



HAL
open science

Étude par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs dans les syndromes myélodysplasiques

Pierre Boncoeur

► **To cite this version:**

Pierre Boncoeur. Étude par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs dans les syndromes myélodysplasiques. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02504125

HAL Id: dumas-02504125

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02504125>

Submitted on 8 Feb 2021

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N° 59

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE
Spécialité Biologie médicale

Étude par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs
dans les syndromes myélodysplasiques

Présentée et soutenue publiquement
le 15 avril 2019

Par

Pierre BONCOEUR

Né le 3 juin 1989 à Bergerac (24)

Dirigée par M. Le Docteur Nicolas Chapuis, MCU-PH

Jury :

Mme Le Professeur Dominique Helley, PU-PH Président

M. Le Professeur François Delhommeau, PU-PH

M. Le Docteur Nicolas Dulphy, MCU-PH

REMERCIEMENTS

Au jury,

A Madame le Professeur Dominique HELLEY, vous me faites l'honneur d'assurer la présidence de ce jury de thèse. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect ainsi que de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François DELHOMMEAU, je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de juger ce travail de thèse qui j'espère sera à la hauteur de l'intérêt que vous lui portez, votre présence m'honore.

A Monsieur de Docteur Nicolas DULPHY, je vous remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury afin d'évaluer mon travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Nicolas CHAPUIS, merci de m'avoir confié ce sujet et pour tes conseils avisés et bienveillants. Ton encadrement et ta disponibilité ont été précieux. J'espère que ce travail est à la hauteur de la confiance que tu m'as accordée. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide dans la dernière ligne droite.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de Cochin,

qui m'a accueilli pendant deux semestres.

Aux techniciens du secteur de CMF, marquis et marquises, Bruno, Catherine, Laurence, Lénéïg et Loé pour leur bonne humeur légendaire, leur gourmandise tout aussi légendaire et leur franc-parler.

A l'équipe biologique de CMF, Nicolas, Alexa et Charles qui ont su me transmettre de façon très pédagogique leurs connaissances et partager leur expérience. Ces 6 mois à « gater » à vos côtés auront été très enrichissants.

A l'équipe biologique de cytologie, Nicolas, Alexa, Olivier, Charles, Anne-So, Ismaël, Carole et Syrine pour vos enseignements de qualité et votre bienveillance. Les blastes n'ont qu'à bien se tenir.

A l'équipe d'hémostase, Madame Fontenay, Elisabeth, Abla et Jérôme pour leur formation irréprochable ainsi qu'aux membres du CRTH toujours accueillants.

A Clotilde, Leila et Charles pour leurs dons de moelle, on se comprend.

Aux biologistes et cliniciens,

qui ont marqué mon parcours et avec qui j'ai eu plaisir à apprendre mon métier :

Natalia Ermak, biologiste haute couture détentrice d'un radar ultrasensible à l'affût du micro-pic (Советский оборонный секрет), tu es une cheffe en or,

Charles-Henri Cottard, Félicia Monge, Karim Maloum, Catherine Settegrana, Isabelle Martin Toutain, Fabrice Compain, Fazia Ould-Hocine , Samia Hamane, Maude Gits-Muselli, Nicolas Guigue, Mazouz Benderdouche, Nicolas Chapuis, Alexa Green, Olivier Kosmider, Charles Dussiau, Anne Sophie Alary, Ismaël Boussaïd, Abla Amara, Elisabeth Mazoyer, Syrine Ellouze, Nathalie Stieltjes, Sophie Combe, Valérie Roussel-Robert, Monsieur Jean-Louis Gaillard, Elsa Salomon, Frédérique Moreau, Anne-Laure Roux, Valérie Sivadon-Tardy, Michael Chaquin, Ludovic Suner, Virginie Planche.

Cette liste est fournie, mais je tenais à sincèrement les remercier pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour leurs conseils avisés. J'ai appris beaucoup à vos côtés.

Aux équipes techniques,

des différents laboratoires qui m'ont accueilli et tout particulièrement à l'hématologie de la Pitié Salpêtrière (une pensée particulière pour Florence avec qui j'ai fait mes premiers pas en cytologie), la parasitologie-mycologie de Saint Louis, l'hématologie et le CRTH de Cochin, la microbiologie d'Ambroise-Paré. Merci pour votre énergie et votre bienveillance.

A mes co-internes,

grâce à qui l'internat est une période de la vie tellement enrichissante sur les plans humain et professionnel. Les pauses caféinées et autres moments plus festifs m'ont aidé à garder le cap durant ces 4 années.

Nico, mon fidèle acolyte, soutien moral indéfectible, le ZZ est notre repère et la x3 ton péché mignon ! Merci encore pour l'aide que tu m'as apporté face à la complexité de la question sinusoïdale de l'anachorète concernant l'outil statistique.

Matthieu, l'homme masqué et encapé, merci pour ta gentillesse, tu as permis à ce travail d'aboutir en donnant de ton temps et je t'en remercie mille fois. Si tu veux, je peux t'apprendre à faire des madeleines ?

Titi et sa méthode révolutionnaire pour se sculpter un corps d'apollon, dépose rapidement un brevet sinon je vais te voler le concept ; à moins que tu ne veuilles la nommer la méthode « Monsieur kéké ... ! »

Agathe, j'ai tellement apprécié examiner les phanères en ta compagnie. A charge de revanche.

Lisou, Iheb, Virginie, Rico, Jen, les loups Adrien et Olivier, Anne, Amélie, Hugo, Al Khansaa, Antoine, Alex.

Aux amis de longue date,

Benoit, un ami comme toi, c'est inestimable.

La Mère Boubou, Clairon, Bidou, France, Chéchile, Emilie, Olympinou pour les moments hors du commun passés ensemble et ceux à venir.

Aux personnes qui m'ont soutenu,

Madame Minaberry, Monsieur Duteil, Aurélie, Aurore, Monsieur Renard et Monsieur Ramirez pour qui j'ai un sentiment profond de respect et de gratitude.

A ma famille,

A Marie, vivre avec toi est tellement extraordinaire. Pour les années merveilleuses passées et celles encore plus exceptionnelles qui s'annoncent. Je t'aime.

A ma mère, Maman, merci de ton amour sans limite. Merci de ton soutien tout au long de ces études et des moments de doute. Merci d'avoir toujours cru en moi. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi.

A mon père, Papa, j'espère que tu es fier de moi.

A Balou et GL, éternels inséparables, grandir à vos côtés dans ce club très fermé fut une chance rare et précieuse. Forever.

A mes grands-parents maternels, Papi et Mamie, merci pour l'amour que vous nous avez toujours apporté qui m'a permis de grandir en toute sérénité.

A mes grands-parents paternels, Jean et Mamie, merci pour les moments heureux partagés.

A mes oncles et tantes, cousins et cousines. Guillaume, merci pour ta relecture consciencieuse. Quelle belle et grande famille !

A Bernadette, Luc, Constance et Etienne pour leur gentillesse ainsi qu'à Clémence et Marie pour leur énergie débordante.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	6
INDEX DES TABLEAUX	9
INDEX DES FIGURES	10
LISTE DES ABREVIATIONS	12
I. INTRODUCTION	14
II. LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES	15
II.A. Définition et généralités.....	15
II.B. Epidémiologie.....	16
II.C. Clinique	17
II.D. Numération formule sanguine et cytologie sanguine	18
II.E. Myélogramme et cytologie médullaire.....	19
II.F. Analyse cytogénétique	20
II.G. Analyse moléculaire.....	21
II.H. Analyse immuno-phénotypique.....	22
II.I. Classification des syndromes myélodysplasiques de l'adulte (OMS 2016)	23
II.J. Diagnostics différentiels.....	25
II.K. Evolution et classification pronostique IPSS-R.....	28
II.L. Thérapeutique	30
III. MICROENVIRONNEMENT ET DEREGULATION IMMUNITAIRE DANS LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES	31
IV. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS	34
IV.A. Définition et généralités	34
IV.B. Historique	34
IV.C. Sous-populations lymphocytaires T	35
IV.D. Sous-populations de lymphocytes T régulateurs	36
IV.D.1. Lymphocytes T régulateurs naturels et induits	36
IV.D.2. Lymphocytes T régulateurs A et B.....	38
1/ Caractérisation phénotypique.....	38
2/ Profil d'expression génique.....	39
3/ Fonction immunosuppressive	40

IV.E. Caractéristiques phénotypiques.....	40
IV.E.1. FoxP3.....	40
IV.E.2. Autres marqueurs.....	41
IV.F. Physiopathologie et mécanismes suppressifs	42
IV.F.1. Sécrétion de cytokines immunosuppressives : IL-35, TGF- β et IL-10	42
IV.F.2. Cytolyse des lymphocytes T effecteurs.....	43
IV.F.3. Perturbations métaboliques des lymphocytes T effecteurs	43
IV.F.4. Inhibition de l'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes T effecteurs	43
V. LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET PATHOLOGIES.....	45
V.A. Lymphocytes T régulateurs et maladies auto-immunes	45
V.B. Lymphocytes T régulateurs et cancers	46
V.C. Lymphocytes T régulateurs et syndromes myélodysplasiques.....	51
VI. OBJECTIFS DE L'ETUDE	57
VII. MATERIEL ET METHODES	58
VII.A. Echantillons	58
VII.B. Patients	58
VII.C. Témoins.....	59
VII.D. Analyse par cytométrie en flux	60
VII.D.1. Panel d'anticorps	60
VII.D.2. Marquage des cellules	61
1/ Prélèvements de moelle osseuse issus de ponctions médullaires	61
2/ Prélèvements de moelle osseuse issus de têtes fémorales.....	61
VII.D.3. Réglage du cytomètre Navios	62
VII.D.4. Stratégie d'analyse des lymphocytes T régulateurs sur le logiciel Kaluza	63
VII.E. Analyse des données avec l'algorithme FlowSOM	66
VII.F. Analyses complémentaires.....	67
VII.G. Analyses statistiques.....	67
VIII.RESULTATS	68
VIII.A. Caractéristiques des populations : patients et témoins	68
VIII.B. Caractérisation de la population témoin.....	71
VIII.C. Quantification des lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de SMD.....	73
VIII.D. Quantification automatisée des lymphocytes T régulateurs par l'algorithme FlowSOM	77
IX. DISCUSSION	84
X. CONCLUSION	91

BIBLIOGRAPHIE	93
ANNEXES	101
RESUME	109

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des SMD de l'adulte (OMS 2016)	24
Tableau 2. « Pré-SMD » et SMD : critères diagnostiques	26
Tableau 3. Critères minimaux pour porter le diagnostic de SMD	27
Tableau 4. Classification cytogénétique de l'IPSS-R.....	29
Tableau 5. Critères pour le calcul de l'IPSS-R.....	29
Tableau 6. Score global IPSS-R.....	29
Tableau 7. Potentielles cibles thérapeutiques pour la déplétion ou la reprogrammation des lymphocytes T régulateurs humains	50
Tableau 8. Liste des anticorps utilisés	60
Tableau 9. Nombre moyen de lymphocytes totaux et de lymphocytes T régulateurs analysés chez les témoins et les patients	65
Tableau 10. Caractéristiques démographiques et biologiques des patients et des témoins.....	70
Tableau 11. Caractéristiques des patients et des témoins « contrôles ponctions »	101
Tableau 12. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD High et SMD Very High	102
Tableau 13. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Intermediate	103
Tableau 14. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Low	104
Tableau 15. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Very Low	105
Tableau 16. Données démographiques et caractéristiques des témoins « contrôles ponctions »	106
Tableau 17. Quantification des sous-populations lymphocytaires et des lymphocytes T régulateurs chez les témoins : « contrôles ponctions » et « contrôles têtes fémorales »	107
Tableau 18. Quantification des sous-populations lymphocytaires et des lymphocytes T régulateurs chez les patients et les témoins.....	107
Tableau 19. Quantification des lymphocytes T régulateurs totaux, des clusters 11, 8 et 4 identifiés par <i>gating</i> automatisé chez les patients et les témoins	108

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Fréquence des mutations <i>driver</i> et des anomalies cytogénétiques identifiées chez 738 patients atteints de SMD, sous-catégorisés par type de SMD.....	22
Figure 2. Différenciation des lymphocytes T helper	36
Figure 3. Les similitudes et différences majeures des marqueurs de surface et intracellulaires des nTregs et iTregs	37
Figure 4. Identification des sous populations de lymphocytes T régulateurs par clustering automatisé	39
Figure 5. Mécanismes utilisés par les lymphocytes T régulateurs pour médier l'immunosuppression	44
Figure 6. Estimation de la valeur pronostique des lymphocytes T régulateurs en termes de survie globale et de survie sans progression par type de cancer, basée sur l'analyse d'échantillons tumoraux	47
Figure 7. Mécanismes suppresseurs utilisés par les lymphocytes T régulateurs accumulés dans le microenvironnement tumoral (iTregs activés) pour inhiber les cellules T effectrices	49
Figure 8. Représentation schématique de l'évolution du phénotype des lymphocytes T régulateurs mémoires dans le contexte d'immunoédition des SMD : conséquences en termes d'immunosuppression et de réponse aux traitements immunosuppresseurs	56
Figure 9. Stratégie de fenêtrage et analyse phénotypique des lymphocytes T régulateurs à l'aide du logiciel Kaluza Analysis (Beckman Coulter).....	65
Figure 10. Prélèvements médullaires des patients et des témoins : analysés, exclus et inclus	69
Figure 11. Comparaison de la répartition des différentes populations lymphocytaires chez les témoins : contrôles ponctions et contrôles têtes fémorales	71
Figure 12. Comparaison du contingent de lymphocytes T régulateurs et des sous-populations Tregs A et B chez les témoins : contrôles ponctions et contrôles têtes fémorales	72
Figure 13. Comparaison de la répartition des différentes populations lymphocytaires entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH	74
Figure 14. Comparaison du contingent de lymphocytes T régulateurs entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH	75
Figure 15. Comparaison du contingent de lymphocytes Tregs A et B entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH	76
Figure 16. Pipeline d'analyse des données de CMF avec la plateforme Cytobank	78
Figure 17. Arbre de recouvrement minimal issu de l'analyse FlowSOM intégrant les lymphocytes CD3+ CD4+ de 29 échantillons médullaires.....	78
Figure 18. Expression des marqueurs CD127 et CD25 dans l'ensemble des 16 clusters ; expression des marqueurs CD95, CD45RA et CD194/CCR4 au sein des clusters 4, 8 et 11 sur les 9 échantillons témoins analysés par FlowSOM	79
Figure 19. Localisation des cellules constituant les clusters 4, 8 et 11 sur le <i>dotplot</i> CD127/CD25 initialement utilisé pour la quantification des Tregs par <i>gating</i> manuel (exemple de 2 témoins)	80
Figure 20. Corrélation de la quantification des lymphocytes T régulateurs totaux, et des Tregs A et B analysés par <i>gating</i> manuel ou par l'algorithme FlowSOM.....	81
Figure 21. Expression du CD194/CCR4 par les cellules des cluster 4 et 8 chez 2 témoins	81
Figure 22. Comparaison de la quantification de lymphocytes T régulateurs totaux, des clusters 11 et 4+8 identifiés par <i>gating</i> automatisé, entre les patients atteints de SMD et les témoins ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH	82

Figure 23. Comparaison de la quantification de lymphocytes T régulateurs du cluster 4 et du cluster 8 identifiés par *gating* automatisé, entre les patients atteints de SMD et les témoins ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH83

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPC	Adénosine mono-phosphate cyclique
ATP	Adénosine tri-phosphate
CCUS	<i>Clonal cytopenia of undetermined significance</i>
CD	<i>Cluster de différenciation (dans ce manuscrit, le terme de CD est utilisé indifféremment pour désigner l'antigène ou l'anticorps dirigé contre l'antigène)</i>
CHIP	<i>Clonal haematopoiesis of indeterminate potential</i>
CMF	Cytométrie en flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4</i>
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EPO	Erythropoïétine
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
ICUS	<i>Idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
InVS	Institut national de veille sanitaire
IPSS-R	<i>International prognosis scoring system - revised</i>
LA	Leucémie aiguë
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
LAM	Leucémie aigüe myéloïde
LMMC	Leucémie myélo-monocytaire chronique
MAI	Maladie auto-immune
MGG	May-Grünwald Giemsa
MO	Moelle osseuse
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	<i>Natural killer cell</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
OS	<i>Overall survival</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFS	<i>Progression free survival</i>
PNN	Polynucléaire neutrophile
SMD	Syndrome myélodysplasique
SMD-SLD	Syndrome myélodysplasique - Dysplasie d'une seule lignée
SMD-MLD	Syndrome myélodysplasique - Dysplasie multi-lignée
SMD-EB	Syndrome myélodysplasique - Excès de blastes
SMD-RS	Syndrome myélodysplasique – Avec sidéroblastes en couronne
SMP	Syndrome myéloprolifératif
SSC	<i>Side scatter</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Teff	Lymphocyte T effecteur
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th	<i>T helper cell</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
iTregs	Lymphocytes T régulateurs induits
nTregs	Lymphocytes T régulateurs naturels

I. INTRODUCTION

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies touchant la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ils se caractérisent par une hématopoïèse inefficace avec un degré variable de cytopénies et un risque d'évolution vers la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Les manifestations auto-immunes, fréquemment rapportées dans les SMD, incluent vascularites systémiques, arthrites inflammatoires, neuropathies périphériques, glomérulonéphrites et connectivites. Il est maintenant largement admis que des mécanismes de dérèglement de l'immunité participent à l'induction et à l'entretien des SMD.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) représentent une petite sous-population de lymphocytes T CD4+. Ils sont caractérisés par l'expression de *Forkhead box protein 3* (FoxP3) qui est le facteur de transcription clé à l'origine de leur développement et de leurs fonctions. Ils jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire et le contrôle de l'auto-immunité. Ce sont de véritables modulateurs de la réponse immunitaire globale notamment vis-à-vis des agents infectieux et des cellules tumorales. Leurs propriétés immunomodulatrices sont à l'origine du développement de stratégies thérapeutiques ayant pour objectif d'inhiber l'activité des cellules tumorales. La diversité des sous-populations de Tregs et leurs propriétés, les voies par lesquelles ils agissent et leur rôle dans le développement des cancers ne sont pas complètement connus.

C'est donc dans ce contexte de pathologie cancéreuse avec une part auto-immune qu'il est apparu légitime d'étudier la population de lymphocytes T régulateurs et d'en détailler les sous-populations afin de mieux connaître le microenvironnement tumoral.

II. LES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES

II.A. Définition et généralités

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) regroupent un ensemble hétérogène d'hémopathies clonales de la cellule souche hématopoïétique pluripotente médullaire. Ils se caractérisent d'une part par une multiplication excessive de progéniteurs myéloïdes qui mûrissent de façon anormale et d'autre part par une apoptose intra-médullaire excessive des précurseurs myéloïdes qui conduit à des cytopénies sanguines. On définit ainsi la dysmyélopoïèse et l'hématopoïèse inefficace en dépit d'une moelle généralement riche.

D'un point de vue physiopathologique, l'acquisition de plusieurs mutations successives est responsable de la survenue du SMD : une première mutation dite fondatrice confère à la CSH un avantage prolifératif ainsi qu'une altération de ses capacités de différenciation ; puis une seconde mutation entraîne la perte de la capacité d'apoptose. Ceci permet l'émergence de la population blastique qui envahit la moelle osseuse jusqu'au stade de LAM dans 30 % des cas (1).

Le diagnostic repose principalement sur l'interprétation de l'hémogramme, du myélogramme et du caryotype qui permettent dans la majorité des cas de classer le SMD selon la classification internationale de l'OMS mise à jour en 2016. Les SMD touchent essentiellement le sujet âgé au-delà de 60 ans. Le SMD de l'enfant, associé une fois sur trois à des anomalies génétiques constitutionnelles, est une entité rare. Les SMD sont régulièrement découverts chez des patients asymptomatiques notamment au décours de l'exploration d'une ou plusieurs cytopénies sur la numération formule sanguine (NFS).

Dans environ deux tiers des cas, la maladie évolue sur un mode lentement progressif et relativement indolent, avec une augmentation progressive des cytopénies. Le syndrome d'insuffisance médullaire qui en découle peut atteindre les 3 lignées myéloïdes et se traduire cliniquement par un syndrome anémique ou hémorragique avec dépendance transfusionnelle et une susceptibilité aux infections. Dans le tiers restant, la maladie évolue sur un mode plus rapide et plus agressif vers une LAM. On parle ainsi d'un « état pré-leucémique » (2).

II.B. Epidémiologie

Les SMD sont des pathologies qui touchent essentiellement le sujet âgé. Leur incidence globale augmente avec l'âge : 3/100 000 habitants par an avant 60 ans, 20/100 000/an à 70 ans et 50/100 000/an à 80 ans selon des sources américaines (3). En s'appuyant sur les données de l'InVS publiées en 2016 étudiant la période 1980-2012 en France, les SMD constituent le groupe d'hémopathies myéloïdes le plus fréquent (42 %), devant les LAM et les syndromes myéloprolifératifs (SMP). A noter une prédominance masculine avec un *sex ratio* H/F de 1,5 avec un âge médian de survenue de 78 ans chez l'homme et 81 ans chez la femme selon le même rapport (4).

Aucune étiologie évidente n'est identifiée dans la très grande majorité des cas : on parle de SMD primitif ou *de novo*. Cependant, des SMD secondaires, minoritaires, peuvent être imputés à l'exposition à des substances toxiques d'origine environnementale, professionnelle ou thérapeutique (5).

En effet, ils peuvent relever de la iatrogénie lorsqu'ils sont chimio-induits en survenant des années après un traitement pour une autre pathologie cancéreuse. Les chimiothérapies les plus clairement incriminées sont les agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide, busulfan, chlorambucil) et les inhibiteurs de topo-isomérase II. Les traitements anticancéreux seraient ainsi responsables de 10 à 15 % des SMD. Ils se manifestent régulièrement par une pancytopenie avec dysplasie multi-lignée et présentent un caryotype complexe. Ces SMD sont de mauvais pronostics et progressent rapidement vers une LAM. Les SMD peuvent aussi être induits à la suite d'irradiations à visée diagnostique mais surtout thérapeutique (radiothérapie principalement). L'irradiation environnementale a aussi clairement été mise en évidence lors des bombardements atomiques ou lors de l'accident nucléaire de Tchernobyl. L'exposition à certains agents cancérigènes et toxiques a aussi été identifiée : benzènes, hydrocarbures aromatiques, solvants, pesticides, engrais. Il n'est pas toujours aisé d'identifier formellement ces facteurs exogènes du fait d'un manque d'information sur les doses et la durée d'exposition (6).

Il existe des syndromes de prédisposition génétique aux SMD qui restent marginaux. Leur fréquence est probablement sous-estimée mais l'identification d'un nombre croissant de gènes incriminés permet de les rattacher à des affections constitutionnelles. On peut citer l'anémie de Fanconi, la dyskératose congénitale, le syndrome de Shwachman, le syndrome de Blackfan Diamond, le syndrome de Li Fraumeni ou le syndrome de Down. Parfois ces syndromes sont décelés dès l'enfance comme pour le syndrome de Down car ils s'inscrivent dans une pathologie pédiatrique globale qui s'accompagne d'anomalies malformatives ou du développement. A l'inverse, la survenue d'un SMD dans un contexte différent peut être un mode d'entrée dans la maladie constitutionnelle, qui peut parfois se révéler uniquement à l'âge adulte (6). Lorsque plusieurs membres d'une même famille sont atteints de SMD, de LAM, d'aplasie médullaire voire de thrombopénie inexplicée, il faut suspecter une mutation constitutionnelle sous-jacente portant sur les gènes *GATA-2*, *RUNX-1*, *CEBP α* , *TERC*, *TERT* (7). Ces étiologies restent toutefois rares.

La distinction entre SMD primitif (80-90 %) et secondaire (10-20 %) se fait donc sur l'histoire clinique du patient ainsi que sur la notion d'exposition aux toxiques et agents mentionnés ci-dessus.

II.C. Clinique

Le diagnostic de SMD est fréquemment évoqué chez des patients asymptomatiques dont une ou plusieurs cytopénies, plus rarement une macrocytose isolée, sont découvertes sur un bilan sanguin de « routine » ou réalisé dans le cadre de l'exploration d'une autre affection. A l'inverse, les patients symptomatiques présentent des signes cliniques en rapport avec les cytopénies mises en évidence sur la NFS, qui reflètent le syndrome d'hématopoïèse inefficace.

Le syndrome anémique est de loin le mode de révélation et d'entrée dans la maladie le plus fréquent (80 % des cas) (8). Les signes classiques en lien avec l'anémie sont l'asthénie, la dyspnée, la pâleur cutanéomuqueuse ou encore des douleurs de type angor selon le terrain cardio-vasculaire du patient.

Le syndrome hémorragique est lié à la thrombopénie qui est souvent associée à une thrombopathie fonctionnelle. Il se traduit par un purpura cutanéomuqueux, de rares hémorragies profondes et une hémostase altérée en cas de traumatisme et de chirurgie.

Le syndrome infectieux lié à la neutropénie et au déficit fonctionnel des granulocytes se traduit par une susceptibilité accrue aux infections. La pneumopathie bactérienne est la manifestation infectieuse la plus fréquente (9).

Des manifestations auto-immunes extra hématologiques, dont la prévalence est largement augmentée par rapport à la population générale, sont rapportées dans environ 10 à 30 % des cas (10,11). Elles sont d'ordre systémique ou spécifique d'organe : vascularites, connectivites, rhumatismes inflammatoires, atteintes cutanées, oculaires ou rénales, neuropathies périphériques, cytopénies auto-immunes (12–14). En 2016, Komrokji et *al.* (15) ont répertorié 28 % de patients présentant une maladie auto-immune (MAI) dans leur cohorte de 1 408 patients atteints de SMD avec par ordre de fréquence : hypothyroïdie (44 %), purpura thrombopénique idiopathique (12 %), arthrite inflammatoire (11 %), psoriasis (7 %) et vascularites (5 %).

On n'observe pas en général de syndrome tumoral, la splénomégalie devant plutôt faire suspecter un syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif (SMD/SMP).

II.D. Numération formule sanguine et cytologie sanguine

Les cytopénies sont fréquentes, isolées ou associées. L'examen du frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG), systématique, est parfois contributif au diagnostic de SMD via la mise en évidence de signes de dysplasie sur la lignée granuleuse (dégranulation, noyaux hypolobés, corps de Döhle) ou de blastes circulants avec parfois un corps d'Auer.

L'anémie est traditionnellement de type normocytaire ou macrocytaire arégénérative ; parfois microcytaire dans le cas d'une anémie sidéroblastique. Le frottis sanguin fait état de signes de dysplasie érythrocytaire de façon non systématique et non spécifique (anisocytose, poïkilocytose, anisochromie, hématies ponctuées, corps de Howell-Jolly). A noter que la

dysérythropoïèse est significativement plus marquée dans les cas de SMD avec sidéroblastes en couronne (16).

Les plaquettes sont souvent d'aspect normal au frottis sanguin mais des plaquettes géantes peuvent être observées. A noter qu'une thrombocytose peut orienter vers un syndrome 5q- ou vers un SMD/SMP.

II.E. Myélogramme et cytologie médullaire

La réalisation d'un prélèvement de moelle osseuse est indispensable à la démarche diagnostique et permet les examens spécialisés nécessaires au diagnostic et à la classification des SMD : cytologie, cytogénétique, biologie moléculaire et cytométrie en flux.

La moelle est généralement de richesse augmentée voire normale. Il existe des SMD à moelle pauvre qui restent marginaux et dont l'appréciation nécessite une biopsie ostéo-médullaire, notamment pour éliminer des diagnostics différentiels tels que la myélofibrose ou l'aplasie médullaire.

L'association entre cytopénie et dysplasie sur la lignée correspondante est souvent retrouvée mais n'est pas une règle stricte. L'analyse cytologique consiste en la détection de signes de dysplasie sur au moins 10 % des cellules d'une ou plusieurs lignées et permet d'affirmer la présence d'une dysérythropoïèse et/ou d'une dysgranulopoïèse et/ou d'une dysmégacaryopoïèse. Le compte précis des blastes médullaires est également déterminant pour classer le SMD.

Les anomalies les plus représentatives de la dysérythropoïèse (17) sont :

- des anomalies nucléaires : irrégularité, multi-nucléarité, macro- voire mégalo blastose, ponts inter-chromatiniens, corps de Howell-Jolly ;
- des anomalies cytoplasmiques : défaut d'hémoglobinisation que l'on décrit sous le terme de cytoplasme feuilleté, présence de sidéroblastes en couronne. La coloration de Perls permet la mise en évidence d'une accumulation de fer apparaissant sous la forme de ponctuations bleu-vert dans le cytoplasme des

érythroblastes ainsi que l'évaluation de la proportion de sidéroblastes en couronne parmi les précurseurs érythroïdes. Seuls les sidéroblastes de type 3, c'est-à-dire contenant au moins cinq grains de répartition péri-nucléaire sont intégrés au décompte.

Les anomalies les plus représentatives de la dysgranulopoïèse sont :

- des anomalies nucléaires avec
 - des défauts de segmentation : pseudo-Pelger, hyposegmentation ;
 - une condensation anormale de la chromatine ;
 - une multi-nucléarité ;
- des anomalies cytoplasmiques : hypogranulation, persistance de basophilie, corps de Döhle, corps d'Auer, grains de type Chediak.

Les anomalies les plus représentatives de la dysmégacaryopoïèse sont principalement nucléaires avec la présence de mégacaryocytes multi-nucléés, de mégacaryocytes hypolobés voire monolobés caractéristiques du syndrome 5q- ou de micromégacaryocytes.

II.F. Analyse cytogénétique

L'hématopoïèse clonale observée dans les SMD peut être mise en évidence par des techniques de cytogénétique conventionnelle ou moléculaire (FISH pour *fluorescence in situ hybridization*) qui permettent la détection d'anomalies chromosomiques au sein des cellules hématopoïétiques myéloïdes. Le caryotype médullaire doit être systématique : au moins 20 mitoses doivent être observées, sinon le caryotype est en échec.

Les anomalies cytogénétiques sont retrouvées dans 50 % des SMD primaires contre 80 % des SMD secondaires. Ces anomalies sont d'une grande hétérogénéité mais les chromosomes 5, 7 et 8 sont les plus fréquemment touchés (70 % des anomalies).

II.G. Analyse moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent de détecter de nombreuses mutations sur différents gènes chez les patients atteints de SMD. Cependant, la valeur pronostique des anomalies décelées n'est pas toujours établie et aucune anomalie moléculaire n'est constante ni spécifique des SMD.

Certaines anomalies moléculaires sont récurrentes dans les SMD avec une fréquence mutationnelle variable et une association variable. Ces gènes mutés codent pour des protéines impliquées dans divers processus :

- la régulation épigénétique de la transcription (*TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1, IDH2, UTX*) ;
- l'épissage des pré-ARN messagers (*SF3B1* muté dans 80 % des anémies sidérolastiques, *SRSF2, ZRSF2, U2AF1*) ;
- la transcription (*RUNX1, TP53, ETV6, BCOR*) ;
- ou plus rarement les gènes des cohésines (*STAG1, STAG2, RAD21, SMC1, SMC3A*).

Les techniques de séquençage haut débit de type NGS (*Next Generation Sequencing*) permettent actuellement de détecter des mutations dans les cellules médullaires dans la majorité des cas de SMD. La classification OMS 2016 des SMD ne retient pour l'instant que la recherche de mutations sur le gène *SF3B1* qui sont corrélées à la présence de sidérolastes en couronne (18). Cependant, il est probable que les données issues du NGS seront à l'avenir intégrées dans les critères permettant non seulement le diagnostic des SMD mais également l'évaluation du pronostic et le choix de leur prise en charge thérapeutique. La place de la recherche des mutations somatiques reste donc encore à préciser.

Les principales anomalies moléculaires et cytogénétiques clairement identifiées sont présentées Figure 1.

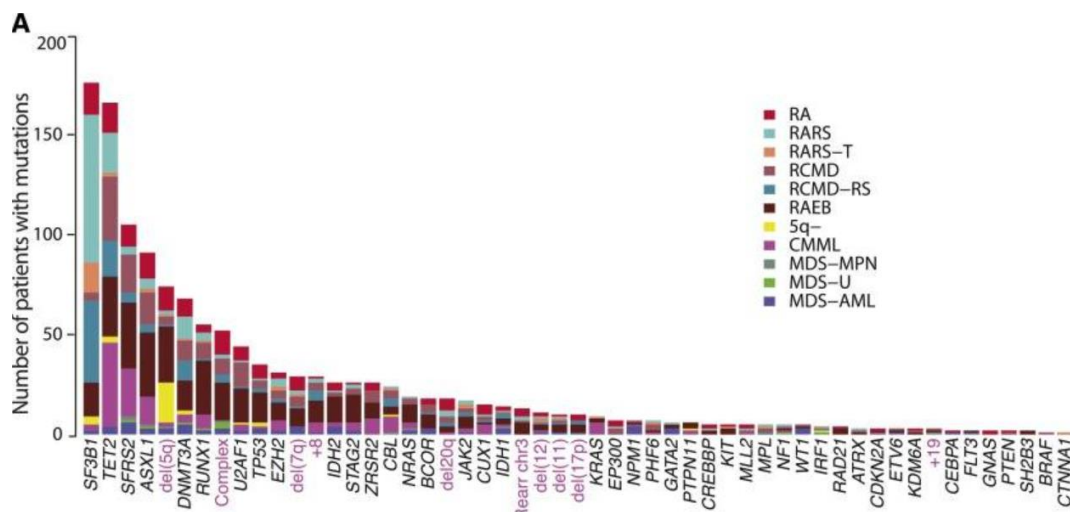


Figure 1. Fréquence des mutations *driver* et des anomalies cytogénétiques identifiées chez 738 patients atteints de SMD, sous-catégorisés par type de SMD.

D'après Papaemmanuil et al. 2013 (19)

II.H. Analyse immuno-phénotypique

Les anomalies phénotypiques des cellules myéloïdes sanguines et médullaires des différentes lignées myéloïdes sont habituelles dans les SMD. Cependant, les anomalies à rechercher par cytométrie en flux (CMF) sont nombreuses et restent souvent difficilement quantifiables. Dans le but de conforter le diagnostic de SMD, notamment lorsque la dysplasie est incertaine et le caryotype normal, des scores issus de l'analyse par CMF ont été développés sur les cellules médullaires. Ils reposent sur la mise en évidence de l'expression anormale d'antigènes membranaires ou d'anomalies concernant le processus de maturation.

Parmi ces approches, le score d'Ogata est probablement le plus couramment utilisé. Ce score peut mettre en évidence en cas de SMD une diminution des progéniteurs B CD19+ CD34+, une augmentation du nombre de cellules CD34+, un profil d'expression anormal du CD45 sur les progéniteurs CD34+ et une diminution de la structure des granuleux (SSC) (20). Ce score a été développé et incrémenté de nouveaux paramètres pour en améliorer la sensibilité (21).

Le RED-score permet la mise en évidence d'une dysérythropoïèse via l'analyse des coefficients de variation de l'expression du CD36 et du CD71 sur les érythroblastes associée au taux d'hémoglobine (22).

L'analyse des anomalies phénotypiques sur les différents compartiments cellulaires de la moelle osseuse peut donc être utile au diagnostic des SMD et est désormais recommandée par l'OMS.

II.I. Classification des syndromes myélodysplasiques de l'adulte (OMS 2016)

La classification OMS 2016 distingue plusieurs sous-types de syndromes myélodysplasiques en s'appuyant sur différents critères :

- le nombre de cytopénie(s) sanguine(s) avec des seuils définis (hémoglobine < 10 g/dL, plaquettes < 100 G/L et polynucléaires neutrophiles < 1,8 G/L) ;
- le nombre de lignée(s) myéloïde(s) dysplasique(s) au niveau médullaire ;
- le pourcentage de blastes sanguins et médullaires ;
- la présence de corps d'Auer ;
- le pourcentage de sidéroblastes en couronne ;
- la présence d'une mutation sur le gène codant pour la protéine SF3B1 ;
- la présence d'une del(5q) au caryotype.

D'autres critères sont indispensables pour poser le diagnostic de SMD :

- un compte de blastes sanguins et médullaires < 20 %. Dans le cas contraire, le diagnostic retenu sera celui d'une leucémie aiguë ;
- un compte de monocytes sanguins < 1 G/L. Dans le cas contraire, le diagnostic évoqué sera celui d'un syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif (SMD/SMP) de type leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC).

L'ensemble des critères de cette classification définissant les sous-types de SMD est présenté dans le Tableau 1.

	SANG		MOELLE OSSEUSE			
	Cytopénie(s) ¹	Blastes	Lignée(s) dysplasique(s) ²	Blastes	Sidéroblastes en couronne ³	Autres
SMD sans sidéroblaste en couronne						
<i>MDS with single lineage dysplasia</i> (SMD-SLD) ou Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU)	1 ou 2	Absence ou rares < 1 %	1	< 5 %	< 15 % ou < 5 % si mutation de <i>SF3B1</i>	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non Critères du SMD del(5q) non réunis
<i>MDS with multilineage dysplasia</i> (SMD-MLD) ou Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (CRDM)	1 à 3	Absence ou rares < 1%	2 ou 3	< 5 %	< 15 % ou < 5 % si mutation de <i>SF3B1</i>	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non Critères du SMD del(5q) non réunis
SMD avec sidéroblastes en couronne (SMD-RS) ⁴						
Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée et présence de sidéroblastes en couronne (SMD-RS-SLD)	1 ou 2	Absence ou rares < 1 %	1	< 5 %	≥ 15 % ou ≥ 5 % si mutation de <i>SF3B1</i>	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non Critères du SMD del(5q) non réunis
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée et présence de sidéroblastes en couronne (SMD-RS-MLD)	1 à 3	Absence ou rares < 1 %	2 ou 3	< 5 %	≥ 15 % ou ≥ 5 % si mutation de <i>SF3B1</i>	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non Critères du SMD del(5q) non réunis
SMD avec délétion 5q isolée						
	1 ou 2	Absence ou rares < 1 %	1 à 3	< 5 %	indifférent	Pas de corps d'Auer del(5q) isolée ou associée à une seule anomalie additionnelle (hors 7- ou del(7q))
SMD avec excès de blastes						
SMD avec excès de blastes de type I (SMD-EB-I)	1 à 3	2-4 %	0 à 3	5-9%	indifférent	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non
SMD avec excès de blastes de type II (SMD-EB-II)	1 à 3	5-19 %	0 à 3	10-19 %	indifférent	Avec ou sans corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non
SMD inclassables						
Avec pancytopénie et dysplasie unilignée	3	Absence ou rares < 1 %	1	< 5 %	indifférent	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non
Avec 1 % de blastes dans le sang	1 à 3	1 % ⁵	1 à 3	< 5 %	indifférent	Pas de corps d'Auer Anomalies cytogénétiques présentes ou non
Avec une anomalie cytogénétique associée aux SMD	1 à 3	< 1 %	0	< 5 %	< 15 %	Pas de corps d'Auer Anomalie(s) cytogénétique(s) évocatrice(s)

Tableau 1. Classification des SMD de l'adulte (OMS 2016)

¹ cytopénies définies par les seuils retenus par l'OMS : hémoglobine < 10 g/dL ; plaquettes < 100 G/L ; polynucléaires neutrophiles < 1.8 G/L.

² une lignée est considérée comme dysplasique si ≥ 10 % des cellules de la lignée myéloïde touchée sont dysplasiques.

³ en % des précurseurs érythroïdes médullaires.

⁴ avec absence de thrombocytose (plaquettes < 450 G/L).

⁵ relevés à au moins 2 occasions distinctes.

II.J. Diagnostics différentiels

La suspicion de SMD repose sur l'observation de cytopénies persistantes à la NFS après avoir éliminé toutes les autres étiologies. Les diagnostics différentiels notamment de l'anémie normo-macrocytaire arégénérative peuvent facilement être éliminés par dosage sanguin : TSH pour éliminer une hypothyroïdie, créatinine pour une insuffisance rénale chronique, vitamines B12/folates pour une carence. Les facteurs aggravant l'anémie sont aussi à rechercher par le bilan biologique : bilan martial, bilan hépato-cellulaire, recherche d'un syndrome inflammatoire, haptoglobine et bilirubinémie. L'interrogatoire a toute sa place devant une macrocytose pour éliminer une prise médicamenteuse ou un alcoolisme chronique.

En cas de thrombocytose, hyperleucocytose, splénomégalie ou myélofibrose le diagnostic s'orientera plutôt vers un SMD/SMP ou un SMP. Les suspicions de SMD avec myélofibrose avec découverte de mutations de *JAK2*, *MPL* ou *CAL-R* peuvent réorienter le diagnostic vers une splénomégalie myéloïde.

Même après l'élimination des causes évidentes de cytopénie, le diagnostic positif de SMD n'est pas toujours aisé, surtout si on ne retrouve pas d'anomalie cytogénétique et que les signes de dysplasie restent discrets voire absents. Il peut alors être utile de répéter les examens à distance pour vérifier la persistance et l'évolution des anomalies constatées.

Dans ce contexte, il a récemment été décrit des états « pré-SMD » dont l'évolution est très variable puisque ces conditions peuvent persister sans manifestation clinique ni retentissement biologique sur la NFS, ou évoluer vers un SMD (ou vers une autre hémopathie myéloïde) (Tableau 2). Ainsi, une hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP pour *Clonal Haematopoiesis of Indeterminate Potential*) peut être mise en évidence chez des patients âgés via la détection de mutations dans des gènes fréquemment mutés dans le cadre de pathologies hématologiques comme les SMD, mais sans qu'une cytopénie ne soit observée à la NFS. La fréquence des CHIP augmente avec l'âge (23) et pourrait prédisposer ces patients au développement d'une hémopathie myéloïde de type SMD.

Dans le cas où cette anomalie moléculaire est associée à une cytopénie sans que l'analyse de la moelle osseuse ne puisse mettre en évidence des signes de dysplasie ou d'anomalie cytogénétique, on parlera alors de cytopénie clonale de signification indéterminée (CCUS pour *Clonal Cytopenia of Indetermined Significance*). Son évolution n'est pas systématique mais elle peut évoluer vers un SMD ou une authentique LAM (24).

Enfin, dans le cas d'une cytopénie persistante sans cause évidente ni signe de dysplasie au myélogramme, ni marqueur d'hématopoïèse clonale (analyses cytogénétiques et moléculaires normales), le diagnostic d'ICUS (Cytopénie Idiopathique de Signification Indéterminée) sera posé et dont l'évolution possible en CCUS ou SMD devra être surveillée.

Feature	Pre-MDS Conditions and MDS					
	ICUS	IDUS	CHIP	CCUS	LR MDS	HR MDS
Monoclonal/Oligoclonal	-/+	+/-	+	+	+	+
Dysplasia*	-	+	-	-	+	+
Cytopenia(s)**	+	-	-	+	+	+
BM blasts	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	<20%
Flow abnormalities	+/-	+/-	+/-	+/-	++	+++
Cytogenetic abnormalities	-/+***	-/+***	+/-	-	+	++
Molecular aberration/s****	-	-	+	+	++	+++

Tableau 2. « Pré-SMD » et SMD : critères diagnostiques

D'après Valent et al. 2017 (2)

ICUS : cytopénie idiopathique de signification indéterminée ; IDUS : dysplasie idiopathique de signification indéterminée ; CHIP : clonal haematopoiesis of indeterminate potential ; CCUS : cytopénie clonale de signification indéterminée ; LR MDS : SMD de bas risque ; HR MDS : SMD de haut risque.

** au moins 10 % des cellules d'une lignée myéloïde sont dysplasiques.*

*** cytopénie persistante sur une période d'au moins 4 mois.*

**** dans certains cas, un clone de petite taille avec une anomalie cytogénétique associée aux SMD est détectable par FISH.*

***** une anomalie moléculaire est définie par une mutation associée à un SMD avec une charge allélique $\geq 2\%$. Une des conditions pour définir un état pré-SMD est une charge allélique $\geq 2\%$, tandis que la charge allélique minimale pour compter comme un co-critère de SMD devrait être plus élevée (10 % par exemple). Cependant, une charge allélique élevée n'exclut pas un CHIP ou un CCUS. Lorsque plusieurs co-critères de SMD sont présents, le diagnostic de SMD peut être établi en l'absence de dysplasie.*

En conclusion, le diagnostic des SMD repose sur l'association de plusieurs critères majeurs et/ou mineurs qui sont résumés dans le Tableau 3.

A. Prerequisite Criteria (both must be fulfilled)

- Persistent (4 months) peripheral blood cytopenia** in one or more of the following lineages: erythroid cells, neutrophils, platelets (exception: in the presence of a blast cell excess and MDS-related cytogenetic abnormalities the diagnosis of MDS can be established without delay)
- Exclusion of all other hematopoietic or non-hematopoietic disorders as primary reason for cytopenia/dysplasia***

B. MDS-Related (Major) Criteria (at least one must be fulfilled)

- Dysplasia in at least 10% of all cells in one of the following lineages in the bone marrow smear: erythroid; neutrophilic; megakaryocytic****
- $\geq 15\%$ ring sideroblasts (iron stain)
or $\geq 5\%$ ring sideroblasts (iron stain) in the presence of *SF3B1* mutation
- 5-19% myeloblasts on bone marrow smears (or 2-19% myeloblasts on blood smears)
- Typical chromosome abnormality(ies) by conventional karyotyping or FISH*****

C. Co-Criteria (for patients fulfilling A but not B, and otherwise show typical clinical features, e.g. macrocytic transfusion-dependent anemia; two or more of these co-criteria must be fulfilled for considering a provisional diagnosis of MDS)

- Abnormal findings in histologic and/or immunohistochemical studies of bone marrow biopsy sections supporting the diagnosis of MDS*****
- Abnormal immunophenotype of bone marrow cells by flow cytometry, with multiple MDS-associated phenotypic aberrancies indicating the presence of a monoclonal population of erythroid and/or myeloid cells
- Evidence of a clonal population of myeloid cells determined by molecular (sequencing) studies revealing MDS-related mutations*****

Tableau 3. Critères minimaux pour porter le diagnostic de SMD

D'après Valent et al. 2017 (2)

Le diagnostic de SMD peut être posé lorsque les deux critères « A » et au moins un critère majeur « B » sont présents. Si aucun critère majeur n'est présent mais que le patient souffre probablement d'une hémopathie myéloïde clonale, les co-critères « C » doivent être recherchés et peuvent aider à conclure que le patient a une néoplasie myéloïde ressemblant à SMD ou est à risque de développer un SMD. Dans ce contexte, des investigations répétées au cours du suivi sur la moelle osseuse peuvent être nécessaires pour porter un diagnostic final de SMD.

II.K. Evolution et classification pronostique IPSS-R

L'évolution des SMD tend de façon systématique vers l'aggravation des cytopénies et la majoration du syndrome d'insuffisance médullaire. L'acutisation en LAM survient dans 30 % des cas avec l'accumulation plus ou moins progressive de blastes, l'aggravation des cytopénies et l'apparition de nouvelles anomalies cytogénétiques.

Plusieurs scores pronostiques existent pour estimer la survie médiane des patients et prévoir l'évolution de la maladie vers une LAM. Les SMD étaient classés schématiquement en fonction de leur gravité en SMD de bas risque (IPSS faible et intermédiaire-I) et SMD de haut risque (IPSS intermédiaire-II et haut) selon l'IPSS proposé par Greenberg en 1997 (25). Il a depuis été révisé et remplacé en 2012 par l'IPSS-R (*International Prognosis Scoring System - Revised*) (26) qui est le score pronostique le plus couramment utilisé. Par rapport à l'IPSS, le score IPSS-R donne plus d'impact aux anomalies cytogénétiques observées au caryotype (Tableau 4) et à la profondeur des cytopénies. Il distingue 5 catégories pronostiques détaillées dans les Tableau 5 et Tableau 6.

D'autres facteurs ne sont pas pris en compte dans ce score mais orientent le choix thérapeutique : l'âge, l'état général évalué par le *performance status*, les comorbidités et les mutations somatiques identifiées.

En cas d'évolutivité (aggravation voire apparition de cytopénies, blastes circulants, myélémie), il est nécessaire de réaliser un nouveau myélogramme ainsi qu'un caryotype médullaire si celui-ci peut avoir des conséquences thérapeutiques. Les complications des transfusions itératives sont aussi à prendre en compte (hémochromatose secondaire, allo-immunisation).

Groupes pronostiques	Anomalies cytogénétiques	% de patients	Médiane de survie (années)	Délai médian pour 25% d'évolution en LAM (années)
Très favorable	Simple : -Y ; del(11q)	4	5,4	Non atteint
Favorable	Simple : normal ; del(5q) ; del(12p) ; del(20q) Double : 2 anomalies dont la del(5q)	72	4,8	9,4
Intermédiaire	Simple : del(7q) ; +8 ; +19 ; i(17q) ; tout autre anomalie simple Double : tout autre anomalie double	13	2,7	2,5
Défavorable	Simple : -7 ; inv(3)/t(3q)/del(3q) Double : 2 anomalies dont -7/del(7q) Complexe : 3 anomalies	4	1,5	1,7
Très défavorable	Complexe > 3 anomalies	7	0,7	0,7

Tableau 4. Classification cytogénétique de l'IPSS-R

Variable pronostique	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Catégorie cytogénétique	Très favorable		Favorable		Intermédiaire	Défavorable	Très défavorable
Blastes médullaires	≤ 2 %		> 2 % et < 5 %		5-10 %	> 10 %	
Hémoglobine (g/dL)	≥ 10		≥ 8 et < 10		< 8		
Plaquettes (G/L)	≥ 100	≥ 50 et < 100		< 50			
PNN (G/L)	≥ 0,8		< 0,8				

Tableau 5. Critères pour le calcul de l'IPSS-R

Catégorie de risque	Score	% de patients	Médiane de survie (années)	Délai médian pour 25% d'évolution en LAM (années)
Très faible	≤ 1,5	19	8,8	Non atteint
Faible	> 1,5-3	38	5,3	10,8
Intermédiaire	> 3-4,5	20	3	3,2
Elevé	> 4,5-6	13	1,6	1,4
Très élevé	> 6	10	0,8	0,73

Tableau 6. Score global IPSS-R

II.L. Thérapeutique

Plusieurs stratégies et approches sont envisageables en fonction de critères cliniques (âge, état général, évolutivité) et biologiques (classification IPSS-R). Schématiquement, pour les SMD de bas risque, l'objectif est d'améliorer la qualité de vie en limitant les cytopénies et leurs conséquences cliniques alors que chez les patients atteints de SMD de risque élevé, l'objectif est de contrôler la prolifération des blastes leucémiques et de retarder l'évolution en LAM.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, seul traitement potentiellement curatif, est réservée aux patients de moins de 65-70 ans avec un SMD de haut risque, sans comorbidité majeure et avec un donneur compatible disponible.

Les autres options chez ces patients avec SMD de haut risque ont un rôle suspensif. Il s'agit de la chimiothérapie intensive (anthracyclines et aracytine) ou d'agents hypométhylants (azacitidine) qui peuvent aussi être administrés en attente d'une greffe de moelle osseuse. L'azacitidine est le traitement de première ligne car relativement bien toléré ; il apporte une indépendance transfusionnelle et permet un gain de survie (27).

Dans les formes de bas risque, la prise en charge est avant tout symptomatique et vise à améliorer la qualité de vie en corrigeant les cytopénies. En effet de nombreux sujets âgés tolèrent parfaitement leur maladie et n'ont besoin que d'un traitement symptomatique voire d'une simple surveillance.

En cas d'anémie, des transfusions itératives de culots globulaires phénotypés sont souvent proposées. Le recours à l'érythropoïétine recombinante ou à la darbepoïétine, associées ou non au G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), permet de diminuer les besoins transfusionnels. Un traitement par lénalidomide chez les patients avec un syndrome 5q- est une alternative en cas d'anémie dépendante des transfusions. Un traitement rapide et probabiliste par une antibiothérapie large spectre est préconisé en cas de neutropénie sévère et de signes d'infection. Le G-CSF en cure courte peut aussi être discuté. La prévention de l'hémochromatose secondaire par des chélateurs du fer est à prévoir et à instaurer dès que nécessaire en cas de transfusions répétées.

III. MICROENVIRONNEMENT ET DEREGULATION IMMUNITAIRE DANS LES SYNDROMES MYELOUDYPLASIQUES

Les SMD sont des pathologies hétérogènes dont la physiopathologie implique de nombreuses anomalies génétiques des cellules souches hématopoïétiques mais également des anomalies du microenvironnement médullaire. Celui-ci est composé de cellules stromales mésenchymateuses, de cellules immunitaires, d'une matrice extracellulaire et de vaisseaux. L'ensemble de ces cellules constitue un réseau complexe où la CSH myélodysplasique interagit avec son microenvironnement qui est « éduqué » pour promouvoir sa prolifération et son développement.

Il semble clairement établi qu'un environnement inflammatoire et un dérèglement du système immunitaire jouent un rôle majeur dans la genèse des SMD. L'implication de l'immunité dans ces pathologies est d'ailleurs suggérée par le fait que les patients présentant une maladie auto-immune ont un risque accru de développer un SMD (*odds ratio* de 1,5 à 3,5 selon les études) (15). Ce contexte dysimmunitaire fréquemment rencontré favorise vraisemblablement la survenue des SMD. Des études ont d'ailleurs montré une amélioration de la survie globale, un bénéfice sur les cytopénies et un risque moindre de progression vers la LAM après un traitement immunosuppresseur, en particulier chez les patients les plus jeunes présentant un SMD à faible risque (28). Les traitements immunosuppresseurs comme le sérum anti-lymphocytaire ou la ciclosporine ont montré leur potentiel thérapeutique en apportant une amélioration hématologique et une suppression des clones T fréquemment observés chez les patients atteints de SMD de bas risque (29).

Une apoptose augmentée des précurseurs hématopoïétiques est une des caractéristiques des SMD de bas risque. Cette apoptose est en partie liée à une dysfonction de la réponse cellulaire T et de la réponse innée. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques oligoclonaux activés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des CSH malignes, prolifèrent et répriment les précurseurs myéloïdes normaux. Une augmentation des lymphocytes T CD8+ et de leur cytotoxicité a été observée chez des patients atteints de SMD de faible risque (30). Les

précurseurs hématopoïétiques sont probablement la cible de ces cellules lymphoïdes T CD8+ qui reconnaissent des auto-antigènes exprimés à la fois par des précurseurs dysplasiques et normaux.

De plus, les cellules lymphoïdes T sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'INF- γ dans le microenvironnement médullaire, ce qui inhibe l'hématopoïèse normale et induit l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales favorisant ainsi l'échappement de ces cellules à la surveillance immunitaire. L'environnement cytokinique médullaire, lié aux cellules tumorales et aux cellules stromales mésenchymateuses ou encore à l'inflammation systémique, renforce l'expression du *Fas receptor* sur les précurseurs hématopoïétiques : ils sont alors plus sensibles à l'apoptose (31). Les cellules stromales mésenchymateuses inhibent l'activation des lymphocytes T médullaires par interaction directe, ou indirecte médiée par des molécules telles que l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) ; ces cellules stromales mésenchymateuses peuvent cependant être défaillantes dans les SMD de bas risque (30).

Dans les SMD de haut grade, l'apoptose est moindre et on observe une faible réponse au traitement immunosuppresseur. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de certains « immune checkpoints » (tels que PD-1 ou PD-L1) à la surface des cellules CD34+ et des cellules mononucléées du sang périphérique a été observée dans les SMD (32).

Les cellules myéloïdes suppressives ou MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) semblent également impliquées dans la dérégulation du système immunitaire observée dans les SMD. Les MDSCs regroupent des progéniteurs et précurseurs de macrophages, de polynucléaires et de cellules dendritiques et sont connues pour favoriser la croissance tumorale via l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale (33). En effet, ces cellules ont une action suppressive vis-à-vis des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules T effectrices et inhibent également la production d'INF- γ . Ces cellules se développent en réponse à des signaux pro-inflammatoires et entraînent la production de diverses cytokines suppressives comme le TGF- β et l'IL-10. Chez les patients atteints de SMD, il a été rapporté une accumulation et une activation de ces cellules au niveau médullaire médiée par la molécule pro-inflammatoire S100A9 (34). Les MDSCs participent donc elles aussi au processus de dérégulation immunitaire.

Les cellules lymphoïdes NK jouent également un rôle essentiel dans le processus de surveillance immunitaire par la sécrétion de cytokines et leur activité cytolytique. La fréquence et l'activité des cellules NK semble plus élevée dans la moelle osseuse des patients atteints de SMD de faible risque par rapport à celle des patients atteints de SMD de haut grade (30). Cette augmentation de l'activité des lymphocytes NK pourrait participer à l'augmentation de l'apoptose des précurseurs médullaires. Cependant, l'implication des cellules NK reste controversée puisqu'une autre étude a montré que l'activité cytotoxique des lymphocytes NK était déficiente chez les patients atteints de SMD ce qui diminuerait la surveillance immunitaire et favoriserait l'évolution de la pathologie (35).

Enfin, les lymphocytes T régulateurs sont aussi impliqués dans la dérégulation du système immunitaire décrite dans les SMD. En effet, ces cellules jouent un rôle crucial dans la surveillance immunitaire et dans la régulation de l'auto-immunité et sont rapportées comme augmentées dans de nombreux types de cancers. Un nombre diminué de lymphocytes Tregs permet l'activation de clones de cellules T auto-réactifs, facilitant ainsi un degré élevé d'apoptose, l'une des caractéristiques des SMD de faible risque ; tandis qu'un nombre élevé de lymphocytes Tregs inhibe la réponse immunitaire contre les clones dysplasiques, facilitant ainsi leur expansion et la progression de la maladie. Ainsi, les SMD de haut risque sont associés à des taux de lymphocytes Tregs en nombre plus élevé que les SMD de faible risque (25,26). La littérature concernant l'implication de cette population dans la physiopathologie des SMD sera plus largement abordée dans le chapitre correspondant.

En conclusion, le microenvironnement médullaire semble jouer un rôle permissif vis-à-vis du clone dysplasique. La dérégulation du système immunitaire met en jeu de nombreux acteurs cellulaires et des mécanismes complexes qui favorisent le développement et l'évolution des SMD. La compréhension des mécanismes impliqués dans cet échappement des clones de SMD vis-à-vis du système immunitaire est un enjeu important puisque des stratégies thérapeutiques qui modulent le système immunitaire (le lenalidomide par exemple) ont déjà montré leur efficacité clinique (36).

C'est dans ce contexte que mon travail de thèse se focalise sur l'étude des lymphocytes T régulateurs.

IV. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS

IV.A. Définition et généralités

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) représentent 5 à 10 % de la population lymphocytaire T CD4+ dans le sang. Le facteur de transcription intracellulaire FoxP3 est la clé de voûte de leur développement et de leur fonctionnalité : il est le marqueur caractéristique et spécifique des Tregs.

Ces cellules ont un rôle capital dans la réponse immunitaire en permettant le maintien de l'homéostasie immune. Par leur action modulatrice et suppressive sur les autres cellules du système immunitaire, les Tregs sont impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire vis-à-vis de situations cliniques variées comme les maladies auto-immunes, les allergies, les infections, les transplantations et les cancers.

IV.B. Historique

Le concept de lymphocytes T régulant de façon négative les fonctions effectrices des cellules T effectrices a été mis en évidence au début des années 1970 dans le contexte de maladies auto-immunes (MAI). En effet, la thymectomie de souriceaux au troisième jour après la naissance est responsable du développement de maladies auto-immunes (37). Une thyroïdite auto-immune est également observée chez des rats thymectomisés post-irradiation. De plus, le transfert de lymphocytes T CD4+ issus de rats sains chez ces mêmes rats thymectomisés supprime ces manifestations auto-immunes (38,39).

Sakaguchi a montré en 1985 que l'injection de lymphocytes T CD4+ CD25^{low} chez la souris *nude* (souris porteuse d'une mutation responsable d'une aplasie du thymus entraînant un déficit du système immunitaire par absence de lymphocyte T), induit des manifestations auto-immunes qui sont inhibées après injection de cellules T CD4+ CD25^{high}. C'est aussi en déplaçant la plus petite fraction de lymphocytes T CD4+ entraînant l'apparition de maladies auto-

immunes sévères sur des rongeurs que Sakaguchi a isolé cette population lymphocytaire suppressive exprimant les marqueurs CD4 et CD25 (40,41).

Dans un premier temps nommés lymphocytes T suppresseurs, ils ont depuis été renommés lymphocytes T régulateurs et identifiés comme une des composantes majeures de la tolérance immunitaire. Il a été depuis largement mis en évidence le rôle protecteur des Tregs dans plusieurs MAI notamment chez la souris comme la colite auto-immune, le diabète ou le lupus ; leur transfert *in vivo* réprime la maladie alors que leur déplétion accélère ou déclenche la maladie. Il en est de même pour la réaction du greffon contre l'hôte et le rejet de greffe qui sont atténués par ces cellules CD4+ CD25+.

IV.C. Sous-populations lymphocytaires T

Parmi les lymphocytes T auxiliaires CD4+, on distingue des populations pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires dont la différenciation dépend de l'environnement cytokinique (Figure 2):

- les lymphocytes Th1 dont la différenciation impliquant le facteur de transcription Tbet est orientée par l'IL-12. Les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α , stimulent l'immunité cellulaire et la production d'anticorps opsonisants et activent les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages.

- les lymphocytes Th2 dont la différenciation est médiée par le facteur de transcription GATA-3 et orientée par l'IL-4. Les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 ; ils stimulent l'immunité humorale, favorisent la production d'IgM, d'IgA et d'IgE, l'atopie et la lutte antiparasitaire.

- les lymphocytes Th17 dont la différenciation impliquant le facteur de transcription ROR γ T est orientée par l'IL-6 et le TGF- β . Les lymphocytes Th17 sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-17 qui sont nécessaires au recrutement des polynucléaires neutrophiles au stade précoce de l'infection.

- les lymphocytes Tregs dont la différenciation est médiée par le facteur de transcription FoxP3 et orientée par le TGF- β et l'IL-10. Les lymphocytes Tregs sécrètent de l'IL-10, de l'IL-35 et du TGF- β et favorisent le phénomène de tolérance immunitaire.

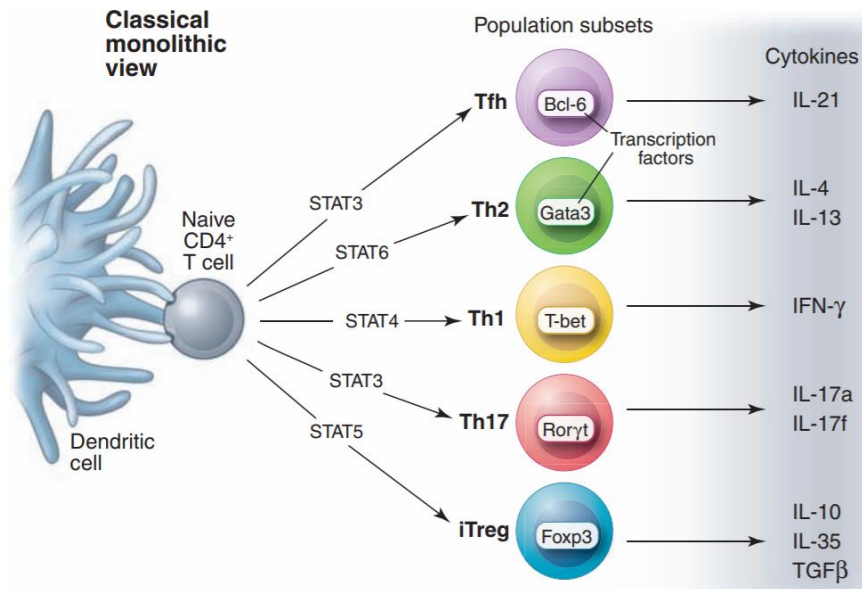


Figure 2. Différenciation des lymphocytes T helper

D'après O'Shea et al. 2010 (42)

L'équilibre entre une action pro-inflammatoire visant à éliminer les pathogènes et les cellules tumorales (rôle d'immuno-surveillance), et une action anti-inflammatoire des lymphocytes Tregs est nécessaire pour éviter le phénomène d'échappement tumoral et la survenue de maladies auto-immunes.

IV.D. Sous-populations de lymphocytes T régulateurs

IV.D.1. Lymphocytes T régulateurs naturels et induits

Les lymphocytes Tregs que l'on retrouve dans le sang forment un groupe hétérogène de cellules qui diffèrent par leur origine : on distingue les Tregs naturels (nTregs) et les Tregs induits ou adaptatifs (iTregs).

Les nTregs acquièrent leur fonction régulatrice lors de leur développement dans le thymus. Potentiellement auto-réactifs, ils sont sélectionnés dans le thymus (sélection positive) par une liaison de forte affinité aux molécules du CMH présentant des peptides du soi. Ils sont CD4⁺ et expriment de façon constitutionnelle le CD25 et FoxP3. Ils constituent le contingent principal des Tregs.

Les iTregs se différencient en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs CD4⁺ CD25⁻ après stimulation antigénique suffisante et stimulation par des cytokines immuno-régulatrices : TGF- β , IL-10 et IL-4. Ils acquièrent alors l'expression de FoxP3 et de CD25.

Cette distinction serait aussi corrélée à l'expression de profils phénotypiques différents présentés Figure 3.

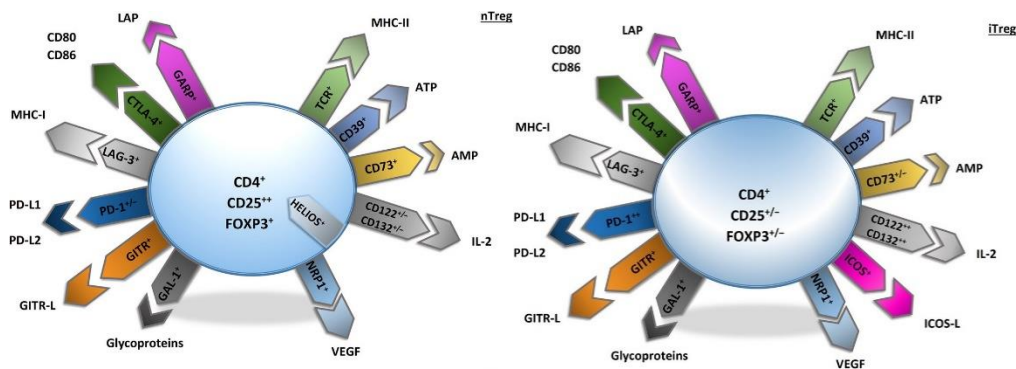


Figure 3. Les similitudes et différences majeures des marqueurs de surface et intracellulaires des nTregs et iTregs

D'après Frydrychowicz et al. 2017 (43)

FoxP3 : Forkhead box protein 3 ; *TCR* : T cell receptor ; *MHC I ou II* : major histocompatibility complex class I ou II ; *ATP* : adenosine triphosphate ; *AMP* : adenosine monophosphate ; *GARP* : glycoprotein A repetitions predominant ; *LAP* : lamina associated polypeptide ; *CTLA-4 (CD152)* : cytotoxic T lymphocytes associated antigen-4 ; *LAG-3* : lymphocyte activation gene-3 ; *PD-1* : programmed cell death protein-1 ; *ICOS (CD278)* : inducible T cell costimulator ; *GITR* : glucocorticoid-induced tumour necrosis receptor ; *GAL-1* : galectin-1 ; *NRP1* : neuropilin 1.

Selon certains auteurs, ces différences phénotypiques suggèrent des implications différentes entre ces deux sous-populations de lymphocytes Tregs : les nTregs seraient plutôt responsables du maintien de la tolérance vis-à-vis du soi et les iTregs de la régulation de la réponse envers le non-soi (44,45).

IV.D.2. Lymphocytes T régulateurs A et B

Kordasti et *al.* ont proposé en 2016 une nouvelle classification des sous-populations de lymphocytes Tregs : les Tregs A et les Tregs B. Ces 2 sous-populations ont été identifiées à partir de données obtenues par cytométrie de masse et analysées à l'aide des algorithmes automatisés viSNE (*visually - stochastic neighbor embedding*) et SPADE (*spanning - tree progression analysis of density-normalized events*) (46).

L'objectif initial de leur étude était d'identifier dans le sang une signature immune chez les patients atteints d'aplasies médullaires idiopathiques, répondeurs ou non au traitement par immunosuppresseur. Comme attendu dans ce contexte de pathologie auto-immune, il a été mis en évidence une diminution du nombre de lymphocytes Tregs dans le sang des patients atteints d'aplasie médullaire par rapport aux donneurs sains. L'utilisation des algorithmes automatisés viSNE et SPADE a également permis d'identifier 2 sous-populations distinctes de Tregs dont la répartition était prédictive d'une réponse au traitement par immunosuppresseur chez les patients atteints d'aplasie médullaire.

La différenciation Tregs A et B s'appuie sur des profils différents en termes de :

1/ Caractérisation phénotypique

Au sein de la population de lymphocytes Tregs identifiée par le phénotype FoxP3^{high} CD25^{high} CD127^{low}, 2 *clusters* de cellules sont nettement mis en évidence par l'analyse viSNE : les Tregs A et les Tregs B (Figure 4 A). Les marqueurs identifiés les plus discriminants des Tregs B vis-à-vis des Tregs A sont les suivants : CD45RA^{low}, CD7^{low}, CD27^{low}, CCR4^{high}, CCR6^{high}, CD25^{high}, CD28^{high}, CD45RO^{high}, CD95^{high}, CXCR3^{high}, FOXP3^{high}, HLA-DR^{high} correspondant au phénotype des Tregs B (Figure 4 B). Parmi ces marqueurs, les trois les plus significativement différents entre les Tregs A et B sont les CD95, CCR4, CD45RO (46).

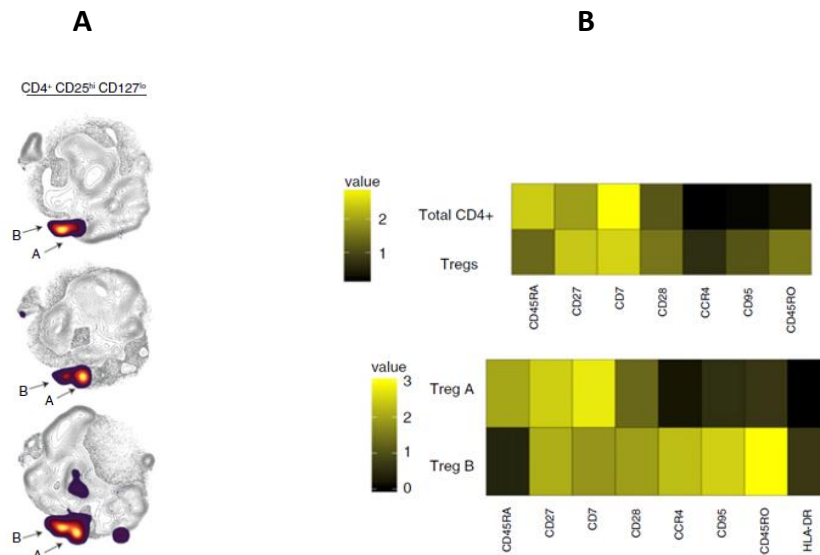


Figure 4. Identification des sous populations de lymphocytes T régulateurs par clustering automatisé

D'après Kordasti et al. 2016 (46)

A : Mise en évidence sur ces density plots de deux sous-populations de Tregs, A et B (désignées par des flèches) à partir d'une représentation en 2 dimensions des données multiparamétriques obtenues par l'algorithme viSNE.

B : Expression des marqueurs les plus discriminants entre lymphocytes T CD4+ totaux et Tregs (en haut), et entre Tregs A et Tregs B (en bas).

Dans cette étude, la distinction des Tregs A et B par l'expression des marqueurs CD4, CD25, CD127, FoxP3, CD95, CCR4 et CD45RA a également été validée par cytométrie en flux (46).

2/ Profil d'expression génique

En analysant le profil d'expression des gènes dans les lymphocytes Tregs, il a logiquement été observé un enrichissement en « Treg-specific genes » (*IL-2RA*, *FOXP3*, *IKZF2*, *FCRL3*, *TIGIT*, et *CTLA4*). En accord avec les résultats obtenus par cytométrie, il a également été montré que les Tregs B sont enrichis en gènes liés à la mémoire et à l'activation (*JAKMIP1*, *CCR8*, *TRIB1* et *GZMK*) par rapport aux Tregs A (46).

De plus, les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la signalisation intracellulaire IL-2/STAT5 et la réponse immunitaire sont surexprimés dans les Tregs B par rapport aux Tregs A, suggérant que la sous-population Tregs B a une capacité de prolifération plus importante.

3/ Fonction immunosuppressive

Les lymphocytes Tregs B ont une capacité significativement plus importante à réduire la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α des cellules T effectrices par rapport aux Tregs A (46).

Pour conclure, l'ensemble des données génomiques, phénotypiques et fonctionnelles observées dans ces 2 sous-populations de lymphocytes Tregs suggèrent que les Tregs B sont, par rapport aux Tregs A, des cellules aux capacités immunosuppressives plus importantes.

IV.E. Caractéristiques phénotypiques

IV.E.1. FoxP3

Le marqueur le plus spécifique de la population Tregs, identifié au début des années 2000, est le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3* codé par le gène *FoxP3*). Il est déterminant pour le développement et la fonctionnalité des Tregs ; il est capital pour maintenir la suppression du système immunitaire et constitue le marqueur de lignée des Tregs.

Des mutations sur le gène *FoxP3* induisent la génération de lymphocytes auto-réactifs à l'origine d'une maladie auto-immune sévère et rare, l'IPEX chez l'homme (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*) ou chez la souris *scurfy*.

Le rôle déterminant de FoxP3 est démontré par le fait qu'en transduisant des lymphocytes T de souris avec *FoxP3*, ils acquièrent les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des Tregs et sont capables d'inhiber la prolifération de cellules T effectrices (47). FoxP3 interagit avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'activation, la différenciation ou la réponse à une stimulation du TCR.

Pour être actif, FoxP3 forme un complexe avec le facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*). Ce complexe stimule l'expression de marqueurs comme CTLA-4 et CD25 et réprime la sécrétion d'IL-2, d'IL-4 et d'IFN- γ . Si une mutation de FoxP3 empêche son interaction avec NFAT, alors son action est compromise. L'activation de STAT5 induite par l'IL-2 est nécessaire à l'expression et au maintien de la stabilité de Foxp3. Des mutants murins avec des lymphocytes T CD4⁺ incapables de répondre à une stimulation par le TGF- β , qui est

nécessaire à la différenciation des lymphocytes Tregs et à l'expression de FoxP3, voient leurs Tregs diminuer et développent une pathologie auto-immune sévère similaire à celle des souris *scurfy*.

En raison de sa localisation intracellulaire, l'étude de l'expression de FoxP3 par cytométrie en flux nécessite la fixation et la perméabilisation des cellules.

IV.E.2. Autres marqueurs

Les lymphocytes Tregs sont caractérisés par des marqueurs de surface (CD3⁺ CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}) qui permettent de les identifier par CMF.

Le CD25 correspond à la chaîne α du récepteur de haute affinité à l'IL2 (IL-2R α). Il est présent sur les lymphocytes T CD4⁺ et est fortement exprimé à la surface des lymphocytes Tregs. Le CD127 correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α).

D'autres marqueurs sont décrits :

- CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) aussi appelé CD152 ;
- GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor*) ;
- galectine 1, LAP (*latency-associated peptide*), ICOS (*inducible costimulator*), PD-1 (*programmed cell death protein-1*), GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) (43) ;
- des molécules d'adhésion même en l'absence de stimulation antigénique : CD11a (LFA-1), CD44, CD54 (ICAM-1), CD103 ;
- des récepteurs aux chimiokines avec un profil assez caractéristique (CXCR3, CXCR4, CCR4, CCR3, CCR5, CCR6, CCR8) permettant le recrutement rapide de ces cellules au niveau des sites inflammatoires.

Contrairement à FoxP3, ces marqueurs sont non spécifiques puisque la plupart peuvent être exprimés de façon temporaire par d'autres cellules T activées. Ainsi, les marqueurs les plus couramment utilisés pour l'étude des lymphocytes Tregs sont le CD3, le CD4, le CD25, le CD127 et FoxP3. Cette stratégie a été confirmée par un groupe de travail international piloté par le

Collaborative Immunoguiding Program visant à conseiller le panel minimal d'anticorps à utiliser en cytométrie de flux pour permettre l'évaluation des Tregs (48).

IV.F. Physiopathologie et mécanismes suppressifs

Les lymphocytes Tregs ont la capacité de réprimer l'activité de plusieurs catégories de cellules du système immunitaire :

- adaptatif : lymphocytes T CD4+, T CD8+ et B ;
- inné : macrophages, monocytes, cellules dendritiques et NK.

Leur action suppressive est médiée par différents mécanismes tels que la sécrétion de cytokines immunosuppressives, la lyse des cellules cibles, la dérégulation de leur métabolisme ou encore l'induction d'un phénotype tolérogène des cellules dendritiques. Les principaux mécanismes sont détaillés ci-dessous et dans la Figure 5.

IV.F.1. Sécrétion de cytokines immunosuppressives : IL-35, TGF- β et IL-10

Le TGF- β , aussi exprimé sous une forme membranaire « *latent TGF- β* » par les lymphocytes Tregs, a de multiples effets entraînant une diminution de la présentation antigénique :

- inhibition de la prolifération des lymphocytes Teffs (T effecteurs) ;
- induction des iTregs et stabilisation des nTregs (49) ;
- induction d'un phénotype tolérogène des cellules dendritiques qui sécrètent l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) ;
- inhibition de la maturation des cellules dendritiques qui se trouvent dans l'incapacité de produire de l'IL-12 pro-inflammatoire et de promouvoir l'activation des cellules T par présentation de l'antigène.

IV.F.2. Cytolyse des lymphocytes T effecteurs

- par la voie des granzymes et des perforines (50) ;
- par interaction directe entre des molécules de surface des Tregs comme la galectine-1 et des récepteurs exprimés sur les Teffs (51) ;
- par la voie Fas/Fas ligand.

IV.F.3. Perturbations métaboliques des lymphocytes T effecteurs

Ces perturbations interviennent par privation de molécules nécessaires à leur fonction (IL-2 et ATP) ou par accumulation de molécules bloquant leur fonction (AMPc) :

- privation d'IL2 normalement présente dans l'environnement qui est captée par le récepteur de haute affinité des lymphocytes Tregs, le CD25 (52). L'IL-2 participe aussi à l'induction des iTregs et au maintien des nTregs ;
- dégradation séquentielle de l'ATP en AMP puis en adénosine par deux enzymes, CD39 et CD73. L'adénosine générée dans l'environnement se fixe au récepteur *A_{2A}R* (*adenosine purinergic adenosine receptor*) des lymphocytes Teffs (53) entraînant une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire ;
- transfert d'AMPc depuis les lymphocytes Tregs vers les lymphocytes Teffs via des jonctions inter-membranaires (54).

IV.F.4. Inhibition de l'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes T effecteurs

Le CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) membranaire des Tregs, qui est un homologue du CD28 des lymphocytes Teffs, entre en compétition avec ce dernier pour se lier aux molécules de co-stimulation, CD80 et CD86, exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (55). De plus, cette liaison entre CTLA-4 et CD80/CD86 induit la sécrétion de l'enzyme immunosuppressive IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) par les cellules dendritiques qui freine la prolifération des lymphocytes T naïfs. Cette sécrétion d'IDO est aussi déclenchée par la liaison de LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) des lymphocytes Tregs avec le CMH-II des cellules dendritiques. Le LAG-3, un homologue de CD4, inhibe aussi la

maturation et la capacité stimulante des cellules dendritiques. Le CTLA-4 des lymphocytes Tregs peut aussi induire la trans-endocytose de CD80 et CD86 des CPA qui aboutit à la dégradation de ces deux molécules et à l'absence de co-stimulation entre cellules dendritiques et lymphocytes Teffs (55). L'importance du CTLA-4 a notamment été démontrée sur la souris présentant des lymphocytes Tregs déficients en CTLA-4 membranaire qui développe une lympho-prolifération incontrôlée et des maladies auto-immunes (56–58).

Les molécules LFA-1 (*Leukocyte Function-Associated Antigen-1*) et neuropiline 1 (Nrp1) exprimées par les lymphocytes Tregs entrent aussi en compétition avec les lymphocytes Teffs pour interagir avec les cellules dendritiques.

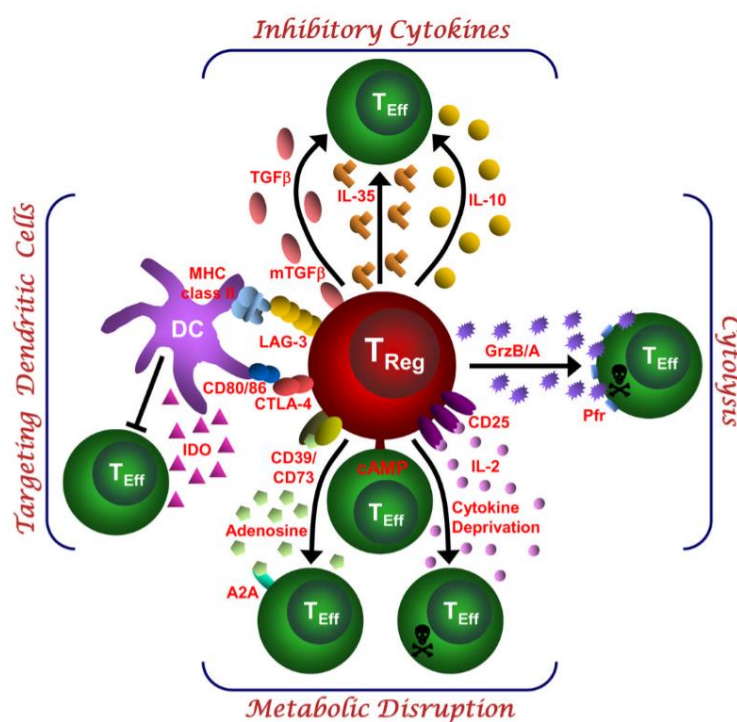


Figure 5. Mécanismes utilisés par les lymphocytes T régulateurs pour médier l'immunosuppression

D'après Vignali et al. 2008 (59)

Il n'est cependant pas bien connu si l'ensemble de la population de lymphocytes Tregs est capable d'utiliser tous ces mécanismes ou s'ils sont réservés à une sous-population spécialisée.

V. LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET PATHOLOGIES

V.A. Lymphocytes T régulateurs et maladies auto-immunes

Le premier mécanisme d'auto-tolérance est la déplétion des cellules T auto-réactives dans le thymus par les cellules dendritiques thymiques qui expriment des autoantigènes. Occasionnellement, des cellules T échappent à cette régulation (notamment parce qu'une suppression systématique des lymphocytes faiblement auto-réactifs réduirait trop drastiquement le répertoire immunitaire et nuirait à la réponse aux pathogènes) et sont potentiellement délétères si elles rencontrent l'auto-antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigènes en périphérie.

Un deuxième mécanisme d'auto-tolérance, cette fois-ci périphérique, appelé tolérance par régulation, implique les lymphocytes Tregs puisque ceux-ci ont la capacité de supprimer des lymphocytes auto-réactifs.

Les lymphocytes Tregs sont des cellules modérément auto-réactives qui ont échappé à la déplétion dans le thymus et qui une fois activées par des auto-antigènes spécifiques s'activent (nTreg) ou se différencient en cellules fortement suppressives (iTregs). Les lymphocytes Tregs inhibent les cellules auto-réactives voisines qui reconnaissent des auto-antigènes différents. On parle d'activation antigène-dépendante mais de suppression antigène-indépendante après activation.

L'altération du nombre et/ou de la fonction des lymphocytes Tregs est impliquée dans de nombreuses maladies auto-immunes telles que la sclérose-en-plaque, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1 (60).

V.B. Lymphocytes T régulateurs et cancers

Dans les pathologies tumorales, il a clairement été démontré que des mécanismes immunosuppresseurs concomitants à la croissance tumorale se mettent en place pour inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale spontanée. Les lymphocytes Tregs ont un rôle évident dans ces processus puisqu'ils bloquent les fonctions effectrices des cellules immunitaires vis-à-vis de l'antigène tumoral de façon plus ou moins spécifique. Les lymphocytes Tregs constituent donc une cible des stratégies anti-tumorales qui visent à inhiber leur recrutement et leur fonction suppressive.

Dans une des premières études montrant le rôle permissif de ces cellules vis-à-vis des tumeurs humaines, Chakraborty a constaté en 1990 (61) que les cellules lymphoïdes T CD25+ issues de ganglions de patients atteints de mélanome étaient capables d'inhiber *in vitro* la réponse immunitaire, notamment la réponse cytotoxique.

Par la suite, les lymphocytes Tregs ont été quantifiés chez les patients atteints de pathologies cancéreuses dans le sang, la tumeur ou les ganglions du territoire de drainage de la tumeur. Il a été constaté une augmentation de cette population chez des patients atteints de différents cancers : cancers de l'ovaire (62,63), cancers bronchiques et pulmonaires (64,65), cancers digestifs (66,67), carcinomes hépatocellulaires (68), cancers ORL (69), mélanomes (70,71), cancers du sein et du pancréas (72) et lymphome de Hodgkin (73).

Un fort infiltrat de lymphocytes Tregs a été décrit comme associé à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers tels que les cancers du sein, du col de l'utérus, de l'ovaire, du foie, de l'estomac et du pancréas (74,75). Il a aussi été rapporté qu'une diminution intraépithéliale du ratio lymphocytes T CD8+/lymphocytes Foxp3+ était corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (76) et les cancers du col utérin (77).

D'autres études suggèrent l'absence de valeur prédictive du taux de lymphocytes Tregs en terme de survie, par exemple dans l'infiltrat tumoral des carcinomes rénaux (78). En fait, outre le nombre de lymphocytes Tregs, une augmentation de leur activité peut également avoir un rôle dans le développement de certaines tumeurs. C'est ce qui a été observé dans une cohorte

de patients atteints de cancers de la prostate où le nombre de lymphocytes Tregs sanguins n'étaient pas différents par rapport au groupe contrôle mais ceux-ci étaient plus actifs (79). Plus largement, il est envisagé que les lymphocytes Tregs de patients cancéreux au niveau du sang et des tissus tumoraux auraient des fonctions suppressives plus importantes que ceux isolés du sang de donneurs sains (44,80).

A l'inverse, d'autres études suggèrent que l'augmentation des lymphocytes Tregs dans l'infiltrat tumoral conférerait un pronostic favorable aux patients atteints d'un lymphome folliculaire ou d'un lymphome de Hodgkin classique (81–83). Une augmentation des lymphocytes Tregs est aussi associée à un pronostic favorable dans le cancer colorectal (44) ou dans les cancers ORL (84). Ceci s'expliquerait par la diminution de l'inflammation initiée par les bactéries qui favorisent la carcinogénèse.

Une méta-analyse de 2015 tente de faire la synthèse de la valeur pronostique des Tregs dans les infiltrats des tumeurs solides (85) (Figure 6). Une augmentation des lymphocytes Tregs aurait ainsi un impact négatif sur la survie globale et la survie sans progression dans la plupart des cancers mais avec une forte disparité selon le site tumoral. A l'inverse, une augmentation des lymphocytes Tregs serait associée à une amélioration de la survie des patients atteints de cancers colorectaux, ORL et de l'œsophage. Un ratio T CD8+/Tregs élevé est associé de façon indépendante à une meilleure survie globale dans la plupart des cancers.

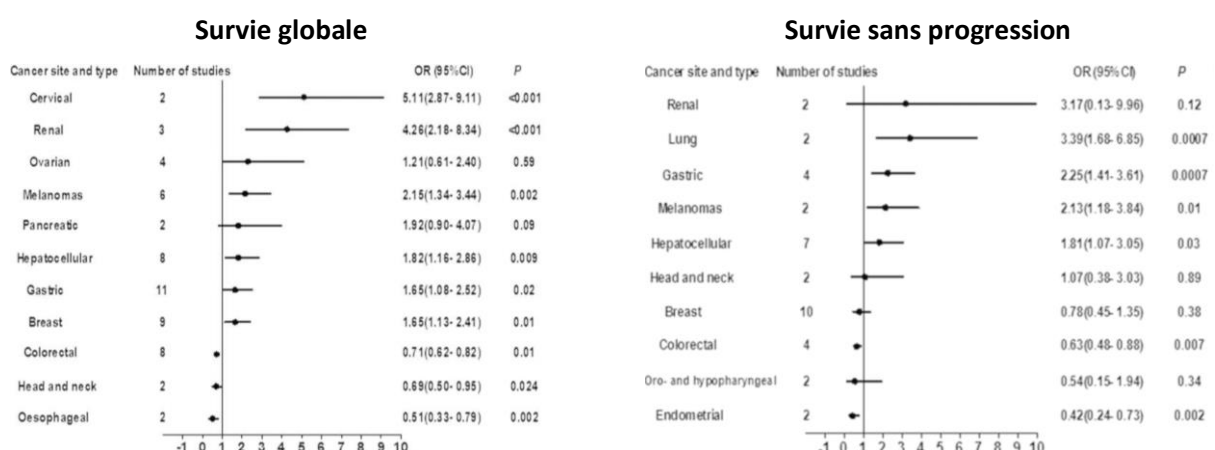


Figure 6. Estimation de la valeur pronostique des lymphocytes T régulateurs en termes de survie globale et de survie sans progression par type de cancer, basée sur l'analyse d'échantillons tumoraux

D'après Shang et al. 2015 (85)

Les mécanismes qui pourraient expliquer l'accumulation des lymphocytes Tregs au niveau des sites tumoraux sont exposés dans la Figure 7 et détaillés ci-dessous.

L'excès d'ATP extracellulaire au niveau des tumeurs avec infiltrat inflammatoire serait un signal de recrutement des lymphocytes Tregs qui exprimeraient un récepteur purinergique P2X7 (43). Nous avons vu précédemment que l'hydrolyse de l'ATP en adénosine par l'action combinée de CD39 et de CD73 est un des mécanismes médiant l'immunosuppression.

Autre exemple, les cancers ORL expriment souvent la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et sécrètent de la prostaglandine E₂ (PGE₂) qui se fixe à son récepteur EP2R (*Prostaglandin E Receptor*) notamment sur les cellules T effectrices, entraînant l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire qui inhibe leurs fonctions. Or, des études ont montré qu'en réalisant une co-culture de cellules T CD4⁺ CD25⁻ avec des cellules cancéreuses COX-2⁺, les cellules T se différencient en Tregs FoxP3⁺ COX-2⁺ qui produisent PGE₂ (75). Ces résultats suggèrent que des cellules tumorales, pour favoriser leur croissance, sont capables d'induire la différenciation de cellules T effectrices initialement dotées d'activité anti-tumorale en lymphocytes Tregs caractérisés à l'inverse par leur fonction immunosuppressive.

De même, la production fréquente par les cellules tumorales de TGF- β qui induit la différenciation en iTregs et l'expression de LAP (*latency-associated peptide*) et GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*) à la surface des lymphocytes Tregs illustrent comment les cellules tumorales régulent les fonctions immunosuppressives des Tregs qui sont recrutés dans le microenvironnement (64). Les cellules tumorales sont à l'origine de multiples facteurs qui favorisent le recrutement des lymphocytes Tregs (45,49) comme des chimiokines présentes dans le microenvironnement comme par exemple CCL22 qui se lie à CCR4 (86). Les lymphocytes Tregs activés expriment plusieurs récepteurs de chimiokines (CCR4-5-6-7-10) qui modulent le trafic des lymphocytes Tregs dans les tissus.

Les lymphocytes Tregs présents dans le microenvironnement tumoral n'auraient pas le même répertoire fonctionnel que ceux circulants en périphérie. En effet, les iTregs sembleraient prédominants dans le microenvironnement tumoral et surexpriment des récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3) et d'autres molécules comme LAP, GARP, NRP-1 ou encore CD39, CD73, des perforines et des granzymes associés à l'immunosuppression (87).

Des vésicules relarguées par les cellules tumorales appelées vésicules extracellulaires tumorales (*TEVs* pour *tumours extracellular vesicles*) contenant notamment des exosomes, favoriseraient la tolérance immunitaire vis-à-vis des tumeurs. Les principales fonctions qui leur sont attribuées sont la promotion de la croissance tumorale, la stimulation de l'angiogenèse, l'activation des fibroblastes du stroma et la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte (88). Leur interaction avec les lymphocytes Tregs serait un autre mécanisme impliqué dans la conversion de lymphocytes T conventionnels en Tregs hautement suppresseurs, dans l'expansion des Tregs, dans la surexpression des fonctions suppressives et dans le renforcement de la résistance à l'apoptose (89,90). Ce mécanisme est aussi décrit comme signal d'inhibition des lymphocytes Tregs envers les Teffs (88,91).

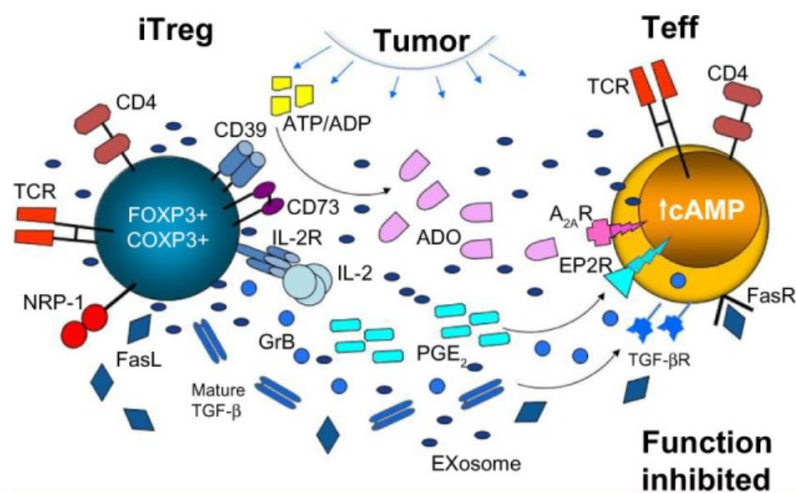


Figure 7. Mécanismes suppresseurs utilisés par les lymphocytes T régulateurs accumulés dans le microenvironnement tumoral (iTregs activés) pour inhiber les cellules T effectrices

D'après Whiteside et al. 2015 (87)

Teff: lymphocyte T effecteur ; *ADO*: adénosine ; *TGF-β*: transforming growth factor-beta ; *GrB*: granzyme B ; *NRP-1*: Neuropilin-1 ; *ATP*: adénosine-5'-triphosphate ; *ADP*: adénosine diphosphate ; *TCR*: T cell receptor ; *cAMP*: adenosine monophosphate cyclique.

En résumé, l'accumulation de lymphocytes Tregs dans les tumeurs et dans le sang des patients cancéreux est généralement considérée comme un marqueur de mauvais pronostic en raison de la suppression de l'immunité antitumorale qu'ils induisent. Cependant, l'impact clinique et pronostique des lymphocytes Tregs dans les cancers dépendrait de facteurs environnementaux, comme les agents infectieux au niveau des muqueuses ou l'environnement cytokinique. En effet, les Tregs contribuent aussi à contrôler l'inflammation

chronique associée au développement des cancers et préviennent les dommages tissulaires. La tumeur est également capable d'induire des changements sur le profil d'expression des récepteurs à la surface des lymphocytes Tregs qui augmentent leurs fonctions suppressives.

Une meilleure compréhension des mécanismes induisant l'accumulation des lymphocytes Tregs ou leur suractivation est primordiale dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques visant justement à restaurer l'immunité anti-tumorale. La suppression des fonctions immunosuppressives des lymphocytes Tregs constitue une approche thérapeutique innovante. Différentes approches sont envisagées (Tableau 7). Par exemple, une déplétion globale des lymphocytes Tregs peut être induite par de fortes doses de cyclophosphamide. Cependant, une déplétion plus sélective qui pourrait épargner les lymphocytes Tregs régulant l'auto-immunité et éliminer les Tregs médiant l'échappement tumoral semble conceptuellement plus attirante. La difficulté pour développer ce type de stratégies thérapeutiques réside dans le fait d'identifier parmi les multiples mécanismes ceux qui ont un rôle clé dans l'échappement tumoral.

Targeted Treg marker	Therapeutic agent	Result
CD25 (IL-2R)	Anti-CD25 Ab* (daclizumab)	Reduced Treg Re-programming
	Denileukin diftitox* (Ontak)	Reduced Treg Reduced suppression
	Bivalent IL-2 fusion toxin (high affinity)	Depleted Treg function inhibited
	TGF-β antagonism	
TGF-β pathway LAP, GARP, active TGF-β	Neutralizing anti-TGF-β Ab (GC1008; fresolimumab)*	Reduced Treg Inhibition of Treg generation
TGF-βR I/II	TGF-βR kinase inhibitors (LY2157299)* Soluble TGF-βR I/II	Impairment of Treg function?
Immune checkpoints CTLA-4	Blocking Abs Ipilimumab* Tremelimumab*	Treg reduced Impaired Treg activity Treg re-programming?
	PD-1	Pembrolizumab* Nivolumab
TIM-3, LAG-3	Abs in development	
Adenosine pathway CD39 CD73 A _{2A} R	Selective blockade Neutralizing Abs Pharmacologic inhibition	Selective Treg depletion Treg reduced Inhibition of ADO production Impaired Treg activity
COX-2 pathway	Selective blockade Celecoxib Indomethacin Diclofenac Ibuprofen	Inhibition of PGE ₂ production Impaired Treg activity
TNFR ₂ GITR	Blocking Ab Anti-GITR Ab	Impaired Treg activity and expansion Attenuation of suppressor activity
Chemokine receptors (CCR 4, 5, 6, 10) All Treg	Receptor blockade migration High-dose cyclophosphamide* Low-dose cyclophosphamide* Sunitinib* Fludarabine*	Impaired Treg Global Treg depletion (apoptosis) Selective Treg depletion Decreased suppression Treg reduced Treg reduced Ameliorates Treg activity

Tableau 7. Potentielles cibles thérapeutiques pour la déplétion ou la reprogrammation des lymphocytes T régulateurs humains

D'après Whiteside et al. 2015 (87)

V.C. Lymphocytes T régulateurs et syndromes myélodysplasiques

Compte tenu de la dérégulation du système immunitaire fréquemment observée dans les SMD et du rôle majeur des lymphocytes Tregs dans le contrôle de l'auto immunité, plusieurs études au cours des quinze dernières années se sont attachées à quantifier et à caractériser la population de Tregs dans le sang et/ou la moelle osseuse des patients atteints de SMD.

En 2007, Kordasti et *al.* (92) ont rapporté que l'augmentation dans le sang des lymphocytes Tregs (identifiés sur le phénotype CD4+ CD25^{high} FoxP3+) était corrélée à un excès de blastes médullaires, à un IPSS élevé et à la progression de la maladie. En effet, le nombre absolu de lymphocytes Tregs était plus élevé chez les patients atteints de SMD de haut risque par rapport aux SMD de bas risque. Une augmentation des lymphocytes Tregs dans le sang et/ou la moelle osseuse dans les SMD de haut grade est en fait retrouvée dans la majorité des autres études portant sur la quantification des lymphocytes Tregs chez les patients atteints de SMD (93–99). L'expansion polyclonale des lymphocytes Tregs serait induite en réponse au microenvironnement tumoral comme rapporté dans d'autres hémopathies malignes (100).

Cependant, quelques études rapportent des résultats différents en ce qui concerne la quantification des lymphocytes Tregs chez les patients atteints de SMD. En effet, Balaian et *al.* (101) ont constaté que les patients atteints de SMD avec del(5q) isolée avaient tendance à avoir moins de lymphocytes Tregs dans le sang et la moelle que les témoins.

En 2017, Perazzio et *al.* (102) ont constaté que les patients atteints de SMD de faible risque présentaient un nombre plus élevé de Tregs (définis par le phénotype CD3+ CD4+ CD25^{high} CD127^{low}) dans le sang en nombre absolu et en pourcentage par rapport au groupe de SMD de risque élevé. Une augmentation des lymphocytes Tregs (identifiés par le phénotype CD4+ CD25^{high} CD127^{low}) dans le sang est également observée dans l'étude de Fozza et *al.* (103) chez des patients atteints de SMD de bas risque par rapport à une population de sujets témoins.

Le nombre de lymphocytes Tregs chez les patients atteints de SMD par rapport à des sujets témoins reste donc controversé et pourrait aussi différer selon les types de SMD. Il semble globalement admis dans la littérature qu'un faible taux de lymphocytes Tregs au niveau

médullaire (< 2 % des lymphocytes d'après l'étude menée par Giovazzino et *al.* (97) en 2018) est associé à une augmentation du recrutement, de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques dans la moelle osseuse. La fréquence de lymphocytes Tregs au diagnostic serait donc inversement associée à la capacité des lymphocytes T cytotoxiques à contrôler la maladie. En effet, le ratio de lymphocytes T CD8+/lymphocytes Tregs est significativement diminué chez les patients SMD suggérant ainsi que l'expansion des Tregs dans les SMD contribuerait à la suppression des lymphocytes T CD8+ à travers la réponse médiée par les lymphocytes Th1 et favoriserait ainsi la progression vers des formes plus agressives de SMD (94).

Kordasti et *al.* (104) ont également décrit en 2009 une augmentation significative des Th17 pro-inflammatoires associée à une diminution des lymphocytes Tregs sanguins dans les SMD de bas grade par rapport aux SMD de haut grade et aux témoins. Une augmentation du ratio Th17/Tregs serait ainsi corrélée à une augmentation de l'apoptose au sein de la moelle osseuse et pourrait permettre d'identifier les candidats potentiels aux thérapies immunosuppressives. Un ratio élevé dans les SMD de bas risque pourrait expliquer la plus haute probabilité de développer une maladie auto-immune et une meilleure réponse à un traitement immunosuppresseur. Les auteurs suggèrent qu'une augmentation de cellules Th17, de cellules T CD8+ oligoclonales et de cytokines pro-inflammatoires induirait potentiellement l'apoptose des précurseurs myéloïdes et, en fin de compte, une défaillance médullaire en dépit de la présence de lymphocytes Tregs fonctionnels. Un taux diminué de Tregs pourrait donc finalement limiter l'inhibition des cellules T cytotoxiques. Alfinito et *al.* (98) ont en effet observé qu'un faible taux de lymphocytes Tregs dans des SMD de bas grade était associé à une forte dysérythropoïèse et à une augmentation significative des cellules T cytotoxiques médullaires qui porteraient atteinte aux progéniteurs hématopoïétiques et sélectionneraient les sous-clones de SMD les plus résistants et agressifs.

La comparaison de la proportion des lymphocytes Tregs entre les compartiments sanguin et médullaire reste ambiguë puisque les études se contredisent : certains auteurs retrouvent plus de Tregs dans le sang (95), parfois seulement dans les SMD de bas risque (93) ; mais d'autres observent plus de Tregs au niveau médullaire quels que soient les groupes de SMD (98).

La répartition des différentes sous-populations de lymphocytes Tregs semble également modifiée et hétérogène chez les patients atteints de SMD. Le contingent de lymphocytes Tregs naïfs (CD45RO-) par opposition aux Tregs mémoires (CD45RO+) est en effet rapporté comme plus élevé, en nombre absolu et en pourcentage, dans les SMD de haut risque par rapport aux SMD de bas risque et aux échantillons témoins (92). Les lymphocytes Tregs naïfs restent cependant toujours moins nombreux que les Tregs mémoires. Une autre étude (93) montre également que même si les lymphocytes Tregs naïfs CD45RA+ sont en effet minoritaires, ils semblent augmentés en proportion dans le sang et la moelle des SMD de haut grade.

Là encore, les résultats publiés dans la littérature sont parfois contradictoires. En effet, Mailloux et *al.* (105) ont constaté que les lymphocytes Tregs ^{Effecteurs Mémoires} (Tregs^{EM}) définis par le phénotype CD4+ FoxP3+ CD25+ CD127^{low} CD45RA- CD27- étaient augmentés chez certains patients atteints de SMD et que cette augmentation constituait un facteur pronostique négatif indépendant en termes de survie globale. Cette population de lymphocytes Tregs^{EM} est caractérisée par une capacité d'immunosuppression *in vitro* plus importante. L'expansion de cette sous-population chez certains patients atteints de SMD impacterait la survie indépendamment du compte de blastes médullaires, des cytopénies, du caryotype, d'un score IPSS élevé et des comorbidités. La quantification de cette sous-population de lymphocytes Tregs^{EM} permettrait donc d'identifier un groupe de patients avec un risque accru de progression et semble être un marqueur clé de la bascule vers l'échappement immunitaire.

La fonctionnalité des lymphocytes Tregs serait également altérée dans les SMD de bas grade. En effet, leur fonction suppressive envers les lymphocytes Teffs apparaîtrait diminuée et leur potentiel migratoire vers la moelle osseuse par l'axe CXCL12/CXCR4 est décrit comme altéré, en lien avec une diminution d'expression de CXCR4 (93). Les auteurs de cette étude ont constaté une diminution significative des Tregs dans la moelle osseuse comparée au sang, et ce exclusivement dans les SMD précoces. Aucune différence n'était retrouvée en comparant les lymphocytes Tregs, au niveau médullaire et sanguin, entre SMD précoces et contrôles. À l'inverse, les SMD de haut grade présentaient une augmentation des lymphocytes Tregs au niveau sanguin et médullaire avec une conservation de leurs capacités suppressive et migratoire (93).

De même, les capacités de prolifération des lymphocytes Tregs évaluées par la quantification des Tregs FoxP3+ Ki67+ sont largement diminuées dans les SMD précoces, par rapport aux témoins et aux SMD avancés, à la fois dans la moelle et le sang (96). La prolifération des lymphocytes Tregs semble donc compromise au niveau central et périphérique dans les SMD précoces, mais réversible lorsque la maladie évolue.

Plusieurs études se sont aussi intéressées à l'impact des traitements utilisés chez les patients atteints de SMD sur la population de lymphocytes Tregs. La quantité de lymphocytes Tregs semble en fait suivre l'évolution de la maladie au niveau sanguin et médullaire puisqu'une diminution est observée lors de la réponse au traitement alors qu'une augmentation est constatée dans les cas évoluant en LAM (93,96). Costantini et *al.* (99) ont étudié l'effet de l'azacitidine sur la fonction et la prolifération des Tregs et des T helper sanguins. Les auteurs ont observé au diagnostic un taux plus important de Tregs chez les non-répondeurs par rapport aux répondeurs, suggérant ainsi que le nombre de Tregs pourrait être un facteur prédictif de la réponse au traitement par azacitidine. Sous traitement, la quantité de lymphocytes T helper et Tregs diminue. *In vitro*, l'azacitidine réduit les capacités prolifératives et immunosuppressives des lymphocytes Tregs et semble plus efficace sur les Tregs des patients SMD que sur les Tregs des donneurs sains. Cependant, la quantification des lymphocytes Tregs serait compliquée chez les patients traités puisque l'azacitidine induirait la conversion de lymphocytes Teffs en lymphocytes Tregs via l'induction de l'expression de FoxP3 ; mais ces cellules resteraient dépourvues de fonctions inhibitrices et secréteraient paradoxalement de l'IL-17.

A l'inverse, sur une cohorte de patients SMD avec del(5q) isolée, Balaian et *al.* (101) ont constaté une augmentation significative du nombre de Tregs (CD4+ CD25^{high} CD127^{low} FoxP3+) dans le sang (5,0 % vs 9,6 % des T CD4+, p = 0,001) et dans la moelle osseuse (3,4 % vs 8,1 %, p = 0,001) après une médiane de 6 cycles de traitement par lenalidomide.

Enfin, l'impact du taux de différentes populations lymphocytaires dont les lymphocytes Tregs sur la progression et la survie globale de patients atteints de SMD a été évalué Kahn et *al.* (106). Ils ont rapporté qu'un environnement immunosuppresseur, caractérisé par un taux de lymphocytes Tregs (CD4+ CD25+ FoxP3+) élevé dans le sang et un taux de progéniteurs lymphoïdes B (CD10+ CD34+) bas dans la moelle osseuse était associé à une survie globale

(OS) et sans progression (PFS) plus faible chez les patients avec un SMD de bas grade. Dans cette étude, la PFS médiane était de 1,9 ans si le taux de lymphocytes Tregs était supérieur à la médiane des Tregs, contre 6,1 ans s'il était inférieur. Les auteurs décrivent aussi une amélioration dans la prédiction correcte de la PFS qui passait de 73 à 83 % en enrichissant le score IPSS-R des deux marqueurs pronostiques identifiés, taux de Tregs et de progéniteurs B. Autre exemple, Giovazzino et *al.* (97) rapportent en 2018 qu'un taux de lymphocytes Tregs élevé serait associé à une évolution plus fréquente vers la LAM et la mort dans les SMD de bas risque ($p < 0,05$). Ces résultats démontrent l'importance pronostique de l'évaluation des lymphocytes Tregs non seulement dans les SMD de haut risque mais aussi dans les SMD de bas risque

L'ensemble de ces études démontrent que le taux de lymphocytes Tregs pourrait constituer un biomarqueur de l'évolutivité des SMD. Cependant, les résultats sont parfois contradictoires probablement en lien avec le type de prélèvement étudié (sang ou moelle osseuse), mais aussi du fait de cohortes de patients hétérogènes et/ou de stratégies de quantification par CMF différentes.

En résumé, l'hétérogénéité des SMD semble être liée à un déséquilibre immunitaire plus ou moins établi selon le stade de la maladie, et à un environnement inflammatoire chronique. Durant les phases précoces de la maladie, une réponse immunitaire anti-tumorale permettrait de contrôler l'évolution des clones de SMD comme attesté par la présence d'un faible taux de cellules blastiques dans la moelle osseuse. Cependant, cette activation des cellules cytotoxiques serait également la cause des cytopénies observées chez les patients puisque ce processus de surveillance immunitaire n'est pas spécifique du clone pathologique en raison d'un probable phénomène d'auto-réactivité croisée qui touche probablement également des progéniteurs hématopoïétiques normaux. A ce stade, un traitement immunosuppresseur semble possible justement pour améliorer les cytopénies. Ensuite, une phase d'équilibre plus ou moins longue selon les patients est observée au cours de laquelle une activation des lymphocytes Tregs et/ou leur expansion entrainerait un échappement des clones de SMD à la surveillance du système immunitaire favorisant ainsi l'évolution de la maladie (Figure 8). L'étude de la quantification des lymphocytes Tregs et de leur activation par CMF pourrait donc être un outil utile pour prédire de manière précoce le processus d'échappement immunitaire et la progression de la maladie qui en découle.

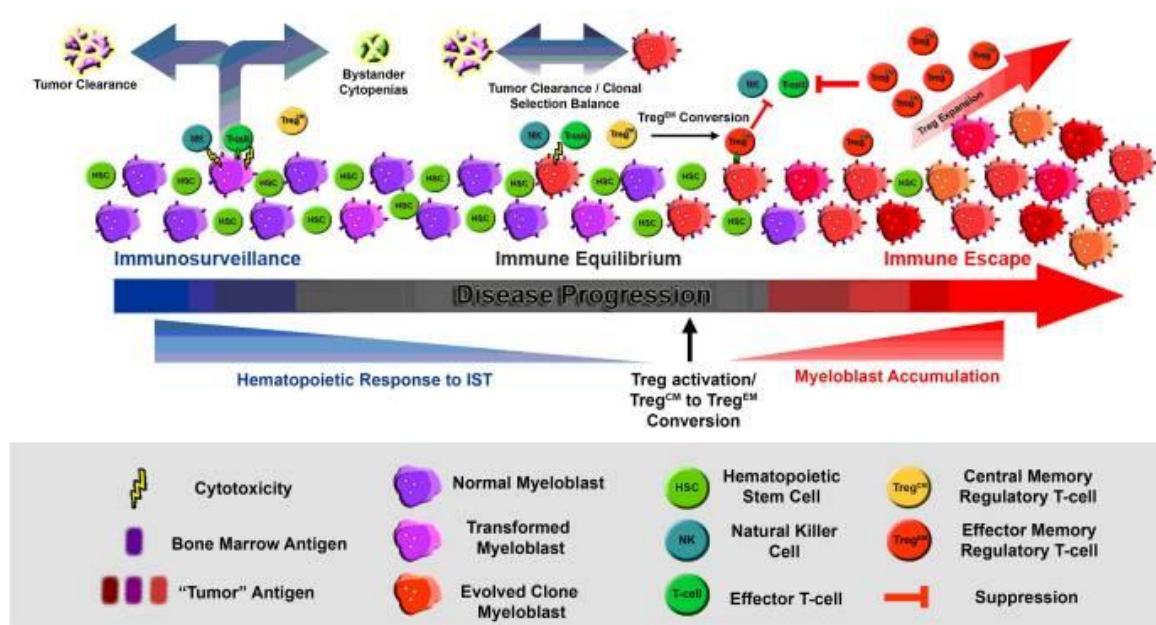


Figure 8. Représentation schématique de l'évolution du phénotype des lymphocytes T régulateurs mémoires dans le contexte d'immunoédition des SMD : conséquences en termes d'immunosuppression et de réponse aux traitements immunosuppresseurs

D'après Mailloux et al. 2013 (107)

VI. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs de cette étude réalisée au sein du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Cochin dans le cadre de ma thèse d'exercice sont les suivants :

- évaluer le contingent de lymphocytes T régulateurs dans la moelle osseuse de patients atteints de SMD au diagnostic et le comparer à des donneurs sains ;
- comparer la répartition de ces lymphocytes T régulateurs selon la classification Tregs A/Tregs B chez les patients atteints de SMD par rapport à celle observée chez des donneurs sains ;
- comparer différentes stratégies d'analyse des données de cytométrie en flux, supervisées ou non, pour identifier la population de lymphocytes T régulateurs.

Mon travail a donc pour objectif d'avoir une meilleure connaissance du microenvironnement immunitaire médullaire des patients atteints de SMD pour mieux appréhender le mécanisme d'échappement tumoral, à travers l'étude de la population des lymphocytes T régulateurs.

VII. MATERIEL ET METHODES

VII.A. Echantillons

Les prélèvements médullaires ont été recueillis entre janvier 2018 et janvier 2019, après information écrite et signature d'un consentement par les patients.

Les échantillons de moelle osseuse (MO) ont été collectés sur un milieu Hanks hépariné. Ils ont été conservés à température ambiante jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux (CMF). Le marquage et l'analyse par CMF des échantillons ont été effectués dans un délai maximum de 24h après le prélèvement.

VII.B. Patients

22 patients pour lesquels un diagnostic de SMD a été posé selon les critères OMS après intégration de l'ensemble des données du dossier clinique ont été inclus. 6 patients avec un SMD connu mais non traité (hors transfusions +/- traitement par EPO) ont également été inclus dans cette étude.

Certains patients ont été exclus de la cohorte étudiée pour cause de traitement immunosuppresseur (azathioprine, corticothérapie) même si le diagnostic de SMD avait été posé (n = 3) ; ou pour cause de diagnostic de SMD finalement non retenu en tenant compte de l'ensemble du dossier clinique (n = 10).

VII.C. Témoins

Deux types de prélèvements médullaires ont été recueillis afin de former le groupe de patients témoins.

Premièrement, des échantillons de moelle osseuse prélevés par ponction médullaire dans le cadre de la recherche d'une prolifération plasmocytaire ont été recueillis :

- suspicion ou suivi de MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance*) ;
- bilan d'une hyper/hypogammaglobulinémie ;
- bilan de fracture.

Chez tous les patients inclus dans ce groupe (groupe « contrôle ponction »), les analyses cytologiques et phénotypiques de la moelle osseuse ne montraient pas d'infiltration plasmocytaire (< 5 %) et pas de signe de dysplasie. Un échantillon a également été inclus dans la cohorte de témoins avec une anémie qui s'est avérée être liée à une carence martiale.

Deuxièmement, des échantillons de moelle osseuse extraits de têtes fémorales (groupe « contrôle tête fémorale ») de patients ayant bénéficié d'une arthroplastie de hanche avec pose de prothèse céphalique ont été recueillis. Ces têtes fémorales ont été prélevées au pôle de santé Léonard de Vinci à Chambray près de Tours et acheminées par transporteur à température ambiante dans un milieu Hanks hépariné dans un délai de 1 à 2 jours au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Cochin. Ces patients ont été opérés dans un contexte d'arthrose mécanique uniquement (les cas d'arthrites septiques ou inflammatoires ont été exclus). Ces patients ne présentaient pas de pathologie hématologique, infectieuse ou inflammatoire et avaient une NFS normale.

VII.D. Analyse par cytométrie en flux

VII.D.1. Panel d'anticorps

Les caractéristiques des anticorps monoclonaux utilisés pour le marquage et l'analyse phénotypique des lymphocytes Tregs par CMF sont reportées dans le Tableau 8 .

Cible/Fluorochrome	Fabricant Marque Référence	Précisions	Volume utilisé pour le marquage (µL)
CD3/ECD	Beckman Coulter IOTest ^R REF A07748	CD3/ Phycoerythrin Texas Red clone UCHT1 Ac de souris anti humain IgG1 kappa	5
CD4/APC	Beckman Coulter IOTest ^R REF IM2468	CD4/Allophycocyanin clone B13B.2 Ac de souris anti humain IgG1	5
CD8/PB	Beckman Coulter IOTest ^R REF B49182	CD8/Pacific Blue clone B9.11 Ac de souris anti humain IgG1	5
CD25/PC5.5	Beckman Coulter IOTest ^R REF B92458	CD25/Phycoerythrin-Cyanin 5.5 clone B1.49.9 Ac de souris anti humain IgG2a	10
CD45/KrOr	Beckman Coulter IOTest ^R REF B36294	CD45/Krome Orange clone J.33 Ac de souris anti humain IgG1 kappa	5
CD45RA/APC-H7	BD Biosciences BD Pharmingen TM REF 560674	CD45RA/Allophycocyanin-H7 (H7 : analogue de cyanine 7), clone HI100 Ac de souris anti humain IgG2b kappa	5
CD95/FITC	BD Biosciences BD Pharmingen TM REF 556640	CD95/Fluorescein isothiocyanate clone DX2 Ac de souris anti humain IgG1 kappa	20
CD127/PE	Beckman Coulter IOTest ^R REF IM1980U	CD127/Phycoerythrin clone R34.34 Ac de souris anti humain IgG1 kappa	20
CD194/PE-Cy7	BD Biosciences BD Pharmingen TM REF 557864	CD194/Phycoerythrin-Cyanin 7 clone 1G1 Ac de souris anti humain IgG1 kappa	10

Tableau 8. Liste des anticorps utilisés

Le CD3 est le marqueur de lignée spécifique des lymphocytes T.

Le CD4 est exprimé sur une sous-population de cellules T et plus faiblement sur les monocytes.

Le CD8 est exprimé sur une sous-population cytotoxique de cellules T et plus faiblement par une sous-population de cellules NK.

Le CD25 correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Il est exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ et est fortement exprimé sur les lymphocytes Tregs. Le CD25 peut être exprimé par tout lymphocyte T après activation et par quelques lymphocytes B.

Le CD45 est un marqueur pan-leucocytaire dont l'intensité d'expression est variable sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes.

Le CD45RA est exprimé sur les cellules T CD4+ et TCD8+ naïves (à hauteur de 50 % en périphérie), sur une partie des lymphocytes B et des monocytes.

Le CD95 est exprimé sur les lymphocytes T (préférentiellement mémoires CD45RO+) et B activés, les lymphocytes NK, les monocytes et les PNN. Encore appelé Fas ou APO-1 (récepteur du TNF), il est impliqué dans la séquence de mort cellulaire programmée.

Le CD127 correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-7. Il est exprimé à la surface des précurseurs B (absent sur les cellules B matures), des lymphocytes T et sur une partie des monocytes et des cellules CD34+.

Le CD194 est exprimé sur les Th2 activés, les lymphocytes Tregs, les NK activés, les polynucléaires basophiles, les monocytes et les plaquettes. Le CD194 est aussi appelé CCR4 (human CC Chemokine Receptor type 4).

VII.D.2. Marquage des cellules

1/ Prélèvements de moelle osseuse issus de ponctions médullaires

Le marquage est réalisé sur 200 μ L d'une suspension cellulaire dont la concentration a été établie à 20 millions de cellules/mL pendant 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec 2,5 mL de réactif de lyse + fixateur (Versalyse, Beckman Coulter) pendant 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées en PBS (*Phosphate buffered saline*) et centrifugées 5 minutes à 1600 tours/minute. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 500 μ L de PBS. L'ensemble de la suspension cellulaire est analysé sur le cytomètre.

2/ Prélèvements de moelle osseuse issus de têtes fémorales

A l'aide d'une spatule, la moelle osseuse est extraite de la tête fémorale par grattage. Elle est broyée au mortier en présence d'une solution de PBS contenant de la DNase visant à décoller les cellules entre elles (10 mL de PBS pour 1 mL de DNase ; la DNase étant préalablement reconstituée à une concentration de 2 mg/mL de PBS). La suspension est transférée dans un Falcon de 50 mL. La suspension est centrifugée 10 minutes à 1300 tours/minute. Le surnageant est rejeté et le culot cellulaire est remis en suspension avec une solution de 10 mL de PBS et 1 mL de DNase. On filtre la suspension en la transférant à la pipette dans un nouveau Falcon sur lequel est apposé un filtre en nylon avec des pores de 70 μ m. Un décompte cellulaire de la suspension est réalisé sur l'analyseur Cell-Dyn 4000 (Abott). Le marquage est ensuite réalisé comme décrit précédemment sur un total de 4 millions de cellules.

VII.D.3. Réglage du cytomètre Navios

Pour régler les voltages appliqués aux différents photo-multiplieurs (PMTs), des cellules de moelle osseuse traitées selon le mode opératoire précédemment décrit mais non marquées par les anticorps, sont passées au cytomètre. Les PMTs sont ajustés de manière à avoir un minimum (moins de 5 %) de cellules lymphoïdes (identifiées par leur taille et leur structure) dans le premier canal. Après avoir réglé les PMTs, le réglage des compensations a été réalisé à l'aide d'un mélange de billes marquées par un fluorochrome donné et de billes non marquées dans 9 tubes différents (Versa Comp Antibody Capture Bead Kit, Beckman Coulter). Les 9 monomarquages sont analysés au cytomètre et la matrice de compensation (mesure de la fuite de fluorescence de chaque fluorochrome au niveau de chaque PMT) est ensuite calculée dans le logiciel Kaluza Analysis. Dans le cadre de l'utilisation en routine du cytomètre Navios, la sensibilité est contrôlée quotidiennement par le passage des billes Flow set Pro (Beckman Coulter).

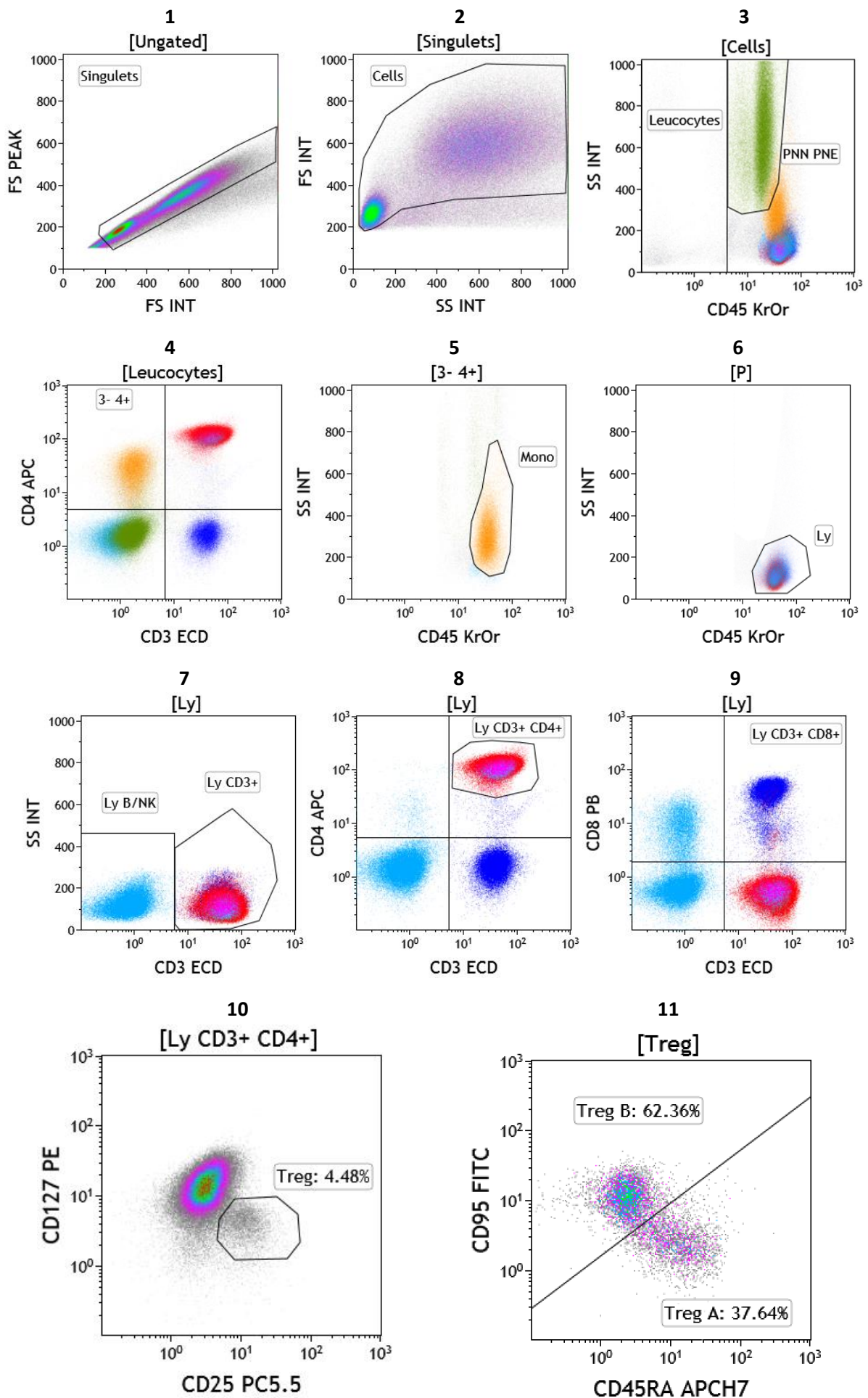
Dans cette étude, le matériel biologique est marqué par les anticorps du panel selon le protocole détaillé ci-avant, sans tri préalable des lymphocytes, puis l'acquisition des données est réalisée sur le cytomètre de flux Navios (Beckman Coulter - 3 lasers, 10 couleurs) puis analysé et interprété sur le logiciel Kaluza Analysis (Beckman Coulter - version 1.5a).

VII.D.4. Stratégie d'analyse des lymphocytes T régulateurs sur le logiciel Kaluza

La stratégie de fenêtrage, aussi appelé *gating*, permettant d'isoler la population de lymphocytes Tregs est présentée

Figure 9 et détaillée ci-dessous. La population de lymphocytes Tregs est définie par le phénotype suivant : CD3⁺ CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}.

Après sélection des singulets sur le *densityplot* FS PEAK/FS INT **(1)**, les débris cellulaires sont éliminés sur le *densityplot* FSC/SSC **(2)** et les leucocytes sont isolés sur le *dotplot* SSC/CD45 **(3)**. Les granuleux et les polynucléaires éosinophiles sont identifiés sur le *dotplot* SSC/CD45 **(3)**. La population de monocytes est identifiée sur le *dotplot* CD4/CD3 par leur phénotype CD3⁻CD4^{low} **(4)** et ajustée ensuite sur le *dotplot* SSC/CD45 **(5)**. Une équation booléenne permet ensuite d'éliminer sur le *dotplot* SSC/CD45 les monocytes et les granuleux **(6)**. Le *gating* de la population lymphocytaire sur le *dotplot* SSC/CD45 est alors plus facile. Les lymphocytes sont sélectionnés dans la *gate* « Ly » sur leur forte expression du CD45 et leur faible SSC **(6)**. Sur le *dotplot* SSC/CD3, les lymphocytes T CD3⁺ sont sélectionnés dans la *gate* « Ly CD3⁺ » et les autres lymphocytes sont sélectionnés dans la *gate* « Ly B/NK » **(7)**. Sur le *dotplot* CD4/CD3 conditionné sur la population de lymphocytes T CD3⁺, les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ sont sélectionnés dans la *gate* « Ly CD3⁺ CD4⁺ » **(8)**. Les lymphocytes T CD3⁺ CD8⁺ sont sélectionnés dans la *gate* « Ly CD3⁺ CD8⁺ » **(9)**. Enfin, sur le *densityplot* CD127/CD25 conditionné sur la population de lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T régulateurs sont sélectionnés dans la *gate* « Treg » sur leur forte expression du CD25 et leur faible expression du CD127 **(10)**. Les populations Tregs A et B sont séparées sur le *densityplot* CD95/CD45RA conditionné sur la population de lymphocytes Tregs **(11)**. Les Tregs A sont sélectionnés dans la *gate* « Treg A » sur leur expression variable du CD45RA et l'absence d'expression du CD95 tandis que les Tregs B sont sélectionnés dans la *gate* « Treg B » sur leur expression du CD95 et l'absence d'expression du CD45RA **(11 et 12)**.



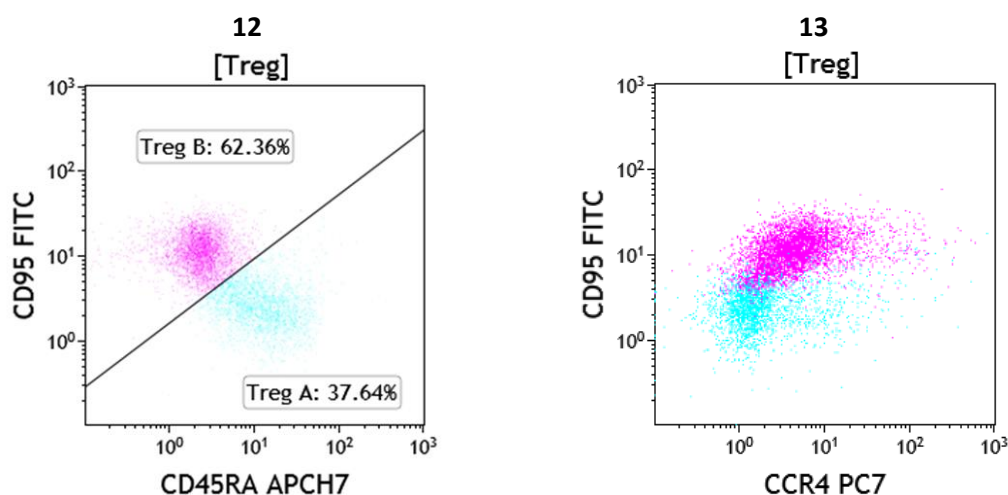


Figure 9. Stratégie de fenêtrage et analyse phénotypique des lymphocytes T régulateurs à l'aide du logiciel Kaluza Analysis (Beckman Coulter)

FS PEAK : Forward Scatter Peak ; FS INT : Forward Scatter Integral ; SS INT = SSC : Side Scatter Integral.

Les lymphocytes Tregs sont identifiés par l'expression des marqueurs de surface CD3⁺ CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}. On distingue deux sous-populations, les Tregs A CD45RA^{high} CD95^{low} (en bleu clair) et les Tregs B CD45RA^{low} CD95^{high} (en rose).

Le nombre moyen de lymphocytes totaux et de lymphocytes Tregs identifiés et analysés par groupe est présenté Tableau 9.

	Contrôle ponction n = 10	Contrôle tête fémorale n = 12	Témoin n = 22	SMD n = 28	SMD LOW n = 21	SMD HIGH n = 7
Lymphocytes	87 099 (8 976 – 143 383)	66 246 (4 508 – 276 281)	75 724 (4 508 – 276 281)	75 493 (23 445 – 154 364)	76 677 (23 445 – 154 364)	71 942 (38 809 – 117 105)
Tregs	2 237 (316 – 5 176)	1 452 (168 – 3 968)	1 809 (168 – 5 176)	2 083 (335 – 6 705)	2 268 (335 – 6 705)	1 526 (1 021 – 2 535)

Tableau 9. Nombre moyen de lymphocytes totaux et de lymphocytes T régulateurs analysés chez les témoins et les patients

Moyenne (valeur minimale – valeur maximale)

VII.E. Analyse des données avec l'algorithme FlowSOM

Les données de cytométrie ont également été analysées avec l'algorithme FlowSOM (*Self Organizing Map*) disponible sur la plateforme Cytobank. Cet algorithme permet un *clustering* d'intérêt, non supervisé et automatisé des cellules, en intégrant de façon simultanée l'ensemble des données correspondant à l'expression de chaque marqueur pour chaque cellule.

Dans le cadre de cette étude, l'algorithme FlowSOM a été utilisé pour *clusteriser* de façon automatisée la population lymphocytaire T CD3+ CD4+. Pour cela, à partir des analyses réalisées dans Kaluza pour 29 échantillons médullaires, les cellules appartenant à la *gate* « Ly CD3+ CD4+ » ont été exportées permettant ainsi pour chaque patient l'obtention d'un fichier CSV. Les 29 fichiers CSV ont ensuite été importés dans Cytobank. Après modification des échelles (de log en Arcsinh), les données ont été soumises à l'algorithme FlowSOM. Un nombre égal de cellules (n = 6229 cellules) provenant des 29 fichiers a été utilisé pour générer les données. L'algorithme FlowSOM a donc tourné sur un nombre total de 180 641 cellules (29 x 6229). Les expressions du CD45RA, du CD194, du CD95, du CD25 et du CD127 ont été utilisées pour *clusteriser* les cellules.

VII.F. Analyses complémentaires

Les numérations formules sanguines ont été réalisées au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Cochin (Sysmex XN-2000) ou dans des laboratoires extérieurs sur tube EDTA.

Le caryotype médullaire a été réalisé au laboratoire de cytogénétique de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Dr I. Radford).

L'analyse cytologique des frottis médullaires et sanguins, et les analyses moléculaires (Pr O. Kosmider) ont été réalisées au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Cochin. A noter que l'analyse cytologique a été réalisée sur tous les prélèvements médullaires à l'exception de ceux issus de têtes fémorales. Concernant l'analyse moléculaire médullaire, elle a été réalisée chez les patients avec suspicion de SMD. Ils ont bénéficié systématiquement d'une recherche de mutation des gènes *ASXL1* (exon 12) et *SRSF2* (séquençage par méthode Sanger). Pour certains patients, un génotypage étendu a été réalisé par séquençage à haut débit (NGS) avec un panel de 38 gènes sur le système Ion PGM (ThermoFisher®).

VII.G. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Software PRISM 6.0. Le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux à deux les différentes populations. La corrélation concernant la quantification de lymphocytes Tregs par *gating* manuel ou automatisé a été évalué par le test de Pearson.

Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les valeurs de p sont représentées ainsi dans les figures : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

VIII.RESULTATS

VIII.A. Caractéristiques des populations : patients et témoins

Entre janvier 2018 et janvier 2019, 63 prélèvements de moelle osseuse ont été analysés par CMF dans le cadre de cette étude.

22 prélèvements témoins ont été inclus (Figure 10) :

- 10 « contrôles ponctions » pour lesquels le myélogramme a été réalisé dans le cadre, le plus souvent, d'une recherche de prolifération plasmocytaire non confirmée en cytologie. Les indications de réalisation du myélogramme étaient variées (3 suspicions de MGUS, 1 suivi de MGUS, 2 bilans de fracture, 2 bilans d'anémie, 2 bilans d'hypogammaglobulinémie, 2 pics IgM ; les indications étant parfois doubles pour un même patient) ;
- 12 « contrôles têtes fémorales » dont la MO a été recueillie par grattage de têtes fémorales.

41 prélèvements ont été réalisés et analysés dans le cadre d'une suspicion ou de suivi de syndrome myélodysplasique (Figure 10). 13 patients n'ont pas été intégrés dans la cohorte finale en raison d'un diagnostic de SMD finalement non retenu (n = 10) ou pour cause de traitement immunosuppresseur (n = 3). Au total, 28 patients atteints de SMD ont donc été inclus dans cette étude prospective. Parmi ces 28 patients atteints de SMD, 6 étaient déjà connus mais non traités. Les 28 patients ont été classés selon l'IPSS-R :

- 10 SMD de risque très faible (SMD Very Low) ;
- 5 SMD de risque faible (SMD Low) ;
- 6 SMD de risque intermédiaire (SMD Intermediate) ;
- 5 SMD de risque élevé (SMD High) ;
- 2 SMD de risque très élevé (SMD Very High).

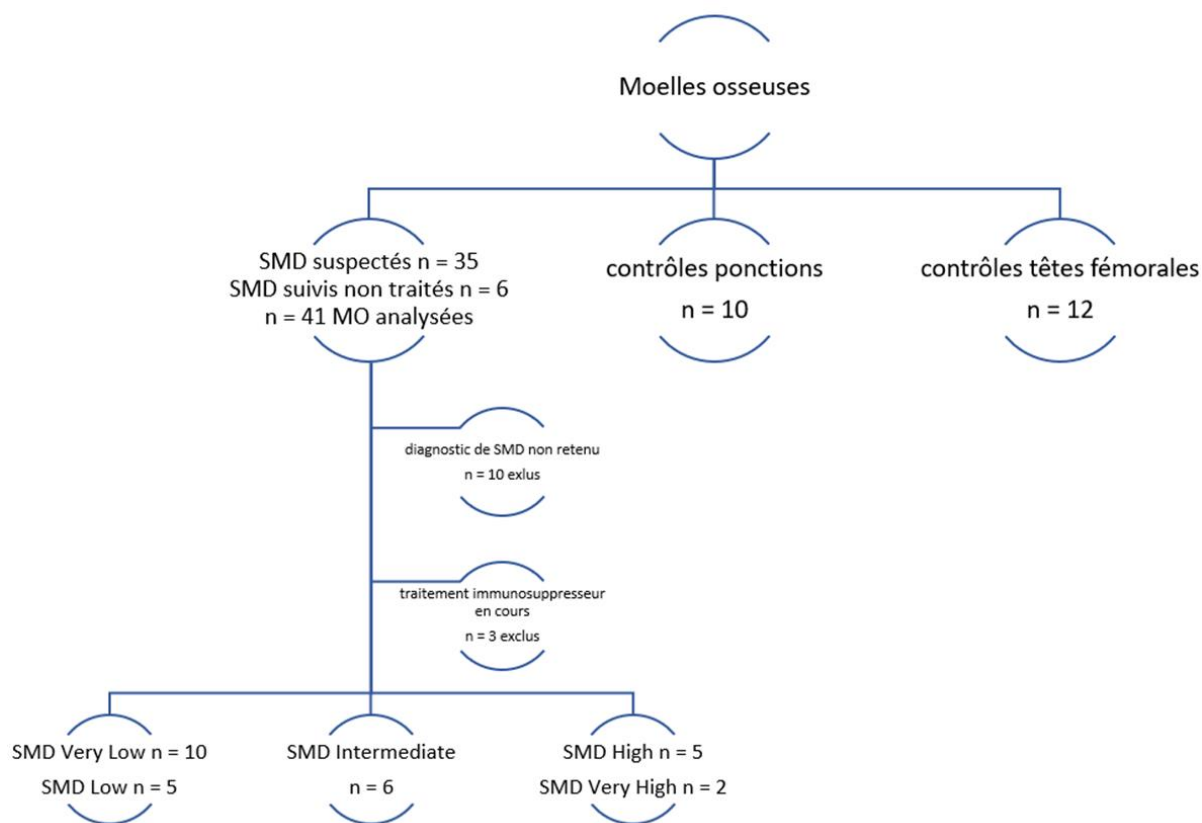


Figure 10. Prélèvements médullaires des patients et des témoins : analysés, exclus et inclus

Les caractéristiques de l'ensemble des patients atteints de SMD et des témoins sont décrites dans le Tableau 10 ci-dessous (les Tableau 11, Tableau 12, Tableau 13, Tableau 14, Tableau 15 et Tableau 16 sont présentés en annexes et offrent une description détaillée de chaque patient et de chaque témoin).

Notre effectif ne nous permettant pas de réaliser des comparaisons entre chacun des 5 groupes à risque selon l'IPSS-R, j'ai décidé pour la suite de l'étude de regrouper les patients en deux sous-groupes de patients, les SMD Very Low/Low/Int (« SMD LOW ») et les SMD High/Very High (« SMD HIGH ») qui se rapprochent le plus d'une définition simplifiée et binaire des SMD de bas risque et des SMD de haut risque.

Contrôles ponctions	n = 10	
Age médian (min-max)	67 ans (35-88)	
Sexe (F/H)	6/4	
Contrôles têtes fémorales	n = 12	
Age médian (min-max)	72,5 ans (58-81)	
Sexe (F/H)	7/5	
Syndromes myélodysplasiques	n = 28	
Age médian (min-max)	73 ans (55-90)	
Sexe (F/H)	11/17	
Anémie *	n = 27	96 %
Neutropénie **	n = 7	25 %
Thrombopénie ***	n = 14	50 %
Caryotype anormal	n = 14	50 %
Caryotype complexe	n = 4	14 %
Caryotype très favorable	n = 4	14 %
Caryotype favorable	n = 16	57 %
Caryotype intermédiaire	n = 3	11 %
Caryotype défavorable	n = 2	7 %
Caryotype très défavorable	n = 3	11 %
Mutation <i>ASXL1</i>	n = 5/26	19 %
Mutation <i>SRSF2</i>	n = 3/24	13 %
NGS anormal ****	n = 10/12	83 %
Ogata > 2	n = 15/23	65 %
Classification OMS		
SMD-SLD	n = 1	4 %
SMD-MLD	n = 14	50 %
SMD-RS-MLD	n = 2	7 %
SMD-EB-I	n = 9	32 %
SMD-EB-II	n = 2	7 %
IPSS-R		
Very Low	n = 10	36 %
Low	n = 5	18 %
Intermediate	n = 6	21 %
High	n = 5	18 %
Very High	n = 2	7 %

Tableau 10. Caractéristiques démographiques et biologiques des patients et des témoins

* Anémie : < 12 g/dL chez les femmes et < 13 g/dL chez les hommes

** Neutropénie < 1,5 G/L

*** Thrombopénie < 150 G/L

**** NGS anormal chez 10 patients / 12 dépistés : 3 mutations de *TP53* dont 1 chez un SMD Very High et 2 chez des SMD High, 2 mutations de *DNMT3A*, 2 mutations de *TET2*, 2 mutations de *RUNX1*, 2 mutations de *U2AF1*, 1 mutation de *PHF6*, 1 mutation de *SRSF2*, 1 mutation de *RIT1* et 1 mutation de *CBL* (parfois plusieurs mutations par patient).

VIII.B. Caractérisation de la population témoin

Dans la mesure où les prélèvements de moelle osseuse des témoins ont été obtenus soit par ponction médullaire soit par grattage de têtes fémorales, j'ai tout d'abord voulu vérifier que la répartition des différentes populations lymphocytaires qu'il m'était possible d'étudier avec le panel d'anticorps utilisé n'était pas significativement différente entre ces 2 types de prélèvements. La quantification des différentes populations lymphocytaires a été réalisée par une analyse dans le logiciel Kaluza Analysis avec la stratégie de *gating* manuel décrite dans la section Matériel et Méthodes (Figure 11 et Figure 12 ; Tableau 17 en annexes).

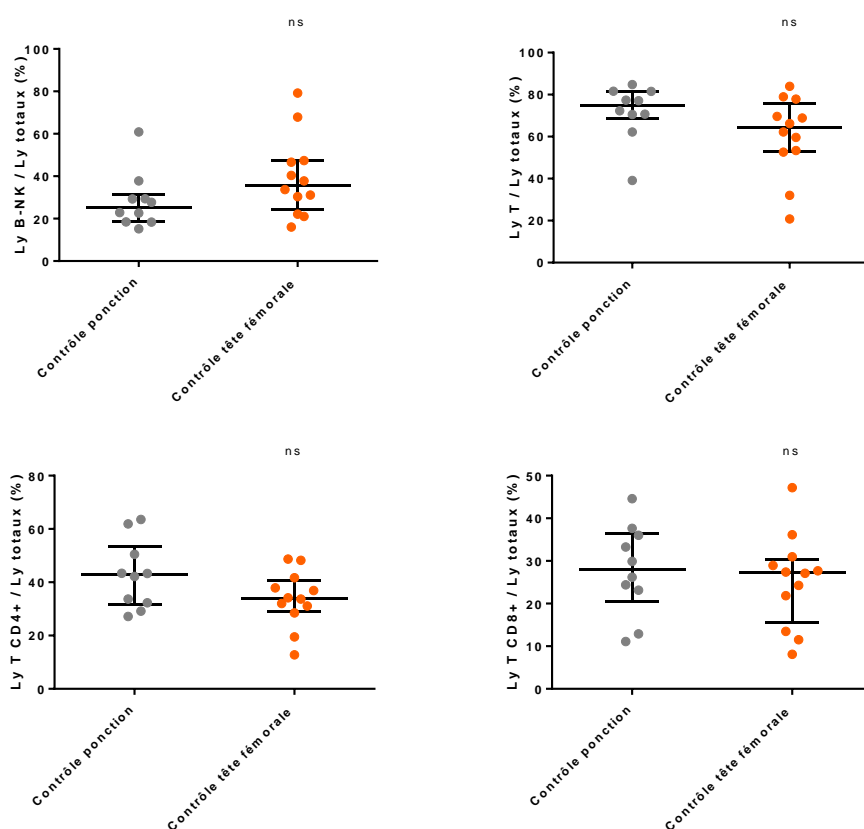


Figure 11. Comparaison de la répartition des différentes populations lymphocytaires chez les témoins : contrôles ponctions et contrôles têtes fémorales

Médiane et écart interquartile ; ns : différence non significative.

Contrôle ponction (n = 10, en gris) et Contrôle tête fémorale (n = 12, en orange).

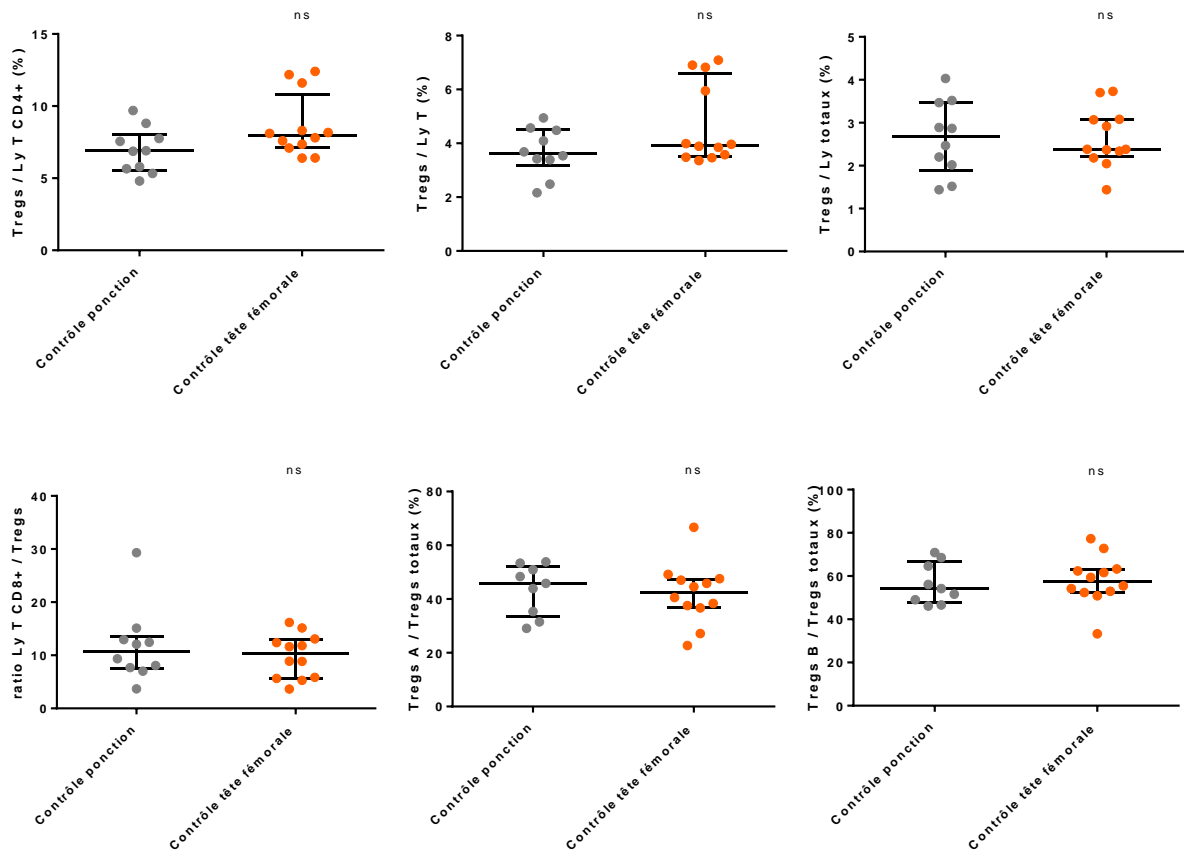


Figure 12. Comparaison du contingent de lymphocytes T régulateurs et des sous-populations Tregs A et B chez les témoins : contrôles ponctions et contrôles têtes fémorales

Médiane et écart interquartile ; ns : différence non significative.

Contrôle ponction (n = 10, en gris) et Contrôle tête fémorale (n = 12, en orange).

Globalement, aucune différence significative n'a été observée concernant la répartition des populations lymphocytaires B/NK (25,3 % vs 35,7 %), T totale (74,7 % vs 64,2 %), T CD4+ (42,7 % vs 33,9 %), et T CD8+ (28,1 % vs 27,3 %) entre les groupes « contrôle ponction » et « contrôle tête fémorale ». Il en est de même pour le contingent de lymphocytes Tregs qu'il soit quantifié par rapport aux lymphocytes T CD4+ (6,9 % vs 8,0 %), aux lymphocytes T totaux (3,6 % vs 3,9 %) ou aux lymphocytes totaux (2,7 % vs 2,4 %) ; et des sous-populations A (45,8 % vs 42,6 %) et B (54,2 % vs 57,4 %). Le ratio lymphocytes T CD8+/Tregs est également identique entre ces deux groupes (10,5 vs 12,7). Il a donc été décidé de regrouper ces deux groupes contrôles pour la suite de l'analyse sous la dénomination commune de « témoins ».

VIII.C. Quantification des lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de SMD

J'ai tout d'abord commencé par comparer la proportion des différentes sous-populations lymphocytaires entre les témoins et les patients atteints de SMD puis entre les différents groupes de SMD.

Cette comparaison, présentée Figure 13, montre une différence significative dans la répartition des populations lymphocytaires avec notamment proportionnellement plus de lymphocytes T (75,8 % vs 70,1 % ; $p = 0,0408$) et moins de lymphocytes B/NK (24,2 % vs 29,9 % ; $p = 0,0408$) chez les patients atteints de SMD que dans la population témoin ($p = 0,0408$).

Cette différence semble en partie s'expliquer par une augmentation relative du contingent de lymphocytes T CD8+ chez les SMD HIGH par rapport aux témoins (35,5 % vs 27,3 % ; $p = 0,0481$). Cependant, cette différence semble être liée principalement à 3 échantillons dans le groupe contrôle qui ont un faible taux de lymphocytes T.

Aucune différence significative n'est observée sur la répartition de ces sous-populations lymphocytaires entre les patients SMD LOW et les patients SMD HIGH.

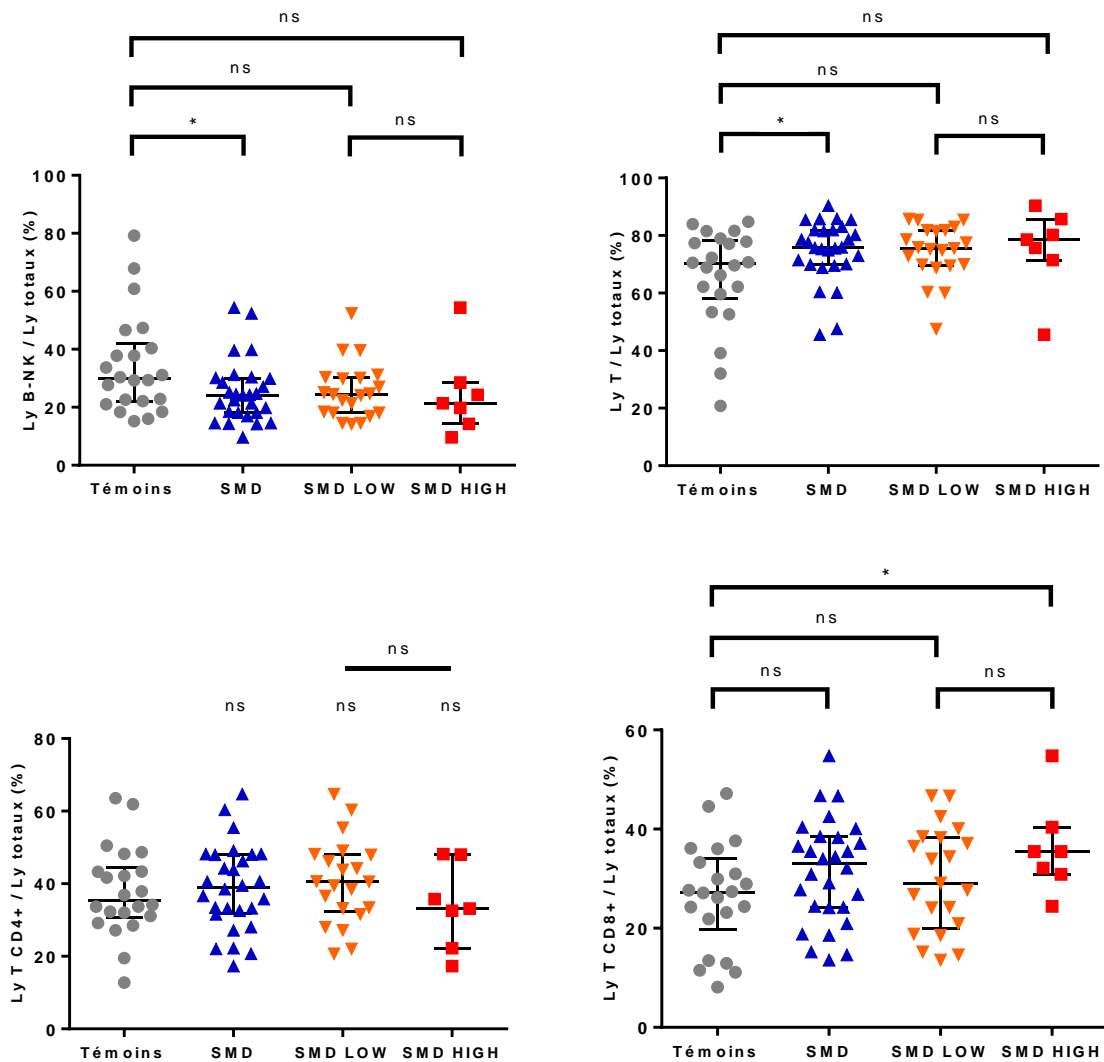


Figure 13. Comparaison de la répartition des différentes populations lymphocytaires entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH

*Médiane et écart interquartile ; * $p < 0,05$; ns : différence non significative.*

Populations : Témoins (n = 22, en gris), SMD totaux (n = 28, en bleu), SMD LOW (n = 21, en orange), SMD HIGH (n = 7, en rouge).

En ce qui concerne la population de lymphocytes Tregs, comme montré sur la Figure 14, il n'a pas été observé de différence significative entre le taux de Tregs dans la moelle osseuse (exprimé en % par rapport aux Ly T CD3+ CD4+) des patients du groupe SMD et du groupe témoin (respectivement 7,0 % vs 7,6 %). La quantification des lymphocytes Tregs par rapport aux lymphocytes T totaux (3,6 % vs 3,9 %) ou par rapport aux lymphocytes totaux (2,7 % vs 2,4 %) ne montre pas non plus de différence significative entre les patients atteints de SMD et les témoins. Le taux de lymphocytes Tregs semble également identique entre le groupe de

patients SMD LOW et le groupe de patients SMD HIGH que ce soit par rapport aux lymphocytes T CD3+ CD4+ (6,9 % vs 7,0 %), par rapport aux lymphocytes T totaux (3,6 % vs 3,6 %) ou par rapport aux lymphocytes totaux (2,6 % vs 3,1 %) (Figure 14). Enfin, le ratio lymphocytes T CD8+/Tregs est similaire entre le groupe témoin et le groupe de patients SMD (10,5 vs 12,7) et également entre le groupe de patients SMD LOW et le groupe de patients SMD HIGH (12,5 vs 12,8).

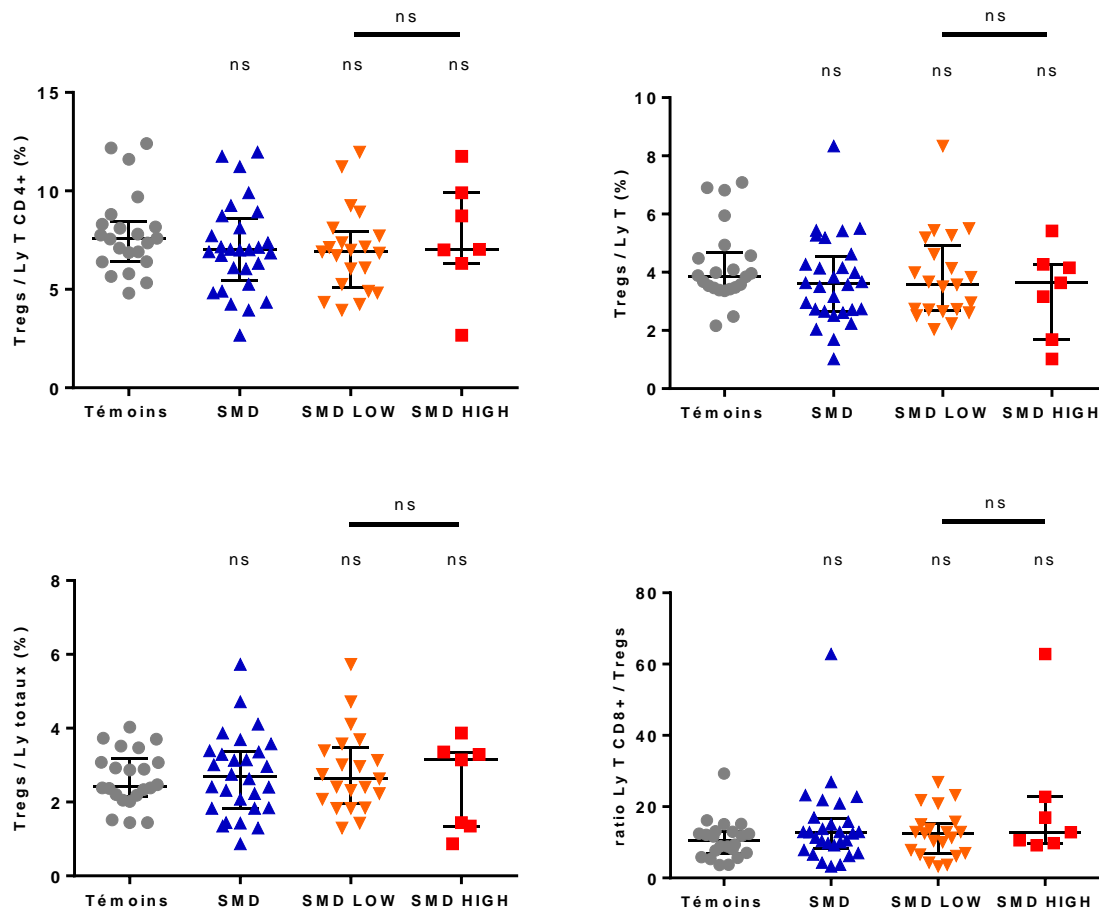


Figure 14. Comparaison du contingent de lymphocytes T régulateurs entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH

Médiane et écart interquartile ; ns : différence non significative.

Populations : Témoins (n = 22, en gris), SMD totaux (n = 28, en bleu), SMD LOW (n = 21, en orange), SMD HIGH (n = 7, en rouge).

J'ai ensuite comparé la quantification des lymphocytes Tregs A et B identifiés sur l'expression du CD95 et du CD45RA (Figure 15). J'ai observé que la sous-population de Tregs B CD45RA-CD95+ est significativement plus représentée dans la moelle osseuse des patients SMD par rapport à celle des témoins (64,3 % vs 55,4 % ; $p = 0,0109$). De façon logique, l'inverse est observé sur le contingent de Tregs A CD45RA+ CD95- puisque cette population est significativement diminuée chez les patients SMD par rapport aux témoins (35,7% vs 44,5%).

Cette différence du taux de Tregs B est observée quel que soit le type de SMD (LOW ou HIGH) comparé aux témoins (respectivement 66,3 % vs 55,4 % ; $p = 0,0274$ et 64,2 % vs 55,4 % ; $p = 0,0479$). En revanche, je n'ai pas trouvé de différence significative entre les SMD HIGH et les SMD LOW concernant la répartition des sous-populations Tregs B (66,3 % vs 64,2 %) et Tregs A (35,8 % vs 33,7%).

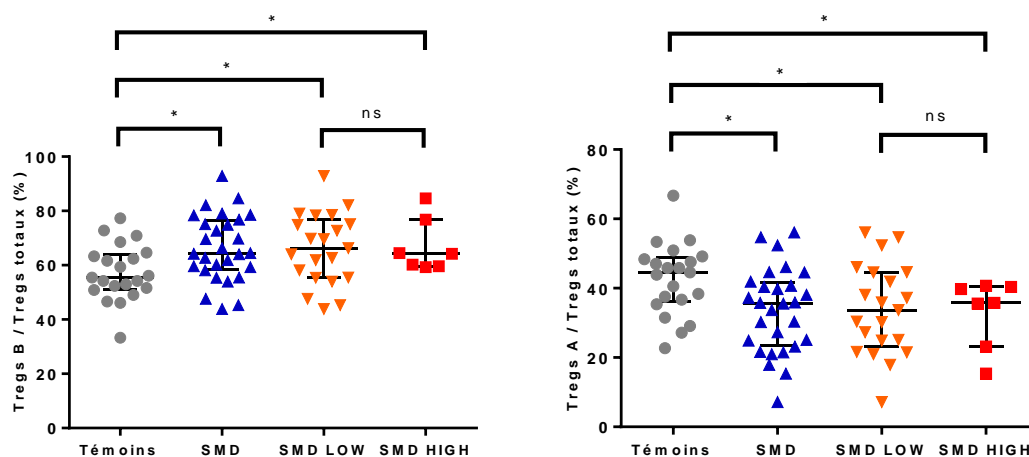


Figure 15. Comparaison du contingent de lymphocytes Tregs A et B entre les témoins et les patients atteints de SMD ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH

*Médiane et écart interquartile ; * $p < 0,05$; ns : différence non significative.*

Populations : Témoins (n = 22, en gris), SMD totaux (n = 28, en bleu), SMD LOW (n = 21, en orange), SMD HIGH (n = 7, en rouge).

Les résultats observés à ce stade montrent que contrairement aux données souvent décrites dans la littérature, le taux global de lymphocytes Tregs ne semble pas modifié chez les patients SMD par rapport aux témoins. En revanche, la sous-population de Tregs B décrite comme étant dotée de capacités immunosuppressives plus importantes serait augmentée chez les patients SMD.

VIII.D. Quantification automatisée des lymphocytes T régulateurs par l'algorithme FlowSOM

Dans la deuxième partie de mon travail, j'ai utilisé une autre stratégie d'analyse afin d'identifier la population de lymphocytes Tregs. En effet, l'ensemble des résultats décrits précédemment ont été obtenus à partir d'une analyse basée sur le *gating* manuel de la population de lymphocytes Tregs sur un *dotplot* CD127/CD25 conditionné sur la population lymphocytaire CD3+ CD4+. Or, le *gating* manuel est parfois difficile et peut donc être opérateur dépendant. De nombreux algorithmes de « *clusterisation* » ont été développés récemment afin d'étudier de façon non supervisée des données de cytométrie. Ces outils sont déjà fréquemment utilisés pour l'analyse de données obtenues par cytométrie de masse, technique qui permet d'étudier de façon simultanée un nombre de paramètres importants (30 à 40) rendant l'analyse par *dotplot* classique très fastidieuse. Cependant, ces algorithmes peuvent également être utilisés pour l'analyse de données obtenues par cytométrie en flux.

C'est donc dans ce contexte que j'ai analysé avec l'algorithme FlowSOM (SOM pour *Self Organizing Map*) disponible sur la plateforme Cytobank, les données issues de 29 prélèvements médullaires :

- 9 témoins : 3 contrôles ponctions et 6 contrôles têtes fémorales ;
- 20 patients atteints de SMD : 15 SMD LOW et 5 SMD HIGH.

Pour cela, les données des cellules isolées dans la fenêtre CD3+ CD4+ sur le logiciel Kaluza ont été exportées sous forme de fichiers CSV puis importées dans Cytobank. Cytobank est une plateforme permettant l'accès à différents algorithmes de réduction dimensionnelle (viSNE) ou de *clusterisation* (SPADE et FlowSOM). J'ai fait le choix d'utiliser l'algorithme de *clusterisation* FlowSOM plutôt que SPADE principalement pour une raison de rapidité d'exécution. J'ai ensuite paramétré l'algorithme FlowSOM comme décrit dans le paragraphe matériel et méthodes : 16 clusters demandés avec, pour tous les fichiers, un nombre identique soumis de cellules incluses pour la formation de l'arbre (soit 6229 cellules CD3+ CD4+ par fichier) et une *clusterisation* basée sur l'expression des marqueurs CD127, CD25, CD95, CD45RA et CD194/CCR4. Le pipeline d'analyse est résumé sur la Figure 16.

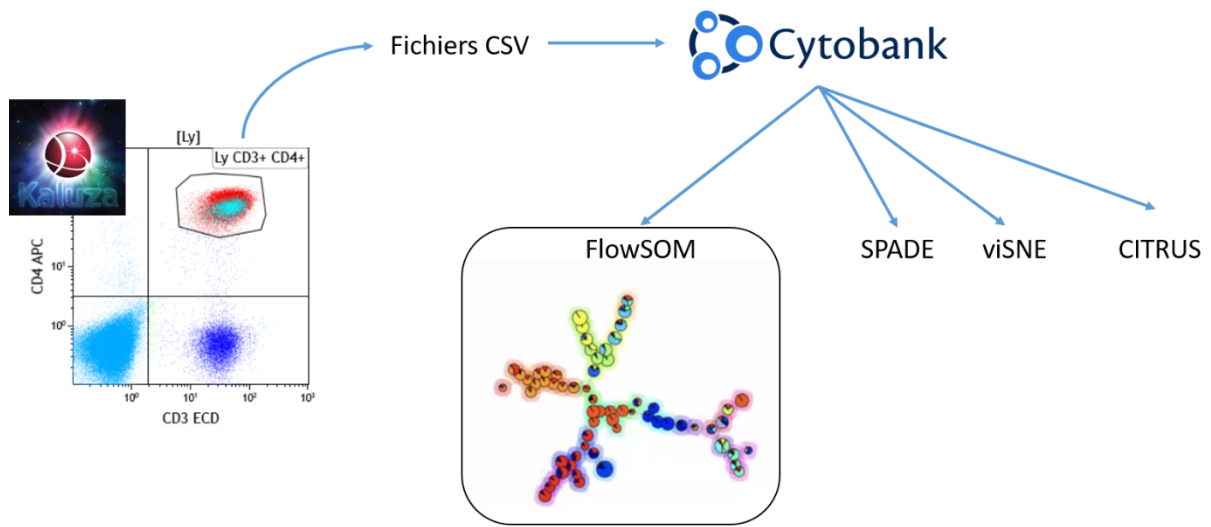


Figure 16. Pipeline d'analyse des données de CMF avec la plateforme Cytobank

L'arbre généré à partir des données des 29 fichiers importés est représenté sur la Figure 17.

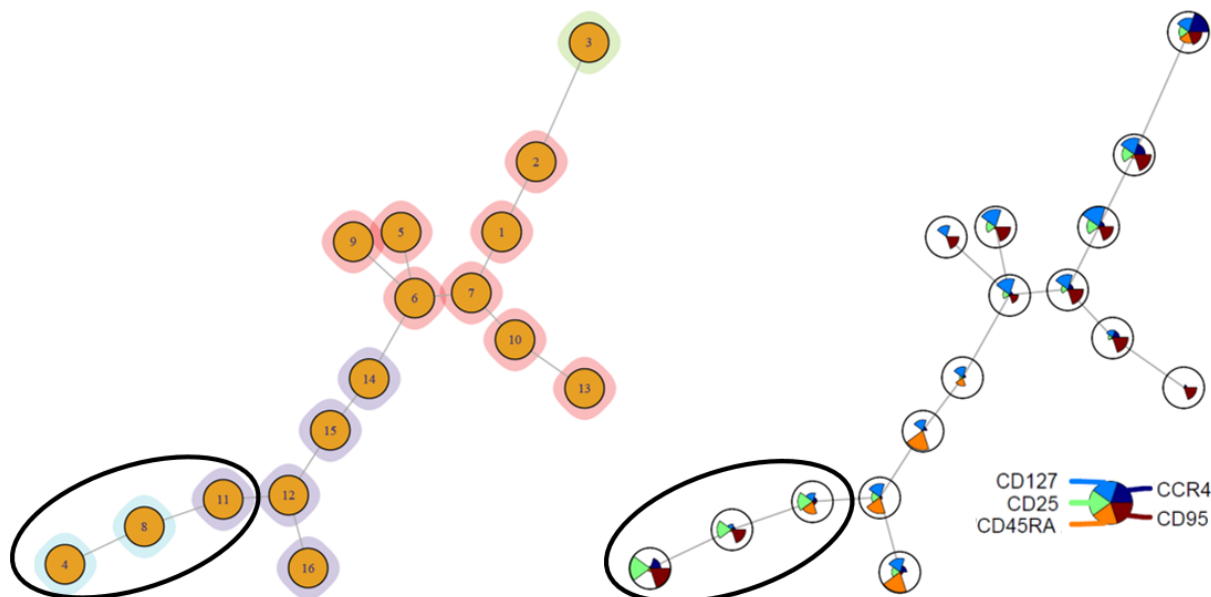


Figure 17. Arbre de recouvrement minimal issu de l'analyse FlowSOM intégrant les lymphocytes CD3+ CD4+ de 29 échantillons médullaires

Les 16 clusters identifiés par l'algorithme sont représentés par 16 cercles numérotés de 1 à 16 (Figure 17, à gauche). Il est ensuite possible de visualiser au sein de chaque cluster l'intensité d'expression de chacun des 5 marqueurs inclus dans l'analyse (Figure 17, à droite) sous la forme d'une portion de disque dont la taille est proportionnelle à l'intensité d'expression du

marqueur. On constate ainsi que 3 clusters (clusters 4, 8 et 11) associent les caractéristiques phénotypiques connues des lymphocytes Tregs à savoir une forte expression du CD25 et une faible expression du CD127. L'analyse de l'intensité d'expression du CD127 et du CD25 au sein de l'ensemble des 16 clusters sous forme de *heat map* (Figure 18) confirme que les clusters 4, 8 et 11 correspondent à la population de lymphocytes Tregs recherchée puisqu'ils sont caractérisés par une forte expression du CD25 associée à une faible expression du CD127. De façon intéressante, l'étude de l'expression du CD95, du CD194/CCR4 et du CD45RA au sein de ces 3 clusters permet d'identifier que le cluster 11 correspond à la population de Tregs A (CD45RA+ et CD95-) tandis que les clusters 4 et 8 correspondent à la population de Tregs B (CD45RA- et CD95+). Enfin, les clusters 4 et 8 diffèrent par l'expression du CD194/CCR4.

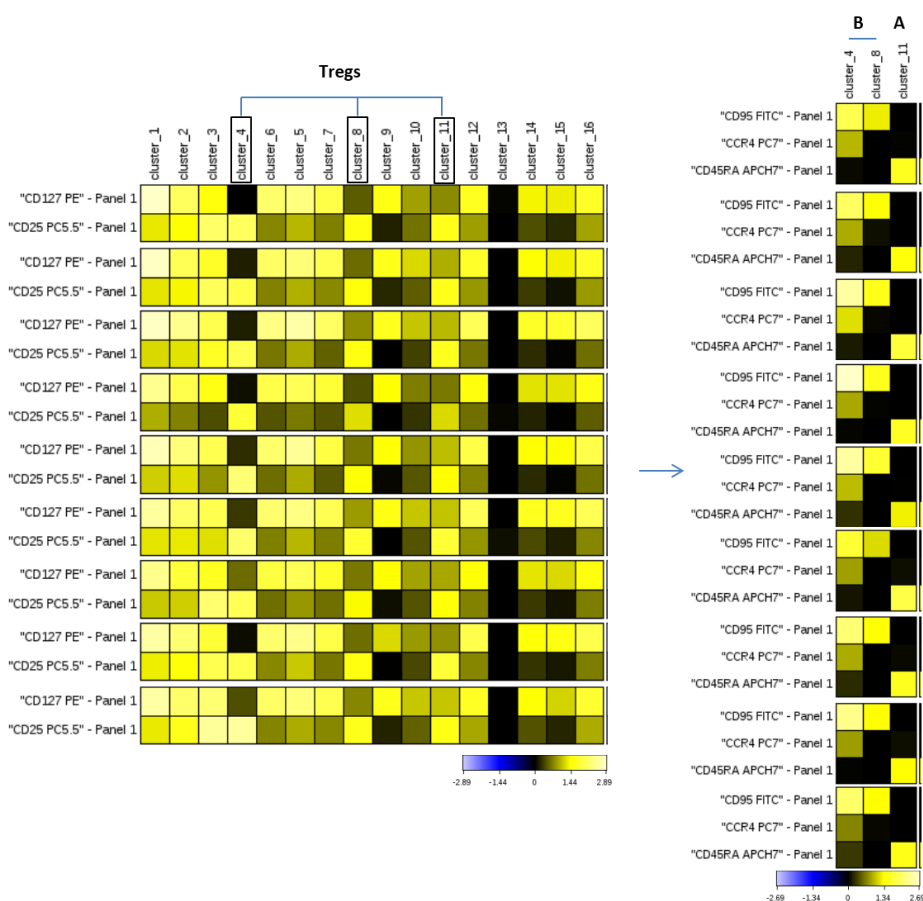


Figure 18. Expression des marqueurs CD127 et CD25 dans l'ensemble des 16 clusters ; expression des marqueurs CD95, CD45RA et CD194/CCR4 au sein des clusters 4, 8 et 11 sur les 9 échantillons témoins analysés par FlowSOM

La couleur est corrélée à l'intensité d'expression du marqueur selon l'échelle présentée en bas de la figure.

Afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus par le clustering automatisé, j'ai reporté les cellules correspondant aux clusters 4, 8 et 11 sur un dot plot CD127/CD25. Comme observé sur la Figure 19, la majorité des cellules sont en effet positionnées dans la fenêtre Tregs placée manuellement sur la population totale de lymphocytes CD3+ CD4+ sur le *dotplot* CD127/CD25. Cependant, un pourcentage important (de 6,8 % à 27,4 % sur les 2 cas exposés sur la Figure 19) de cellules identifiées comme appartenant à la population de lymphocytes Tregs par l'algorithme de *clustering* automatisé, est localisé juste à côté de la fenêtre Tregs analysée manuellement. Ceci suggère donc que l'identification de la population de lymphocytes Tregs basée sur le *gating* manuel ne permettrait pas l'identification de la totalité de la population Tregs.

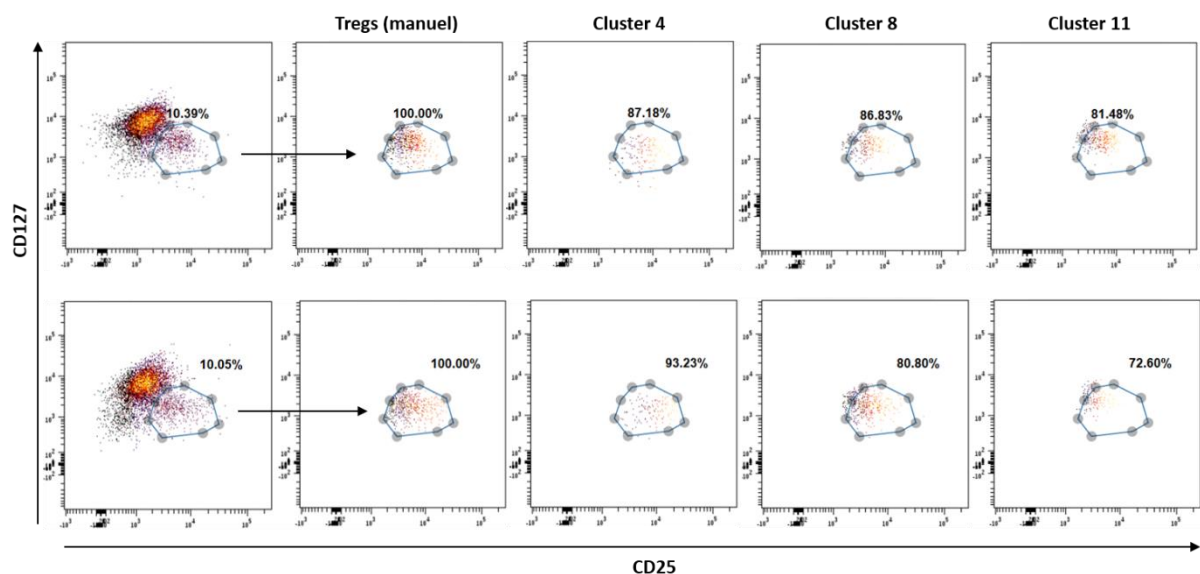


Figure 19. Localisation des cellules constituant les clusters 4, 8 et 11 sur le *dotplot* CD127/CD25 initialement utilisé pour la quantification des lymphocytes Tregs par *gating* manuel (exemple de 2 témoins)

Suite à cette observation, j'ai analysé le nombre de cellules regroupées dans les clusters 4, 8 et 11 identifiées comme la population de lymphocytes Tregs et je l'ai comparé à la quantification des Tregs réalisée à partir du *gating* manuel dans le logiciel Kaluza. Comme présenté par les résultats exposés sur la Figure 20, l'analyse de la corrélation entre le *gating* manuel et le *gating* automatisé de la population globale des Tregs montre une corrélation très moyenne ($R^2 = 0,25$). La même analyse réalisée sur la répartition des Tregs A et B montre également une corrélation moyenne ($R^2 = 0.45$).

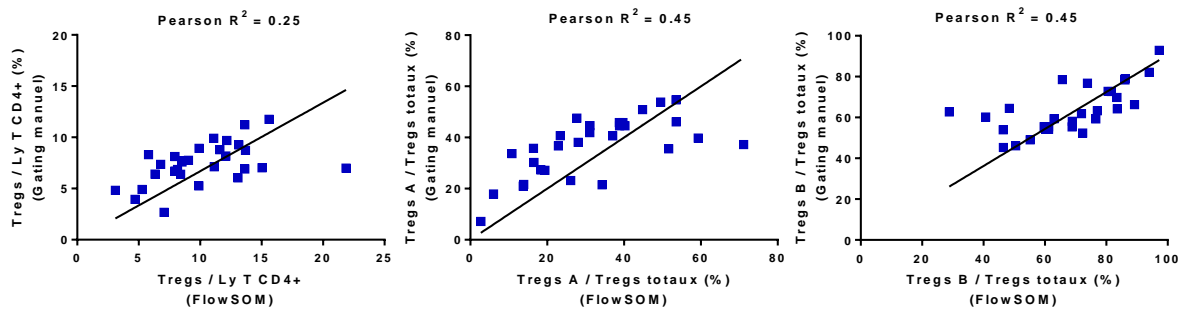


Figure 20. Corrélation de la quantification des lymphocytes T régulateurs totaux, et des Tregs A et B analysés par *gating* manuel ou par l’algorithme FlowSOM

Enfin j’ai également vérifié que les 2 clusters correspondant aux Tregs B sont bien séparés par l’expression du CD194/CCR4. Comme présenté sur la Figure 21, les cellules du cluster 4 correspondent bien à une population de cellules CCR4+ tandis que les cellules du cluster 8 sont CCR4-.

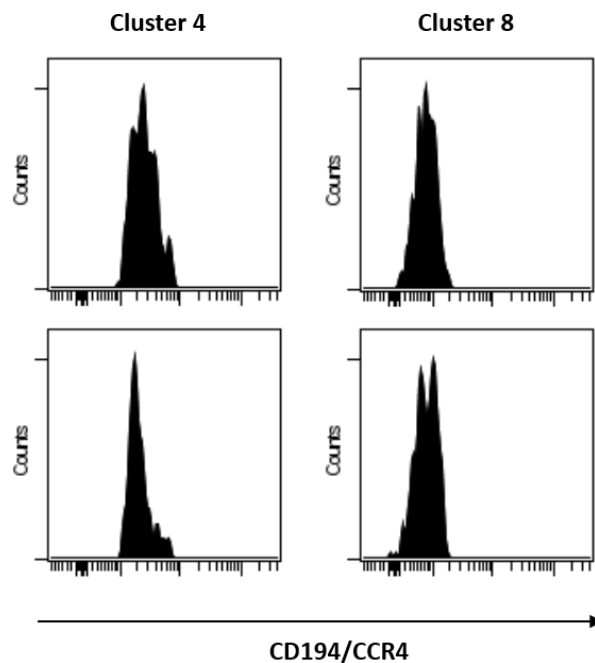


Figure 21. Expression du CD194/CCR4 par les cellules des cluster 4 et 8 chez 2 témoins

Comme pour les données obtenues par l’analyse manuelle dans le logiciel Kaluza, j’ai ensuite analysé l’abondance des lymphocytes Tregs et des sous-populations identifiées au sein des clusters 4, 8 et 11 chez les patients atteints de SMD et chez les témoins (Figure 22, Figure 23 ci-dessous ; Tableau 19 en annexes). Le taux de lymphocytes Tregs par rapport aux lymphocytes

CD4+ totaux n'est pas significativement différent entre les témoins et les patients SMD (8.5 % vs 10.5 %) et ce quel que soit le stade de la pathologie puisqu'aucune différence statistiquement significative n'est observée également entre les SMD LOW et les SMD HIGH (9.9 % vs 13.7 %). En ce qui concerne l'étude des sous-populations de Tregs A (cluster 11) et B (clusters 4+8), aucune différence significative n'est observée entre les témoins et les patients SMD (38.8 % vs 27.1 % pour les Tregs A et 61.2 % vs 72.9 % pour les Tregs B) ni entre les 2 groupes de patients SMD. De même, la comparaison de la quantification des lymphocytes Tregs du cluster 8 entre les différents groupes ne montre pas de différence significative (51.7 % vs 31.7 % pour les témoins et les SMD ; 33.9 % et 28.0 % pour les SMD LOW et SMD HIGH). Les derniers résultats exposés ne présentent pas de différence statistiquement significative mais on peut parfois tout de même constater des écarts conséquents entre les taux énoncés. En revanche, la quantité de cellules Tregs correspondant au cluster 4 caractérisé par le phénotype CD95+ CD45RA- CD194/CCR4+ est significativement augmentée (34.0 % vs 17.7 % ; $p = 0,0035$) chez les patients atteints de SMD par rapport au groupe témoin sans qu'il n'y ait de différence entre les SMD LOW et les SMD HIGH.

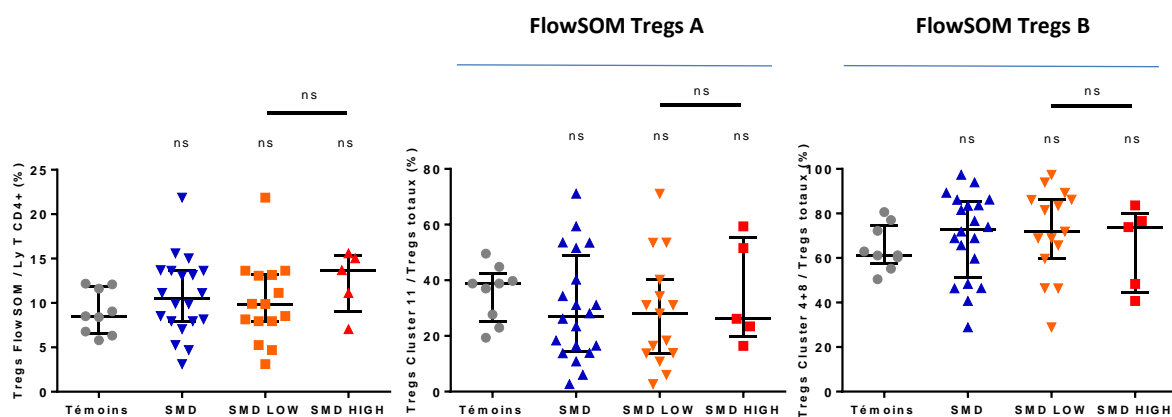


Figure 22. Comparaison de la quantification de lymphocytes T régulateurs totaux, des clusters 11 et 4+8 identifiés par *gating* automatisé, entre les patients atteints de SMD et les témoins ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH

Médiane et écart interquartile ; ns : différence non significative.

Populations : Témoins (n = 9, en gris), SMD totaux (n = 20, en bleu), SMD LOW (n = 15, en orange), SMD HIGH (n = 5, en rouge).

FlowSOM Tregs B

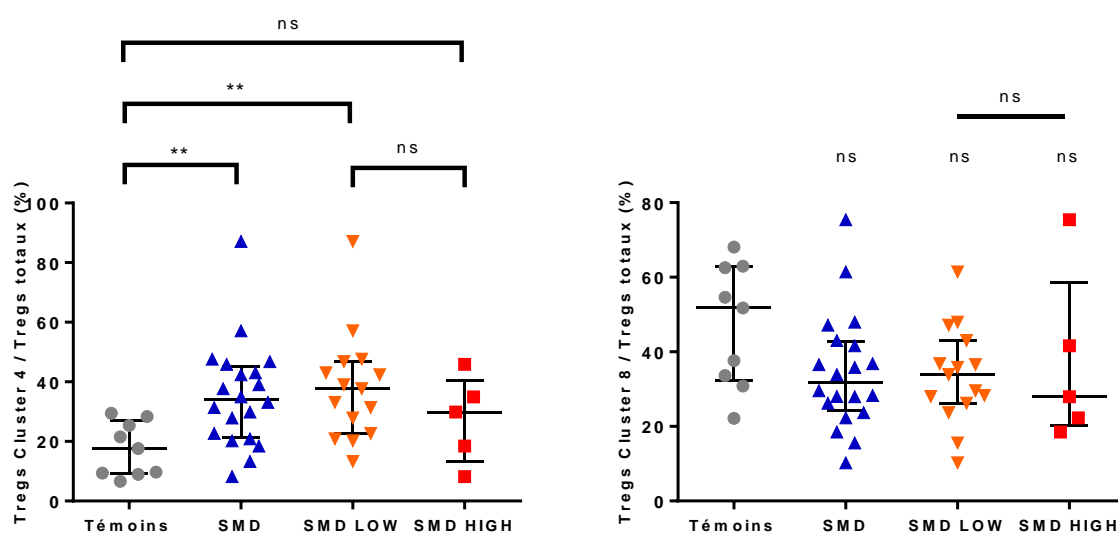


Figure 23. Comparaison de la quantification de lymphocytes T régulateurs du cluster 4 et du cluster 8 identifiés par *gating* automatisé, entre les patients atteints de SMD et les témoins ; et entre les SMD LOW et les SMD HIGH

Médiane et écart interquartile ; ** $p < 0,01$; ns : différence non significative.

Populations : Témoins ($n = 9$, en gris), SMD totaux ($n = 20$, en bleu), SMD LOW ($n = 15$, en orange), SMD HIGH ($n = 5$, en rouge).

En conclusion de cette partie de l'étude, réalisée avec l'algorithme FlowSOM, les résultats observés suggèrent que la quantification des lymphocytes Tregs par le *gating* manuel ne soit pas optimale. L'analyse FlowSOM pourrait donc permettre une identification plus précise de cette population et surtout permettre de séparer plus finement différentes sous-populations de lymphocytes Tregs notamment au sein de la population Tregs B. En effet, deux populations de Tregs B se distinguent par l'expression ou non de CCR4. De façon intéressante, il semblerait que ce soit la sous-population de Tregs B exprimant CCR4 qui augmente dans un contexte de SMD.

IX. DISCUSSION

Les SMD regroupent un ensemble de pathologies hétérogènes caractérisées par des anomalies clonales acquises par la cellule souche hématopoïétique. Ces pathologies se traduisent cliniquement par des cytopénies et peuvent évoluer vers la LAM. Les données de la littérature suggèrent fortement qu'une réponse immunitaire inadaptée joue à la fois un rôle dans l'insuffisance médullaire observée chez les patients et dans la progression de la maladie. L'implication de ce dérèglement immunitaire est suggérée par la fréquence importante des maladies auto-immunes chez les patients atteints de SMD (10–12,14) mais aussi par l'observation de l'amélioration de l'hématopoïèse survenant après traitement immunosuppresseur (sérum anti-lymphocytaire ou ciclosporine) (29) ou immunomodulateur (lénalidomide), particulièrement dans les SMD de bas grade. De même, il a été rapporté qu'un traitement par agent hypométhylant tel que l'azacitidine permettait une amélioration de la maladie auto-immune associée (108). L'existence d'une base immunologique commune au développement des SMD et des maladies auto-immunes est ainsi supposée d'autant plus que plusieurs sous-populations lymphocytaires sont décrites comme dérégulées dans les SMD (109).

La nature et l'origine des perturbations du système immunitaire qui interviennent dans la pathogénie des SMD diffèrent entre les différents stades d'évolution de la maladie et donc des différents groupes de patients classés selon l'IPSS-R. En effet, dans les SMD de bas risque, ces dérèglements consistent en l'expansion de lymphocytes T CD8+ oligoclonaux dans un contexte d'inflammation chronique qui est à l'origine d'une apoptose accrue des progéniteurs hématopoïétiques et donc d'une inhibition de l'hématopoïèse (30,110–113). Epling *et al.* (110) ont par exemple retrouvé un réarrangement clonal du TCR chez 50 % des patients SMD vs 5 % chez des sujets contrôles appariés sur l'âge. Les phénomènes d'auto-réactivité accrue envers des antigènes exprimés dans la moelle osseuse pourraient entraîner en réaction l'expansion des lymphocytes Tregs jusqu'alors peu nombreux voire non fonctionnels. De façon intéressante, le taux des lymphocytes Tregs médullaires apparaît inversement lié au recrutement de lymphocytes T cytotoxiques CD8+, au degré de dysérythropoïèse et à la nécessité d'un traitement par érythropoïétine dans les SMD de bas risque (98). A l'inverse, dans les SMD de haut risque, la composante environnementale est permissive vis-à-vis des

clones dysplasiques. Un des mécanismes contribuant à cette bascule pourrait être l'activation et/ou l'expansion des lymphocytes Tregs ou plus spécifiquement d'une sous-population de Tregs qui favoriseraient la progression des clones leucémiques en inhibant les cellules réactives et effectrices incluant les lymphocytes T CD4+ CD25-, les lymphocytes T CD8+, les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes B. Bien que partiellement comprise, l'expansion des lymphocytes Tregs semble liée à une migration accrue vers la moelle osseuse, à l'induction de cellules effectrices en iTregs et à une prolifération locale.

A la vue de ces données publiées dans la littérature, on comprend bien le rôle crucial des lymphocytes Tregs dans les SMD puisque ces cellules sont censées participer à la fois au maintien de la tolérance immunitaire et à la lutte anti-tumorale ; mais qui dans des conditions immunitaires perturbées par le clone tumoral peuvent faire le jeu de l'hémopathie.

La majorité des études publiées décrivent une augmentation significative des lymphocytes Tregs à la fois aux niveaux sanguin (92,93) et médullaire (93,95,97,98) dans les SMD de haut risque par rapport aux SMD de bas risque. En effet, une corrélation est observée entre l'augmentation du nombre de lymphocytes Tregs et plusieurs indicateurs d'évolutivité de la maladie comme l'infiltration blastique médullaire, un IPSS élevé et la progression de la maladie (92). Seuls Perazzio et *al.* en 2018 (102), ont des résultats opposés rapportant un nombre de lymphocytes Tregs supérieur dans les SMD de bas risque par rapport aux SMD de haut grade.

Le plus faible taux de lymphocytes Tregs dans les SMD de bas grade pourrait s'expliquer par une diminution de leur recrutement par déficit de l'expression de CXCR4 (93) et par une diminution des capacités de prolifération (peu de Tregs Ki67+) (96). Certains auteurs décrivent même une altération de leur fonction suppressive suggérant l'implication des lymphocytes Tregs dans les processus auto-immuns des SMD précoces (93). Les données de la littérature comparant les SMD de bas risque à une population contrôle sont aussi hétérogènes. Des études retrouvent plus de lymphocytes Tregs sanguins dans les SMD de bas grade que chez les témoins (94,103). En revanche, Balaian (101) a constaté en 2016 un déficit en lymphocytes Tregs à la fois dans le sang et la moelle dans une cohorte composée uniquement de patients avec del(5q) isolée. Enfin, pour Kotsianidis (93) et Moon (95), SMD de bas risque et témoins présentaient des taux de lymphocytes Tregs non statistiquement différents dans le sang mais

aussi dans la moelle osseuse. Le constat est identique pour Alfinito (98) sur l'analyse de prélèvements médullaires.

Ces différences entre les études publiées pourraient s'expliquer par l'hétérogénéité des cohortes étudiées de patients atteints de SMD et de sujets témoins mais également par le type de prélèvement analysé (sang ou moelle) ou par l'application de différentes stratégies de *gating* pour identifier la population de lymphocytes Tregs. Les lymphocytes Tregs sont le plus souvent évalués par le nombre absolu sur le sang ou par le pourcentage de Tregs/T CD4+ (93,95,101,105) mais certaines études présentent leurs résultats sous la forme du ratio Tregs/lymphocytes totaux (97,102) ce qui complique la comparaison des résultats.

C'est donc dans ce contexte que mon projet a consisté à étudier les lymphocytes Tregs par CMF sur des prélèvements de moelle osseuse issus de patients atteints de SMD au diagnostic (ou dans le cadre de suivi mais en l'absence de traitement) et de sujets témoins. Dans notre étude, les patients ont été inclus sur une période de 1 an. Elle a donc porté sur 28 patients (dont 7 SMD HIGH) et 22 sujets témoins. Cet effectif reste donc relativement limité. Dans cette cohorte de patients, je n'ai pas mis en évidence de différence entre le taux de lymphocytes Tregs médullaires chez les patients SMD et les témoins ni entre les patients SMD LOW et SMD HIGH. Le même résultat était observé quelle que soit la manière d'analyser le taux de lymphocytes Tregs (par rapport aux lymphocyte T CD3+ CD4+ totaux, aux lymphocytes T totaux ou aux lymphocytes totaux). Il est tout à fait possible que l'effectif de la cohorte étudiée reste trop faible pour mettre en évidence une éventuelle différence. Il serait donc nécessaire de compléter l'étude avec un effectif plus conséquent. De plus, contrairement à la plupart des études qui évaluent les lymphocytes Tregs, nous n'avons pas fait de marquage intracellulaire du facteur de transcription FoxP3. Il est cependant connu que la combinaison des marqueurs de surface utilisés dans notre étude (CD3, CD4, CD25 et CD127) permet une sélection très légèrement plus large et bien corrélée au nombre total de lymphocytes Tregs. En effet, Kotsianidis a constaté que les cellules CD4+ CD25^{high} exprimaient à plus de 90 % FoxP3 (93), de même que Moon qui estime ce chiffre à 92,8 % (95). Avec notre stratégie qui considère en plus la faible expression du CD127 sur les lymphocytes Tregs, on peut logiquement penser qu'on se rapproche des 100 % et donc d'un *gating* quasi optimal des Tregs. Par ailleurs, des études ont fait un choix similaire au notre (102,103). De plus, dans la littérature récente, la spécificité du facteur de transcription FoxP3 est discutée. En effet, son expression ne serait

pas aussi spécifique des lymphocytes Tregs chez l'homme que chez la souris puisqu'il ne serait pas exprimé par quelques sous-types de Tregs et serait présent chez d'autres types cellulaires (114).

Il est possible que l'identification de différentes sous-populations de lymphocytes Tregs soit plus informative que la quantification de la population globale de Tregs. La classification des sous-populations de Tregs n'est pas encore complètement consensuelle. En effet, cette classification s'appuie selon les études sur des critères différents : l'origine (nTregs et iTregs, phénotypiquement différents), des caractéristiques fonctionnelles (cellules Tregs exprimant le Ki67), le statut d'activation (Tregs effecteurs mémoires CD45RA⁻ CD27⁻ (105), Tregs B CD45RA⁻ CD95⁺ (46), Tregs activés FoxP3^{high} CD45RA⁻ (115)). En raison de la plasticité des lymphocytes Tregs et de la possibilité de co-expression de certains marqueurs avec d'autres populations lymphocytaires, distinguer des sous-types de Tregs avec des fonctions suppressives différentes n'est pas aisé. En l'absence de marqueur de surface spécifique et stable, c'est bien une combinaison de marqueurs qui est souvent utilisée pour isoler les lymphocytes Tregs et les sous-types. En 2016, Kordasti et *al.* (46) ont caractérisé de manière assez exhaustive la population de lymphocytes Tregs par cytométrie de masse en analysant l'expression de plus de 40 paramètres sur une même cellule. Il a défini deux sous-populations, Tregs A et B, qui diffèrent sur plusieurs plans : profil phénotypique, profil d'expression génique et activité immunosuppressive. Les Tregs B ont un phénotype que l'on peut qualifier de « mémoire » et « activé » et sont caractérisés par la forte expression du CD45RO, du CD95 et de CCR4. De plus, ils expriment fortement des gènes codant pour des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Leur plus forte action immunosuppressive, confirmée *in vitro*, vient étayer l'hypothèse qu'ils constituent une sous-population de lymphocytes Tregs plus actifs et donc potentiellement capable de favoriser le développement de maladies auto-immunes ou cancéreuses, respectivement en cas de déficit ou de prolifération excessive. Kordasti et Kotsianidis ont aussi évalué dans les SMD les sous-groupes de lymphocytes Tregs selon une distinction Tregs naïfs (CD45RO⁻ ou CD45RA⁺) / Tregs mémoires (CD45RO⁺ ou CD45RA⁻). Ils ont observé un contingent mémoire largement majoritaire mais une augmentation du ratio Tregs naïfs / mémoires sanguin et médullaire chez les patients avec un SMD de haut grade vs un SMD de bas grade (92,93).

Compte tenu de ces résultats, j'ai utilisé dans le cadre de ce travail un panel d'anticorps pour étudier l'expression des marqueurs les plus discriminants afin d'identifier les Tregs A et B, à savoir CD45RA, CD95 et CD194/CCR4. Dans mon étude, j'ai ainsi observé une augmentation de la proportion de lymphocytes Tregs B (mémoires et activés définis par le phénotype CD45RA⁻ CD95⁺) et par conséquent une diminution de la proportion de Tregs A (CD45RA⁺ CD95⁻) chez les patients SMD par rapport aux patients témoins. Cette augmentation par rapport au groupe témoin est retrouvée aussi bien chez les patients SMD de bas grade que chez les patients SMD de haut grade. Au niveau médullaire, les résultats de Kotsianidis vont dans ce sens puisqu'il a retrouvé significativement moins de Tregs naïfs dans les SMD de bas grade par rapport aux sujets témoins (93). En revanche, il n'a pas constaté de différence entre les SMD de haut grade et les témoins sur cette répartition Tregs naïfs/mémoires dans la moelle osseuse. Contrairement à Kordasti et Kotsianidis (92,93), je n'ai pas constaté de différence de taux de Tregs A et B entre les patients SMD de bas grade et les patients SMD de haut grade.

Ces résultats suggèrent donc que dans un contexte de SMD, il y aurait une proportion plus importante de lymphocytes Tregs dotés de fonctions plus immunosuppressives. Ces résultats doivent évidemment être confirmés sur une cohorte plus importante de patients atteints de SMD notamment pour permettre une comparaison plus fine des différents stades de SMD évalués selon l'IPSS-R que celle exposée ici où les patients ont été regroupés en 2 entités (SMD LOW et SMD HIGH).

De façon intéressante, l'analyse réalisée avec l'algorithme de clustering automatisé FlowSOM sur la population lymphocytaire CD3⁺ CD4⁺ montre l'augmentation d'une sous-population particulière de Tregs B identifiée par une expression du CD194/CCR4. CCR4 est un récepteur aux chimiokines CCL17 et CCL22. Ce récepteur est connu pour être exprimé à la surface des cellules lymphocytaires situées dans les infiltrats de plusieurs cancers, dont le glioblastome et le cancer du sein, et semble être un indicateur de mauvais pronostic. CCR4 est également exprimé à la surface de certaines cellules tumorales comme les cellules du cancer de l'estomac, du cancer du rein ou encore les cellules de certains lymphomes T, faisant de ce récepteur une cible thérapeutique potentielle. L'expression de CCR4 à la surface de certaines sous-populations lymphocytaires permettrait donc de moduler leur potentiel de migration. Il est donc possible que l'expression de CCR4 à la surface d'une fraction de lymphocytes Tregs

favorise le recrutement de cette sous-population caractérisée par des fonctions immunosuppressives plus importantes au niveau médullaire dans un contexte de SMD. Une étude avait analysé par CMF le profil d'expression des récepteurs aux cytokines des cellules lymphoïdes T dans le sang et la moelle osseuse de patients atteints de SMD (116). Les auteurs avaient observé la présence d'un profil d'expression de récepteurs aux chimiokines reflétant un statut activé de lymphocytes, mais différent entre le sang et la moelle osseuse suggérant donc le recrutement spécifique de certaines populations lymphocytaires T au niveau médullaire. Une évolution de ce profil d'expression était également observée au cours de l'évolution de la pathologie et pouvait avoir une valeur pronostique. Cependant, aucune donnée spécifique aux lymphocytes Tregs chez ces patients atteints de SMD n'était rapportée dans cette étude (116).

D'un point de vue méthodologique, les résultats de mon travail montrent également la difficulté d'utilisation des stratégies analytiques basées sur un *gating* manuel pour isoler des populations faiblement représentées comme les lymphocytes Tregs en CMF. L'avantage de l'algorithme FlowSOM est sa capacité à intégrer l'ensemble des données d'expression des différents marqueurs afin de regrouper sous forme de clusters les cellules dont l'expression des marqueurs est très proche. Les résultats présentés Figure 19 montrent bien qu'un simple *gating* en CD127/CD25 ne permet pas d'isoler l'ensemble des cellules incluses dans l'un des 3 clusters correspondant à une population de lymphocytes Tregs. De même, comme observé sur la Figure 9, la séparation des Tregs A et B basée sur l'expression du CD45RA et du CD95 est parfois peu évidente. L'utilisation d'algorithmes automatisés de type FlowSOM est donc une alternative très prometteuse qui permettrait d'homogénéiser les stratégies de *gating* et qui pourrait dans le futur être de plus en plus utilisée, et ce y compris au sein de laboratoires d'hématologie de routine pour des applications comme la recherche de maladie résiduelle.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. L'objectif est d'obtenir le même type de données sur une cohorte de patients et de témoins plus importante afin de confirmer chez les patients atteints de SMD l'augmentation de la sous-population de lymphocytes Tregs du cluster 4 qui serait potentiellement dotée de propriétés particulièrement immunosuppressives. Un nombre plus important de patients inclus permettrait d'affiner les données à des groupes de patients plus homogènes classés selon l'IPSS-R et également

d'étudier cette même population de lymphocytes Tregs chez des patients SMD avec MAI. Il serait également intéressant d'évaluer le taux de cette population au cours de l'évolution de la maladie chez un même patient (nécessité d'obtenir des prélèvements de suivi) et en réponse à la stratégie thérapeutique éventuellement utilisée. En effet, comme décrit précédemment, la progression de la maladie est associée à l'augmentation significative du contingent de lymphocytes Tregs sanguins (92,93,96) et médullaires (96,97). L'évolution du taux de lymphocytes Tregs constituerait donc un marqueur de l'évolution de la maladie. Les traitements semblent aussi avoir une influence sur les lymphocytes Tregs (99,101). Il est intéressant de noter que le taux de Tregs évoluerait sous traitement soit en diminuant (pour permettre la restauration d'une surveillance immunitaire) dans les cas de SMD avancés soit en augmentant (pour favoriser une immunosuppression) dans les cas de SMD précoces. La quantification des lymphocytes Tregs, et plus particulièrement de la sous-population correspondant aux Tregs identifiés au sein du cluster 4 dans le cadre de cette étude, semble d'autant plus intéressante qu'elle pourrait également servir de marqueur prédictif à la réponse au traitement comme suggéré par l'étude de Costantini (99). La poursuite de ce travail au sein du laboratoire pourra permettre de vérifier cette hypothèse.

Enfin, dans le cadre de cette étude, je me suis focalisé sur la quantification des lymphocytes Tregs au niveau médullaire puisque la moelle osseuse constitue le siège de la maladie et dont l'étude reflète plus précisément le degré d'immunosuppression dans lequel la CSH dysplasique évolue. Cependant, il n'est pas possible de raisonner en termes de valeur absolue de lymphocytes Tregs contrairement au sang. Dans le cadre de la poursuite de ce travail, il serait donc intéressant de recueillir de façon systématique les échantillons sanguins des patients et des témoins pour lesquels un prélèvement de moelle est réalisé. Cela permettra d'évaluer une éventuelle différence de répartition entre sang et moelle chez les patients SMD et/ou chez les témoins. Dans le cadre de cette étude, j'ai eu la possibilité d'effectuer l'analyse de quelques prélèvements sanguins mais leur nombre était vraiment trop faible pour en inclure les résultats.

X. CONCLUSION

L'importance des lymphocytes Tregs dans le développement et la progression des cancers n'est pas complètement connue et parfois controversée : leur fréquence dans les tumeurs ou dans le sang est un potentiel biomarqueur pronostique s'inscrivant dans la signature immune de la tumeur.

Cette population cellulaire est dotée d'une remarquable faculté de plasticité en réponse aux stimuli : recrutement au niveau du site tumoral, prolifération, surexpression des marqueurs de surface impliqués dans les fonctions suppressives et conversion en cellules fortement immunosuppressives. L'augmentation des lymphocytes Tregs dans le sang et au niveau des sites tumoraux indique qu'ils répondent aux stimuli du microenvironnement créés par la cellule tumorale.

Les stratégies pour monitorer les lymphocytes Tregs dans les cancers sont discutées du fait de leur hétérogénéité fonctionnelle et phénotypique. On peut supposer que la mesure de leurs fonctions est plus corrélée à la réponse au traitement anti-tumoral que leur seule énumération. Cependant, si au sein des lymphocytes Tregs on parvient à mettre en évidence une sous-population plus activée facilement identifiable, on se rapprocherait de cette mesure de la fonctionnalité immunosuppressive. J'ai aussi comparé la quantification des lymphocytes Tregs par *gating* automatisé à un *gating* manuel plus traditionnel afin d'évaluer l'intérêt de cette approche pour isoler cette population lymphocytaire minoritaire.

Une connaissance approfondie des voies moléculaires opérant dans un microenvironnement particulier est nécessaire pour définir l'impact réel des lymphocytes Tregs dans les cancers et sélectionner des immunothérapies ciblant les Tregs. En effet, l'identification de différences phénotypiques et fonctionnelles entre des sous-types de lymphocytes Tregs amène à en considérer les implications thérapeutiques pour une déplétion sélective et non globale des Tregs.

Ce travail de thèse avait pour objectif l'évaluation de la population de lymphocytes Tregs et de ses sous-populations au niveau médullaire chez des patients atteints de syndromes

myélodysplasiques. Ainsi, dans cette étude prospective incluant 28 patients, j'ai mis en évidence que seule une sous-population de lymphocytes Tregs dont les capacités immunosuppressives seraient plus importantes par rapport aux autres Tregs, et dont l'expression de CCR4 pourrait faciliter la localisation au niveau médullaire, serait augmentée dans un contexte de SMD. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les SMD de bas et de haut grades, peut-être en raison d'un effectif trop faible notamment sur la population de SMD à risque élevé. Une plus large cohorte serait nécessaire pour valider nos résultats. Mes résultats suggèrent également que la quantification automatisée de cette population de lymphocytes pourrait être plus robuste que celle réalisée par *gating* manuel traditionnel. L'ensemble de ce travail pourrait donc aider à mieux comprendre la base immunologique de ces maladies hématologiques, hétérogènes en termes de pronostic et de risque de transformation en LAM ; et suggère que la quantification de cette sous-population de lymphocytes Tregs CD95+ CD45RA- CCR4+ pourrait avoir un intérêt chez les patients atteints de SMD.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cooper JN, Young NS. Clonality in context: hematopoietic clones in their marrow environment. *Blood*. 30 nov 2017;130(22):2363-72.
2. Valent P, Orazi A, Steensma DP, Ebert BL, Haase D, Malcovati L, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 26 sept 2017;8(43):73483-500.
3. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 15 avr 2007;109(8):1536-42.
4. Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, et al. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique*. avr 2016;64(2):103-12.
5. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. janv 1995;16(3-4):247-62.
6. Fenaux P, Adès L, Dreyfus F, Société française d'hématologie. *Les syndromes myélodysplasiques*. Montrouge: Éd. John Libbey Eurotext; 2016.
7. Fenaux P, Ades L, Fontenay M, Raynaud S, Eclache V, Rose C, et al. French consensus on myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia: diagnostic, classification and treatment 2015 update by the Myelodysplasia French Group. *Hématologie*. 2015;21(1):28-45.
8. Santini V. Anemia as the Main Manifestation of Myelodysplastic Syndromes. *Semin Hematol*. oct 2015;52(4):348-56.
9. Sullivan LR, Sekeres MA, Shrestha NK, Maciejewski JP, Tiu RV, Butler R, et al. Epidemiology and risk factors for infections in myelodysplastic syndromes. *Transpl Infect Dis*. déc 2013;15(6):652-7.
10. Berthier S, Magy N, Gil H, Schneider MB, Vuitton DA, Dupond JL. Myelodysplasias and systemic diseases. A non-fortuitous association. *Rev Med Interne*. mai 2001;22(5):428-32.
11. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br J Cancer*. 10 mars 2009;100(5):822-8.
12. Mekinian A, Grignano E, Braun T, Decaux O, Liozon E, Costedoat-Chalumeau N, et al. Systemic inflammatory and autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia: a French multicentre retrospective study. *Rheumatology*. févr 2016;55(2):291-300.
13. Castro M, Conn DL, Su WP, Garton JP. Rheumatic manifestations in myelodysplastic syndromes. *J Rheumatol*. mai 1991;18(5):721-7.
14. Saif MW, Hopkins JL, Gore SD. Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. nov 2002;43(11):2083-92.
15. Komrokji RS, Kulasekararaj A, Al Ali NH, Kordasti S, Bart-Smith E, Craig BM, et al. Autoimmune diseases and myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. mai 2016;91(5):E280-283.

16. Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, et al. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* juin 2012;36(6):727-34.
17. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi M-T, Tomonaga M, et al. Dyserythropoiesis in the diagnosis of the myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms: problem areas. *British Journal of Haematology.* août 2018;182(4):526-33.
18. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med.* 13 oct 2011;365(15):1384-95.
19. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 21 nov 2013;122(22):3616-27.
20. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica.* août 2009;94(8):1066-74.
21. Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, Morvan C, Debord C, Trimoreau F, et al. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* avr 2015;100(4):472-8.
22. Mathis S, Chapuis N, Debord C, Rouquette A, Radford-Weiss I, Park S, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* oct 2013;27(10):1981-7.
23. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology.* janv 2018;93(1):129-47.
24. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia.* 2017;31(9):1869-71.
25. 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.
26. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 20 sept 2012;120(12):2454-65.
27. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* févr 2010;28(4):562-9.
28. Sloan EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy. *J Clin Oncol.* 20 mai 2008;26(15):2505-11.
29. Parikh AR, Olnes MJ, Barrett AJ. Immunomodulatory treatment of myelodysplastic syndromes: antithymocyte globulin, cyclosporine, and alemtuzumab. *Semin Hematol.* oct 2012;49(4):304-11.
30. Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, Ossenkoppele GJ, Westers TM, Bontkes HJ. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy: Review. *British Journal of Haematology.* juin 2011;153(5):568-81.

31. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, et al. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* oct 1998;103(1):176-88.
32. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia.* juin 2014;28(6):1280-8.
33. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol.* 1 janv 2006;176(1):284-90.
34. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, Zhang L, Djeu J, Fortenbery N, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* nov 2013;123(11):4595-611.
35. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood.* 1 juin 2007;109(11):4816-24.
36. McDaniel JM, Zou JX, Fulp W, Chen D-T, List AF, Epling-Burnette PK. Reversal of T-cell tolerance in myelodysplastic syndrome through lenalidomide immune modulation. *Leukemia.* juin 2012;26(6):1425-9.
37. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 7 nov 1969;166(3906):753-5.
38. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, Irvine WJ. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol.* oct 1973;15(2):225-36.
39. Penhale WJ, Irvine WJ, Inglis JR, Farmer A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin Exp Immunol.* juill 1976;25(1):6-16.
40. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med.* 1 janv 1985;161(1):72-87.
41. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. *J Immunol.* 1 avr 2011;186(7):3808-21.
42. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 26 févr 2010;327(5969):1098-102.
43. Frydrychowicz M, Boruckowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. The Dual Role of Treg in Cancer. *Scand J Immunol.* déc 2017;86(6):436-43.
44. Whiteside TL, Schuler P, Schilling B. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert Opin Biol Ther.* oct 2012;12(10):1383-97.
45. Whiteside TL. Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opin Biol Ther.* oct 2014;14(10):1411-25.

46. Kordasti S, Costantini B, Seidl T, Perez Abellan P, Martinez Llordella M, McLornan D, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood*. 1 sept 2016;128(9):1193-205.
47. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*. avr 2003;4(4):330-6.
48. Santegoets SJAM, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A, et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol Immunother*. oct 2015;64(10):1271-86.
49. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 1 mars 2007;178(5):2883-92.
50. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. oct 2004;21(4):589-601.
51. Garin MI, Chu C-C, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 1 mars 2007;109(5):2058-65.
52. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. oct 2009;21(10):1105-11.
53. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 11 juin 2007;204(6):1257-65.
54. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 11 juin 2007;204(6):1303-10.
55. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity*. sept 2010;33(3):326-39.
56. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 10 oct 2008;322(5899):271-5.
57. Tivol EA, Boyd SD, McKeon S, Borriello F, Nickerson P, Strom TB, et al. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J Immunol*. 1 juin 1997;158(11):5091-4.
58. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. mai 2009;30(5):636-45.
59. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*. juill 2008;8(7):523-32.
60. Boyer O, Jacquot S. Physiology and pathophysiology of CD4 +CD25 + regulatory T cells. *Hématologie*. 12(3):164-70.

61. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M, Ergin MT, Hellstrom KE, Mukherji B. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol.* 1 oct 1990;145(7):2359-64.
62. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* sept 2004;10(9):942-9.
63. Li X, Ye D-F, Xie X, Chen H-Z, Lu W-G. Proportion of CD4+CD25+ regulatory T cell is increased in the patients with ovarian carcinoma. *Cancer Invest.* 2005;23(5):399-403.
64. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol.* 1 mai 2002;168(9):4272-6.
65. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* févr 2003;9(2):606-12.
66. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2003;9(12):4404-8.
67. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer.* 1 sept 2003;98(5):1089-99.
68. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 15 mars 2005;65(6):2457-64.
69. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* 14 mars 2005;92(5):913-20.
70. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 15 juill 2004;173(2):1444-53.
71. Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother.* févr 2003;26(1):85-93.
72. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 1 sept 2002;169(5):2756-61.
73. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1 mars 2004;103(5):1755-62.
74. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene.* 22 juill 2010;29(29):4121-9.
75. Tu J-F, Ding Y-H, Ying X-H, Wu F-Z, Zhou X-M, Zhang D-K, et al. Regulatory T cells, especially ICOS+ FOXP3+ regulatory T cells, are increased in the hepatocellular carcinoma microenvironment and predict reduced survival. *Sci Rep.* 11 2016;6:35056.

76. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 déc 2005;102(51):18538-43.
77. Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, et al. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res*. 1 avr 2008;14(7):2028-35.
78. Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, et al. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1 avr 2007;13(7):2075-81.
79. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, et al. Enhanced Functionality of CD4+CD25highFoxP3+ Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Patients with Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 15 févr 2008;14(4):1032-40.
80. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 1 août 2007;13(15):4345-54.
81. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 1 févr 2008;93(2):193-200.
82. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 1 nov 2006;108(9):2957-64.
83. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2005;11(4):1467-73.
84. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NEH, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 15 janv 2006;12(2):465-72.
85. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 14 oct 2015;5:15179.
86. Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*. janv 2015;27(1):11-20.
87. Whiteside TL. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther*. 2015;4:159-71.
88. Muller L, Mitsuhashi M, Simms P, Gooding WE, Whiteside TL. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep*. 4 févr 2016;6:20254.
89. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS ONE*. 22 juill 2010;5(7):e11469.

90. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 15 sept 2009;183(6):3720-30.
91. Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans.* 1 févr 2013;41(1):245-51.
92. Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, et al. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 1 août 2007;110(3):847-50.
93. Kotsianidis I, Bouchliou I, Nakou E, Spanoudakis E, Margaritis D, Christophoridou AV, et al. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia.* mars 2009;23(3):510-8.
94. Hamdi W, Ogawara H, Handa H, Tsukamoto N, Nojima Y, Murakami H. Clinical significance of regulatory T cells in patients with myelodysplastic syndrome. *European Journal of Haematology.* mars 2009;82(3):201-7.
95. Moon H-W, Kim BH, Park CM, Hur M, Yun Y-M, Kim S-Y, et al. CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T-cells in hematologic diseases. *Korean J Lab Med.* oct 2011;31(4):231-7.
96. Bouchliou I, Miltiades P, Nakou E, Spanoudakis E, Goutzouvelidis A, Vakalopoulou S, et al. Th17 and Foxp3(+) T regulatory cell dynamics and distribution in myelodysplastic syndromes. *Clin Immunol.* juin 2011;139(3):350-9.
97. Giovazzino A, Leone S, Rubino V, Palatucci AT, Cerciello G, Alfinito F, et al. Reduced regulatory T cells (Treg) in bone marrow preferentially associate with the expansion of cytotoxic T lymphocytes in low risk MDS patients. *British Journal of Haematology.* juill 2018;[Epub ahead of print].
98. Alfinito F, Sica M, Luciano L, Pepa RD, Palladino C, Ferrara I, et al. Immune dysregulation and dyserythropoiesis in the myelodysplastic syndromes: Treg and Immune Effectors in Myelodysplasia. *British Journal of Haematology.* janv 2010;148(1):90-8.
99. Costantini B, Kordasti SY, Kulasekararaj AG, Jiang J, Seidl T, Abellan PP, et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 1 août 2013;98(8):1196-205.
100. Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrauch MR, Knolle PA, et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood.* 15 mai 2006;107(10):3940-9.
101. Balaian E, Schuster C, Schönefeldt C, Germing U, Haase D, Tuve S, et al. Selective expansion of regulatory T cells during lenalidomide treatment of myelodysplastic syndrome with isolated deletion 5q. *Ann Hematol.* oct 2016;95(11):1805-10.
102. Perazzio ASB, Oliveira JSR, Figueiredo VLP, Chauffaille M de LLF. Increase of IRF-1 gene expression and impairment of T regulatory cells suppression activity on patients with myelodysplastic syndrome: A longitudinal one-year study. *Leukemia Research.* avr 2017;55:6-17.
103. Fozza C, Longu F, Contini S, Galleu A, Viridis P, Bonfigli S, et al. Patients with Early-Stage Myelodysplastic Syndromes Show Increased Frequency of CD4+CD25high+CD127low Regulatory T Cells. *Acta Haematologica.* 2012;128(3):178-82.

104. Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, Ingram W, Hayden J, Barber L, et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* avr 2009;145(1):64-72.
105. Mailloux AW, Sugimori C, Komrokji RS, Yang L, Maciejewski JP, Sekeres MA, et al. Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome. *J Immunol.* 15 sept 2012;189(6):3198-208.
106. Kahn JD, Chamuleau MED, Westers TM, Van de Ven PM, van Dreunen L, van Spronsen M, et al. Regulatory T cells and progenitor B cells are independent prognostic predictors in lower risk myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* juin 2015;100(6):e220-222.
107. Mailloux AW, Epling-Burnette PK. Effector memory regulatory T-cell expansion marks a pivotal point of immune escape in myelodysplastic syndromes. *Oncoimmunology.* 1 févr 2013;2(2):e22654.
108. Fraison J-B, Mekinian A, Grignano E, Kahn J-E, Arlet J-B, Decaux O, et al. Efficacy of Azacitidine in autoimmune and inflammatory disorders associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia Research.* avr 2016;43:13-7.
109. Fozza C, Longinotti M. Are T-cell dysfunctions the other side of the moon in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes?: T-cell immunity in myelodysplasia. *European Journal of Haematology.* mai 2012;88(5):380-7.
110. Epling-Burnette PK, Painter JS, Rollison DE, Ku E, Vendron D, Widen R, et al. Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia.* avr 2007;21(4):659-67.
111. Fozza C, Longinotti M. The role of T-cells in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: Passengers and drivers. *Leukemia Research.* févr 2013;37(2):201-3.
112. Epperson DE, Nakamura R, Sauntharajah Y, Melenhorst J, Barrett AJ. Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: evidence for an autoimmune process. *Leuk Res.* déc 2001;25(12):1075-83.
113. Kerbauy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* nov 2007;35(11):1739-46.
114. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol Immunother.* sept 2014;63(9):869-76.
115. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 19 juin 2009;30(6):899-911.
116. Sand KE, Rye KP, Mannsåker B, Bruserud Ø, Kittang AO. Expression patterns of chemokine receptors on circulating T cells from myelodysplastic syndrome patients. *Oncoimmunology.* févr 2013;2(2):e23138.

ANNEXES

	Contrôles ponctions (n=10)	SMD Very Low (n=10) SMD Low (n=5)	SMD Intermediate (n=6)	SMD High (n=5) SMD Very High (n=2)
Sexe Femme/Homme	6/4	7/8	2/4	2/5
Age (années) *	67 (35-88)	75 (55-90)	72 (59-73)	74 (56-85)
Classification SMD OMS 2016	/	SMD-SLD (n=1) SMD-MLD (n=11) SMD-RS-MLD (n=1) SMD-EB-I (n=2)	SMD-MLD (n=2) SMD-EB-I (n=4)	SMD-MLD (n=1) SMD-RS-MLD (n=1) SMD-EB-I (n=3) SMD-EB-II (n=2)
Score global IPSS-R *	/	1 (0-3)	3,5 (3,5 -4)	5,5 (5-9)
Score cytogénétique IPSS-R *	/	1 (0-1)	1 (1-3)	3 (2-4)
Blastose médullaire (%) *	2 (1-3)	2 (1-7)	6,5 (2-9)	8 (4-15)
Score d'Ogata *	/	1 (0-3)	2 (0-4)	3 (2-4)
Leucocytes (G/L) *	6,02 (4,40-9,59)	5,10 (3,17-9,70)	3,81 (1,88-11,35)	2,63 (1,43-5,25)
Hémoglobine (g/dL) *	12,8 (8,5-13,7)	10,5 (6,7-12,9)	10,7 (5,5-13,7)	8,3 (6,8-10,5)
Volume globulaire moyen (fL) *	86,3 (79,3-91,9)	91,1 (85,0-105,5)	104,8 (97,1-109,7)	95,7 (85,5-104,1)
Plaquettes (G/L) *	254 (115-365)	241 (75-323)	116 (72-323)	102 (39-215)
Polynucléaires neutrophiles (G/L) *	3,76 (2,72-8,44)	3,29 (1,60-6,77)	2,33 (0,36-7,04)	1,20 (0,47-3,01)
Lymphocytes (G/L) *	1,26 (0,57-2,46)	1,17 (0,80-2,82)	1,40 (0,80-3,37)	0,88 (0,41-1,97)

Tableau 11. Caractéristiques des patients et des témoins « contrôles ponctions »

* Médiane (valeur minimale - valeur maximale)

Sexe	Age	Classification SMD OMS 2016	Groupe à risque IPSS-R	Score global IPSS-R	Blastes médullaires (%)	Score Ogata	Caryotype	Score cytogénétique IPSS-R	ASXL1	SRSF2	SF3B1	NGS	GB	HB	PLQ	PNN	LY
M	56	SMD-EB-II	Very High	8,5	15	NR	complexe (-7, ...)	4	N	NR	NR	TP53+ (C275G) / bilan LA -	1,43	8,2	102	0,52	0,82
M	84	SMD-EB-II	Very High	9	13	NR	complexe (-5q, -7, -12, ...)	4	N	NR	NR	CEBPA+ et reste bilan LA -	1,5	6,8	75	1	IND
F	67	SMD-EB-I	High	5,5	8	3	2 clones dont un 5q- et trisomie 21	2	N	N	NR	NGS-	5,25	7,6	215	3,01	1,34
F	74	SMD-EB-I	High	5	9	4	trisomie 8	2	P	P	NR	NR	IND	8,3	138	1,2	IND
M	76	SMD-MLD	High	5	4	NR	2 clones dont un 20q- et un isochr dérivant de la del(20q)	2	N	N	NR	NR	2,68	8,9	39	1,73	0,41
M	85	SMD-EB-I	High	6	7	NR	complexe (-9q, -11q) avec un sous clone (-5, -7q, -17p)	3	N	N	NR	TP53+ (R273C)	2,68	10,5	44	1,42	0,88
M	74	SMD-RS-MLD	High	5,5	4	2	complexe (-7, -17, -20, -5q)	4	N	N	N	TP53+ (D259)	2,57	10	122	0,47	1,97

Tableau 12. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD High et SMD Very High

IND : information non disponible ; NR : non recherché ; Normal : lorsque l'information numérique de ce paramètre de la NFS est indisponible mais que le paramètre est normal d'après le compte rendu clinique ;

GB : leucocytes en G/L ; HB : hémoglobine en g/dL ; VGM : volume globulaire moyen en fL ; PLQ : plaquettes en G/L ; PNN : polynucléaires neutrophiles en G/L ; LY : lymphocytes en G/L

Cette Légende est valable pour les Tableau 12, Tableau 13, Tableau 14, Tableau 15 et Tableau 16.

Sexe	Age	Classification SMD OMS 2016	Groupe à risque IPSS-R	Score Global IPSS-R	Blastes médullaires (%)	Score Ogata	Caryotype	Score cytogénétique IPSS-R	ASXL1	SRSF2	SF3B1	NGS	GB	HB	PLQ	PNN	LY
M	73	SMD-EB-I	Int	3,5	9	4	46XY(20)	1	N	N	NR	<i>U2AF1+</i> , <i>DNMT3A+</i>	4,17	10,3	93	2,58	1,45
M	59	SMD-MLD	Int	3,5	2	0	2 clones : minoritaire trisomie 1q, -7q / majoritaire -Y	3	N	N	NR	<i>RUNX1+</i> , <i>U2AF1+</i>	6,55	13,7	97	4,35	1,38
F	72	SMD-EB-I	Int	4	8	NR	46XX(20)	1	N	N	NR	NGS-	1,88	11,2	72	0,79	0,95
M	73	SMD-EB-I	Int	4	9	2	46XY(20)	1	P	P	NR	<i>SRSF2+</i>	3,45	8,3	323	2,08	0,8
M	67	SMD-EB-I	Int	3,5	5	2	46XY(20)	1	N	N	NR	NR	2,16	11	201	0,36	1,41
F	72	SMD-MLD	Int	3,5	4	3	46XX(20)	1	P	N	P	NR	11,35	5,5	134	7,04	3,37

Tableau 13. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Intermediale

Sexe	Age	Classification SMD OMS 2016	Groupe à risque IPSS-R	Score Global IPSS-R	Blastes médullaires (%)	Score Ogata	Caryotype	Score cytogénétique IPSS-R	ASXL1	SRSF2	SF3B1	NGS	GB	HB	PLQ	PNN	LY
M	86	SMD-EB-I	Low	3	7	3	46XY(20)	1	P	N	NR	NR	3,47	12,9	156	1,6	0,87
F	69	SMD-MLD	Low	2	2	0	46XX(20)	1	N	N	NR	TET2+	5,1	8,8	251	Normal	Normal
F	71	SMD-EB-I	Low	3	5	2	46XX(20)	1	N	N	P	NR	Normal	11,6	Normal	Normal	Normal
F	71	SMD-MLD	Low	2,5	3	1	46XX(20)	1	N	P	NR	TET2+, PHF6+	4,83	11,7	75	2,76	1,34
F	77	SMD-MLD	Low	3	3	0	46XX(20)	1	N	N	NR	NR	6,99	9,5	285	5,41	0,9

Tableau 14. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Low

Sexe	Age	Classification SMD OMS 2016	Groupe à risque IPSS-R	Score Global IPSS-R	Blastes médullaires (%)	Score Ogata	Caryotype	Score cytogénétique IPSS-R	ASXL1	SRSF2	SF3B1	NGS	GB	HB	PLQ	PNN	LY
M	55	SMD-MLD	Very Low	1	1	1	46XY(20)	1	N	N	NR	<i>DNMT3A+</i>	3,17	12,5	269	1,85	0,94
F	88	SMD-MLD	Very Low	1	2	2	-20q	1	IND	IND	IND	IND	4,7	10,5	112	2,77	1,13
M	90	SMD-SLD	Very Low	0	2	2	-Y	0	N	N	NR	NR	4,85	10,2	156	3,12	1,21
M	75	SMD-MLD	Very Low	1	2	2	46XX(20)	1	P	N	NR	NR	Normal	10,3	Normal	Normal	Normal
F	67	SMD-MLD	Very Low	1,5	2	2	5q-	1	IND	IND	IND	IND	4,6	10	90	2,52	1,34
M	69	SMD-MLD	Very Low	0	2	1	-Y	0	N	N	NR	<i>RUNX1+, RIT1+, CBL+</i>	9,7	10,6	115	5,5	2,82
M	82	SMD-RS-MLD	Very Low	1	1	0	46XY(20)	1	N	N	N	NR	6,32	10,6	287	3,46	1,74
M	86	SMD-MLD	Very Low	1,5	1	1	-Y	0	N	N	NR	NR	8,22	6,7	241	6,77	0,8
M	79	SMD-MLD	Very Low	1	3	1	-Y	0	N	N	NR	TET2-	5,5	10,9	311	3,6	0,9
F	72	SMD-MLD	Very Low	1	2	1	46XX(20)	1	N	N	NR	NR	7,76	10	323	5,37	1,62

Tableau 15. Données démographiques et caractéristiques des patients SMD Very Low

Sexe	Age	Contexte clinique / Informations complémentaires	Conclusion myélogramme	Blastes médullaires (%)	GB	HB	VGM	PLQ	PNN	LY
F	64	suspicion de MGUS devant un pic IgG kappa / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques	Moelle de richesse moyenne, équilibrée, sans excès de plasmocytes.	2	4,4	13,3	90,5	204	2,8	1,07
F	35	bilan de fracture patiente jeune / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques	Moelle riche, équilibrée et polymorphe dans laquelle on retrouve de nombreux mégacaryocytes. Absence d'infiltration plasmocytaire. Pas de cellule anormale par ailleurs.	3	IND	IND	IND	IND	IND	IND
F	69	Bilan de fracture (ostéoporotique ?) et d'hypogammaglobulinémie	Moelle de richesse moyenne, grasseuse, équilibrée sans excès de plasmocytes.	3	9,59	11,4	86,6	323	8,44	0,57
M	88	Bilan d'anémie isolée chez un patient avec hémorragie digestive / immuno-phénotypage médullaire lymphocytaire B : population B polytypique	Moelle riche, avec mégacaryocytes présents, équilibrée, sans excès de blaste. Pas de cellule anormale. A noter la présence de polynucléaires hypersegmentés ainsi que de légers signes de dysérythropoïèse (carence ?). Aspect insuffisant pour poser le diagnostic de SMD.	2	6,57	8,5	79,3	360	4,5	1,21
M	65	Suspicion de MGUS devant un pic IgG / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B non disponibles	Moelle riche dans laquelle on retrouve de nombreux mégacaryocytes. Lignées granuleuse et érythroblastique équilibrées sans signe majeur de dysplasie. On note 3% de plasmocytes dont certains dystrophiques (rares petits amas). A confronter au reste du bilan.	2	IND	IND	IND	IND	IND	IND
F	76	Bilan d'hypogammaglobulinémie et de discrète Anémie / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques	Moelle plutôt riche pour l'âge mais équilibrée sans excès de lymphocytes ni de plasmocytes.	3	6,79	11,8	91,8	365	4,85	1,31
M	59	Suivi de MGUS avec pic IgG à 26g/L et découverte d'une hypercalcémie	Moelle riche avec un taux limite de plasmocytes (5%).	3	5,83	12,3	84,5	150	2,75	2,46
F	74	Bilan devant un pic IgM / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques MYD88 non muté	Moelle riche, avec nombreux mégacaryocytes, sans excès de blastes. Absence d'infiltration lymphoïde pathologique décelée cytologiquement.	1	5,79	13,3	85,9	299	2,72	2,31
F	58	Bilan devant un pic IgM / immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques	Moelle riche, équilibrée, avec mégacaryocytes présents, sans excès de blastes ni infiltration lymphoïde pathologique décelée cytologiquement.	2	6,21	13,7	85,3	208	4,47	1,37
M	80	Suspicion MGUS devant un pic IgG kappa immuno-phénotypage médullaire plasmocytaire et lymphocytaire B : populations polytypiques	Moelle riche dans laquelle on retrouve de nombreux mégacaryocytes. Absence d'excès de plasmocytes et d'infiltrat lymphocytaire pathologique cytologiquement décelable.	1	4,58	13,6	91,9	115	3,04	0,99

Tableau 16. Données démographiques et caractéristiques des témoins « contrôles ponctions »

	Contrôles ponctions n = 10	Contrôles têtes fémorales n = 12
Ly B-NK / Ly totaux (%)	25,3 (18,8 – 37,7)	35,7 (27,5 – 51,4)
Ly T / Ly totaux (%)	74,7 (62,2 – 81,2)	64,2 (48,7 – 72,4)
Ly T CD4+ / Ly totaux (%)	42,7 (33,5 – 27,1)	33,9 (27,1 – 40,4)
Ly T CD8+ / Ly totaux (%)	28,1 (20,3 – 35,5)	27,3 (18,5 – 32,3)
Ratio Ly T CD4+/CD8+	1,5 (1,0 – 2,8)	1,4 (1,0 – 2,0)
Tregs / Ly T CD4+ (%)	6,9 (5,8 – 8,0)	8,0 (7,2 – 10,0)
Tregs A / Tregs totaux (%)	45,8 (36,3 – 50,8)	42,6 (34,9 – 49,1)
Tregs B / Tregs totaux (%)	54,2 (49,2 – 63,7)	57,4 (50,9 – 65,1)
Tregs / Ly T (%)	3,6 (3,0 – 4,3)	3,9 (3,7 – 5,6)
Tregs / Ly totaux (%)	2,7 (2,0 – 3,3)	2,4 (2,2 – 3,1)
Ratio Ly T CD8+ / Tregs	10,5 (8,3 – 13,2)	12,7 (10,0 – 18,8)

Tableau 17. Quantification des sous-populations lymphocytaires et des lymphocytes T régulateurs chez les témoins : « contrôles ponctions » et « contrôles têtes fémorales »

Médiane (intervalle de confiance 95 %). La comparaison de l'ensemble des paramètres présentés ne montre pas de différence significative entre les 2 groupes.

	Témoins n = 22	SMD n = 28	SMD LOW n = 21	SMD HIGH n = 7
Ly B-NK / Ly totaux (%)	29,9 (26,8 – 42,0)	24,2 (21,2 – 29,5)	24,4 (21,2 – 30,0)	21,4 (11,2 – 38,1)
Ly T / Ly totaux (%)	70,1 (58,0 – 73,2)	75,8 (70,4 – 78,8)	75,5 (70,0 – 78,8)	78,6 (61,9 – 88,8)
Ly T CD4+ / Ly totaux (%)	35,5 (32,4 – 43,2)	39,0 (34,3 – 43,5)	40,6 (35,3 – 45,9)	33,2 (23,1 – 44,7)
Ly T CD8+ / Ly totaux (%)	27,3 (21,8 – 31,2)	33,0 (27,4 – 35,6)	29,1 (25,1 – 34,7)	35,5 (27,4 – 45,0)
Ratio Ly T CD4+/CD8+	1,45 (1,2 – 2,1)	1,1 (1,1 – 1,8)	1,2 (1,2 – 2,0)	0,8 (0,6 – 1,3)
Tregs / Ly T CD4+ (%)	7,6 (6,9 – 8,8)	7,0 (6,2 – 8,0)	6,9 (6,0 – 7,9)	7,0 (4,9 – 10,3)
Tregs A / Tregs totaux (%)	44,5 (38,0 – 47,3)	35,7 (29,0 – 38,4)	33,7 (28,0 – 39,9)	35,8 (23,9 – 42,1)
Tregs B / Tregs totaux (%)	55,4 (52,6 – 62,0)	64,3 (61,6 – 71,0)	66,3 (60,1 – 72,0)	64,2 (57,9 – 76,1)
Tregs / Ly T (%)	3,9 (3,6 – 4,8)	3,6 (3,1 – 4,3)	3,6 (3,1 – 4,5)	3,6 (1,9 – 4,7)
Tregs / Ly totaux (%)	2,4 (2,3 – 3,0)	2,7 (2,3 – 3,2)	2,6 (2,3 – 3,3)	3,1 (1,4 – 3,6)
Ratio Ly T CD8+ / Tregs	10,5 (8,3 – 13,2)	12,7 (10,0 – 18,8)	12,5 (9,3 – 15,3)	12,8 (3,0 – 38,4)

Tableau 18. Quantification des sous-populations lymphocytaires et des lymphocytes T régulateurs chez les patients et les témoins

Médiane (intervalle de confiance 95%)

	Témoins n = 9	SMD n = 20	SMD LOW n = 15	SMD HIGH n = 5
Tregs FlowSOM / Ly T CD4+ (%)	8.5 (7.1 – 10.9)	10.5 (8.7 – 12.8)	9.9 (7.6 – 12.7)	13.7 (8.2 – 16.8)
Cluster 11 (Tregs A) / Tregs totaux (%)	38.8 (27.7 – 43.1)	27.1 (21.1 – 39.1)	28.1 (17.5 – 39.2)	26.1 (11.9 – 58.8)
Cluster 4+8 (Tregs B) / Tregs totaux (%)	61.2 (56.9 – 72.3)	72.9 (60.9 – 78.9)	71.9 (60.8 – 82.6)	73.9 (41.2 – 88.1)
Cluster 8 (Tregs B CCR4-) / Tregs totaux (%)	51.7 (34.5 – 59.8)	31.7 (27.3 – 41.8)	33.9 (26.4 – 40.9)	28.0 (8.5 – 65.8)
Cluster 4 (Tregs B CCR4+) / Tregs totaux (%)	17.7 (10.5 – 24.4)	34.0 (27.2 – 43.6)	37.7 (28.0 – 48.1)	29.9 (9.3 – 45.6)

Tableau 19. Quantification des lymphocytes T régulateurs totaux, des clusters 11, 8 et 4 identifiés par *gating* automatisé chez les patients et les témoins

Médiane (intervalle de confiance 95%)

ETUDE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS DANS LES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES

Introduction. La dérégulation du système immunitaire observée chez les patients atteints de syndrome myélodysplasique (SMD) met en jeu des acteurs cellulaires et des mécanismes complexes qui favorisent le développement de la maladie et diffèrent selon son stade. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs), en tant que population immunosuppressive, jouent un rôle central dans ces perturbations. L'objectif de ce travail a consisté à quantifier et caractériser par cytométrie en flux les différentes sous-populations de Tregs chez des patients atteints de SMD.

Matériel et Méthodes. 28 échantillons médullaires de patients SMD classés selon l'IPSS-R ont été analysés (Navios, Beckman Coulter) et comparés à 22 prélèvements médullaires contrôles. Les Tregs ont d'abord été quantifiés à l'aide d'une stratégie de gating manuel CD3+ CD4+ CD25high CD127low avec le logiciel Kaluza. Une analyse non supervisée avec l'algorithme FlowSOM a ensuite été réalisée.

Résultats. Aucune différence significative du taux de Tregs n'est observée entre les patients SMD et les témoins. Cependant, une sous-population de lymphocytes Tregs mémoires et activés (CD45RA- CD95+) est significativement augmentée chez les patients SMD. L'analyse réalisée avec l'algorithme FlowSOM montre qu'il s'agit en fait de la sous-population de Tregs CD45RA- CD95+ exprimant CCR4 qui est augmentée dans les SMD.

Conclusion. Ces résultats ont permis l'identification d'une sous-population de Tregs CD45RA- CD95+ CCR4+ augmentée dans les SMD, connue pour être dotée de fonctions immunosuppressives plus importantes et dont l'expression de CCR4 pourrait permettre le recrutement préférentiel de ces cellules au niveau médullaire.

QUANTIFICATION BY FLOW CYTOMETRY OF REGULATORY T CELLS IN MYELODYSPLASIC SYNDROMES

Introduction. The immune system is frequently deregulated in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). Many cell types and complex mechanisms are implicated in this deregulation which sustains progression of MDS. Regulatory T cells (Tregs) are known to induce immunosuppression and play a pivotal role in these modifications. The objective of this study was to evaluate and characterize distinct Tregs sub-populations in patients with MDS by flow cytometry.

Material and Methods. 28 bone marrow samples from patients with MDS classified according the IPSS-R were analysed (Navios, Beckman Coulter) and compared to 22 control samples. First, Tregs were quantified using a manual gating strategy CD3+ CD4+ CD25high CD127low with the Kaluza software. Then, an unsupervised strategy using FlowSOM was used.

Results. No significant difference was observed between MDS and control samples according the Tregs quantification. However, a fraction of memory and activated Tregs characterized by the phenotype CD45RA- CD95+ was significantly increased in patients with MDS. Finally, the analysis performed with the FlowSOM algorithm revealed that this CD45RA- CD95+ Tregs population increased in MDS also express CCR4.

Conclusion. These results led to the identification of an increased population of Tregs CD45RA- CD95+ in bone marrow of patients with MDS. Interestingly, this population which is reported to have a high immunosuppressive capacity, also express CCR4 probably leading to the specific recruitment of these cells in bone marrow of patients with MDS.

Mots clés : syndrome myélodysplasique, lymphocytes T régulateurs, cytométrie en flux, FlowSOM.
Keywords : myelodysplastic syndrome, regulatory T cells, flow cytometry, FlowSOM.

Faculté Médecine Paris Descartes
15, rue de l'école de médecine, 75006 Paris