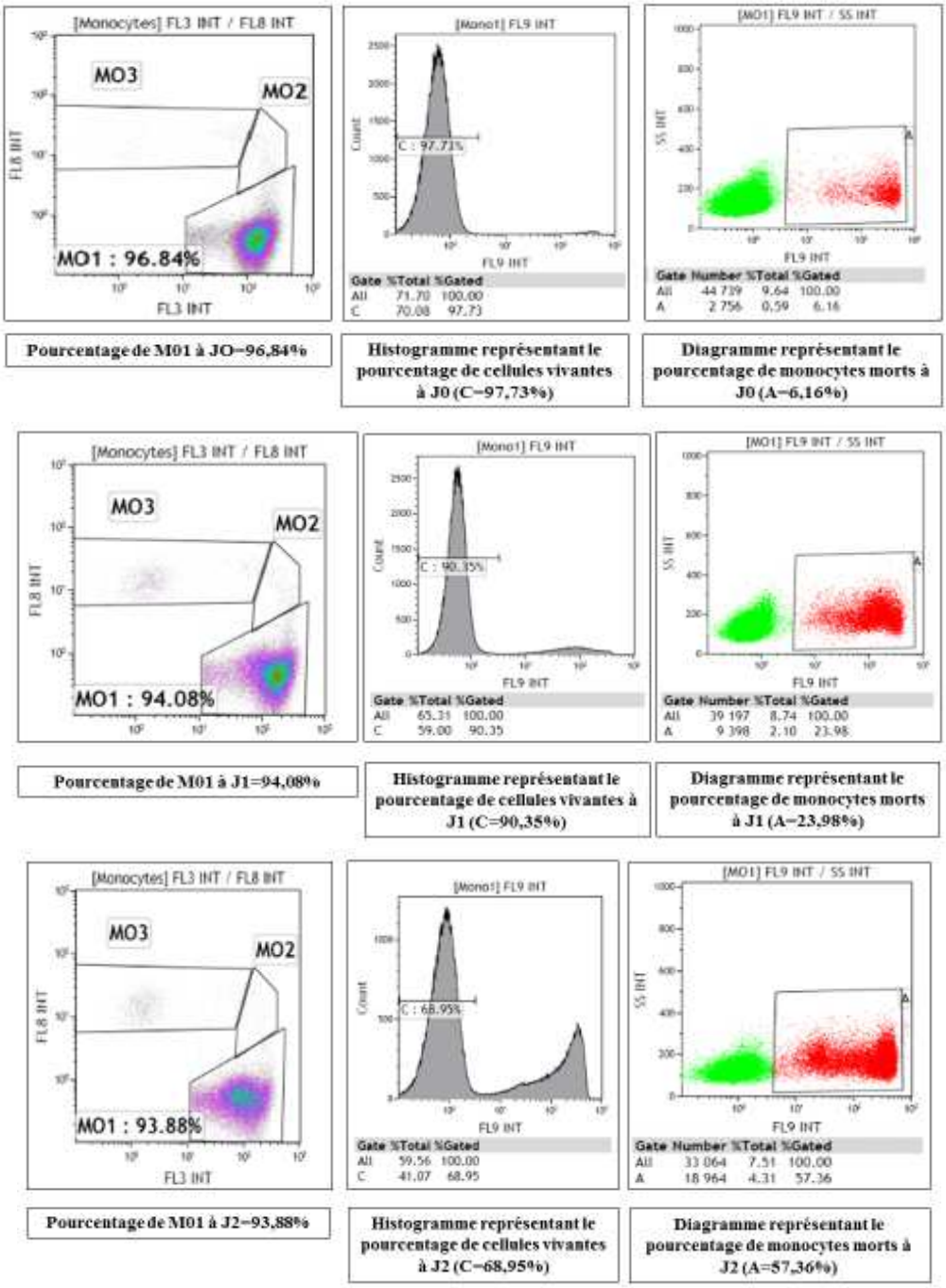
Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie, nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence, afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence.

	FL2	FL3	FL4	FL5	FL8	FL10
FL2	-	9,7	8,8	42,8	0	0,4
FL3	39,9	-	3,8	17,6	0	0,1
FL4	1,5	5,7	-	0,5	0	0
FL5	0,4	1,8	56,3	-	2,7	0
FL8	0	0	6,2	0,8	-	0
FL10	1,3	0,2	0,2	0,2	0,2	-

Matrice de compensation des différentes fluorescences :

- *FL = canal de fluorescence ; FL2=PE ; FL3=ECD ; FL4=PC5.5 ; FL5=PC7 ; FL8=AA75 ; FL10=KO*

3. DELAI OPTIMAL DE REALISATION DU MARQUAGE EN CMF CONVENTIONNELLE ET VIABILITE DU PARAMETRE MO1



Quantification des MO1 par CMF conventionnelle à J0, J1, J2 chez un patient présentant une monocytose chronique

U.F.R. DE **PHARMACIE** DE RENNES	N°

LE MOUEL Marc - Apport de l'immunophénotypage monocytaire sanguin dans le diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique

87 feuilles, 25 illustrations, 8 tableaux, 3 annexes, 30 cm.- Thèse : (Pharmacie) ; Rennes 1; 2016 ; N° .

Résumé français

Un nouveau marqueur diagnostique de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), basé sur l'immunophénotypage des monocytes sanguins par cytométrie en flux conventionnelle, a été récemment publié par Selimoglu-Buet *et al*. Ainsi, un pourcentage de monocytes CD16-négatifs (MO1) supérieur ou égal à 94% des monocytes totaux présente une excellente spécificité et sensibilité pour le diagnostic de LMMC. Dans notre laboratoire, la stratégie de rendu en routine des numérations formules sanguines, utilise le couple analyseur DXH800 – cytométrie en flux avec la solution HématoFlow™ (Beckman Coulter, Brea, CA). Cette stratégie permet d'obtenir sur une formule de routine le pourcentage de MO1. L'objectif principal de ce travail, grâce à une étude rétrospective menée au CHU de Rennes, est de démontrer l'intérêt de l'HematoFlow (HF) pour le diagnostic de LMMC. Secondairement, sur une cohorte prospective, nous avons étudié la corrélation entre la technique HF et la cytométrie en flux conventionnelle, technique de référence mise en place au laboratoire, pour la quantification des MO1. Enfin, nous avons évalué la pertinence de l'association des deux techniques pour le diagnostic de LMMC.

Résumé anglais

A new diagnostic marker of the chronic myelo-monocytic leukemia (CMML), based on the phenotype of circulating monocytes by flow cytometry, has been recently published by Selimoglu-Buet et al. Thus, a percentage of monocytes that do not express CD16 (MO1) greater than or equal to 94% of total monocytes has excellent specificity and sensitivity for diagnosis of CMML. In our laboratory, the results of the complete blood count are made by the analyzer couple DXH800 - flow cytometry with the solution Hématoflow (Beckman Coulter, Brea, CA). This strategy provides the percentage of MO1 on a routine blood count. The main objective of this work is to demonstrate the interest of the HematoFlow (HF) for the diagnosis of CMML, through a retrospective study conducted at the University Hospital of Rennes. Secondarily, on a prospective cohort we studied the correlation between HF and conventional flow cytometry for the quantification of MO1, actually implemented in our diagnostic work-up for chronic monocytosis. Finally, we evaluated the relevance of the association of two techniques for the diagnosis of CMML.

Rubrique de classement :	BIOLOGIE MEDICALE
Mots-clés :	Leucémie myélomonocytaire chronique, immunophénotypage monocytaire, CD 16, cytométrie en flux,
Mots-clés anglais MeSH :	Chronic myelomonocytic leukemia, monocytic immunophenotyping, CD 16, flow cytometry

JURY :		
	Président :	Monsieur le Professeur Olivier Fardel
	Assesseurs :	Monsieur le Professeur Thierry Fest Monsieur le Docteur Mikael Roussel Monsieur le Docteur Stanislas Nimubona Monsieur le Docteur Cédric Pastoret [directeur de thèse]