



HAL
open science

L'intérêt de la cytométrie en flux dans le diagnostic et la quantification des cellules blastiques des syndromes myélodysplasiques

Ella Hadj Khalifa

► **To cite this version:**

Ella Hadj Khalifa. L'intérêt de la cytométrie en flux dans le diagnostic et la quantification des cellules blastiques des syndromes myélodysplasiques. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03213001

HAL Id: dumas-03213001

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03213001>

Submitted on 30 Apr 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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2020

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 30.09.2020

par

HADJ KHALIFA Ella

Née le 13.02.1994 à Cannes

***L'intérêt de la cytométrie en flux dans le diagnostic
et la quantification des cellules blastiques des
syndromes myélodysplasiques.***

Président du jury : Pr. Loïc FAVENNEC

Directeur de thèse : Dr. Gérard BUCHONNET

Membres du jury : Dr. Elsa BERA

Pr. Fabrice JARDIN

Dr. Aspasia STAMATOULLAS-BASTARD

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN :

Professeur Benoît VEBER

ASSESEURS :

Professeur Loïc FAVENNEC

Professeur Agnès LIARD

Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes

Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale

Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (détachement)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CASTANHEIRO-MATIAS	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE-BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN** Anglais

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice **MOISAN** Virologie
M. Henri **GONDÉ** Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel **MOUHAJIR** Parasitologie
M. Maxime **GRAND** Bactériologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla **SALHI** Pharmacognosie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON** Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** Physiologie
Mme Elisabeth **CHOSSON** Botanique
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation et économie de la santé
Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie
Mr Abdelhakim **EL OMRI** Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR** Chimie organique
Mr Loïc **FAVENNEC** Parasitologie
Mr Michel **GUERBET** Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** Microbiologie
Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique
Mr Rémi **VARIN** Pharmacie clinique
M. Jean-Marie **VAUGEOIS** Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

III- MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO - APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med) Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med) Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (med) Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med) Physiologie

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med) Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN** Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med) Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :

Mme Véronique **DELAFONTAINE** HCN - Hôpital Charles Nicolle HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME CB - Centre Henri Becquerel CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray CRMPPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation in improbations.

Table des matières

Table des Tableaux	14
Table des Figures	15
I. Les syndromes myélodysplasiques	17
A. Définition	17
B. Épidémiologie	17
C. Physiopathologie	18
1. Hématopoïèse inefficace.....	19
2. Mutations somatiques dans les SMD.....	20
3. Le microenvironnement.....	25
4. Le système immunitaire.....	28
D. Étiologies et facteurs de risque	31
E. Classification	32
1. Classification Franco-américaine Britannique (FAB).....	32
2. Classification de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS).....	33
F. Scores de pronostic	37
1. Le score IPSS (International Prognostic Scoring System).....	37
2. Le score WPSS (WHO- Based Prognostic Scoring System).....	38
3. Le score IPSS-R (International Prognostic Scoring System-Revised).....	39
4. Autres classifications pronostiques.....	41
G. Traitement	42
1. Prise en charge des SMD de faible risque (SMD-LR) avec IPSS faible ou intermédiaire 1.....	42
2. Prise en charge des SMD de haut risque (SMD-HR) avec un IPSS élevé ou intermédiaire 2.....	47
II. Diagnostic d'un SMD	51
A. Signes cliniques et circonstances de découverte	51
B. Hémogramme	51
1. Numération sanguine.....	51
2. Formule sanguine.....	52
C. Myélogramme	54
D. La génétique	62
1. La cytogénétique conventionnelle : le caryotype.....	62
2. Place de la technique d'hybridation in situ.....	64
3. Apport des nouvelles technologies : séquençage haut débit.....	65

E.	Autres analyses biologiques.....	67
F.	Diagnostic différentiel.....	68
1.	Autres causes de dysmyélopoïèse.....	68
2.	Autres hémopathies.....	68
3.	Critères de définition des SMD.....	69
III.	<i>Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic des SMD.....</i>	72
A.	Généralité sur cytométrie en flux.....	72
B.	Développement de la CMF dans les SMD.....	75
1.	Flow Cytometric Scoring System (2003) : score pronostiques.....	75
2.	Standardisation de la CMF dans les SMD par ELN.....	76
3.	Score d'Ogata : score diagnostic.....	79
C.	L'analyse des différentes lignées par CMF dans les SMD.....	84
1.	La lignée érythroïde.....	84
2.	Étude de la lignée plaquettaire.....	90
3.	Étude des progéniteurs lymphoïdes.....	91
4.	Étude de la lignée blastique.....	93
5.	Étude de la lignée monocytaire.....	98
IV.	<i>Travail du mémoire de DES.....</i>	101
	<i>Bibliographie.....</i>	103

Table des Tableaux

Tableau 1 : L'altération de la répartition des lymphocytes chez les patients atteints de SMD (de faible ou du haut risque) par rapport à des sujets normaux.

Tableau 2 : Classification FAB des SMD.

Tableau 3 : Classification OMS 2016 des SMD.

Tableau 4 : Calcul du score IPSS

Tableau 5 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS.

Tableau 6 : Groupes de risques issus du score IPSS.

Tableau 7 : Groupes pronostiques du score IPSS.

Tableau 8 : Calcul du score pronostic WPSS

Tableau 9 : Calcul du score IPSS –R

Tableau 10 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS-R.

Tableau 11 : Groupes de risques issus du score IPSS-R.

Tableau 12 : Système de notation pronostique LR-PSS

Tableau 13 : Fréquences des anomalies cytogénétiques décrites au diagnostic des SMD. (p : bras court du chromosome, q : bras long du chromosome)

Tableau 14 : Autres analyses biologiques nécessaire au diagnostic de SMD recommandé par GFM.

Tableau 15 : Résumé des recommandations de ELN concernant les méthodes standards d'échantillonnage, de manipulation et de traitement des cellules médullaires pour la CMF.

Tableau 16 : Exigences minimales recommandées pour évaluer la dysplasie par CMF selon ELN.

Tableau 17 : Valeurs seuils définies pour les quatre paramètres analysés en CMF.

Tableau 18 : Détails du calcul du RED-score basé sur 3 paramètres.

Tableau 19 : Liste des marqueurs utilisés pour calculer le score d'Ogata et quantifier les blastes.

Table des Figures

- Figure 1** : Incidence des SMD sur différent groupe d'âge aux États-Unis.
- Figure 2** : Incidence des patients atteints du SMD par sexe et par âge aux États-Unis.
- Figure 3** : Mécanismes physiopathologiques dans les SMD.
- Figure 4** : Catégories de gènes communément mutés dans le SMD avec l'indication de leur fréquence estimée.
- Figure 5** : Impact des mutations inactivatrices de TET2.
- Figure 6** : Rôle des isocitrates déshydrogénases (IDH 1 & 2) dans l'activation de la protéine TET2.
- Figure 7** : Impact des mutations des gènes EZH2 et UTX.
- Figure 8** : Structure multi-protéique de la cohésine en forme d'anneau.
- Figure 9** : Incidence des mutations génétiques courantes dans les SMD.
- Figure 10** : Progression par étape de la pathogénèse des SMD au sein du microenvironnement de la MO.
- Figure 11** : Mécanismes hypothétiques de la réponse immunitaire dans les SMD
- Figure 12** : Évolution des systèmes de classification des SMD.
- Figure 13** : Courbe de survie des patients atteints de SMD d'après le système de notation pronostique LR-PSS.
- Figure 14** : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de faible risque (IPSS faible ou intermédiaire 1) selon les recommandations du Groupe Francophone des Myélodysplasies.
- Figure 15** : Intervention thérapeutique précoce dans l'anémie des SMD de faible risque.
- Figure 16** : Mécanisme d'action du Luspatercept.
- Figure 17** : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de haut risque (IPSS élevé ou intermédiaire II) en dehors de l'allogreffe selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies.
- Figure 18** : Allogreffe de CSH dans les SMD selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies.
- Figure 19** : Dysérythroïèse : anomalie des hématies sur frottis de sang (A x40, B x 63)
- Figure 20** : Dismégacaryoïèse : anomalies des plaquettes sur frottis de sang (x63).
- Figure 21** : Dysgranuloïèse : anomalies des polynucléaires neutrophiles sur frottis de sang (x63).
- Figure 22** : Illustrations de richesse médullaire (coloration MGG, grossissement x 10).
- Figure 23** : Blastes sur frottis de MO (x 63).
- Figure 24** : Illustrations de dysmégacaryoïèse avec des mégacaryocytes hypolobés sur frottis de MO (A à C, x63 ; D x40).
- Figure 25** : Illustrations de dysmégacaryoïèse avec des mégacaryocytes bi- et multinucléés sur frottis de MO (A, B, x63 ; C, D, x 40)
- Figure 26** : Illustrations de dysmégacaryoïèse : micromégacaryocytes entourés de plaquettes sur frottis de MO (A à C x63).
- Figure 27** : Illustration de la dysgranuloïèse sur frottis de MO (A à D, x63).
- Figure 28** : Illustrations de la dysérythroïèse sur frottis de MO (A à J, x63).
- Figure 29** : Illustrations de la dysérythroïèse sur la coloration de Perls sur un frottis de MO (A, B, x40 ; C à E, x63).
- Figure 30** : Pronostique des mutations somatiques mises en évidence par le panel NGS des SMD.
- Figure 31** : Essais cliniques de différentes cibles moléculaires et thérapeutiques dans les SMD.
- Figure 32** : Critères de définition des SMD, Cytopénie Clonale et Idiopathique de signification Indéterminée, en comparaison à ceux d'une CHIP.

Figure 33 : Relation entre la cytopénie, la dysplasie et la clonalité dans les états précurseurs et le SMD.

Figure 34: Les composants de base d'un cymomètre en flux.

Figure 35: Propriété de diffusion de la lumière d'une cellule.

Figure 36 : Information obtenus par CMF à partir d'un échantillon de sang périphérique.

Figure 37 : Exemple d'anomalie retrouvé dans des moelles de patients atteints de SMD.

Figure 38 : Analyse de quatre paramètres cardinaux à partir d'une aliquote de cellule unique colorée avec des anticorps CD10-FITC, CD34-PE et CD45-PerCP.

Figure 39 : Comparaison entre les scores Ogata classiques (à gauche) et étendus (à droite).

Figure 40 : Stratégie utilisée pour définir l'analyse du compartiment érythroïde sur un échantillon de MO lysée.

Figure 41 : Schéma caractéristique du développement érythroïde normal avec la cohérence de la corrélation entre l'expression de CD235a et CD71 sur des échantillons de MO.

Figure 42 : Intensités de l'expression des antigènes de surface durant la maturation de la lignée érythroïde.

Figure 43 : Comparaison de l'expression de CD71 et CD36 chez les patients atteints de SMD et les témoins de la cohorte d'apprentissage.

Figure 44 : Relation d'intensité entre CD105 et CD45.

Figure 45 : Histogrammes mono paramétriques illustrant les aberrations immunophénotypiques présentes sur les plaquettes de sujet atteint de SMD (gris) et de sujets sains (noir).

Figure 46 : Comparaison de la survie globale médiane.

Figure 47 : Identification de la région blastique grâce au CD45 et SSC dans une MO d'un individu sain.

Figure 48 : Exemple de résultats obtenus pour le comptage des blastes chez un patient atteint de SMD.

Figure 49 : Distinction entre le modèle d'expression des blastes (CD34+, CD13+, HLA-DR+) de sujets sains versus patients atteint de SMD.

Figure 50: Proportion de cellules CD34 + immature comparant MO normale et SMD de faible et de haut risque. Les cellules immatures (noires), myéloïdes (rouges) et engagées par lymphoïde B (bleu) sont observées.

Figure 51: Intensité moyenne de fluorescence du CD38+ de la population totale de CD34+ chez des patients atteints de SMD et les populations témoins.

Figure 52 : Représentation des trois sous-types de monocytes, selon l'expression du CD14 et du CD16 chez un individu sain.

Figure 53 : Représentation multicolore de la répartition des sous-ensembles de monocytes dans le sang périphérique recueilli auprès de groupe distinct de la cohorte d'apprentissage.

Figure 54 : Pourcentage de monocytes classique (MO1) au sein des différentes catégories de patients de la cohorte d'apprentissage.

I. Les syndromes myélodysplasiques.

A. Définition.

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont un groupe hétérogène d'affections clonales des cellules souches hématopoïétiques (CSH)¹. La maladie se caractérise par une hématopoïèse inefficace, par défaut de production de cellules matures, se traduisant par une ou plusieurs cytopénies périphériques et contrastant avec une moelle souvent riche. Ceci est lié à la dysmyélopoïèse, à l'origine d'une prolifération excessive de précurseurs myéloïdes se différenciant de manière anormale. Ces anomalies de maturation se traduisent alors par des dysplasies sur une ou plusieurs lignées hématopoïétiques, à l'origine d'une apoptose excessive des précurseurs médullaires². Il s'agit d'un état pré-leucémique, au vu de l'instabilité génétique, avec une évolution possible vers une leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans environ un tiers des cas³. Leur diagnostic est souvent délicat, notamment dans les formes de bas grade, retardant ainsi une prise en charge appropriée pour les patients.

B. Épidémiologie.

Les SMD sont un groupe de pathologie qui touche préférentiellement les sujets âgés, avec un âge médian de diagnostic de 77 ans et dont l'incidence augmente avec l'âge⁴. En effet, l'incidence globale des SMD est estimée en moyenne à 4-5 cas pour 100 000 personnes par an, alors qu'à 70 ans elle est supérieure à 20 cas pour 100 000 personnes par an et augmente jusqu'à 50 cas pour 100 000 personnes par an à l'âge de 80 ans (**Fig. 1**). Ainsi, 86 % des patients au diagnostic ont plus de 60 ans et seulement 6,7 % ont moins de 50 ans. C'est d'ailleurs l'hémopathie maligne la plus fréquente au sein de cette population⁵.

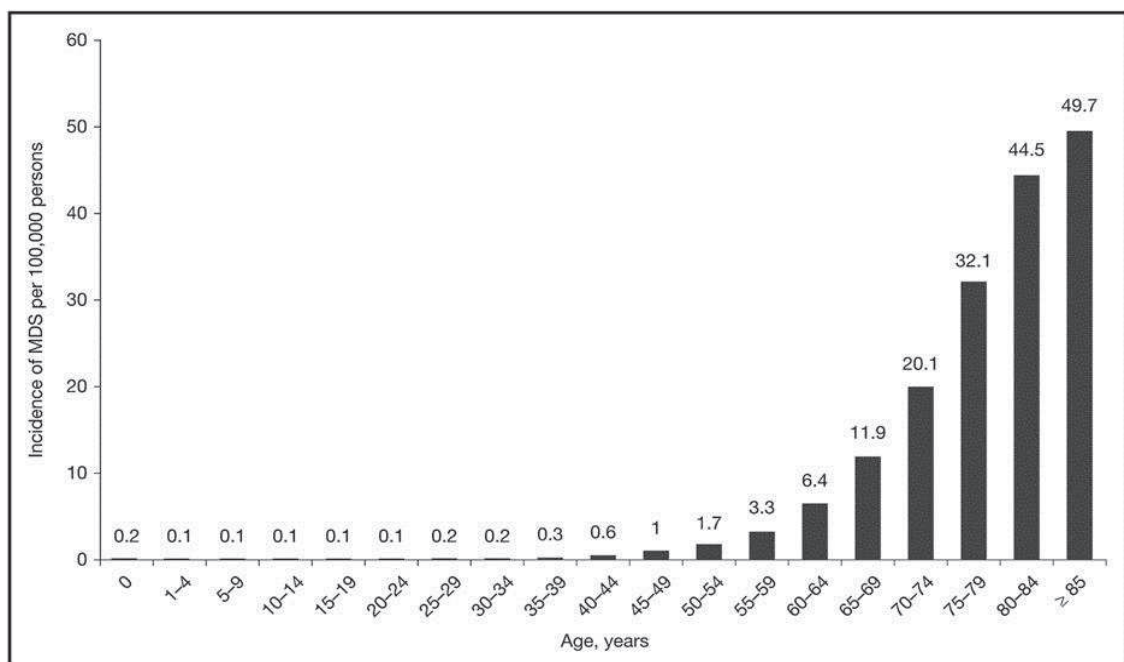


Figure 1 : Incidence des SMD sur différent groupe d'âge aux États Unis.

Ma, X. *Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. The American Journal of Medicine* **125**, S2-S5 (2012). ⁵

Les SMD sont plus fréquents chez l'homme avec une incidence à 4,5 cas pour 100 000 habitants par an contre 2,7 cas pour la femme ⁴⁻⁶ (**Fig. 2**). On observe de très rares cas chez l'enfant et en général de pronostic très péjoratif⁷. L'incidence varie selon les ethnies, avec un taux d'incidence plus élevé chez les Caucasiens (3,5/100 000 les deux sexes confondus), qui diminue chez les Afro-Américains (3,0/100 000), les Asiatiques (2,6/100 000) puis chez les Indiens Américains (1,3/100 000) ⁸.

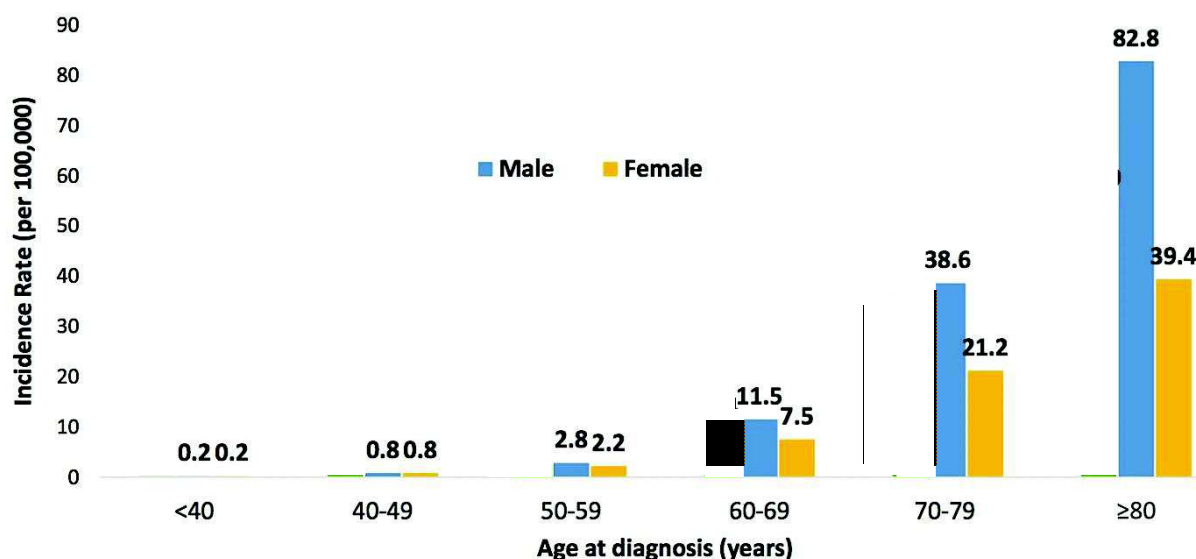


Figure 2 : Incidence des patients atteints de SMD par sexe et par âge aux États-Unis.

Zeidan, A. M., Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A. & Ma, X. *Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. Blood Reviews 34, 1–15 (2019).*⁶

De plus, d'après les données du Registre régional des hémopathies malignes de Basse-Normandie (RRHMBN), les SMD représentent 13 % de l'ensemble des hémopathies malignes. Et, les anémies réfractaires (AR) sont les plus fréquentes et représentent près de la moitié (48,4 %) de l'ensemble des SMD ⁸.

C. Physiopathologie.

La physiopathologie des SMD est un processus complexe impliquant plusieurs étapes. Bien qu'historiquement le SMD n'ait pas toujours été défini comme un cancer, il résulte de l'expansion clonale d'une CSH au sein de laquelle sont survenus différents événements oncogéniques successifs. Les événements précoces sont responsables de l'émergence d'une hématopoïèse clonale inefficace, devenant progressivement majoritaire au sein de la moelle^{1,3} (**Fig. 3**). Ce mécanisme s'apparente donc bien à celui d'un cancer¹.

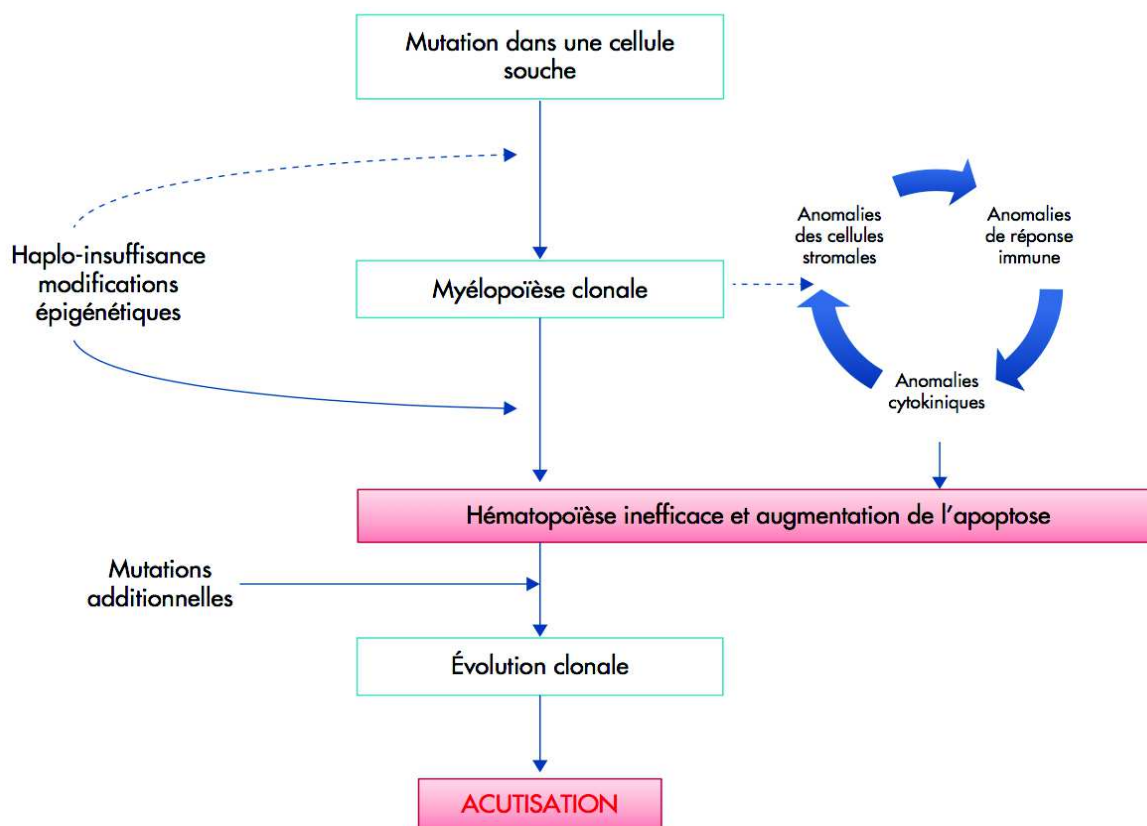


Figure 3 : Mécanismes physiopathologiques dans les SMD.

Roux C, Roulin L. Généralités sur les syndromes myélodysplasiques : épidémiologie, diagnostic et principes de traitement. *Hématologie*. (2016)¹

Plusieurs mécanismes favorisent l'apparition d'une myélopoïèse clonale : les mutations au sein de la CSH, l'haplo-insuffisance (perte d'un allèle fonctionnel), les modifications épigénétiques, délétions chromosomiques, mécanismes liés au microenvironnement, l'altération de la réponse immune et de la réponse aux cytokines. L'ensemble aboutit à une hématopoïèse inefficace par augmentation de l'apoptose⁹. Ces anomalies favorisent ensuite la survenue d'évènements secondaires qui vont procurer aux cellules malignes un avantage prolifératif favorisant une évolution clonale aboutissant à la transformation leucémique.

1. Hématopoïèse inefficace.

L'hématopoïèse inefficace dans les SMD résulte de la susceptibilité accrue des précurseurs myéloïdes clonaux à l'apoptose. L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus physiologique normal par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal inducteur d'apoptose (= signal de mort).

Chez les patients atteints de SMD au stade précoce de la maladie, des niveaux relativement élevés de protéines pré-apoptotiques tel que *TNF- α* , *IFN- γ* ont été détectés. Puis, lorsque la maladie évolue, les cellules dysplasiques développent alors des mécanismes de résistance à l'apoptose à l'origine d'une augmentation de la prolifération et une progression vers une LAM¹⁰. Cette progression serait liée à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, tel que *TP53* et contribuerait ainsi à l'expansion clonale¹¹.

2. Mutations somatiques dans les SMD.

L'avènement des nouvelles technologies de séquençage du génome à haut débit (NGS) a permis une résolution plus fine des analyses génétiques. L'évolution des données suggère que les mutations somatiques et germinales sont également des marqueurs clés de la clonalité. Au moins une mutation génétique a été identifiée chez 70 à 90% des patients atteints de SMD¹². Il est important de noter qu'environ les deux tiers de ces mutations génétiques se trouvent chez les patients ayant un caryotype normal¹². Les gènes fréquemment mutés dans les SMD sont regroupés dans des panels NGS « SMD ». Ainsi les mutations somatiques récurrentes retrouvées sont divisées en catégories fonctionnelles : gènes impliqués dans l'épissage de l'ARN, la régulation épigénétiques (méthylation de l'ADN et modification des histones), la transcription de l'ADN, la traduction du signal et la cohésion des chromatides. L'acquisition de ces mutations somatiques est souvent associée à phénotypes cliniques spécifiques (Fig. 4)¹³.

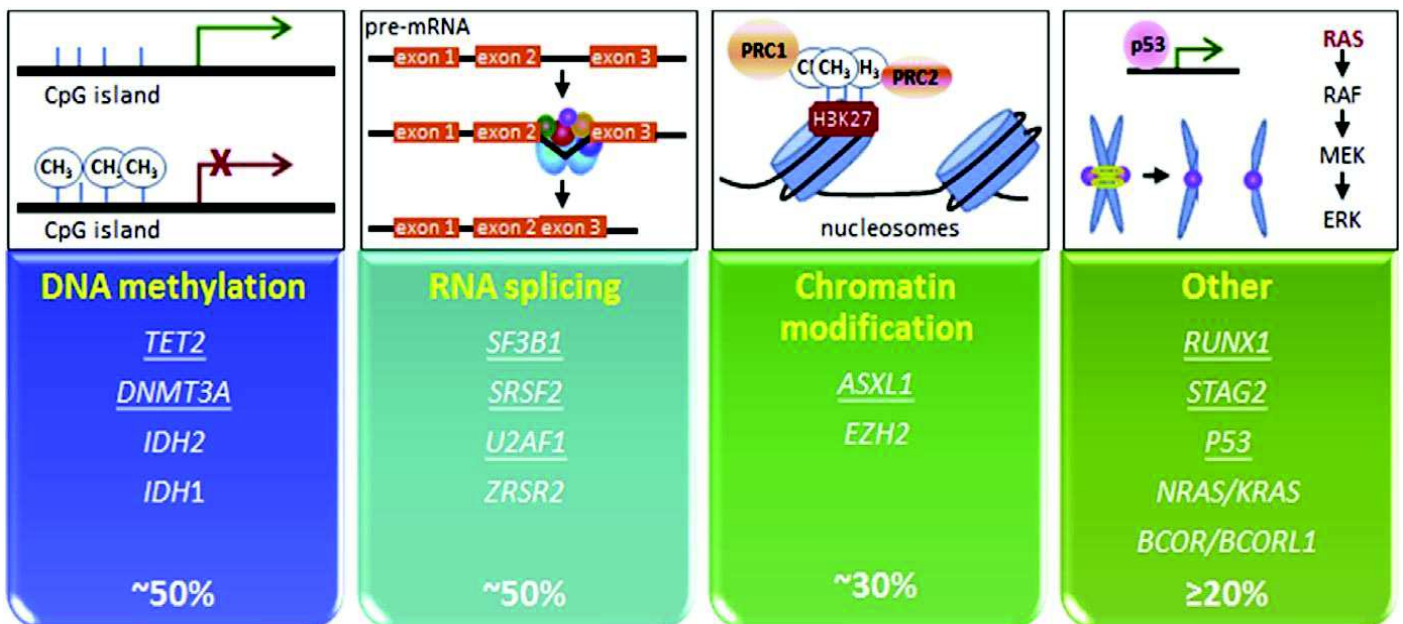


Figure 4 : Catégories de gènes communément mutés dans le SMD avec l'indication de leur fréquence estimée. Chacun des gènes soulignés est signalé comme présent dans plus de 10% des cas de SMD.

Dao, K.-H. T. (2017). Myelodysplastic Syndromes. *Medical Clinics of North America*, 101(2), 333–350. ¹³

a) Mutation somatique au sein des gènes impliqués dans l'épissage de l'ARN.

L'épissage des pré-ARN messagers joue un rôle majeur dans la régulation des protéines. La plupart des gènes humains subissent un épissage par l'activation du spliceosome (complexe de cinq petites ribonucléoprotéines nucléaires (*snRNPs*), *U1*, *U2*, *U4*, *U5* et *U6*, associés à plusieurs autres protéines). Les mutations dans les gènes des facteurs d'épissage ou dans la machinerie du spliceosome, constituent la majorité des mutations génétique dans les SMD ¹⁴.

Les gènes d'épissage d'ARN (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) sont mutés dans plusieurs tumeurs malignes hématologiques, y compris dans les LAM, mais sont fortement associés au phénotype de SMD, considérées parfois même comme des mutations fondatrices. En effet, ces mutations sont généralement hétérozygotes et surviennent chez plus de la moitié de tous les patients atteints de SMD *de novo*, constituant ainsi les anomalies moléculaires les plus courantes de cette hémopathie maligne. Ces mutations peuvent être retrouvées isolément ou associées de manière spécifique avec d'autres gènes mutés (régulateurs épigénétiques ou d'autres oncogènes) de façon récurrente¹⁵.

Les mutations du gène *SF3B1*, qui code pour une sous-unité clé du spliceosome, ont été parmi les premières mutations spliceosomales découvertes dans les SMD et sont maintenant reconnues comme la mutation du facteur d'épissage la plus courante chez ces patients, survenant dans 20% à 35% des cas¹². Les mutations *SF3B1* sont fortement associées à la présence de sidéroblastes en couronne dans la moelle osseuse (MO) et prédisent un pronostic favorable tandis que les mutations *SRSF2* et *U2AF1* ont été associées à un risque plus élevé de transformation en LAM mais sont présent dans de moindre mesure. En effet, les mutations de *SRSF2* sont décrites dans 10% à 15 % des cas de SMD, les mutations *U2AF1* dans 5 à 10 % des SMD ainsi que les mutations de *ZRSR2* dans moins de 5% des SMD¹².

b) Mutation somatique au sein de la régulation épigénétique.

Parmi les mutations de méthylation de l'ADN, la plus répandue dans les SMD se produit au sein du gène *TET2* (*Ten-Eleven-Translocation-2*). Les protéines de la famille *TET* sont des dioxygénases dépendante de l' α kétoglutarate qui catalysent l'oxydation de la 5-méthylcytosine (5-MC) en 5- α hydroxyméthylcytosine (5-HMC) au sein des îlots de CpG. Ces nucléotides 5-HMC sont ensuite excisés et remplacés par des cytosines non méthylés par un mécanisme de réparation de l'ADN, ceci constituerait une étape clé de déméthylation qu'elle soit active ou passive (**Fig.5**). Le résultat est une déméthylation de l'ADN qui, lorsqu'elle affecte les îlots CpG au niveau d'un promoteur, favorise la transcription d'un gène. Ainsi, les protéines *TET* seraient donc impliquées dans la régulation épigénétique de la transcription. Les mutations (généralement inactivatrices) de *TET2* sont responsables d'une accumulation de la 5-MC qui induit une hyperméthylation de l'ADN, potentiellement au niveau des gènes suppresseurs de tumeur (**Fig.5**). Les mutations *TET2* sont présentent dans 11-26% des patients atteints de SMD¹⁶.

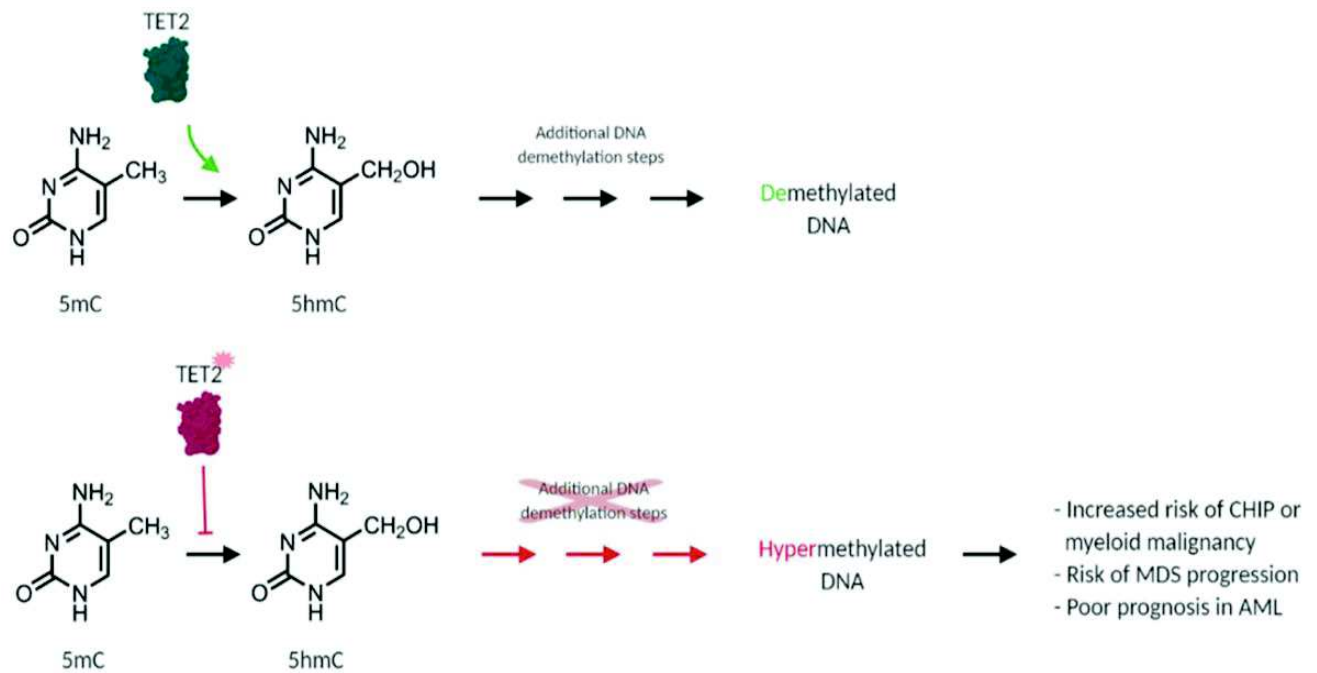


Figure 5 : Impact des mutations inactivatrices de TET2.

Ferrone et al. - 2020 - Age-Associated TET2 Mutations Common Drivers of Myeloid Dysfunction, Cancer and Cardiovascular Disease¹⁷

Par ailleurs, la conversion de 5-MC et 5-HMC par TET2 nécessite la présence d' α -kétoglutarate obtenue via le cycle de Krebs à partir de l'isocitrate grâce aux isoenzymes d'isocitrate déshydrogénases IDH1/2 (Fig.6). Les mutations des gènes d>IDH1/IDH2 aboutissent donc également à l'inactivation de la protéine TET2, et sont retrouvées dans 5 à 10 % des SMD¹².

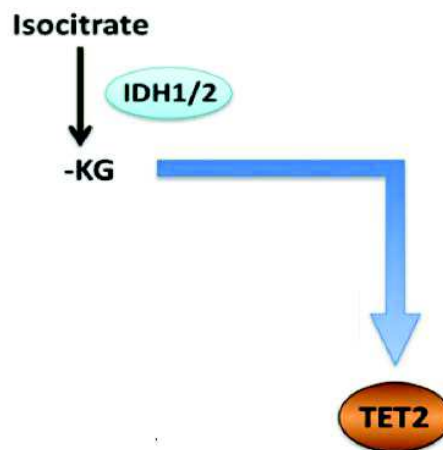


Figure 6 : Rôle des isocitrate déshydrogénases (IDH 1 & 2) dans l'activation de la protéine TET2.

Nakajima et Kunimoto - 2014 - iTET2i as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis.¹⁸

La méthylation de l'ADN peut être affectée directement par altération des ADN méthyltransférases (DNMT). DNMT3A est une enzyme de cette famille. Elle catalyse la méthylation des cytosines au niveau des îlots CpG, générant des molécules de 5-méthylcytosine (5-MC). La méthylation des cytosines des îlots CpG sur les régions promotrices des gènes diminue la transcription de ces gènes. Ainsi, des mutations inactivatrices avec perte de fonction de DNMT3A sont retrouvées dans 7 à 10 % des SMD¹².

Les gènes de la méthylation des histones impliqués dans les SMD font partis des protéines du groupe des polycomb. Les protéines du groupe des polycomb sont une famille de complexes protéiques qui peuvent remodeler la chromatine de telle sorte à pouvoir activer ou inactiver l'épigénétique des gènes. Le gène *EZH2* code pour une histone méthyl-transférase de ce groupe qui induit la condensation de la chromatine et inactive donc la transcription génétique. Au contraire, les gènes *UTX* et *ASXL1* joueraient un rôle dans le maintien de la conformation ouverte de la chromatine et donc permettraient l'activation de la transcription génétique. Les mutations observées au cours des SMD sont des mutations inactivatrices pour les gènes *ASXL1* et *UTX* entraînant ainsi un état de répression de l'ADN, avec une chromatine dense et des mutations activatrices pour le gène *EZH2* entraînant l'activation de la transcription génétique (**Fig.7**)¹⁹.

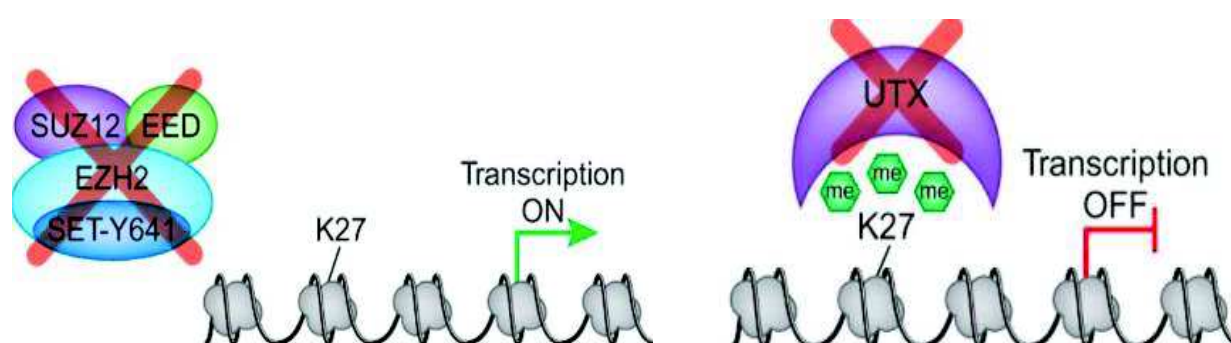


Figure 7 : Impact des mutations des gènes EZH2 et UTX.

*Martinez-Garcia et Licht - 2010 - Deregulation of H3K27 methylation in cancer.*²⁰

Ces fréquentes mutations épigénétiques ont conduit à développer des thérapeutiques permettant de renverser ces phénomènes tels que les agents déméthylants (Azacitidine et Décitabine) et les inhibiteurs d'histone acétylase.

c) Régulation de la transcription de l'ADN.

Les gènes mutés impliqués dans la régulation de la transcription ont également contribué à la pathogenèse du SMD. *RUNX1* est un facteur de transcription clé dans l'hématopoïèse. Des mutations inactivatrices de *RUNX1* ont été identifiées dans les SMD, surtout les SMD secondaires aux agents alkylants¹².

Enfin, les mutations du gène de la protéine tumorale *p53*, protéine impliquée dans la machinerie de réparation de l'ADN et aussi dans la régulation de l'auto-renouveau des CSH, sont retrouvées dans moins de 10 % des SMD, presque exclusivement dans les SMD avec caryotype complexe ou avec del (5q) isolée et sont de mauvais pronostic^{21,22}.

d) Traduction du signal.

Les protéines RAS (*NRAS*, *KRAS*, *HRAS*, *PTPN11*) sont une famille de protéines ayant un rôle de proto-oncogènes et sont impliquées dans la traduction du signal. Leurs mutations représentent environ 5 à 10% des cas de SMD, et ont tendance à être mutuellement exclusifs¹².

e) Cohésine des chromatines.

La cohésine est un complexe multi-protéique exprimé de manière omniprésente, mieux connue pour son implication dans la cohésion des chromatides sœurs, mais qui joue également un rôle important dans le maintien de la structure de la chromatine, l'expression des gènes et la réparation de l'ADN. *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A* et *SMC3* sont des gènes qui composent ce multimètre en forme d'anneau (Fig.8). Lorsque la structure de la chromatine est mutée, les facteurs de transcription sont exposés aux mécanismes cellulaires qui peuvent conduire à une réplication aberrante. Les mutations dans les gènes codant pour les composants du complexe de cohésine représentent environ 10% des SMD^{12,23}.

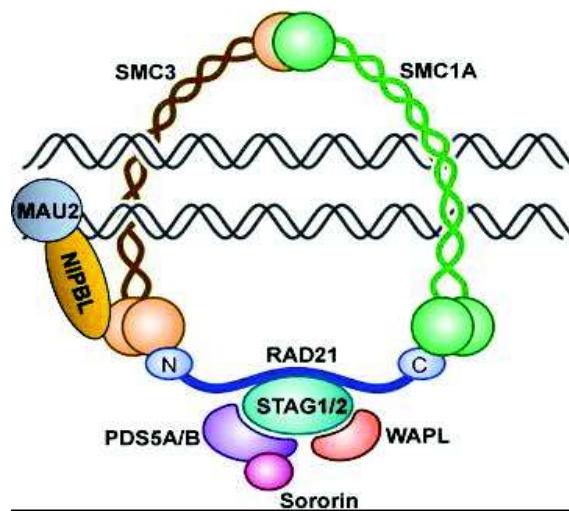


Figure 8 : Structure multi-protéique de la cohésine en forme d'anneau.

D. A. Solomon -2014- Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance²⁴.

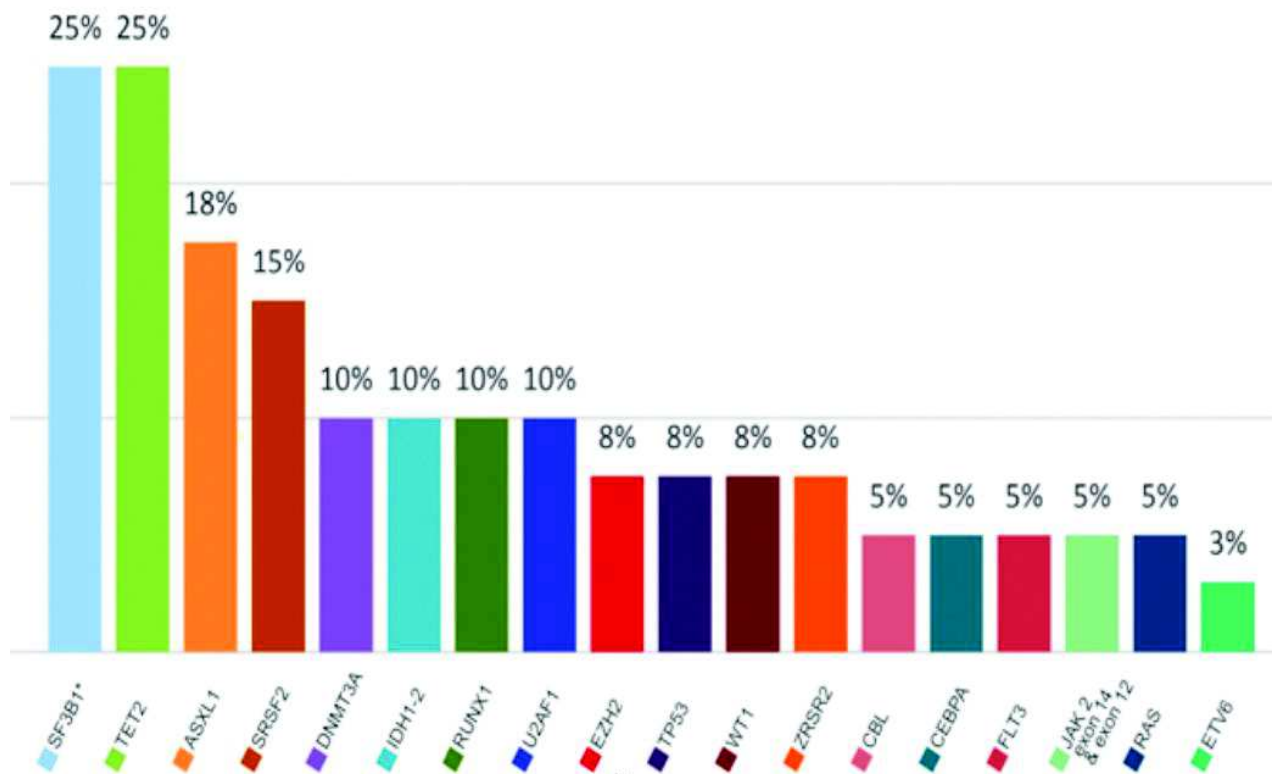


Figure 9 : Incidence des mutations génétiques courantes dans les SMD.

Eurofins- Biomis- Panel NGS²⁵

En résumé, dans les SMD, la plupart des mutations génétiques sont non spécifiques car sont également rencontrées dans d'autres hémopathies myéloïdes¹². Cependant, elles permettent d'affiner le pronostic. A noter qu'en revanche, ces mutations sont indépendantes des facteurs de risque établis. En effet, elles ne sont pas incluses dans les systèmes de notations pronostiques actuels (IPSS et IPPS-R). Enfin certains laissent envisager l'adjonction de traitement ciblés dans la prise en charge des SMD.

3. Le microenvironnement.

Bien que l'identification récente de nombreuses aberrations chromosomiques, génétiques et épigénétiques chez les patients atteints de SMD a contribué de manière significative à la compréhension de la pathogenèse, il apparaît que les cellules du stroma de la MO jouent également un rôle crucial dans l'expression et la prolifération du clone chez les patients atteints de SMD²⁶.

La MO est un tissu complexe contenant des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques à renouvellement autonome qui génèrent des descendants qui se différencient progressivement en cellules matures dans le sang. La régulation de l'hématopoïèse et le maintien du pool de CSH sont médiés aux moins en partie par les constituants du microenvironnement de la MO principalement par les cellules stromales mésenchymateuses, les cellules de la lignée ostéoblastique et les cellules endothéliales.

Par conséquent, le dysfonctionnement de ces populations peut également contribuer à la physiopathologie des hémopathies, y compris dans les SMD. Ainsi les anomalies du microenvironnement de la MO sont des contributeurs clés de la genèse et de la progression de la maladie. Cette progression par étapes de la pathogénèse des SMD est représentée schématique sur la

Figure 10 :

- ① Les anomalies du microenvironnement de la MO contribuent au développement et à l'expansion du clone SMD
- ② Les cellules du SMD modifient davantage le microenvironnement de la MO via une production aberrante de facteurs sécrétés tels que les cytokines qui agissent sur les cellules stromales mésenchymateuses, les cellules de la lignée ostéoblastique et les cellules endothéliales
- ③ Ce micro environnement de la MO dysfonctionnel favorise l'expansion clonale et la progression de la maladie avec l'accumulation de défauts génétiques supplémentaires favorisant l'évolution en LAM²⁷.

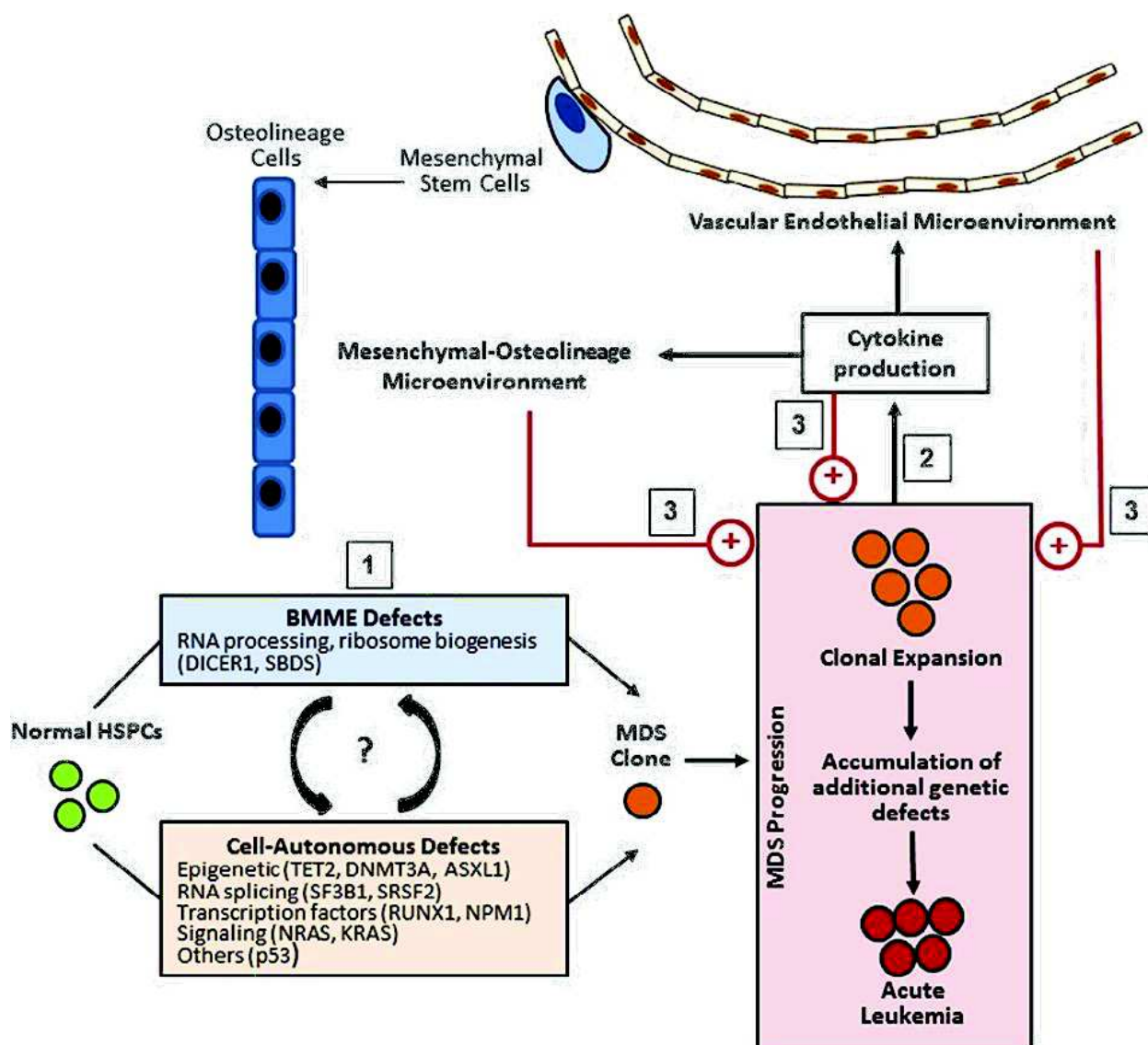


Figure 10 : Progression par étape de la pathogénèse des SMD au sein du microenvironnement de la MO. (BMME : bone marrow microenvironnement – HSPC hematopoietic stem and progenitors cells)

A. J. Li and L. M. Calvi, *Experimental Hematology* – 2017- *The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression*²⁵.

a) Altération des cellules mésenchymateuses.

Les premières preuves d'anomalie du microenvironnement de la MO dans les SMD proviennent d'études des cellules mésenchymateuses pour lesquelles on retrouve une désorganisation morphologique par rapport à la morphologie de type fibroblastique des donneurs normaux²⁸.

b) Altération de la lignée ostéoblastique.

Concernant l'altération de la lignée ostéoblastique, des études sur des modèles murins ont démontré que la délétion sélective de *Dicer1* dans les cellules ostéoprogénitrices induisait une diminution de l'expression du gène SBDS, à l'origine d'un dysfonctionnement ostéoblastique et d'un développement de SMD. *Dicer1* est une ribonucléase qui clive les fragments doubles brins d'ARN et les pré-micro-ARN pour obtenir des petits ARN interférant et des micro-ARN qui jouent un rôle dans la régulation post transcriptionnelle. Ceci est la preuve qu'un défaut primaire du microenvironnement de la MO peut être suffisant pour induire un SMD. En effet, la déficience du gène SBDS chez l'homme est à l'origine du syndrome de Shwachman-Diamond (SDS), qui cliniquement entraîne des défauts squelettiques, une aplasie et une forte probabilité de développer des SMD et des LAM tôt dans la vie²⁹. Chez les patients atteints de SMD, le nombre d'ostéoblastes et d'ostéocalcine sériques sont plus faibles que chez les sujets sains de même âge. Par conséquent, des altérations fonctionnelles dans les cellules de la lignée ostéoblastique peuvent contribuer à des défauts osseux structurels altérant l'hématopoïèse normale et favorise la progression du phénotype SMD.

c) Altération vasculaire et endothéliale.

Le rôle de l'angiogenèse dans la physiopathologie a été mis en évidence sur la base d'une augmentation de la vascularisation observée dans les biopsies de MO et de ganglions lymphatiques des patients atteints de SMD, mais aussi dans d'autres hémopathies. Cette vascularisation accrue est induit par une augmentation du niveau circulatoire de VEGF. Et permet d'augmenter le niveau circulatoire d'autres facteurs pro-angiogéniques comme le facteur de croissance des fibroblastes (BFGF) et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF)³⁰. Cette néo-angiogenèse permet de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'expansion du clone SMD, sur le même principe que les tumeurs solides. Le taux plasmatique de VEGF serait même corrélé à la progression et au pronostic de la maladie, et cela de manière plus importante dans les LAM que les SMD³¹. Par ailleurs, la densité des microvaisseaux pourrait différer selon le sous type de SMD²⁷.

Un VEGF élevé dans le microenvironnement de la MO entraîne une plus grande fuite vasculaire et cela induit des conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques en favorisant le cycle cellulaire, la migration et la différenciation accrue au détriment de la survie et du bon fonctionnement des cellules³².

Ces données indiquent bien que des altérations des cellules du stroma sont présentes dans les SMD, mais le niveau de déficience est hétérogène et peut être difficile à détecter notamment dans les petites cohortes, en particulier parce que l'hétérogénéité des patients est une caractéristique reconnue du SMD. C'est pourquoi de nombreuses études contradictoires ont parfois décrit l'absence d'altérations du stroma. Mais la majorité des rapports met en évidence des schémas de croissance et de survie modifiés des cellules mésenchymateuses avec une diminution du taux de prolifération, une augmentation du temps de doublement de la population et une capacité réduite à atteindre la confluence de la culture par rapport aux homologues sains. Une telle variabilité rend plus difficile la détection rigoureuse des différences dans le microenvironnement²⁷.

d) Les cytokines dans le microenvironnement des SMD.

Une autre composante du microenvironnement des SMD est la dérégulation des voies de signalisation des cytokines. L'équilibre entre les cytokines stimulantes et inhibitrices joue un rôle critique dans la régulation de l'hématopoïèse. L'expression anormale de nombreuses cytokines a été rapportée. Notamment avec le *CCL3*, cytokine appartenant à la famille des chimiokines CC impliquée dans l'état inflammatoire aigu, le recrutement et activation des granulocytes. Elle est également connue sous le nom de protéine inflammatoire des macrophages 1 α (MIP1 α). C'est le dysfonctionnement de la lignée ostéoblastique qui induirait l'augmentation du taux sériques de *CCL3* dans les SMD.

Par ailleurs, les motifs moléculaires associés aux dégâts (*DAMP*, Damage Associated Molecular Pattern) sont des biomolécules qui peuvent causer et perpétuer une réponse inflammatoire à la suite de dommages cellulaires de nature non infectieuse. En effet, ces *DAMP* sont délivrées par des cellules malignes, elles s'activent lorsqu'elles sont reconnues par les cellules du système immunitaire et induisent la sécrétion de médiateur de l'inflammation tel que des cytokines. Les *DAMP* stimulent donc la sécrétion de cytokines et sont considérées comme des médiateurs du développement des SMD. Ainsi, les cytokines *CCL3* et *DAMP* sont considérées être à l'origine d'un environnement médullaire inflammatoire favorisant le stress oxydatif des cellules hématopoïétiques et donc la survenue d'évènements oncogéniques²⁷.

4. Le système immunitaire.

Les réponses immunologiques sont de plus en plus reconnues comme étant importantes dans l'initiation et la progression des SMD. En effet, 10 à 30 % des SMD sont associés à des pathologies auto-immunes, se développant avant ou après le diagnostic hématologique³³. Plusieurs constatations d'anomalies dans les paramètres immunitaires ont été fréquemment décrites chez des patients atteints de SMD (**Tab.11**). En revanche, les données physiopathologiques de l'association entre SMD et maladie auto-immune (MAI) restent incomplètes.

Lymphocyte category	Low risk MDS	High risk MDS
B lymphocytes	↓	↓
Cytotoxic T lymphocytes CD8+	↑	↓
Treg	N-↓	↑
T lymphocytes Th17	↑	↓
T lymphocytes $\gamma\delta$	↓	↓

Tableau 1 : L'altération de la répartition des lymphocytes chez les patients atteints de SMD (de faible ou du haut risque) par rapport à des sujets normaux. (↑ : nombre de cellules augmenté par rapport aux sujets sains ; N nombre identique aux sujets sains ; ↓ nombre de cellules diminué par rapport aux sujets sains)

T. Braun and P. Fenaux, - 2013- Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): Cause or consequence? ³³

a) Dérégulation de l'immunité cellulaire dans les SMD.

Chez les patients atteints de SMD, on retrouve dans le sang et dans la MO, une diminution du taux de lymphocyte B et une expansion oligo clonale des lymphocytes TCD8+ cytotoxiques (**Tab.1**). Cette expansion est déclenchée par l'expression d'un néo-antigène *WT1*, sur les cellules souches clonales (**Fig. 11**) et induisent la sécrétion d'interleukine- 6 (*IL-6*) et de *TNF- α* par les fibroblastes et les macrophages de la MO ^{33,34}.

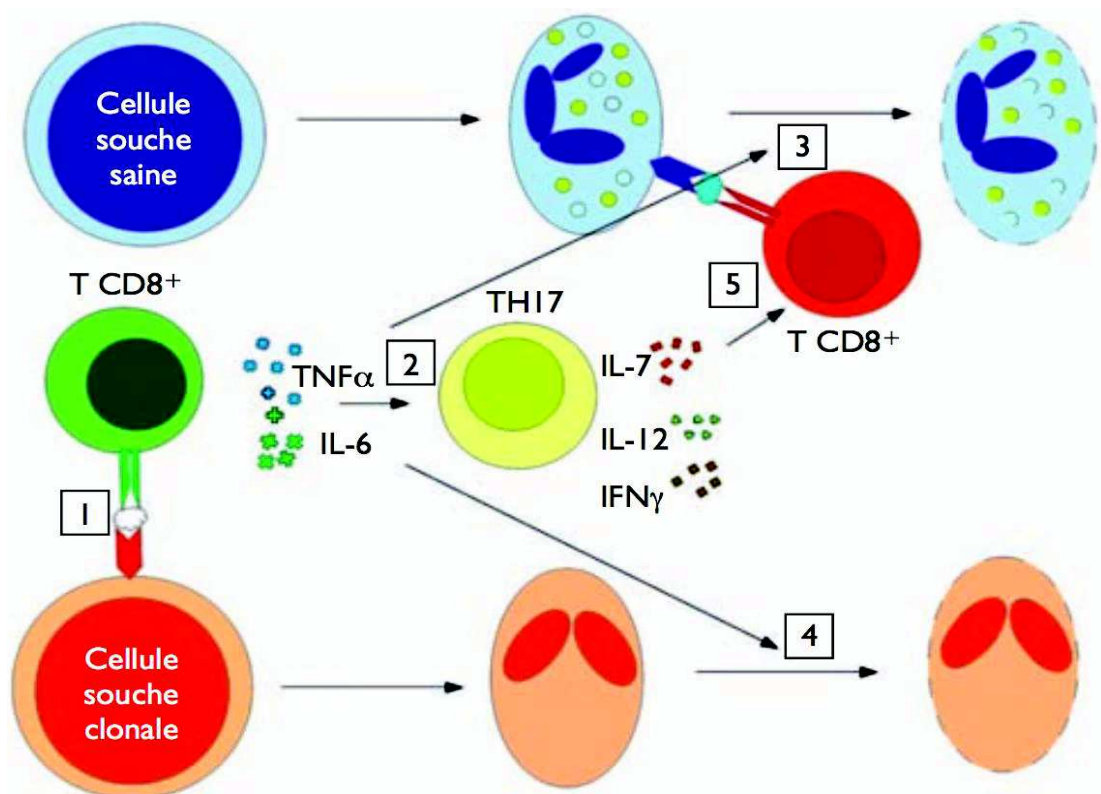


Figure 11 : Mécanismes hypothétiques de la réponse immunitaire dans les SMD.

G. Stalder et al. Revue Médicale Suisse – 2015- Syndromes myélodysplasiques et auto-immunité. ³³

- ①: L'expression d'un néo-antigène WT1, par les cellules souches clonales induit l'activation des lymphocytes TCD8+ cytotoxiques.
- ②: Les lymphocytes TCD8+ cytotoxiques favorisent la production de *TNF- α* et *IL-6* qui permet la prolifération de lymphocytes TH17 qui sécrètent à leur tour d'*IL-7*, *IL-12* et *IFN γ* .
- ③et ④: En parallèle, l'apoptose des cellules issues du clone et des cellules non tumorales est stimulée par des cytokines inflammatoires (*TNF- α* et *IL-6*).
- ⑤: Le milieu cytokinique pro-inflammatoire facilite l'émergence de cellules lymphocytes T CD8+ cytotoxiques auto réactives, qui s'attaquent aux cellules hématopoïétiques saines et à leurs lignées descendantes.

Les lymphocytes TCD4+ régulateurs (Treg) et en particulier l'effecteur hautement suppresseur (ETreg) jouent un rôle dans la physiopathologie des SMD, car une augmentation du nombre de Treg fonctionnels inhibe la réaction immune de lymphocytes TCD8+ cytotoxiques contre les cellules souches clonales et donc favorise la progression des SMD en LAM^{33,34}.

Les lymphocytes T CD4 auxiliaires (Th17) subissent en parallèle une expansion poly clonale stimulée par l'*IL-6* et *TNF- α* (**Fig. 11**). Ces lymphocytes sécrètent de l'*IL-7*, *IL-12* et de l'interféron γ (*IFN γ*), participant ainsi à l'activation de la réponse inflammatoire. Ces cellules sont possiblement à l'origine des manifestations auto-immunes^{33,34}.

Enfin, une fonction diminuée et altérée des lymphocytes $\gamma\delta$ a été décrite chez des patients atteints de SMD associé à une MAI et sont comparables à celles observées chez des patients atteints de MAI isolée. Les lymphocytes $\gamma\delta$ sont d'importants régulateurs de la réponse des lymphocytes TCD8+ cytotoxiques et sont impliqués dans la surveillance immunitaire anti-tumorale, leur fonction altérée peut contribuer au développement de MAI et à l'expansion clonale du SMD³³.

b) Dérégulation de l'immunité humorale dans les SMD.

Concernant l'immunité humorale, il est fréquent de mettre en évidence la présence d'auto-anticorps ou de gammopathie monoclonale chez les sujets atteints de SMD. En effet, la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) est fréquente chez les patients atteints de SMD (jusqu'à 50%) sans conséquences cliniques dans la majorité des cas, puisqu'en effet l'association SMD et lupus érythémateux est rarement observée. De plus, des anticorps anti-cytoplasmiques des polynucléaires neutrophiles (ANCA) sont positifs dans 5% des cas, contre entre 0 et 1,8% dans une population témoin^{33,35}.

c) *Dérégulation des cytokines de l'immunité.*

Parallèlement, une libération anarchique de cytokines inflammatoires a été démontrée au cours des SMD. Comme ces cytokines sont également impliquées dans les MAI, il peut donc exister un lien fonctionnel entre la libération incontrôlée de cytokines, les SMD et les MAI. En effet, l'expression du néo-antigène *WT1* par les cellules souches clonales stimule l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques qui alors induisent la production et de la sécrétion d'*IL-6* et de *TNF- α* par les fibroblastes et les macrophages de la MO. Ces deux cytokines stimulent à leur tour la prolifération des lymphocytes Th17 régulateurs ce qui induit la sécrétion d'*IL-7*, *IL-12* et *IFN γ* . Le *TNF- α* et l'*IFN γ* conduisent à l'expression du récepteur de mort *FAS* sur les cellules précurseurs CD34 +, qui à son tour, induit l'apoptose par la réponse inflammatoire aussi bien dans les cellules saines que dans les cellules souches clonales (**Fig. 11**).

D. Étiologies et facteurs de risque.

L'étiologie des SMD reste dans 85% des cas inconnue. Certains facteurs de risques ont été mis en évidence, mais ils sont présents chez seulement une minorité de patient. On distingue deux types d'étiologies : les SMD primaires ou *de novo* et les SMD secondaires à des facteurs professionnels, environnementaux ou suite à de la chimiothérapie et/ou radiothérapie anticancéreuse⁹.

Les SMD primaires se manifestant chez les enfants ou les adultes jeunes sont dans un tiers des cas associés à une prédisposition constitutionnelle. En effet, certaines maladies congénitales telles que la trisomie 21, l'anémie de Fanconi, la neurofibromatose, la dyskératose congénitale, le syndrome de Pearson, le syndrome de Noonan, le syndrome de Blackfan-Diamond sont des prédispositions génétiques aux SMD. Ces pathologies sont associées principalement à une instabilité génétique et à des troubles de réparation de l'ADN. Chez l'adulte, la prédisposition héréditaire est moins fréquente mais doit être étudiée dans certains SMD de l'adulte jeune (< 50 ans) ou dans les familles présentant d'autres cas de SMD, de LAM ou d'aplasie médullaire. Chez l'adulte jeune, on retrouve aussi parfois des mutations germinales sur le gène du complexe de la télomérase (*RUNX1*, *GATA2* *DDX41*), dont l'expressivité clinique peut être tardive^{3,9,36}.

Les SMD secondaires chimio-ou radio-induits représentent de 10 à 20% des SMD. L'utilisation de plus en plus importante de la chimiothérapie et/ ou de la radiothérapie dans le traitement de nombreux cancers solides ou hématologiques se traduit par une augmentation du nombre de cas de SMD et de LAM induits. Il s'agirait de la conséquence d'événements mutationnels induits par ce type de thérapie, mais dans la plupart des cas la pathogénèse reste incertaine. Les principaux agents cytotoxiques impliqués sont les agents alkylants, les analogues des purines, les anti-métabolites, et dans une moindre mesure, les inhibiteurs de la topoisomérase II. Des cas, ont également été décrits après autogreffe de cellules souches, particulièrement dans les lymphomes multi traités. Les SMD induits par les traitements

sont souvent de mauvais pronostic du fait d'anomalies cytogénétiques complexes, d'une résistance à la chimiothérapie, de comorbidités liées à la maladie et au traitement antérieur, et voir de la persistance de la maladie initiale. L'exposition aux radiations ionisantes (thérapeutique, professionnelle ou liée aux explosions nucléaires) est également associée à un risque accru de SMD et de LAM. Ainsi, la radiothérapie associée à la chimiothérapie amplifie d'avantage le risque leucémogène par rapport à la chimiothérapie seule⁹.

Il existe de nombreux autres facteurs de risques impliqués dans les SMD secondaires. Ils sont principalement d'origines professionnelles ou environnementales. En effet, il existe des maladies professionnelles reconnues dans certains cas, comme l'exposition au benzène qui présente un risque leucémogène même à des doses cumulées faibles. Certains produits chimiques et solvants sont également soupçonnés d'un excès d'hémopathie dans le milieu agricole. Le tabagisme actif est également identifié comme étant un facteur leucémogène avec une relation effet-dose probablement dû à la présence de benzène dans la fumée des cigarettes^{9,37}. Il convient de noter que les taux de SMD secondaires ont récemment augmenté en raison à la fois de l'incidence croissante des cancers, d'un succès accru dans le traitement de ces maladies, et d'un vieillissement de la population qui subit une exposition plus longue et plus importante aux toxiques.

E. Classification.

1. Classification Franco-américaine Britannique (FAB).

Le but des classifications des hémopathies est de fournir des critères fiables pour le diagnostic et l'assignation dans une entité clinique pertinente.

Au début des années 1970, un groupe international constitué de chercheurs français, américains et britanniques a travaillé sur une classification des LAM en étudiant des centaines de dossiers médicaux de malades leucémiques. Il en a résulté en 1976, un article fondateur qui a non seulement fourni la première classification uniforme des LAM, mais a également éveillé la communauté hématologique aux caractéristiques cliniques et morphologiques des SMD³⁸. Ainsi, initialement le groupe FAB n'a identifié que deux sous-types de SMD, l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) et la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Ce premier document basé sur une analyse de 150 patients atteints de LAM et de SMD, a été le premier à souligner que tous les patients atteints de SMD ne progressent pas en LAM mais succombent souvent aux complications d'une hématopoïèse inefficace et d'une insuffisance médullaire. Cet article a également fourni des critères pour reconnaître et classer les « troubles dysplasiques » et ainsi les distinguer des LAM. Les SMD d'abord dénommés « état pré-leucémique » ont vu leur appellation évoluer à la suite de cette étude.

C'est en 1982 que le groupe FAB introduit le terme de « syndrome myélodysplasique » et propose des directives plus détaillées pour le diagnostic et la classification³⁹. En effet, avec l'étude de plus de patients, l'hétérogénéité des SMD a été appréciée et trois sous-types supplémentaires ont été inclus dans la classification révisée en 1982 (**Tab.2**). Les différents SMD étaient classés en fonction des lignées atteintes par la dysplasie, du pourcentage de blastes dans le sang et du pourcentage de blastes dans la MO. De nombreuses études ont par la suite validé l'efficacité de cette classification qui est ainsi devenue la première référence pour le diagnostic et la classification des SMD⁴⁰.

Catégorie	Dysplasie médullaire	% de blastes médullaires	% de blastes dans le sang
Anémie réfractaire (AR)	Érythrocytaire Présence ou absence de sidéroblastes en couronne	< 5	<1
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	Érythrocytaire ≥ 15% des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne	< 5	<1
Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB)	2 ou 3 lignées Présence ou absence de sidéroblastes en couronne	5-20	0-4
Anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (AREB-T)	Habituellement 2 ou 3 lignées Présence ou absence de sidéroblastes en couronne ± corps d'Auer	21 -30	≥ 5
Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)	Variable	< 20	<1 Monocytes > 1 G/L

Tableau 2 : Classification FAB des SMD.

Vardiman J. *The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. Leukemia Research. 2012*⁴⁰.

2. Classification de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS).

Au fil du temps, la classification FAB a montré plusieurs limites, c'est pour cela qu'en 1997, l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) l'a révisé. Elle maintient une grande partie de la structure et de la philosophie de la classification FAB, mais s'appuie sur d'autres informations biologiques, cliniques et génétiques pour affiner les critères diagnostiques et améliorer sa valeur pronostique. La classification OMS a été introduite en 2001 revue en 2008 puis en 2016 (**Tab.3**)^{40,41}. C'est cette classification qui est utilisée à l'heure actuelle⁴².

Pathologie		Dans le sang	Dans la moelle	Cytogénétique	
SMD avec dysplasie uni lignée SMD -DUL		1-2 cytopénie(s) < 1% de blaste	1 lignée dysplasique < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer < 15% (< 5%*) des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne (SC).	Quelles qu'elles soient (présentes ou absentes) <u>sauf</u> la délétion isolé 5q	
SMD avec dysplasie multi lignée : SMD -DML		1-3 cytopénie(s) < 1% de blaste	2 ou 3 lignées dysplasiques < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer < 15% (< 5%*) des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne		
SMD avec sidéroblastes en couronne SMD -SC	Dysplasie uni lignée SMD- SC- DUL	1-2 cytopénie(s) < 1% de blaste	1 lignée dysplasique < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer ≥ 15% (≥ 5%*) des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne		
	Dysplasie multi lignée SMD -SC – DML	1-3 cytopénie(s) < 1% de blaste	2 ou 3 lignées dysplasiques < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer ≥ 15% (≥ 5%*) des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne		
SMD avec délétion 5q isolée		1-2 cytopénie(s) < 1% de blaste	1 ou 3 lignées(s) dysplasique(s) < 5 % de blastes Absence de corps d'Auer Présence ou absence de sidéroblastes en couronne		Del (5q) isolée , ou associée à 1 seule anomalie additionnelle, <u>sauf</u> monosomie 7 ou del (7q)
SMD avec excès de blastes SMD - EB	SMD -EB 1	1-3 cytopénie(s) 2 - 4% de blastes	0 ou 3 lignée(s) dysplasique(s) 5- 9 % de blastes Absence de corps d'Auer Présence ou absence de sidéroblastes en couronne		Quelles qu'elles soient (présentes ou absentes)
	SMD -EB 2	1-3 cytopénie(s) 5 - 19% de blastes	0 ou 3 lignée(s) dysplasique(s) 10 -19% de blastes Ou présence de corps d'Auer Présence ou absence de sidéroblastes en couronne		
SMD Inclassable (SMD - I)	1 % de blaste dans le sang	1-3 cytopénie(s) = 1 % de blaste**	1 ou 3 lignée(s) dysplasique(s) < 5% de blastes ± corps d'Auer Présence ou absence de sidéroblastes en couronne	Quelles qu'elles soient (présentes ou absentes)	
	Dysplasie uni lignée et pancytopenie	3 cytopénies <1 % de blaste	1 lignée dysplasique < 5% de blastes Absence de corps d'Auer Présence ou absence de sidéroblastes en couronne		
	Basé sur la définition d'une anomalie cytogénétique	1-3 cytopénie(s) <1 % de blaste	Pas de lignée dysplasique < 5% de blastes Absence de corps d'Auer < 15% *** des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne	Au moins l'une de celles qui sont associées aux SMD	
	Cytopénies réfractaires de l'enfant	1-3 cytopénie(s) <2 % de blaste	1 ou 3 lignée(s) dysplasique(s) < 5% de blastes Absence de corps d'Auer Pas de sidéroblastes en couronne	Quelles qu'elles soient (présentes ou absentes)	

Tableau 3 : Classification OMS 2016 des SMD.

Arber et al. - 2016 - The 2016 revision to the World Health Organization. ⁴¹

** Si présence de la mutation SF3B1*

***= 1% de blaste sanguin doit être enregistré sur au moins 2 NFS distincts*

**** = Les cas avec $\geq 15\%$ de sidéroblastes en couronne ont par définition une dysplasie érythroïde significative et sont classés comme MDS -RS-SLD.*

Les cytopénies sont définies comme : hémoglobine $<10\text{g/dL}$, plaquette $<100\text{ G/L}$, polynucléaires neutrophiles $<1,8\text{ G/L}$, monocytes $<1\text{ G/L}$. Les cytopénies des SMD peuvent être plus modérées que les chiffres ci-dessus, mais au moins une cytopénie doit être en deçà de ces seuils pour évoquer un SMD (tenir compte de la variabilité ethnique, surtout si neutropénie modérée isolée).

La classification OMS a également introduit un nouveau groupe distinct de pathologie les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs dit SMD/ SMP, formes frontières entre les SMD et les SMP. Ces maladies sont des hémopathies clonales qui, au moment de leur manifestation initiale, présentent une expression clinique, des caractéristiques biologiques et cytologiques compatibles à la fois avec un SMD et un SMP. Toutes les maladies regroupées dans cet ensemble associent une composante proliférative portant principalement sur les globules blancs ou les plaquettes (mais sans chromosome Philadelphique ni réarrangement BCR-ABL), caractérisée par une hypercellularité de la MO et une composante dysplasique plus ou moins marquée, responsable d'une ou plusieurs cytopénies. La plus fréquente de ces pathologies est la LMMC qui auparavant était associée aux SMD, notamment dans la classification FAB⁴³. On distingue trois types de LMMC :

- Type 0 : $< 2\%$ de blastes dans le sang et $< 5\%$ de blastes dans la moelle osseuse
- Type 1 : $<5\%$ de blastes dans le sang et $< 10\%$ de blastes dans la moelle osseuse
- Type 2 : $<19\%$ de blastes dans le sang et $< 19\%$ de blastes dans la moelle osseuse

Sont également présents dans ce groupe, la leucémie myéloïde chronique atypique, la leucémie myélomonocytaire juvénile, le SMD/SMP avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (SMD/ SMP-RS-T) et les SMD / SMP inclassables.

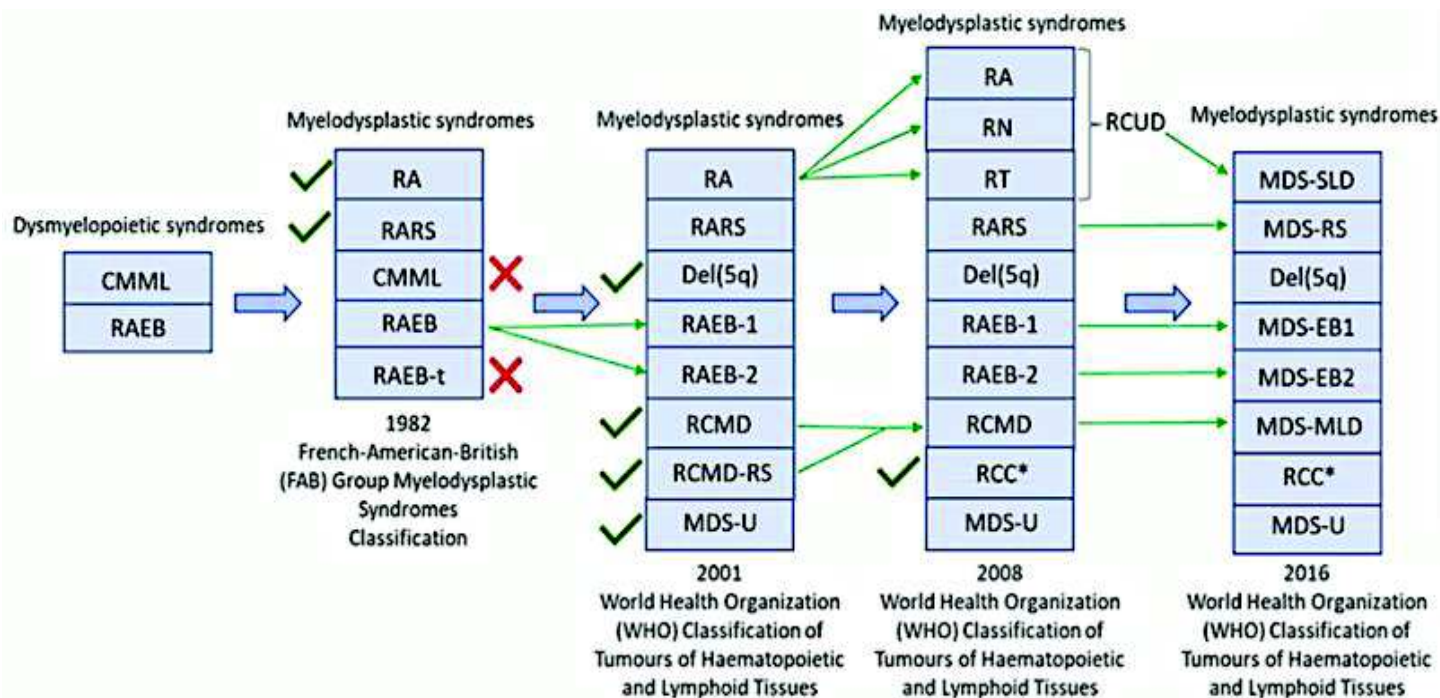


Figure 12 : Évolution des systèmes de classification des SMD.

Zeidan, A. M., Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A. & Ma, X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Reviews* **34**, 1–15 (2019).⁶

Les changements majeurs entre les classifications FAB et OMS 2001 sont la disparition de la catégorie Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos en Transformation (AREB-t) suite à un abaissement du seuil de blastos à 20% pour le diagnostic de LA, la distinction des Anémies Réfractaires avec Excès de Blaste (AREB) de type 1 (5 à < 10% de blastos médullaires) et de type 2 (< 19% de blastos médullaires), la prise en compte du nombre de lignées dysplasiques dans la catégorie des Cytopénies Réfractaires avec Dysplasie Multilignée avec (CRDM-SC) ou sans (CRDM) sidéroblastes en couronnes, l'apport de la cytogénétique avec l'identification d'une entité individuelle appelée SMD avec délétion 5q isolée (Del-5q), la création d'une nouvelle catégorie de SMD considérés comme inclassables (SMD-I) et enfin la création d'une catégorie frontière SDM/SMP dans laquelle est incluse la LMMC. (**Fig. 12**)

Ensuite les principaux changements entre les classifications de l'OMS 2001 et 2008 sont, l'identification isolée pour chaque lignée myéloïde d'une Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Unilignée (CRDU) : Anémie Réfractaire (AR), Neutropénie Réfractaire (NR), Thrombopénie Réfractaire (TR), la prise en compte des blastos sanguins circulant permettant d'identifier des AREB-1 (< 5%) des SMD inclassables (1%), la formation d'une catégorie provisoire Cytopénie Réfractaire de l'Enfant (CRE).

Enfin, entre les classifications OMS 2008 – 2016, il n'y a pas gros changement mise à part la mise à jour de la dénomination de chaque catégorie.

F. Scores de pronostic.

Les SMD regroupent un ensemble de pathologies hétérogènes dans leur présentation clinicobiologique mais également dans leur pronostic, l'espérance de vie pouvant varier de quelques mois à des décennies. Certes, la classification permet de définir des groupes de pathologies avec des caractéristiques communes mais la stratification du risque chez ces patients est fondamentale. Ainsi plusieurs scores pronostics ont été proposés afin de prévoir l'évolution de la maladie et adapter au mieux la prise en charge.

1. Le score IPSS (International Pronostic Scoring System).

Apparu en 1997, le score IPSS (*International Pronostic Scoring System*) a été le premier validé et utilisé en clinique de routine. Ce score a été établi à partir de données européennes, américaines et japonaises en se basant sur l'étude de la survie globale de 816 patients atteints de SMD. Ce score pronostic IPSS permet de classer les SMD selon leur niveau de risque en prenant en compte que 3 paramètres (**Tab.4**): la blastose médullaire, les anomalies cytogénétiques (**Tab.5**) et le nombre de cytopénie périphérique³. On distingue ainsi quatre groupes pronostics : risque faible, intermédiaire 1, intermédiaire 2 et élevé. Ce score permet de séparer schématiquement les SMD de « bas grade » avec un IPSS faible ou intermédiaire 1 des SMD de « haut grade » avec un IPSS élevé ou intermédiaire 2 (**Tab.6**). Il est devenu la référence pour prédire la survie ainsi que le risque de transformation en LAM (**Tab.7**). Il est également utilisé pour la prise en charge thérapeutique.

Critères pronostiques	Valeur de score pronostique IPSS				
	0	0,5	1	1,5	2
Cytogénétique	Favorable	Intermédiaire	Défavorable		
% Blastos	< 5	5-10		11-20	21-30
Cytopénies*	0 ou 1	2 ou 3			

Tableau 4 : Calcul du score IPSS. * Cytopénies : Hémoglobine < 10g/dL, PN < 1,8 G/L, Plaquettes < 100G/L

Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014³.

Catégorie	Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Anomalies Cytogénétiques	Normal - Y Del (5q) Del (20q)	Autres anomalies	Anomalies du chromosome 7 Caryotypes complexes (≥ 3 anomalies)

Tableau 5 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS.

Duchmann et al. - 2015 - Prise en charge des myélodysplasies.⁹

	Groupe de Risques	Score IPSS
SMD de bas grade	Faible	0 point
	Intermédiaire 1	0,5 – 1 point
SMD de haut grade	Intermédiaire 2	1,5 – 2 points
	Élevé	≥ 2,5 points

Tableau 6 : Groupes de risques issus du score IPSS.

Bejar et al – 2013- Myelodysplastic Syndromes: Recent Advancements in Risk Stratification and Unmet Therapeutic Challenges⁴⁴.

Groupes pronostiques	Faible	Intermédiaire 1	Intermédiaire 2	Élevé
Survie (années)	5,7	3,5	1,2	0,4
Délai médian de transformation en LAM (années)	9,4	3,3	1,1	0,2

Tableau 7 : Groupes pronostiques du score IPSS.

Bejar et al – 2013- Myelodysplastic Syndromes: Recent Advancements in Risk Stratification and Unmet Therapeutic Challenges⁴⁴.

La mise en pratique de ce score est simple en raison du faible nombre de critères, d'autant plus qu'ils font partie du bilan initial de routine chez un patient atteint de SMD. Bien qu'étant encore très utilisé, le score IPSS présente quelques défauts. Il n'est utilisable qu'au diagnostic initial, donc il est limité aux SMD primaires non traités préalablement. De plus, il ne prend pas en compte la profondeur des cytopénies sous estimant ainsi le risque de certains patients. Désormais, la présence de blastes médullaire de plus de 20% est considérés comme une LA, ce qui rend ainsi son l'usage du score IPSS sans intérêt. Ces limites soulevées ont conduit plusieurs équipes à proposer de nouveau score. Actuellement, le score IPSS reste tout de même le plus couramment utilisé.

[2. Le score WPSS \(WHO- Based Prognostic Scoring System\).](#)

Le score WPSS cotent les patients de 0 à 6 points, il est basé sur la classification de l'OMS de 2008 (0 à 3), sur l'importance des besoins transfusionnels aux globules rouges qui reflète mieux les cytopénies (0 ou 1) et sur les anomalies cytogénétiques (0 à 2) (**Tab.8**)⁴⁵. Ainsi, il ne prend pas en compte le pourcentage de blaste qui est finalement remplacé par le type de SMD selon la classification OMS 2008. Ces éléments permettent de stratifier en cinq catégories le risque de survie des patients atteints de SMD et de transformation en LAM. C'est un score facile d'utilisation en routine et qui ne nécessite pas d'examen spécialisé en dehors du bilan initial. Ce score est validé pour être utilisé à tout moment et non pas seulement au moment du diagnostic comme le score IPSS. Car prenant en compte le rôle joué par les besoins transfusionnels, le score peut se modifier au cours du temps pour un patient donné.

Critères pronostiques	Valeur du score pronostique			
	0	1	2	3
Catégories OMS	CRDU, syndrome 5q-, anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne	CRDM	AREB-1	AREB-2
Cytogénétique	Bon (normal, -Y, del (5q), del20q)	Intermédiaire (autres)	Mauvais (caryotype complexe, anomalie du chromosome 7)	
Besoins transfusionnels en Globule Rouges*	Non	Oui		

Tableau 8 : Calcul du score pronostic WPSS. Hémoglobine < 9g/dL chez les Hommes et < 8g/dL chez les femmes. Score : 0 (très bas), 1 (bas), 2 (intermédiaire), 3-4 (haut), 5-6 (très haut).

L. Malcovati et al, -2007- *Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes.*⁴²

Les principales difficultés d'application de ce score, construit en dehors du cadre d'un consensus international, résident dans son caractère essentiellement descriptif et de la grande importance accordée à la cytologie hors celle-ci est difficilement reproductible, et l'absence de validation prospective du bénéfice de son utilisation dans un contexte de décision thérapeutique.

[3. Le score IPSS-R \(International Prognostic Scoring System-Revised\).](#)

Les limites du score IPSS ont conduit à la révision du score IPSS en 2012, à l'origine du score IPSS-R (*International Prognostic Scoring System- Revised*)⁴⁶. Il a été défini par l'étude d'un grand nombre de patients atteints de SMD à travers l'Europe et les États-Unis. L'impact pronostique du caryotype a été réévalué dans le but de réviser la définition des catégories cytogénétiques de l'IPSS, car des études ont montré que la cytogénétique joue un rôle pronostique sur la survie aussi importante voir même davantage que la blastose médullaire. Ce nouveau score pronostic distingue un grand nombre d'anomalies cytogénétiques réparties en cinq catégories (de « très favorables » à « très défavorable » **Tab.10**) permettant de mieux stratifier le risque associé, prend en compte la profondeur des cytopénies et une nouvelle répartition du pourcentage de blaste avec un partage plus précis, en prenant en compte le taux de blastes dès 2% (**Tab.9**). Ainsi, le score IPSS-R permet une meilleure stratification du risque sans qu'il ne requière de données supplémentaires par rapport à l'IPSS. Le score IPSS-R classe les patients en cinq sous-groupes de risques différents (de « très bon pronostic » à « très mauvais pronostic ») (**Tab.11**). Il a été montré qu'il permettait une meilleure évaluation pronostique concernant la survie globale et le risque de transformation en LAM par rapport au score IPSS, notamment pour les groupes intermédiaires 1 et 2. Il faut souligner que cette classification a été construite à partir de séries de patients qui n'ont pas été traités par les facteurs de croissances, par 5- Azacitidine ou par le Lénalidomide, alors que ces traitements influencent la survie.

Critères pronostiques	Valeur de score pronostique IPSS-R						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogénétique	Très bon		Bon		Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
% Blastés	≤2		[2-5]		5-10%	>10%	
Hémoglobine g/dL	≥ 10		[8-10[< 8			
Plaquettes (G/L)	≥100	[50-100[<50				
Leucocytes (G/L)	≥ 0,8	< 0,8					

Tableau 9 : Calcul du score IPSS –R.

Greenberg et al. - 2012 - Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. ⁴⁶

Anomalies Cytogénétiques	Très bon	Bon	Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
	- Y Del (11q)	Normal Del (5q) Del (12q) Del (20q) 2 anomalies cytogénétiques incluant la Del (5q)	Del (7q) Trisomie 8 ou 19 i(17q) Anomalie isolée ou 2 clones indépendants ou double anomalie (sans anomalie du 7)	- 7 inv(3), t(3q) Del (3q) Double anomalie incluant -7/ del (7q) ≤ 3 anomalies	> 3 anomalies

Tableau 10 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS-R.

Greenberg et al. - 2012 - Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. ⁴⁶

Groupe de Risques	Score IPSS
Très bas	≤ 1,5
Bas	> 1,5 à 3
Intermédiaire 1	> 3 à 4,5
Haut	> 4,5 à 6
Très haut	≥ 6

Tableau 11 : Groupes de risques issus du score IPSS-R.

Greenberg et al. - 2012 - Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. ⁴⁶

4. Autres classifications pronostiques.

LR-PSS est un système de notation pronostique spécifique, qui a été défini pour re-stratifier le risque des patients atteints de SMD de bas grade selon le score IPSS (faible ou intermédiaire 1)⁴⁷. Le LR-PSS est basé sur différents critères l'âge, le taux d'hémoglobine, le nombre de plaquettes, le pourcentage de blastes médullaire et la cytogénétique (**Tab.12**).

Critères	Point
Cytogénétique défavorable (pas normal sans del-5q isolée)	1
Age ≥ 60 ans	2
Hémoglobine < 10g /dL	1
Nombre de Plaquettes G/L	
< 50	2
50 -200	1
Blastes dans la moelle osseuse ≥ 4%	1

Tableau 12 : Système de notation pronostique LR-PSS

Bejar et al -2012- Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes.⁴⁴

Ce système de score LR-PSS permet la stratification des patients de SMD de bas grade, d'après le score IPSS, en trois catégories de risque différents. Première catégorie de 0 à 2 points, la deuxième de 3 à 4 points et la troisième de 5 à 7 points. Parmi celles-ci, la troisième catégorie est considérée comme un sous-groupe de patients dont le pronostic est nettement pire que les autres, et dont les patients faisant partie de cette catégorie pourraient ainsi bénéficier d'une intervention thérapeutique précoce (**Fig. 15**). Puisqu'en effet, la survie globale médiane de cette troisième catégorie serait similaire à celle des patients classés IPSS de niveau intermédiaire 2 et considéré comme un SMD de haut grade.

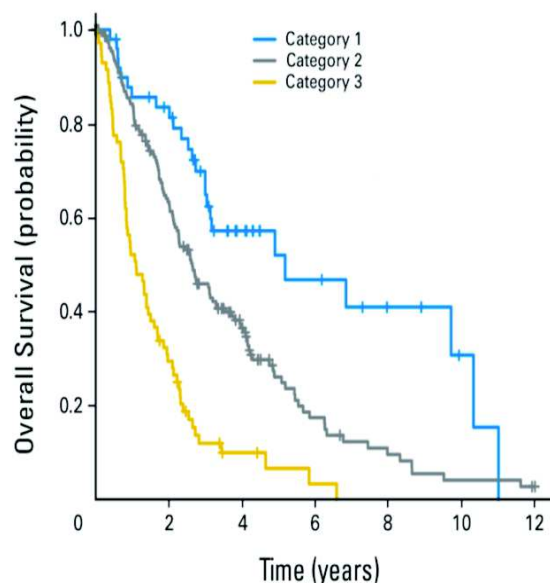


Figure 13 : Courbe de survie des patients atteints de SMD d'après le système de notation pronostique LR-PSS.

Bejar et al -2012- Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes.⁴⁴

Enfin, plusieurs autres facteurs pronostics tel que la présence d'une myélofibrose, la ferritinémie, les lactates déshydrogénases ou la β -2 microglobuline, ont également été proposé mais l'intérêt de ces variables dans les démarches diagnostiques et thérapeutiques n'a pas été clairement démontré^{9,41}.

G. Traitement.

La prise en charge thérapeutique est différente entre SMD de faible risque (LR) et haut risque (HR). Alors que le traitement des SMD-LR, qui représentent deux tiers des patients, consiste essentiellement à corriger les cytopénies, le traitement des SMD-HR va cibler la prolifération blastique et l'instabilité chromosomique afin de contrôler le clone leucémique⁴⁸.

Actuellement, le seul traitement potentiellement curatif est l'allogreffe de CSH, il pourra être envisagé en fonction de l'âge du patient et de l'existence d'un donneur apparenté ou non⁴⁸.

1. Prise en charge des SMD de faible risque (SMD-LR) avec IPSS faible ou intermédiaire 1.

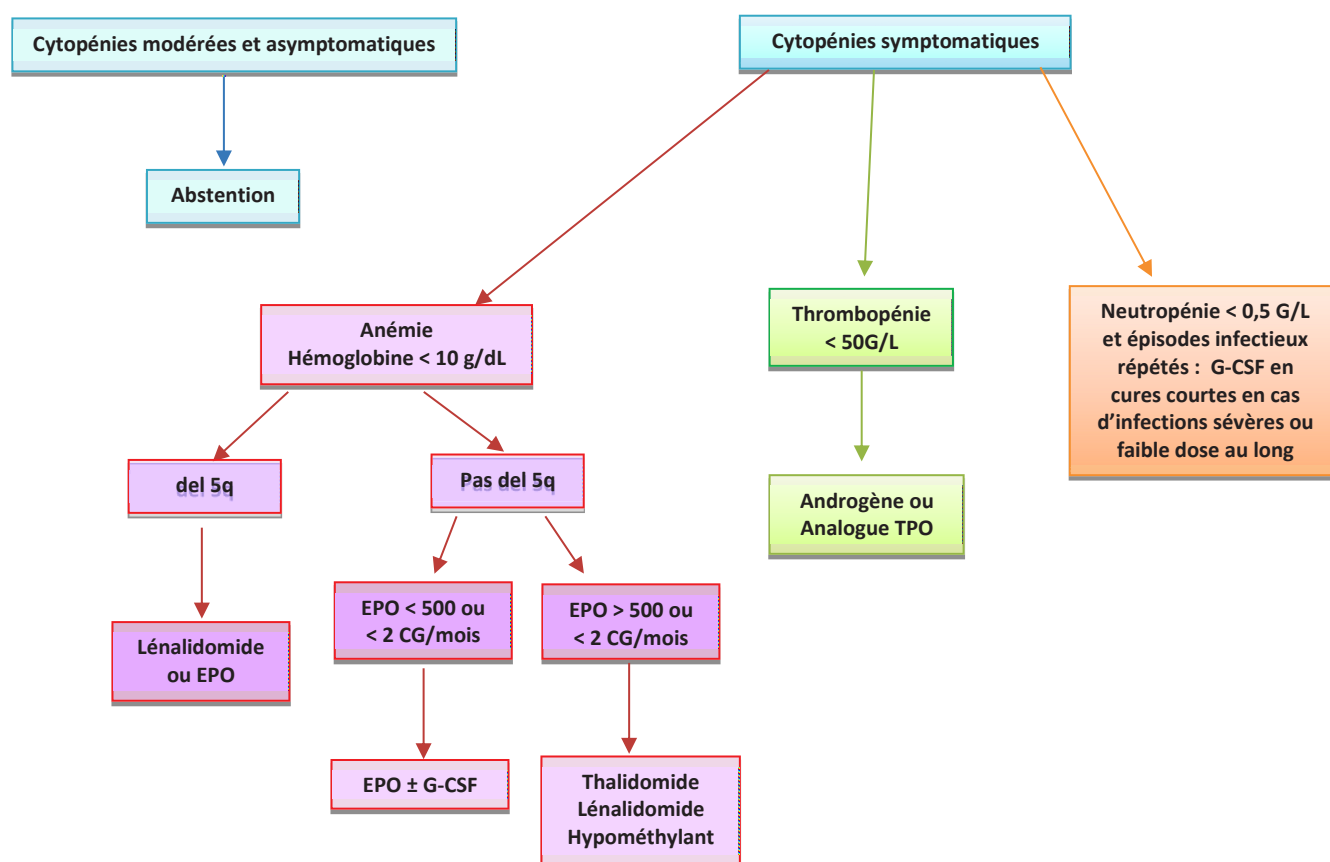


Figure 14 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de faible risque (IPSS faible ou intermédiaire 1) selon les recommandations du Groupe Francophone des Myélodysplasies.

Fontenay Met al. - 2008- Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies.⁴⁹

a) Traitement de l'anémie.

L'anémie est l'atteinte la plus fréquente. Face à une anémie modérée et asymptomatique, une abstention thérapeutique est proposée⁴⁸.

- Les agents stimulants l'érythropoïèse.

Dès lors que l'anémie est symptomatique avec une mauvaise tolérance clinique et une hémoglobine inférieure à 10g/dL, un traitement par de l'érythropoïétine (EPO) recombinante est recommandé en première intention. Leur introduction précoce pourrait permettre d'obtenir un meilleur taux de réponse et une durée plus longue d'indépendance transfusionnelle (**Fig. 15**)¹. L'EPO recombinante est un agent stimulant l'érythropoïèse (ASE), et agit comme un anti-apoptotique en majorant la production érythrocytaire par inhibition du signal de mort de progéniteurs érythroïdes précoces. En pratique, il améliore la survie chez les répondeurs avec un taux de réponse qui varie entre 30 et 75%⁴⁸.

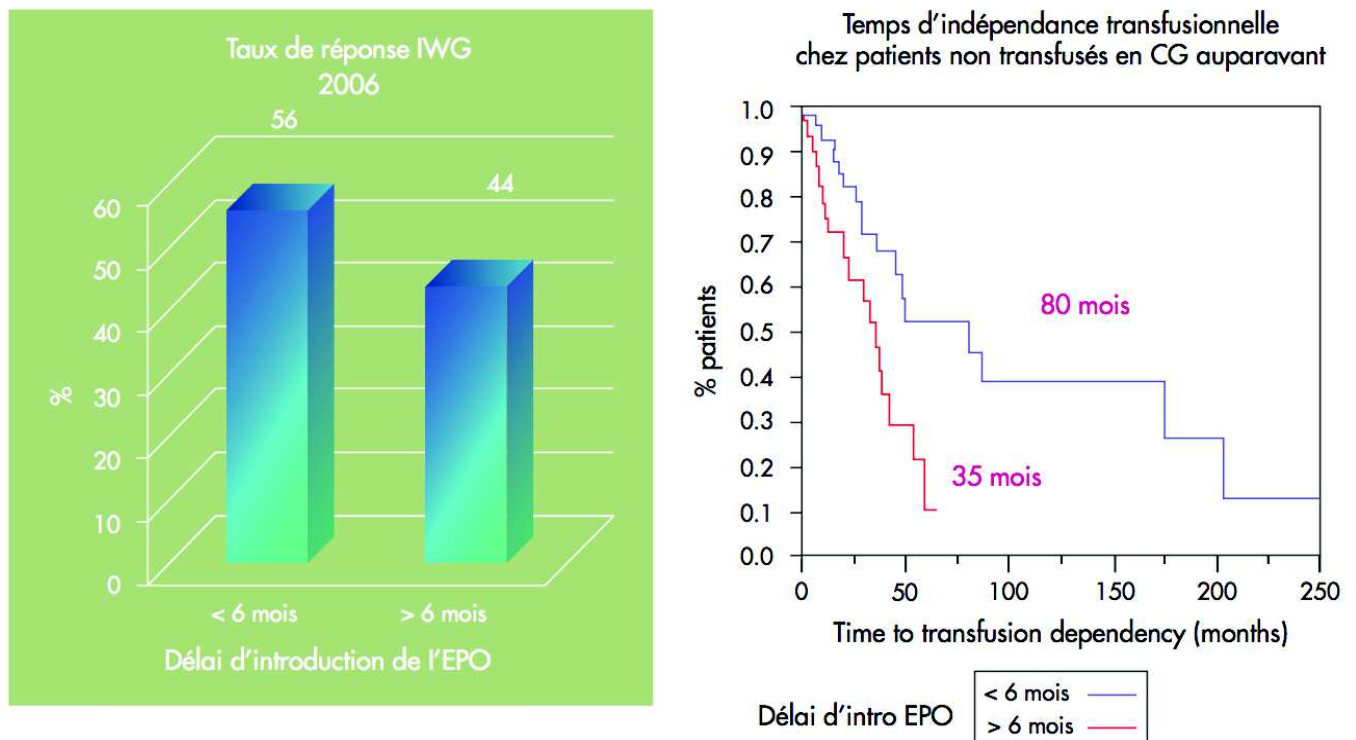


Figure 15 : Intervention thérapeutique précoce dans l'anémie des SMD de faible risque.

Roux C, Roulin L. Généralités sur les syndromes myélodysplasiques : épidémiologie, diagnostic et principes de traitement. *Hématologie*. 2016¹

Le dosage de l'EPO sérique est un marqueur prédictif de réponse aux ASE⁵⁰. En effet, le traitement sera débuté après vérification que l'EPO sérique soit inférieure à 500 UI/mL pour espérer un taux de réponse satisfaisant. Il est recommandé de débiter le traitement en utilisant des posologies, par voie sous cutanée, allant de 20 000 à 80 000 unités par semaine pour l'Érythropoïétine α ou β . Pour la Darbépoïétine α , la dose habituelle se situe entre 150 et 300 μ g/semaine, l'avantage de cette molécule étant de disposer d'un stylo auto-injectable qui permet aux patients d'être autonomes^{51,52}.

L'objectif est de maintenir un taux d'hémoglobine entre 10 et 12 g/dL. Cependant, l'action de l'EPO est limitée dans le temps (avec une durée médiane d'échappement de 24 mois) et variable selon les patients. En cas d'inefficacité initiale, une association avec un facteur de croissance granulocytaire peut être proposée (G-CSF) à faible dose, ce médicament ayant démontré in vitro une action synergique sur l'érythropoïèse permet ainsi une majoration de l'efficacité de l'EPO et donc d'obtenir 10 à 20 % de réponses supplémentaires⁵⁰⁻⁵³.

Les transfusions chroniques de culot globulaire restent très souvent employées après échec des ASE. Il est recommandé de transfuser dès lors que le taux d'hémoglobine est inférieur à 8 g/dL⁴⁸. L'anémie chronique et le traitement transfusionnel érythrocytaire comportent toutefois de nombreux inconvénients : surcharge martiale, fatigue, diminution de la qualité de vie, majoration des complications cardiovasculaires, accidents transfusionnels... et sont des facteurs clairement identifiés de morbidité dans les SMD.

- **Autres traitements de l'anémie.**

- Le Lénalidomide (REVLIMID®) est indiqué par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour le traitement des patients présentant un SMD de risque faible ou intermédiaire-1, associé à une anomalie cytogénétique de type délétion 5q isolée (del 5q), et présentant une dépendance transfusionnelle, dès lors que les autres options thérapeutiques sont insuffisantes ou inappropriées tel que l'EPO^{51,52}. Son mécanisme d'action dans les SMD est incertain. C'est un immunomodulateur aux propriétés antinéoplasique, anti-angiogénique et pro-érythropoïétique qui agit notamment en augmentant l'apoptose des cellules mutées et permet de restaurer la lignée érythroïde, avec un taux de réponse obtenu de 65–70 %⁴⁸. La durée médiane de réponse est de l'ordre de 24 mois. Il semblerait que l'association Lénalidomide + EPO permette de doubler le pourcentage d'indépendance transfusionnelle, y compris chez des patients résistants à l'EPO seule^{9,48}. En pratique, le Lénalidomide n'est pas utilisé chez les patients ayant une mutation de *TP53* qui est de mauvais pronostic. En effet, si elle est présente, on doit considérer le SMD comme de haut risque. La posologie initiale est de 10 mg/j pendant 21 jours par mois. Du fait de l'importance des cytopénies (neutropénie ou thrombopénie) induites à l'initiation du traitement, il est nécessaire d'avoir une surveillance rapprochée de l'hémogramme. Elles peuvent amener à utilisation du G-CSF en cas de neutropénie sévère < 1G/L, voire même d'interruption de traitement (si agranulocytoses ou plaquettes < 25G/L)⁴⁸.

- Les traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs ont une place importante dans la prise en charge des SMD de faible risque. Puisqu'en effet, les SMD semblent être associés à une dérégulation immunologique avec parfois des manifestations auto-immunes associées. Le taux de réponse au sérum anti-lymphocytaire (Anti-Thymocyte Globuline ATG) chez ces patients est d'environ 30% à 40%, il peut être utilisé en association à la Ciclosporine⁵². Son usage devrait être limité aux sujets relativement jeunes (moins de 60 ans), sans excès de blastes, avec une maladie récente⁵².

- Agent de Maturation Érythroïde.

Les patients souffrant d'anémie et de SMD à faible risque chez lesquels le traitement par un ASE n'est pas efficace deviennent généralement dépendants des transfusions de globules rouges. Le Luspatercept est une nouvelle approche thérapeutique ayant été évaluée récemment et semble prometteuse dans les SMD-SC de faible risque et/ou une mutation de SF3B1⁵⁴. En effet, l'une des causes de l'inhibition de l'érythropoïèse dans les SMD est l'augmentation de la concentration des ligands de la super famille des TGF- β , régulateurs négatifs aux stades tardifs de l'érythropoïèse. Ainsi, le Luspatercept agit comme un « piège » car il s'agit d'une protéine de fusion recombinante qui vient inhiber l'action du TGF- β (Fig.16)⁵⁵ole. En effet, une récente étude sur des patients atteints de SMD-SC, a fait l'objet d'une publication dans le New England Journal of Medicine qui a montré qu'une indépendance transfusionnelle pendant huit semaines ou plus a été observée chez 38% des patients du groupe Luspatercept, contre 13% de ceux du groupe placebo⁵⁶. Des résultats similaires de phase II, bien qu'avec une toxicité plus importante a également été rapportés avec un composé chimique apparenté le Sotatercept^{21,57}. De nouveaux essais vont débiter, en envisageant l'association combinée de l'EPO (agit sur l'érythropoïèse précoce) et du Luspatercept (agit sur l'érythropoïèse tardive). En pratique ce médicament n'est encore pas disponible en France, il est en attente d'AMM⁵⁸.

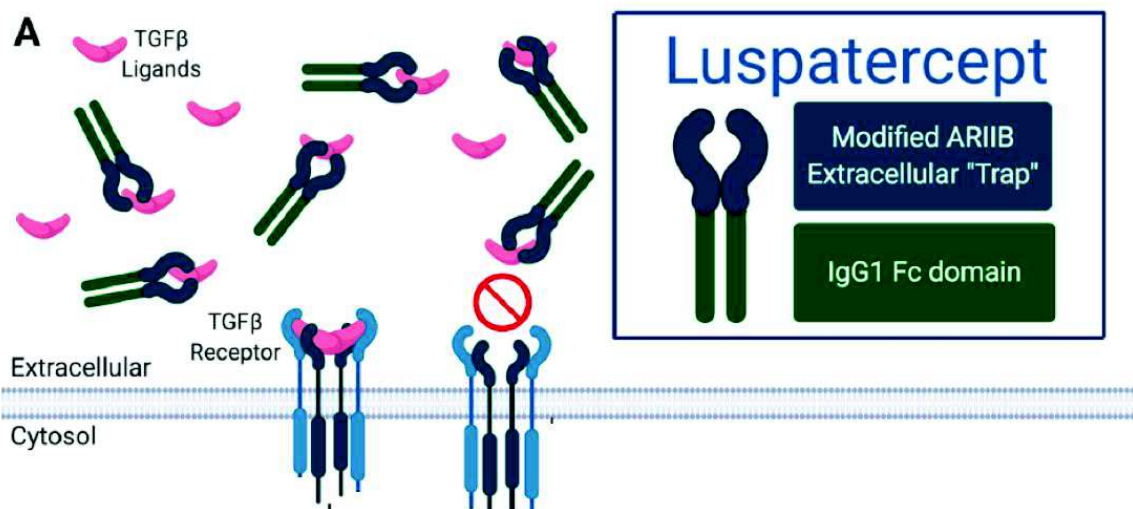


Figure 16 : Mécanisme d'action du Luspatercept.

Feld J, Navada SC, Silverman LR. Myelo-deception: Luspatercept & TGF-Beta ligand traps in myeloid diseases & anemia. *Leukemia Research*. 2020.⁵⁸

b) Traitement de la neutropénie.

Dans le cas de la neutropénie, l'intérêt du G-CSF n'a pas été réellement démontré, de ce fait, il n'est pas recommandé. En effet, si l'utilisation de G-CSF permet de corriger la neutropénie dans environ deux tiers des cas, l'effet sur la diminution du risque infectieux et l'amélioration de la survie n'est pas prouvé⁴⁸. De plus, son innocuité en termes de risque de transformation leucémique est incertaine. On ne peut donc envisager leur usage que dans des cas très ciblés comme par exemple en cas d'épisodes infectieux graves chez des patients très neutropéniques⁴⁸.

La prise en charge des infections est identique à celle des patients en post-chimiothérapie. A noter que les patients atteints de SMD ont parfois en plus un déficit fonctionnel des polynucléaires neutrophiles qui accroît d'avantage le risque infectieux. En pratique, il n'existe pas de données sur l'intérêt d'une antibioprophylaxie au long cours, d'autant plus qu'on prend le risque de favoriser l'émergence de résistance. Il est donc recommandé aux patients atteints de SMD avec neutropénie de disposer à l'avance d'antibiotiques à large spectre à débiter au moindre signe infectieux : par exemple, l'association Amoxicilline /Acide Clavulanique 3 g/ j avec de la Ciprofloxacine 1 g/j⁴⁸.

c) Traitement de la thrombopénie.

En routine, le recours à la transfusion plaquettaire doit être limité à des indications très précises (un geste opératoire, un syndrome hémorragique ou un taux de plaquettes inférieur à 10 G/L) et ne doit pas être instaurée chez les patients stables ne présentant pas de saignement et ne recevant pas de chimiothérapie intensive. Puisqu'en effet, le risque d'envisager ce traitement au long court est d'induire rapidement une inefficacité par allo-immunisation. Cependant, il existe d'autres moyens pour traiter la thrombopénie, certes peu de molécules sont disponibles, mais on retrouve soit les androgènes ou les agonistes des récepteurs de la thrombopoïétine.

- Parmi les androgènes, on retrouve de Danazol (DANATROL®) qui peut être utilisé sur une courte période avec un taux de réponse d'environ 30% mais qui nécessite des précautions d'utilisation avec une surveillance de l'état hépatique et prostatique chez l'homme^{1,48,50}. Le mécanisme d'action des androgènes dans les SMD reste cependant incertain.

- Concernant les analogues du récepteur de la thrombopoïétine, leur intérêt a souvent été très discuté. En effet, au cours d'un essai clinique randomisé, le traitement par Romiplostim (NPLATE®) a été prématurément arrêté en raison d'une augmentation du nombre de cas de progression de SMD en LAM et d'augmentations transitoires du nombre de cellules blastiques chez les patients traités par rapport au placebo⁵⁹. Des données plus récentes, ont montré l'absence de sur évolution en LAM et un bon taux de réponse au traitement⁶⁰. De ce fait, en pratique l'utilisation d'un analogue du récepteur de la thrombopoïétine dans les SMD de faible risque doit être discutée en RCP. Leur prescription semble être limitée dans le cadre d'essais thérapeutiques et il paraît indispensable de se limiter aux patients ayant une blastose médullaire < 5 %⁴⁸.

2. Prise en charge des SMD de haut risque (SMD-HR) avec un IPSS élevé ou intermédiaire 2.

Les SMD de haut risque correspondent aux patients ayant un score IPSS de risque intermédiaire-2 ou élevé et/ou un score IPSS-r élevé ou très élevé. Ces patients ont plus de 30% de risque d'évoluer vers une LAM et ont une médiane de survie d'environ 12 mois sans traitement. Le seul traitement curatif est l'allogreffe de CSH. Pour les patients atteints de SMD de haut grade non éligibles à une allogreffe de CSH, une chimiothérapie intensive précoce offre un avantage de survie. Les agents déméthylants comme l'Azacitidine (VIDAZA®) apportent également un gain de survie et sont bien tolérés chez les personnes âgées et les personnes ayant des comorbidités. La figure 17 détaille l'algorithme de prise en charge des SMD de haut grade non allogreffables⁴⁹.

a) Non allogreffable.

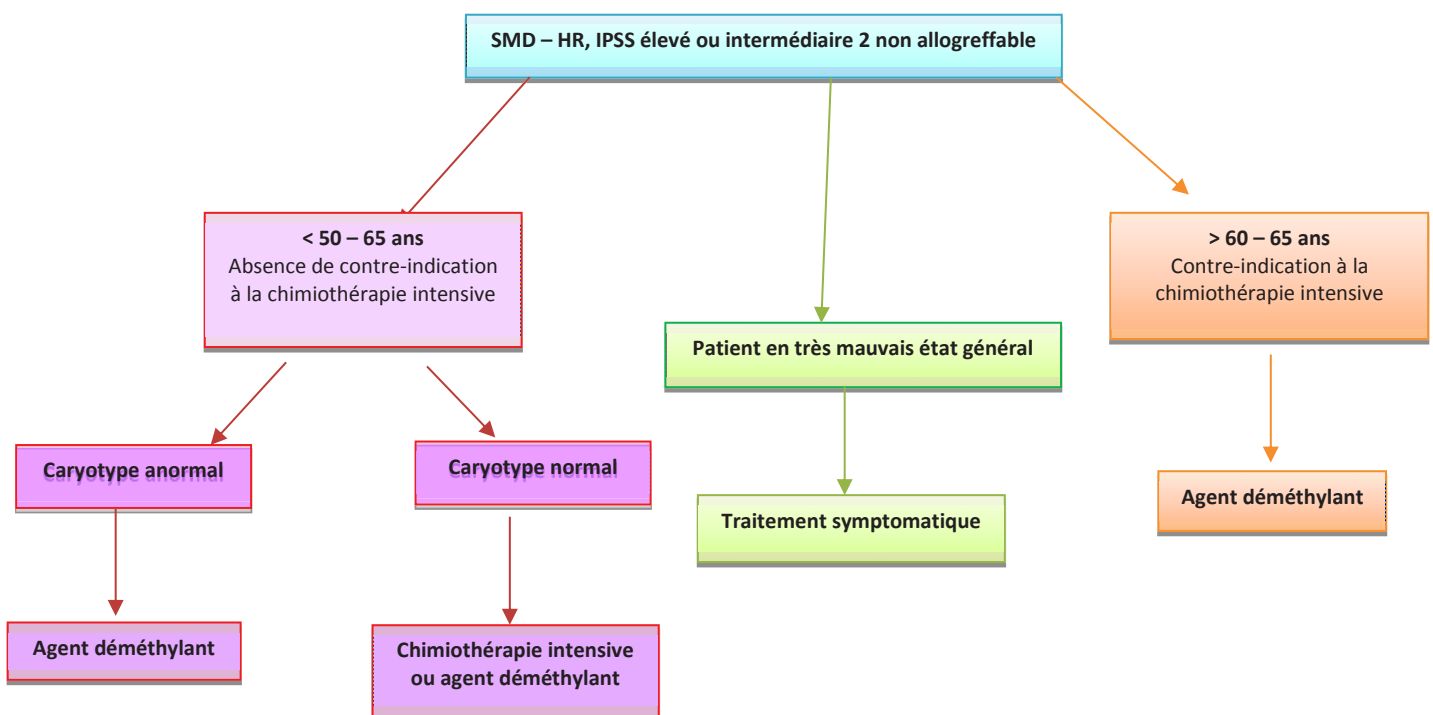


Figure 17 : Arbre décisionnel pour le traitement des SMD de haut risque (IPSS élevé ou intermédiaire II) en dehors de l'allogreffe selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies.

Fontenay Met al. - 2008- Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies.⁴⁹

- Les agents hypométhylants.

Les agents hypométhylants sont représentés par l'Azacitidine (VIDAZA®) et la Décitabine (DACOGEN®). Ils sont devenus le traitement de référence des SMD-HR même jusqu'à un âge avancé, car ils sont très bien tolérés¹³. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas encore totalement compris, ces analogues de cytosine possèdent des propriétés cytotoxiques :

- Par incorporation au sein de l'ARN à la place de la cytosine, cela induit une inhibition de la traduction donc diminution de la synthèse de protéines oncogènes.
- Par incorporation au sein de l'ADN à la place de la cytosine qui inhibe l'ADN méthyltransférase (DNMTs) à l'origine d'une hypométhylation donc influent sur l'expression de différents gènes, permettant la réexpression de certains gènes suppresseurs de tumeurs dont le promoteur est inactivé par une hyperméthylation.

En Europe, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'Azacitidine (VIDAZA®) a été obtenue en 2009, à la suite d'un essai de phase III, qui a mis en évidence que la survie globale et la survie à deux ans étaient mieux dans le bras Azacitidine que le bras « traitements conventionnels »⁵¹. Et aussi que, l'Azacitidine permettait d'obtenir un temps de progression en LAM plus long (de 13,0 mois contre 7,6 mois pour le « traitement conventionnel »)⁵¹. De plus, la survie globale des différents sous-groupes était similaire quelle que soit la tranche d'âge ou le groupe de risque cytogénétique et la réponse de l'Azacitidine (VIDAZA®) était plus favorable dans le groupe avec des anomalies du chromosome 7 (délétion ou monosomie)⁴⁸.

À la différence de l'autorisation européenne, l'Azacitidine (VIDAZA®) est également indiquée dans les SMD faible risque aux États-Unis. Cette indication a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) à la suite d'études qui ont montré l'intérêt de son utilisation chez des patients dépendants de transfusion et en échec des autres traitements (ASE ou Lénalidomide). En pratique, en France, l'Azacitidine (VIDAZA®) est utilisée uniquement pour le traitement des SMD de haut risque mais son utilisation peut être discutée en cas d'impasse thérapeutique chez les patients SMD faible risque dépendants des transfusions ou thrombopéniques ou encore lors d'association à des manifestations auto-immunes dans le cadre d'un essai du Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM) qui est actuellement en cours (AZA-SAID)⁴⁸.

A noter que le pronostic des SMD- HR est sombre si le patient présente un échec ou une perte de réponse à l'Azacitidine (VIDAZA®). Cependant, il existe un développement de nouveaux agents prometteurs tel que les inhibiteurs d'IDH1/2 potentiellement utilisés en cas d'échec à l'Azacitidine

(VIDAZA®) ou en association lorsque la mutation correspondante est présente. L'inhibiteur de BCL-2, le Vénétoclax (VENCLYXTO®) est actuellement testé dans les SMD-HR. De même que, l'APR 246 (agent « re-conformant » des protéines *p53*) semble donner de bons résultats en association avec Azacitidine (VIDAZA®) dans les SMD–HR avec caryotype complexe et la mutation *TP53*.

Concernant la Décitabine (DACOGEN®), elle n'est disponible qu'en ATU nominative (Autorisation Temporaire d'Utilisation) alors qu'elle a été approuvée par la FDA pour les patients de risque intermédiaire-1, 2, et élevé, suite à un essai de phase III qui a mis en évidence des taux de réponse globale significatifs, durables et qui permettaient une indépendance transfusionnelle par rapport aux traitements symptomatiques⁵⁰.

- **Place de la chimiothérapie intensive**

Les indications de la chimiothérapie intensive dans les SMD tendent à se réduire et elles sont surtout privilégiées avant une allogreffe chez les patients atteints de SMD à haut risque ayant un excès de blastes médullaires > à 10%, et un caryotype favorable⁵². La chimiothérapie intensive correspond à l'association d'une Anthracycline et de la Cytarabine (ARACYTINE®). Elle permet d'obtenir 40 à 60 % de rémission complète mais avec une médiane courte de 10 à 12 mois. Ces résultats sont observés uniquement pour des patients de moins de 65 ans. Au-delà, la cytotoxicité est trop importante entraînant de profondes cytopénies^{48,51}.

b) Allogreffable.

A ce jour, l'allogreffe de CSH est le seul traitement curatif des SMD-HR, généralement proposé jusqu'à l'âge de 70 ans en l'absence de comorbidités significatives³. En effet, ses résultats s'améliorent au fil des années, puisque dans les années 90, les patients âgés de plus de 55 ans n'étaient qu'exceptionnellement proposés à l'allogreffe du fait de l'importante mortalité précoce qui pouvait atteindre 30 à 40% dans les 3 mois suivant la greffe⁶¹. Aujourd'hui grâce à l'amélioration de la qualité des soins, à l'utilisation de nouveaux conditionnements dits « atténués » et au meilleur traitement des complications post-greffe, la mortalité précoce est réduite, le taux de rechute est de 20% environ et la survie sans maladie est proche de 50%⁶². Ainsi, l'âge limite de l'allogreffe se décale progressivement jusqu'à l'âge de 70 ans⁴⁸. Cependant, sa toxicité et ces complications potentielles sont aussi désormais bien connues. Elle doit donc être précédée d'une évaluation rigoureuse du rapport bénéfice risque pour chaque patient éligible.

L'allogreffe de CSH ne constitue habituellement pas un traitement des SMD de faible risque. Cependant, des données récentes suggèrent un effet bénéfique sur la survie globale de l'allogreffe de CSH dans des formes qui comportent certains facteurs de gravité et ne répondant pas aux autres traitements⁶¹. En effet, en pratique, l'allogreffe de CSH peut être discutée chez des jeunes patients en échec des autres traitements thérapeutiques (étude en cours du GFM). De plus, une récente étude en a conclu que pour les groupes de risque faible ou intermédiaire-1, l'allogreffe de CSH retardée était associée à une espérance de vie maximale, au contraire, pour les groupes de risque intermédiaire-2 et élevé, l'allogreffe de CSH précoce assure une espérance de vie maximale^{48,9}. Du fait de l'hétérogénéité des SMD, les protocoles de traitement peuvent varier sur les plusieurs points, faire précéder ou non l'allogreffe d'une chimiothérapie intensive, ou au contraire recourir rapidement à la greffe sans chimiothérapie préalable (Fig. 18).

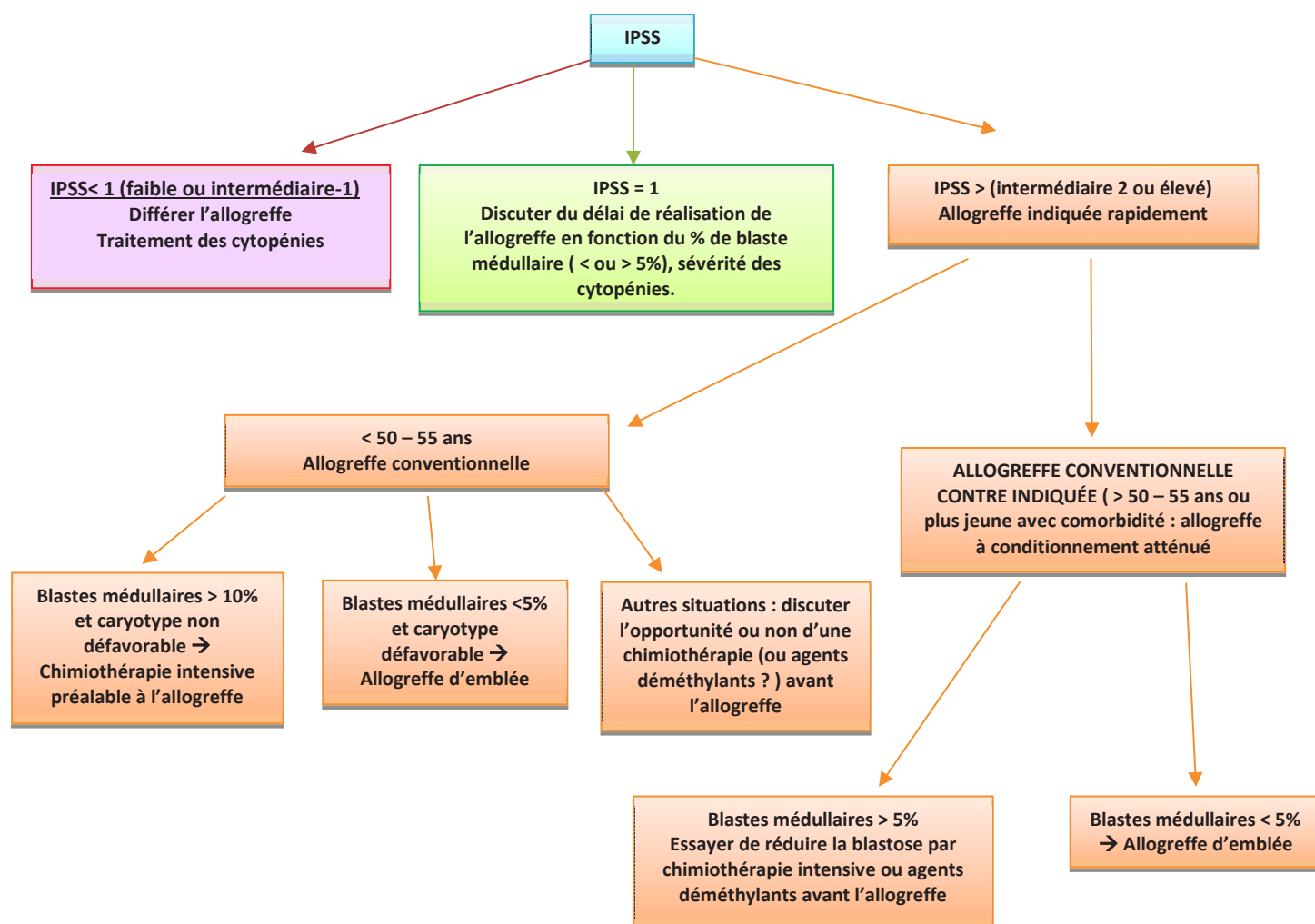


Figure 18 : Allogreffe de CSH dans les SMD selon le Groupe Francophone des Myélodysplasies.

Fontenay Met al. - 2008- Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies.⁴⁹

II. Diagnostic d'un SMD

A. Signes cliniques et circonstances de découverte.

Les SMD sont souvent découverts de façon fortuite lors d'un bilan biologique de routine, au cours de la réalisation d'un hémogramme parfois indiqué devant des symptômes. Les signes cliniques, essentiellement liés aux cytopénies, sont peu spécifiques, inconstants et de sévérités variables⁴⁹. Les SMD sont principalement révélés par des signes cliniques associés à l'anémie dans 90% des cas avec de l'asthénie progressive, altération de l'état général, pâleur, tachycardie. Dans les 10% restants, ce sont les signes hémorragiques (purpura cutanéomuqueux) en rapport avec la thrombopénie ou un problème infectieux lié à la neutropénie. D'autres manifestations, rhumatologiques, dermatologiques ou encore systémiques peuvent être au premier plan, rendant le diagnostic plus difficile⁶³.

Un examen clinique et un interrogatoire précis doivent être menés afin d'évaluer le retentissement des cytopénies, tenant compte de l'âge du patient et de ses comorbidités, on recherche également leurs anciennetés permettant d'apprécier ainsi l'évolutivité de la maladie^{49,64}. De plus, il est important de connaître les antécédents du patient en termes d'exposition à des agents étiologiques comme la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'exposition professionnelle à des agents leucémogènes tels que le benzène et ces dérivés, cette dernière étant considéré comme maladie professionnelle. On observe parfois, une splénomégalie ou la présence de signes dysimmunitaires associées tels qu'une arthropathie, une vascularite, une polychondrite....^{46,52,64}.

B. Hémogramme.

1. Numération sanguine.

La numération sanguine va permettre de confirmer la présence d'une ou plusieurs cytopénies chroniques (supérieures à 6 mois). L'anémie, est l'anomalie la plus fréquente chez 90 % des patients. Elle est habituellement normocytaire ou macrocytaire, normochrome⁴⁸. La mesure du nombre de réticulocytes est informative. En effet, un nombre diminué indique qu'il s'agit d'une anémie arégénérative en faveur d'un SMD. Une autre cytopénie est associée dans 50% des cas. Une thrombopénie peut être présente dans 20-40% des cas, souvent modérée (supérieure à 50 G/L), d'origine centrale ou plus rarement périphérique (thrombopénie immunologie). Une neutropénie est présente dans plus de 50 % des cas. Enfin, une pancytopénie est retrouvée dans 50% des cas⁴⁸. Le nombre de cytopénies constitue clairement un critère de mauvais pronostic d'après l'IPSS.

D'autres anomalies permettent d'évoquer un SMD, une monocytose doit faire évoquer lorsqu'elle est significative ($> 1G/L$ et $> 10\%$ des leucocytes) et chronique, un syndrome mixte SMD/SMP de type LMMC. Tandis qu'une thrombocytose peut être présente dans les formes de SDM avec délétion 5q (del 5q) ou dans l'anémie sidérolastique avec thrombocytose.

2. Formule sanguine.

Outre l'aspect quantitatif, l'examen du frottis sanguin au microscope peut orienter vers le diagnostic de SMD par la mise en évidence d'anomalies cytologiques. Les anomalies dans le sang sont toujours moins intenses que dans la moelle. Cela tient du fait que seules les cellules matures accèdent à la circulation sanguine, restreignant la diversité des types cytologiques et donc des anomalies. On peut parfois y observer des anomalies morphologiques des trois lignées cellulaires témoignant de la dysmyélopoïèse⁶⁵ :

- **Dysérythroïèse (Fig.19)**: mise en évidence par des anomalies des hématies non spécifiques du SMD tel que l'anisocytose, la poïkilocytose, une macrocytose, des hématies à ponctuations basophiles, la présence érythroblastes circulants...⁶⁵

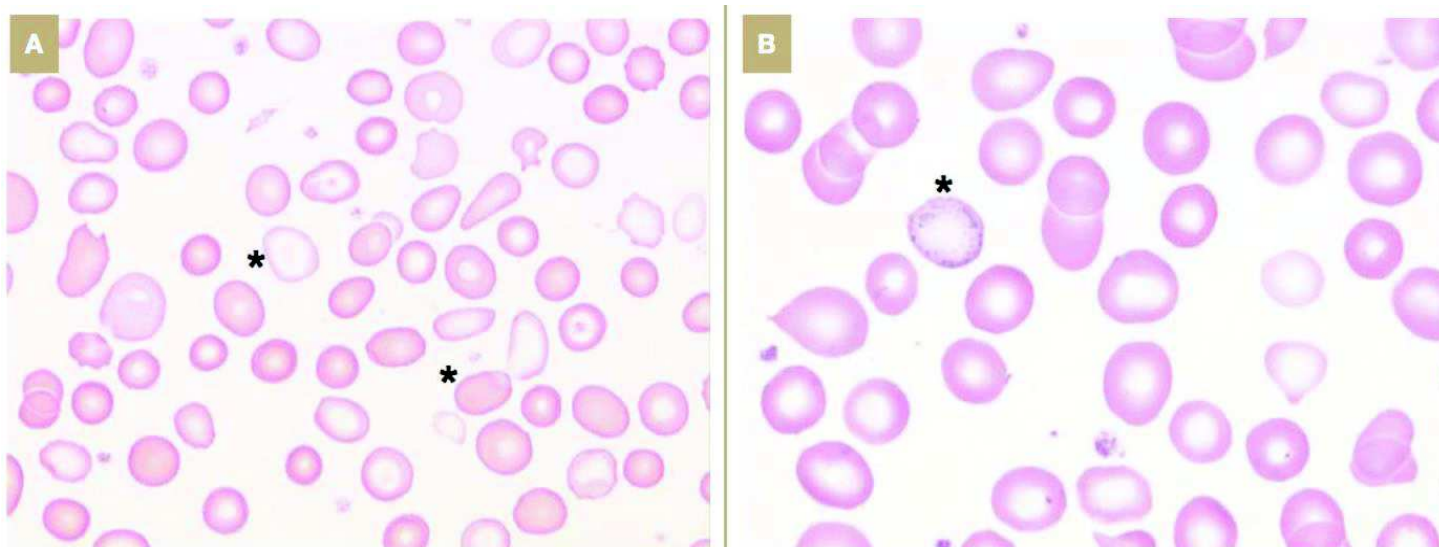


Figure 19 : Dysérythroïèse : anomalie des hématies sur frottis de sang (A x40, B x 63)

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A : Poïkilocytose et anisochromie avec coexistence d'une double population des hématies vides et pleines(*).

B : Présence d'hématie à ponctuation basophile.

- **Dysmégacaryopoïèse (Fig.20)**: mise en évidence par une anisocytose plaquettaire avec des plaquettes géantes et parfois la présence de micromégacaryocytes, la présence de granulations anormales ou absence de granulation⁶⁵.

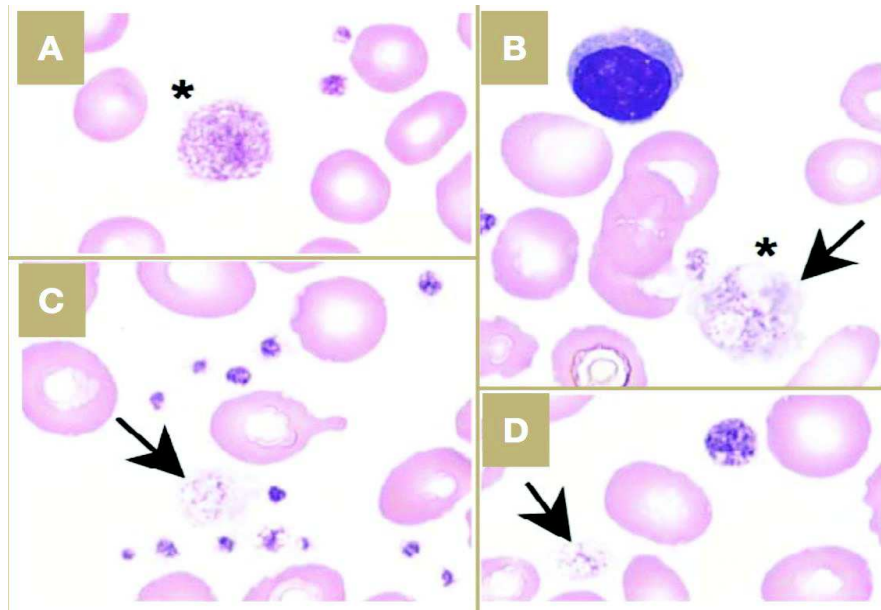


Figure 20 : Dysmégacaryopoïèse : anomalies des plaquettes sur frottis de sang (x63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A et B : exemple de plaquettes géantes.

→ : Hétérogénéité du contenu en granulation parfois peu nombreuses.

- **Dysgranulopoïèse (Fig.21)** : anomalie qualitative ayant la plus grande valeur diagnostique. Elle comprend une dégranulation des PNN ou une hypogranulation (anomalie très spécifique), anomalies nucléaires assez fréquentes avec des condensations anormales de la chromatine et / ou une segmentation des noyaux conduisant à l'existence de forme bilobées ou monolobées avec un aspect de type Pseudo-Pelger-Huët ou hypersegmentation plus rarement retrouvée et caractérisée par un noyau comprenant plus de 6 lobes, persistance de plages cytoplasmiques basophiles (corps de Döhle) ...⁶⁵

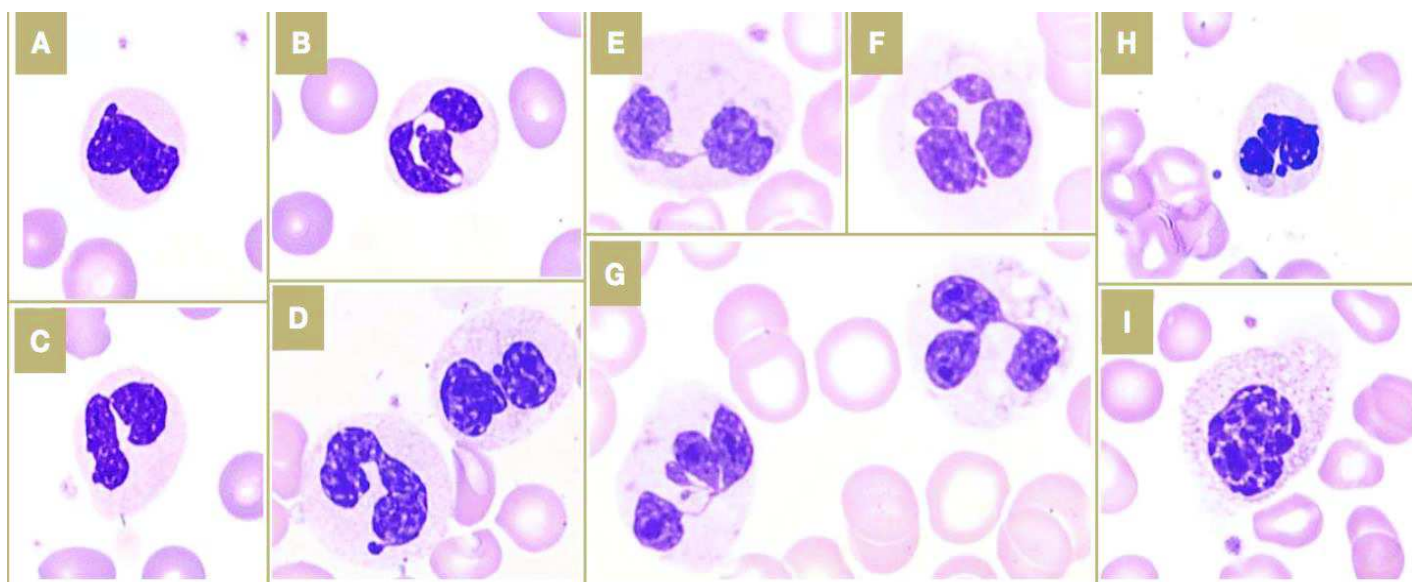


Figure 21 : Dysgranulopoïèse : anomalies des polynucléaires neutrophiles sur frottis de sang (x63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A à I : Polynucléaires neutrophiles hyposegmentés, hypogranuleux

H et I : Polynucléaires neutrophiles à condensation anormale de la chromatine

E et G : Présence de corps de Döhle dans les polynucléaires neutrophiles

F, G et H : Polynucléaires neutrophiles à noyaux dystrophiques.

Enfin, sur le frottis de sang, on peut également mettre en évidence la présence de quelques blastes circulants, certains peuvent comporter des corps d'Auer. Ceux-ci doivent être minutieusement recherchés et dénombrés, leur pourcentage doit être déterminé sur un nombre suffisant d'éléments, à savoir au moins 200 leucocytes selon les recommandations de l'OMS⁴⁹.

La cytologie sanguine a plutôt une valeur d'orientation ; ce n'est qu'après étude cytologique d'un frottis médullaire de qualité que le diagnostic pourra être affirmé.

C. Myélogramme.

Le myélogramme, après aspiration du suc médullaire par ponction sternale ou iliaque, est l'élément essentiel du diagnostic. L'examen du frottis de MO fournit des informations sur la richesse de la MO, la présence de blastes et les anomalies morphologiques des différentes lignées myéloïdes. C'est l'étude de ces critères qui permet de confirmer le diagnostic de SMD.

① **La richesse de la MO (Fig.22):** elle est habituellement normale ou augmentée. Cette richesse médullaire contraste avec les cytopénies périphériques et, est le témoin d'une hématopoïèse inefficace, d'où le terme de « pancytopénie à moelle riche ». On retrouve cependant une moelle hypoplasique chez 10% des patients rendant le diagnostic différentiel difficile entre une aplasie médullaire, une myélofibrose ou un véritable SMD à moelle pauvre, correspondant le plus souvent à des SMD secondaires radio ou chimio-induit. Dans ce cas, il faudra envisager le recours à la biopsie ostéo-médullaire (BOM), indiquée également en cas d'aspiration médullaire impossible⁶⁵.

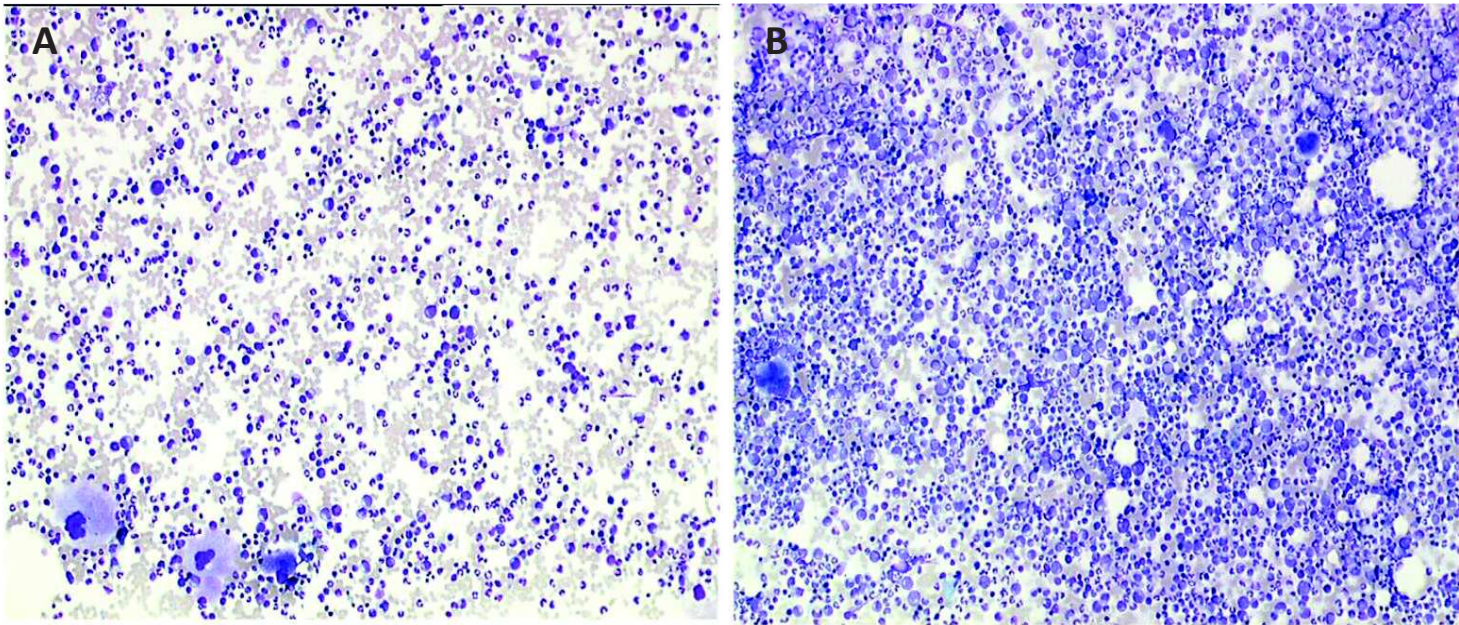


Figure 22 : Illustrations de richesse médullaire (coloration MGG, grossissement x 10).

Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. Les Syndromes Myélodysplasiques [Internet]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/117-les-syndromes-myelodysplasiques>

A : Richesse normale

B : Richesse augmentée

② **Le décompte des blastes** : par définition, le décompte des blastes doit être compris entre 0 et 19%. Au-delà, le diagnostic de LA doit être porté. C'est un élément fondamental de la classification, car le pourcentage de blastes médullaires déterminera les SMD sans excès de blastes (< 5%) avec excès de blaste de type 1 (5 à 9%), avec excès de blaste de type 2 (10 à 19%). Le décompte de blaste doit donc être fait de façon rigoureuse. D'après l'OMS et le GFM, il est recommandé de l'effectuer sur au moins 500 cellules afin de quantifier le plus précis possible le nombre de blastes⁴⁹. Les blastes sont en principe de taille moyenne avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Les contours nucléaires sont souvent ovoïdes avec une chromatine fine et un nucléole visible. Le cytoplasme est basophile, sans archoplasme, et plus ou moins granuleux (**Fig.23**)⁶⁵.

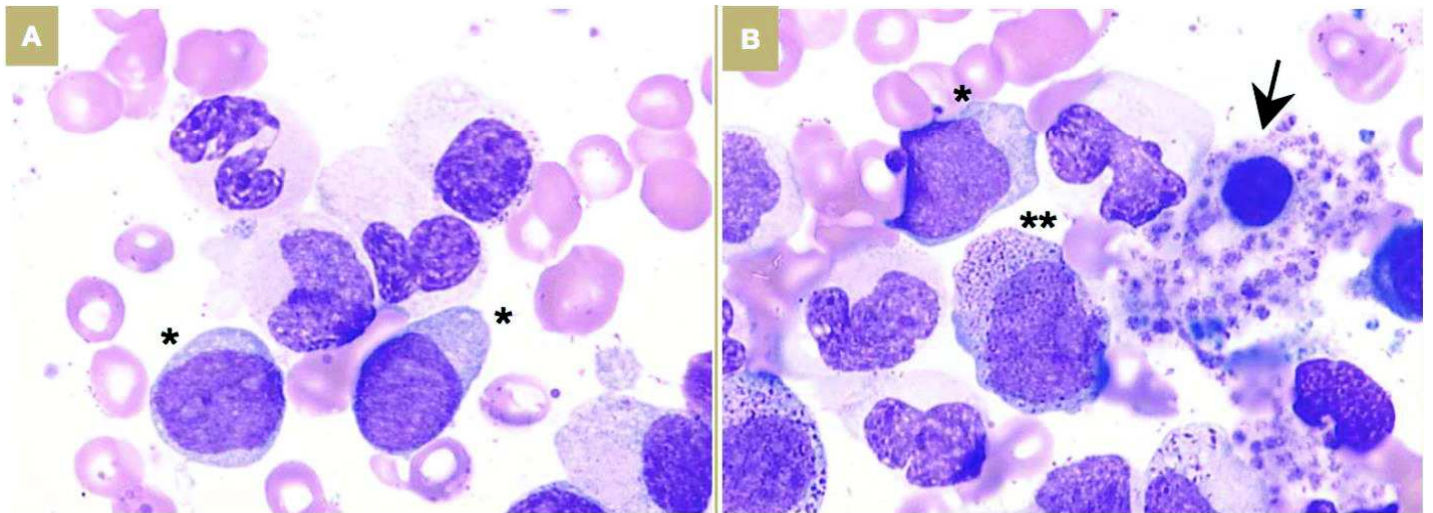


Figure 23 : Blastes sur frottis de MO (x 63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

* : Blastes sans grains

** : Blastes avec grains

→ : Micromégacaryocyte entouré de plaquette.

③ **L'existence d'anomalies morphologiques qualifiant la dysmyélopoïèse** : l'OMS définit une lignée comme dysplasique lorsque les anomalies qualitatives cytologiques sont observées sur plus de 10% des cellules de la lignée⁶⁵. Les dystrophies observées peuvent être très variées et elles n'ont pas toutes la même significativité.

- **La dysmégacaryopoïèse** est variable, avec plus fréquemment des anomalies du noyau, même si la taille et le cytoplasme peuvent aussi être anormaux, elle est considérée par certains comme très informative pour le diagnostic de SMD. Pour cela, le GFM recommande l'observation d'au moins 30 mégacaryocytes⁴⁹. Ainsi, on recherchera des micro-mégacaryocytes de petit noyau à chromatine dense, non lobé avec un cytoplasme peu abondant, souvent entouré de plaquettes (**Fig.23 & Fig.26**). Mais aussi les mégacaryocytes à noyau hypolobés et surtout monolobés (**Fig. 24**) excentrés qui peuvent orienter vers un SMD de type 5q- avec un cytoplasme bien délimité, cet aspect à une forte valeur diagnostique. A l'inverse, on peut observer des cellules à noyaux bien séparés, multiples, arrondis à chromatine dense, on parle de mégacaryocytes en « sac de billes » (**Fig. 25**)⁶⁵.

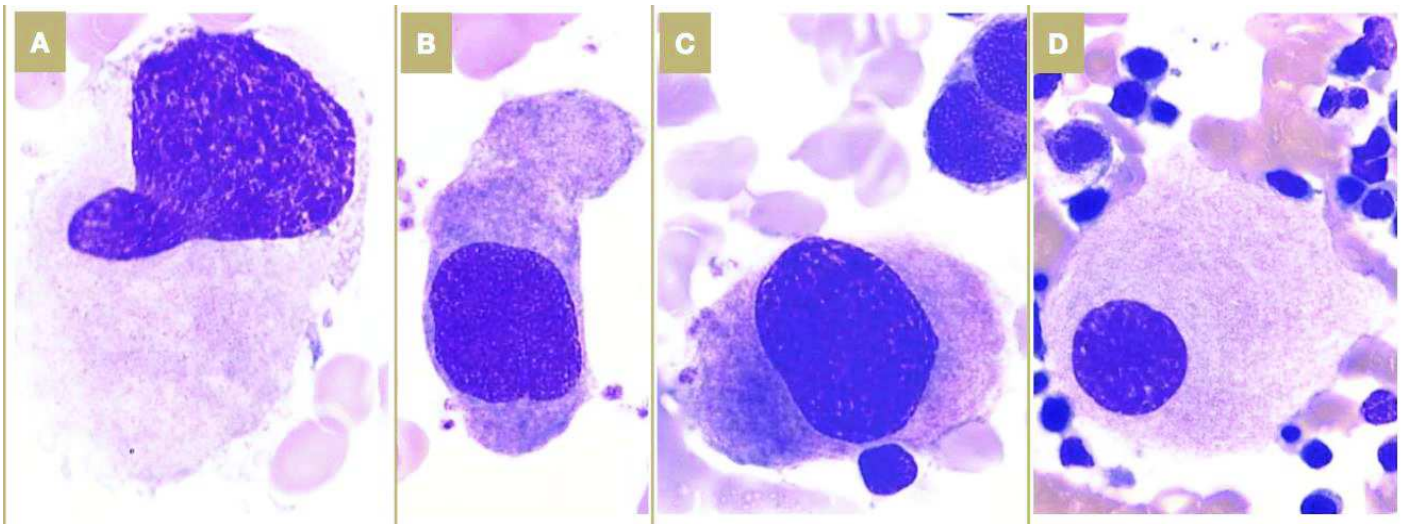


Figure 24 : Illustrations de dysmégacaryopoïèse avec des mégacaryocytes hypolobés sur frottis de MO (A à C, x63 ; D x40).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A, B, C : mégacaryocytes monolobés

D : mégacaryocyte monolobé excentré de type SMD « 5q- ».

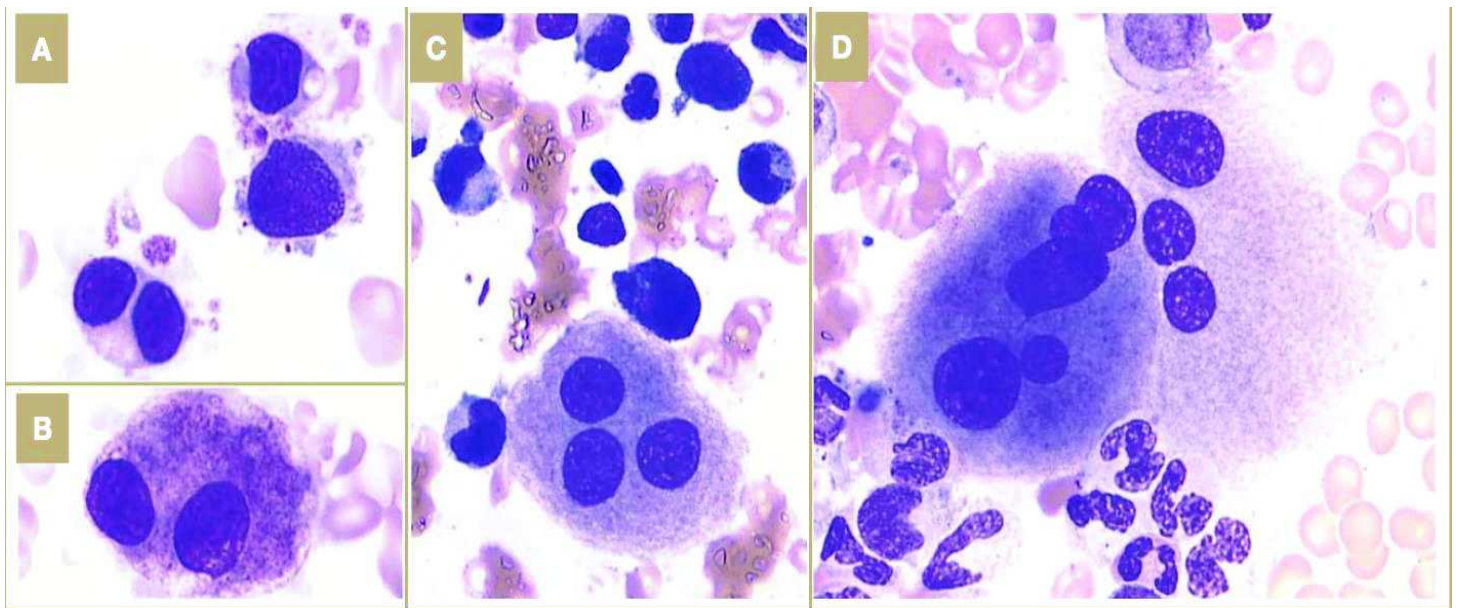


Figure 25 : Illustrations de dysmégacaryopoïèse avec des mégacaryocytes bi- et multinucléés sur frottis de MO (A, B, x63 ; C, D, x 40).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A, B : mégacaryocytes binucléés

C, D : mégacaryocytes multinucléés dit en « sac de billes »

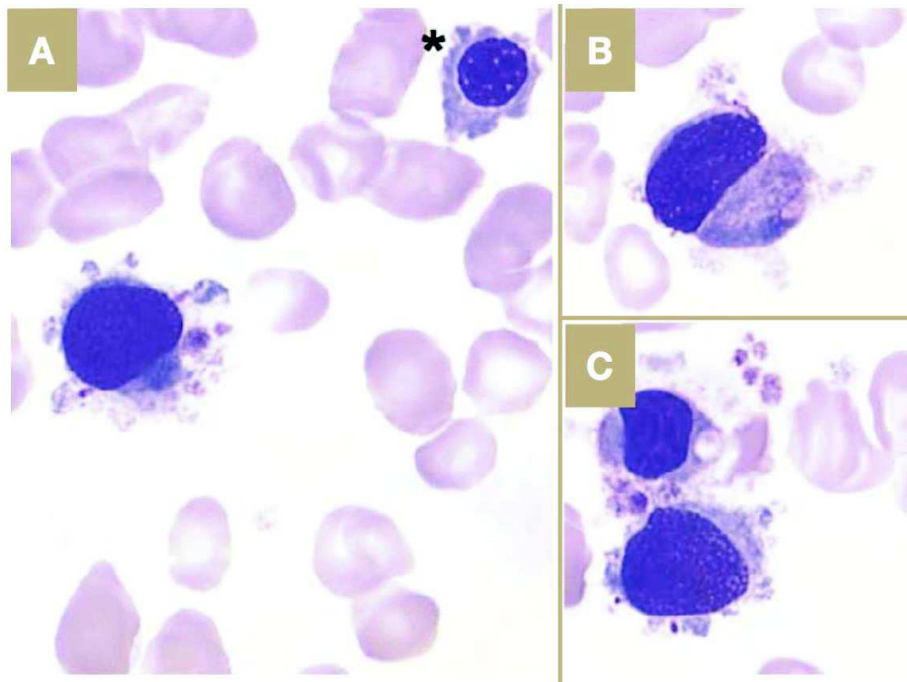


Figure 26 : Illustrations de dysmégacaryopoïèse : micromégacaryocytes entourés de plaquettes sur frottis de MO (A à C x63). * : érythroblaste.

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

- **La dysgranulopoïèse** se manifeste, quant à elle, à la fois par des atteintes cytoplasmiques et nucléaires. Au niveau cytoplasmique, on peut observer des éléments hypogranulaires (peu spécifiques) voire agranulaires (très spécifiques) surtout sur les précurseurs les plus matures ce qui peut parfois rendre leur identification difficile (**Fig. 27**)⁶⁵. On peut également noter un asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique avec persistance de la basophilie du cytoplasme des formes matures, la présence de granules de Chediak-Higashi (volumineuses granulations azurophiles), de corps de Döhle (**Fig. 27**), de vacuoles cytoplasmiques voir parfois de corps d'Auer. Les anomalies nucléaires sont particulièrement significatives. Elles sont de deux types souvent associés : on peut tout d'abord observer une condensation imparfaite de la chromatine avec présence de mottes très denses séparées par des zones plus claires ; et d'autres part on peut constater des anomalies de segmentation, qui peuvent se traduire, d'une part, par des lobes anormaux en terme de taille et de forme hétérogène mais aussi par des anomalies de nombre avec parfois des polynucléaires bilobés - d'aspect Pseudo-Pelger-Huët - ou à l'inverse, par des formes hypersegmentées⁶⁵.

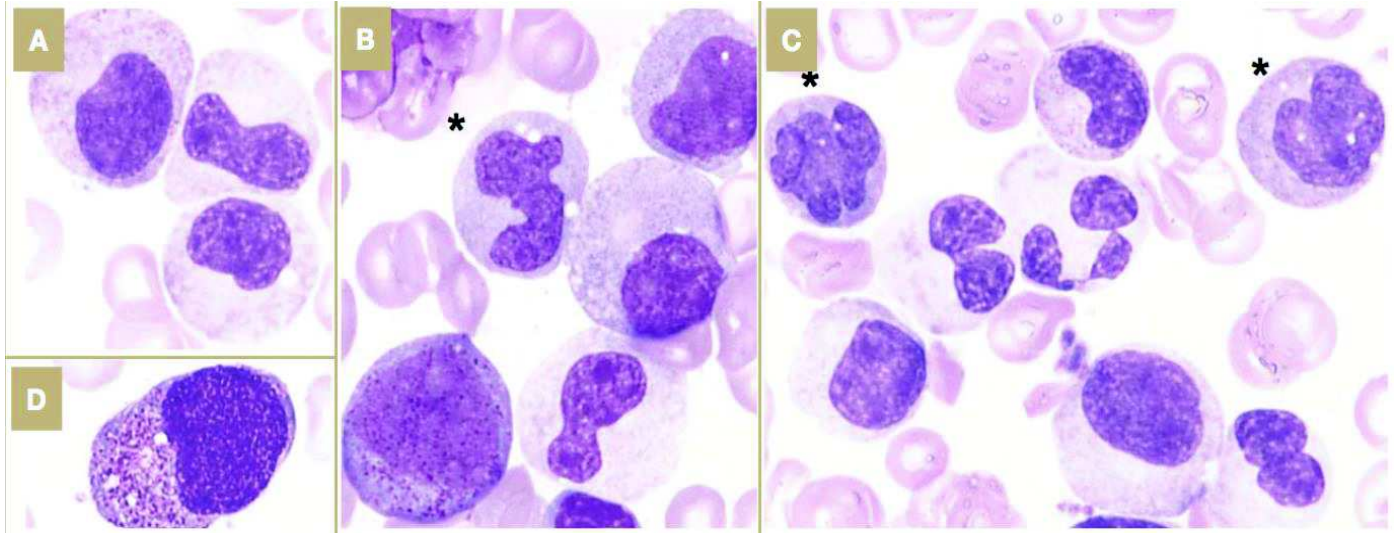


Figure 27 : Illustration de la dysgranulopoïèse sur frottis de MO (A à D, x63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopôïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A, B, C : Dégranulation des précurseurs neutrophiles.

C : Hyposegmentation des polynucléaires neutrophiles, et la présence de corps de Döhle

D : Présence de promyélocytes dystrophiques

* Monocytes

- **La dysérythroïèse** est habituellement observée dans la plupart des SMD, surtout marquée en cas de SMD avec sidéroblastes en couronne. A noter que l'on retrouve souvent une hyperplasie de la lignée érythroïde dans un SMD⁶⁵. On observe des anomalies nucléaires : des noyaux à contours irréguliers voire bosselés, des bourgeonnements nucléaires, des aspects binucléés voire multinucléés. Le cytoplasme, quant à lui, peut-être de coloration hétérogène traduisant un défaut d'hémoglobinisation ce qui se manifeste par des aspects feuilletés du cytoplasme (anischromie). On peut également observer des vacuoles cytoplasmiques correspondant à des mitochondries balonisées, des corps de Howell-Jolly (résidu nucléaire se présentant sous la forme d'une inclusion rouge violacée, reflète la dysérythroïèse), des ponctuations basophiles ou encore des aspects mégaloblastiques plus ou moins associés à un asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique. Ces signes de dysérythroïèse sont la plupart relativement peu spécifiques du SMD et ont une valeur diagnostique faible. Le GFM recommande l'observation d'au moins 100 érythrocytes pour apprécier la dystrophie de cette lignée (**Fig. 28**)⁴⁹.

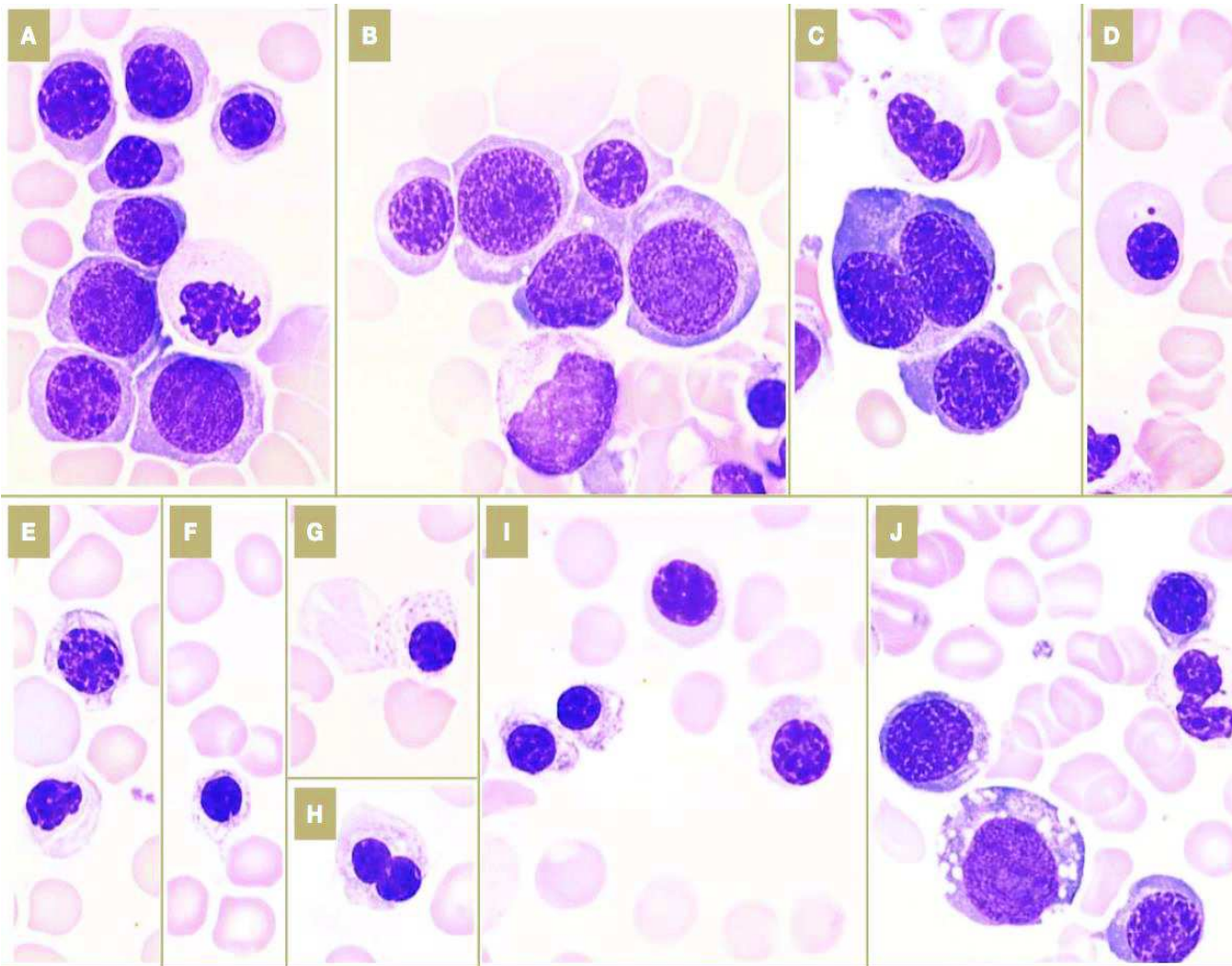


Figure 28 : Illustrations de la dysérythropoïèse sur frottis de MO (A à J, x63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

- A, B : Gigantisme de certains érythroblastes
- B : Asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique
- C : Érythroblaste binucléé
- D : Corps de Jolly
- E, H : Noyaux dystrophiques des érythroblastes
- E, F, G, H : Cytoplasme feuilleté
- F, G, H, I : Ponctuations basophiles
- J : Cytoplasme vacuolé

L'évaluation des dysplasies médullaires doit comprendre également un examen cytochimique utile dans le diagnostic des SMD : la coloration de Perls. Elle permet grâce à la coloration au bleu de Prusse de colorer en forme de grain bleu-vert les vacuoles chargées de fer et permet ainsi de détecter la présence de sidéroblaste (**Fig. 29**)⁶⁵. C'est à dire des érythroblastes contenant du fer insoluble extra-héminique dans leur cytoplasme. Cette recherche doit être effectuée systématiquement devant toute suspicion de SMD. On définit trois types de sidéroblastes en fonction du nombre de grains observés et leur répartition au sein de l'érythroblaste³:

- sidéroblastes de type I : contenant 1 à 4 granule(s),
- sidéroblastes de type II : contenant au moins 5 granules dispersées dans le cytoplasme,
- sidéroblastes de type III ou sidéroblastes en couronne : plus de 5 granules qui englobent au moins un tiers de la circonférence nucléaire. La présence de plus de 15% de sidéroblastes en couronne ou 5 % si présence de la mutation SF3B1, décomptés sur au moins 100 érythroblastes est un argument diagnostique et permet de différencier les anémies réfractaires des anémies sidéroblastiques en l'absence de signes de dysplasie associés. Il s'agira d'une anémie sidéroblastique uni ou multi lignée en l'absence d'excès de blaste ou de délétion isolée 5q-.

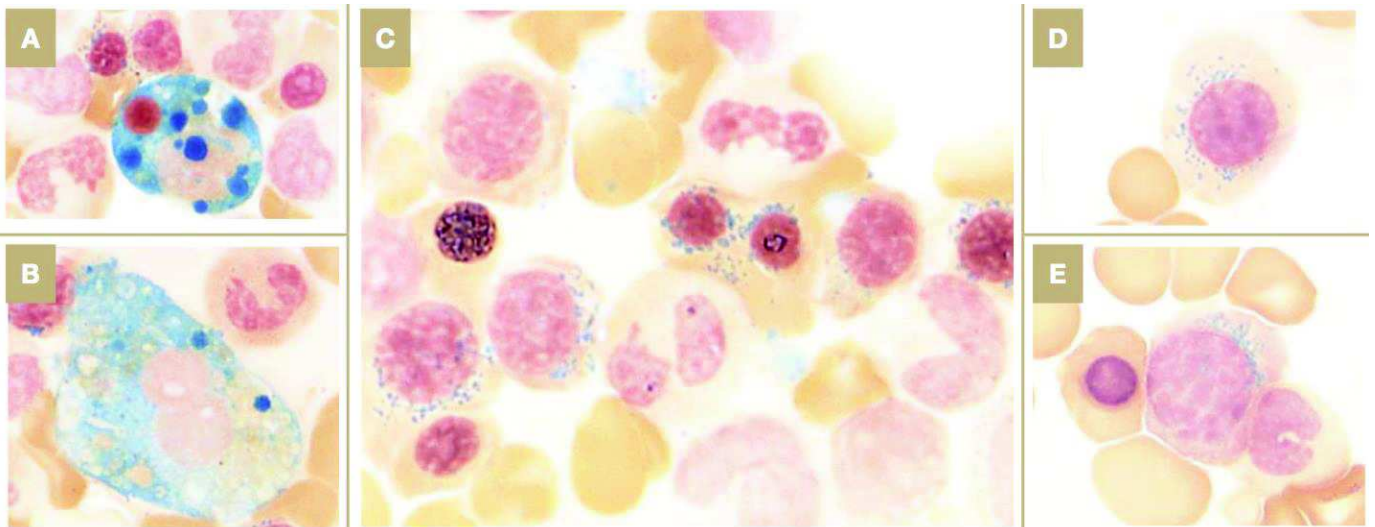


Figure 29 : Illustrations de la dysérythropoïèse sur la coloration de Perl sur un frottis de MO (A, B, x40 ; C à E, x63).

*Wagner-Ballon et Imbert - 2009 - Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique.*⁶⁵

A et B : Présence de fer dans les macrophages

C, D et E : Exemples de sidéroblastes à différents stades de maturation des érythroblastes.

E : Sidéroblaste en couronne avec plus de 5 grains sur un tiers de la circonférence du noyau.

L'évaluation des dysplasies cellulaires sur le frottis de MO est donc essentielle et déterminante mais elle est parfois délicate et subjective. Ainsi, la qualité des étalements et de la coloration des frottis au May-Grünwald-Giemsa (MGG) est extrêmement importante pour l'appréciation du degré de la dysplasie. De plus, il est recommandé de compter au moins 500 cellules sur un frottis de MO (contre seulement 200 cellules sur un frottis sanguin), dont au moins 100 érythroblastes et 30 mégacaryocytes dans la mesure du possible⁴⁹. L'étude de la cytologie médullaire doit s'attacher à évaluer le plus précisément possible le nombre de lignées atteintes, la proportion d'éléments atteints dans une lignée, le type d'anomalie morphologique qui peut avoir une valeur diagnostique plus ou moins importante et le décompte de blaste.

La BOM n'est en France pas recommandée pour le diagnostic des SMD, sauf en cas de moelle hypoplasique rendant le diagnostic différentiel difficile avec une aplasie médullaire ou une myélofibrose⁵². D'ailleurs, la BOM présente quelques avantages par rapport au myélogramme. Elle permet d'apprécier de manière précise la richesse médullaire et le degré de fibrose, les anomalies morphologiques de la lignée mégacaryocytaire sont plus visibles, elle permet l'appréciation de l'augmentation de l'angiogenèse et enfin, un immunomarquage dirigé contre le CD34 permet de mettre en évidence une répartition anormale des progéniteurs médullaires, qui peuvent se retrouver localisés au sein de logettes au lieu d'être situés contre les travées osseuses². Ce signe est appelé ALIP (*Abnormal Localisation of Immature Precursor*) et semble être un marqueur pronostic de la transformation en LAM.

D. La génétique.

1. La cytogénétique conventionnelle : le caryotype.

L'analyse cytogénétique de la MO doit être réalisée systématiquement devant toute suspicion de SMD afin de confirmer le diagnostic, et d'établir le pronostic. Sauf chez des sujets avec un diagnostic de SMD certain et où le caryotype n'aurait aucune conséquence sur la prise en charge thérapeutique⁶⁴. Le caryotype est important pour la compréhension de la physiopathologie, pour le diagnostic et le calcul d'un score pronostique permettant une évaluation du risque de transformation en LAM et une aide à la prise de décision thérapeutique.

D'un point de vue cytogénétique, les SMD sont caractérisés par une grande hétérogénéité. Les SMD primaires et secondaires se distinguent par le degré de complexité du caryotype établi au moment du diagnostic de la maladie. Les SMD *de novo* présentent habituellement des caryotypes normaux ou anormaux simples avec au maximum deux anomalies chromosomiques présentes au sein du clone cellulaire, s'opposant ainsi aux SMD secondaires avec des caryotypes anormaux complexes (décrits par au moins trois anomalies) associés généralement à une évolution clinique défavorable. Ces anomalies cytogénétiques sont détectables dans 40 à 60 % des SMD *de novo*⁶⁶. Ce chiffre monte à 80 % pour les SMD secondaires à une chimiothérapie ou à l'exposition à des agents leucémogènes⁶⁶. Contrairement à ce qui est observé dans les LAM, où dominent des phénomènes de translocation, inversion, ou encore insertion, les SMD se caractérisent surtout par une perte ou un gain complet ou partiel de chromosome. La répartition et la fréquence de ces anomalies dans les SMD sont décrites dans le tableau 13. La valeur pronostique de ces anomalies a été étudiée depuis de nombreuses années, c'est à l'instauration du score pronostic IPSS que la place des données du caryotype est devenue un facteur indispensable. Les anomalies chromosomiques sont au sein de ce score divisées en trois groupes dits de bon, intermédiaire ou mauvais pronostic (**Tab.5**)⁹.

Anomalies cytogénétiques	SMD primaires	SMD secondaires
Non équilibrées		
Trisomie 8 *	10%	
Monosomie 7 ou délétion(7q)	10%	50%
Monosomie 5 ou délétion (5q)	10%	40%
Délétion (20q)*	5-8%	
Perte d'un chromosome Y *	5%	
Insertion (17q) ou Translocation (17p)	3-5%	
Monosomie 13 ou Délétion (13q)	3%	
Délétion (11q)	3%	
Délétion (12q) ou Translocation(12p)	3%	
Délétion (9q)	1-2%	
idic(X) (q13)	1-2%	
Équilibrées		
Translocation (11 ;16)(q23 ;p13.3)		3%
Translocation (3 ;21)(q26.2 ;q22.1)		2%
Translocation (1 ;3)(p36.3;q21.2)	< 1%	
Translocation (2 ;11)(p21 : q13)	< 1%	
Inversion (3)(q21q26.2)	1%	
Translocation (6 ;9)(p23 ;q34)	< 1%	

Tableau 13 : Fréquences des anomalies cytogénétiques décrites au diagnostic des SMD. (p : bras court du chromosome, q : bras long du chromosome)

Eclache et al. - 2016 - Cytogenetic place in managing myelodysplastic syndromes. ⁶⁶

* La présence de ces anomalies comme seule anomalie cytogénétique, et en l'absence de critère morphologique de dysplasie suffisant au myélogramme, n'est pas considérée comme spécifique pour le diagnostic de SMD. Dans le cas de cytopénies persistantes d'origine indéterminée, les autres anomalies cytogénétiques sont considérées comme des arguments en faveur du diagnostic de SMD même en l'absence d'anomalie morphologique.

La cytogénétique conventionnelle réalisée sur la moelle des patients suspects de SMD reste la méthode de référence pour la détection d'anomalies spécifiques. Selon les recommandations de l'ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), l'évaluation du caryotype doit être effectuée sur des cultures à court terme sans facteur de croissance, sur un minimum de 20 métaphases.

Les anomalies les plus fréquentes dans les SMD sont des monosomies ou des délétions touchant principalement les bras longs des chromosomes 5 (5q-) et 7 (7q-) et aussi les bras longs des chromosomes 11, 13, 20, ou les bras courts des chromosomes 12 et 17 ; en revanche, les translocations réciproques sont rares⁶⁷. Certaines de ces anomalies clonales sont corrélées à des anomalies morphologiques et cliniques. Par exemple, les SMD associés à une délétion 5q (del 5q) se caractérisent par des mégacaryocytes monolobés, une anémie réfractaire macrocytaire et un taux de plaquette normal ou augmenté, ils présentent une évolution clinique favorable. A l'inverse, les SMD associés à une monosomie 17 ou la délétion du bras court du chromosome 17 (del 17p) peuvent être associées à une forme particulière de dysgranulopoïèse avec anomalie de type Pseudo-Pelger-Huët et présence de vacuoles dans les neutrophiles, pratiquement toujours associés à un excès de blastes, ils présentent une évolution clinique de mauvais pronostic⁶⁷.

À noter que la trisomie 8 et la délétion 20q, bien que fréquentes dans ces pathologies, elles ne sont que le reflet d'une pathologie myéloïde clonale mais ne permettent pas à elles seules de poser le diagnostic de SMD avec certitude. En effet, la trisomie 8 peut être retrouvée dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ou les LAM *de novo*. La délétion partielle du bras long du chromosome 20 (del 20q) est également retrouvée dans les SMP en particulier dans la myélofibrose primitive⁶⁷. Le problème de la perte du chromosome Y est délicat à trancher : d'une part, la perte est considérée comme physiologiquement due à l'âge avancé des patients masculins surtout lorsqu'elle concerne un petit nombre de mitoses (moins de 15 %) et, d'autre part, les SMD touchent une population relativement âgée. Certaines études considèrent cette perte comme spécifique d'une hémopathie lorsqu'elle atteint des taux de 80 à 100 % de mitoses⁶⁸. Ainsi, lorsque la perte concerne moins de 80 % des mitoses, il est donc impossible de conclure à l'heure actuelle. De ce fait, la trisomie 8, la del 20q et la perte du chromosome Y ne sont pas la preuve définitive de SMD en l'absence de critères morphologiques. En revanche, la présence des autres anomalies cytogénétiques du caryotype médullaire décrites dans le tableau 13 affirme l'existence d'un clone pathologique et, est un argument présomptif pour établir le diagnostic de SMD. Ainsi, la présence de cytopénie sans dysplasie au myélogramme, peut être interprétée comme SMD en présence de ces anomalies chromosomiques⁶⁶.

2. Place de la technique d'hybridation *in situ*.

Lorsque l'analyse cytogénétique classique de la MO n'est pas possible ou a échoué car le nombre de mitoses obtenus après culture est insuffisant (< 19 mitoses), il faut renouveler le prélèvement médullaire et/ ou avoir recours à l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Le caryotype met en évidence des anomalies chromosomiques de nombre et de structure présente au sein d'une cellule tandis que la technique FISH ne permet d'analyser que des anomalies détectables par des sondes génomiques choisies, c'est à dire qu'on utilise une sonde fluorescente spécifique de la séquence d'ADN que l'on souhaite étudier. La présence de caryotypes complexes n'étant pas rare, la FISH voit son indication limitée car l'utilisation de multiples sondes rendrait cette technique très coûteuse. Les indications majeures de la FISH sont orientées par le caryotype lui-même⁶⁶. Elle est utilisée :

- En cas d'échec du caryotype pour éliminer des anomalies simples de mauvais pronostic avec utilisation de sonde spécifique du centromère des chromosomes 7 (\pm 8) et des sondes génomiques homologues des gènes *EVI1* (5q-) et *TP53* (i 17q/ t 17q). Ceci étant recommandé par le GFM.
- Pour rechercher des anomalies chromosomiques non détectées au caryotype mais attendues au vu des résultats de la morphologie des cellules. C'est l'exemple de rares cas de « syndrome 5q- » cryptiques, détectables par les sondes couvrant le gène *EGR1*.

- De fournir une indication quantitative de la taille d'un clone plus sûre que le caryotype puisqu'elle prend en compte toutes les cellules.

Bien que les systèmes de notation pronostiques établis soient basés sur la cytogénétique conventionnelle, certaines études ont montré que les anomalies chromosomiques détectées par FISH pouvaient fournir des informations pronostiques et pouvaient être utiles pour soutenir la prise de décision clinique dans certains cas, tels que la del 5q, la del 7q ou encore une monosomie 7.

3. Apport des nouvelles technologies : séquençage haut débit.

Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS) mettent en évidence des mutations somatiques fréquentes dans la plupart des SMD en particulier dans les SMD à caryotype normal. Le panel NGS des SMD consiste en une analyse exhaustive de plusieurs mutations somatiques connues pour leur rôle dans la physiopathologie de la maladie^{16,66}. Il présente ainsi plusieurs intérêts diagnostique, pronostique et thérapeutique.

- A ce jour, l'aide diagnostique du panel NGS des SMD est limitée au contexte de suspicion clinique de myélodysplasie, en l'absence de cytologie médullaire évocatrice c'est à dire sans signe de dysmyélopoïèse et absence d'anomalie chromosomique clonale⁶⁹.

- L'intérêt pronostique est prédominant car il permet de définir des facteurs moléculaires de pronostic défavorable (mutations *TP53*, *EZH2*, *FLT3*, *RUNX1*...) ou favorable (mutation *SF3B1*) permettant de guider la stratégie thérapeutique (Fig. 30)⁷⁰.

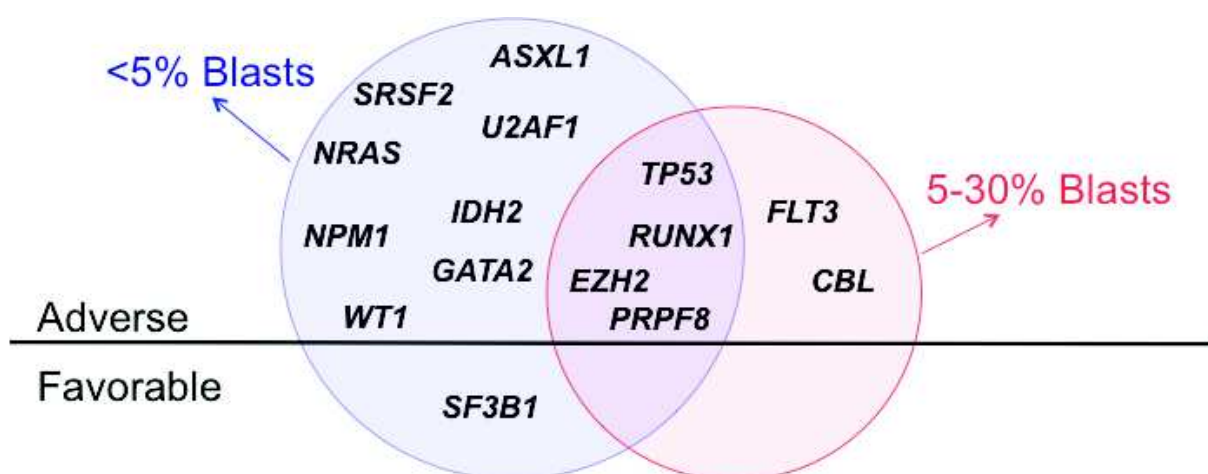


Figure 30 : Pronostique des mutations somatiques mises en évidence par le panel NGS des SMD.

Guidelines for the diagnosis and treatment of Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia Nordic MDS Group - 2017.⁷⁰

Les gènes énumérés au-dessus de la ligne droite sont de pronostiques défavorables. Seule la mutation de SF3B1 répertoriée sous la ligne est favorable.

Le caryotype demeure un « *gold standard* » dans la prise en charge des malades et doit être prescrit au diagnostic chez tous patients suspects de SMD. Les techniques complémentaires FISH sont réalisées essentiellement pour rechercher des anomalies spécifiques dans des caryotypes complexes ou en cas d'échecs répétés du caryotype. Cependant devant la grande diversité des anomalies rencontrées dans les SMD, un panel extensif de sondes serait nécessaire mais en pratique seule l'utilisation de quelques sondes est recommandée par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH) et le GFM, les autres sondes sont optionnelles en fonction du contexte clinique⁴⁹. Enfin, l'étude du profil mutationnel issu du NGS est prometteuse, mais l'impact des mutations détectées (sur la survie, la réponse et la transformation en LA) reste à être préciser.

E. Autres analyses biologiques.

Le diagnostic de SMD est parfois difficile à poser, en effet, non seulement l'évaluation cytologique des anomalies est subjective mais en plus, la dysplasie cellulaire peut être le résultat d'une somme d'autres facteurs, sans lien avec une pathologie clonale. Ainsi, le GFM recommande un certain nombre d'analyses biologiques, soit pour exclure des diagnostics différentiels responsable de dysmyélopoïèse (carences vitaminiques, infection, inflammation) soit dans la perspective du traitement⁴⁹.

Diagnostics différentiels	Biochimie	<ul style="list-style-type: none"> - bilan martial : ferritine + coefficient de saturation à la transferrine - recherche de carences : vitamine B12 sérique + folates sériques et érythrocytaires - recherche d'insuffisance rénale : créatininémie + acide urique + albumine - bilan biologique hépatique : transaminases + PAL - recherche d'un syndrome inflammatoire : CRP - recherche d'une hémolyse : haptoglobine + bilirubine + LDH + test de Coombs - recherche d'une pathologie thyroïdienne : dosage de la TSH - exposition à des métaux lourds, en particulier l'arsenic ? - prise de Cotrimoxazole ? (<i>responsable de PNN hypolobés</i>)
	Virologie	<ul style="list-style-type: none"> - sérologie VIH, hépatite B, hépatite C, parvovirus B19, CMV

En vue du traitement	<ul style="list-style-type: none"> - phénotype érythrocytaire chez tous les patients en cas de traitement substitutif par transfusion : système Rhésus complet et Kell ± phénotypage étendu pour les patients régulièrement transfusés (<i>FY1, JK1, MNS3 et MNS4</i>) - évaluer et suivre l'hémosidérose transfusionnelle : ferritine - typage HLA du patient et de sa fratrie (< 70 ans) ; <ul style="list-style-type: none"> • si une allogreffe ou une chimiothérapie intensive sont envisagées, • si traitement immunosuppresseur car la présence du HLA DR 15 semble un facteur favorable au traitement - dosage sérique de l'EPO dans les SDM de risque faible ou intermédiaire 1 : facteur pronostique important pour la réponse au traitement par EPO recombinante
Autres	Recherche de clone hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est recommandé dans les SMD hypoplasiques

Tableau 14 : Autres analyses biologiques nécessaire au diagnostic de SMD recommandé par le GFM.

Fontenay Met al. - 2008- Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies.⁴⁹

F. Diagnostic différentiel.

1. Autres causes de dysmyélopoïèse.

Dans le diagnostic des SMD, la principale difficulté est de déterminer si la dysmyélopoïèse est liée à une cellule clonale ou si elle est due à une cause secondaire. Il est donc important avant même la réalisation du myélogramme d'éliminer ces causes secondaires de dysplasie. En effet, de nombreux facteurs sont responsables dysmyélopoïèses. Les plus fréquemment retrouvées sont les carences nutritionnelles (B12, folates), de nombreux médicaments comme le cotrimoxazole, les chimiothérapies anticancéreux (méthotrexate), ou encore l'utilisation de facteur de croissance granulocytaire. On retrouve en outre des causes virales comme le Parvovirus B19 ou des causes toxiques comme l'exposition aux métaux lourds en particulier l'arsenic⁶⁵.

2. Autres hémopathies.

Des hémopathies autre que les SMD peuvent également être responsable de dysmyélopoïèse et sont donc à écarter lors du diagnostic, tel que des troubles hématologiques congénitaux comme l'aplasie médullaire, dysérythropoïèse congénitale ou encore l'hémoglobinurie paroxystique nocturne⁶⁵.

Effectivement, la plupart des patients souffrant d'un SMD présentent une MO normale ou hypercellulaire, et dans ce cas-là le diagnostic est souvent plus facile. En revanche, dans moins 10% des cas, la MO est pauvre, on parle de SMD hypoplasiques, la moelle est pauvre soit parce qu'elle est vraiment hypocellulaire ou parce qu'il existe une myélofibrose. Dans ces cas-là, une ponction correcte de la MO est rarement obtenue, les frottis médullaires pauvres rendent l'identification des dysplasies et la numération précise des blastes difficiles à établir. Ce qui induit des diagnostics différentiels délicats notamment avec les aplasies médullaires qui présentent des anomalies morphologiques communes aux SMD à savoir la présence d'érythrocytes macrocytaires sur frottis sanguin, mais sans dysplasie sur les lignées cellulaires. La présence d'une myélofibrose n'est pas spécifique d'un SMD, d'autres hémopathies présentent souvent une fibrose notamment les SMP ou plus rarement certaines LAM. Dans ces contextes-là, une BOM permettra ainsi de faire le diagnostic différentiel.

3. Critères de définition des SMD.

Le diagnostic de SMD sera retenu, devant une cytopénie uni ou multi lignée persistante de plus de 6 mois après exclusion des autres causes de cytopénie et de dysplasie, en présence d'au minimum un critère de diagnostic parmi (**Fig. 32**)⁷² :

- Excès de blastes médullaire compris entre 5-10 % avec une morphologie myéloïde
- > 10% de cellules dysplasiques sur au moins une lignée cellulaire myéloïde
- 15% de sidéroblaste en couronne
- Clonalité définie avec une anomalie caryotypique associée aux SMD.

Par ailleurs, la sensibilité accrue des techniques de séquençage à haut débit (NGS) a permis d'identifier des mutations somatiques au sein de gènes considérés comme impliqués à la physiopathologie des hémopathies, dans les cellules sanguines de sujets sains, asymptomatique (sans cytopénie ou anomalie cytologique)⁷². Ainsi, la notion de seuil de détection de ces mutations, appelé fréquence allélique (Variant Allele Frequency ou VAF), est essentielle, et a été fixé arbitrairement à 2 % des cellules hématopoïétiques pour définir le concept de CHIP. Le principal facteur de risque des CHIP est l'âge des individus, d'où l'acronyme ARCH (*Age- Related Clonal Hematopoiesis*) c'est-à-dire hématopoïèse clonale liée à l'âge. En effet, la prévalence des CHIP augmente avec l'âge de 0,3 % avant 40 ans, à plus de 10 % après 70 ans⁷¹.

	<p>Syndrome myélodysplasique Myelodysplastic Syndrome ou MDS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie uni ou multi-lignée • Un des éléments diagnostic parmi: Excès de blastes (>5%) avec une morphologie myéloïde, 10% de cellules dysplasiques sur au moins une lignée cellulaire myéloïde (érythroïde, granulocytaire, mégacaryocytaire), 15% de sidéroblaste en couronne, clonalité définie avec une anomalie caryotypique associée aux MDS
	<p>Cytopénie Clonale de Signification Indéterminée Clonal Cytopenia of Undetermined Significance ou CCUS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie uni ou multi-lignée • Hématopoïèse Clonale • Absence de critères cytologique de syndrome myélodysplasique
	<p>Cytopénie Idiopathique de Signification Indéterminée Idiopathic Cytopenia of Undertermined Significance ou ICUS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie uni ou multi-lignée • Absence d'hématopoïèse clonale • Absence de critères cytologique de syndrome myélodysplasique
	<p>Hématopoïèse Clonale de Signification Indéterminée Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential ou CHIP</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absence de cytopénie • Hématopoïèse Clonale • Absence de critères cytologique de syndrome myélodysplasique

Figure 32 : Critères de définition des SMD, Cytopénie Clonale et Idiopathique de signification Indéterminée, en comparaison à ceux d'une CHIP.

P. Valent, Pathobiology - 2019- ICUS, IDUS, CHIP, CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from Myelodysplastic Syndromes, and Clinical Implications.⁷¹

La découverte des CHIP (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*) suggère, par analogie avec les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) et les lymphocytoses B monoclonales (MBL), un risque accru de développer d'une hémopathie maligne aussi bien myéloïde que lymphoïde⁷². De manière inattendue, elle induit un risque accru de mortalité d'origine non-hématologie, notamment cardiovasculaire par augmentation du risque d'athérosclérose, ainsi une CHIP ne se limite pas à la définition d'un état pré leucémique potentiel⁷².

Malgré des différences subtiles, qui sont peut-être plus pertinentes pour la recherche que pour la pratique clinique, des tentatives de classification des affections « pré- malignes » quelque peu chevauchantes et potentiellement cliniquement importantes ont été réalisées à partir de trois principaux résultats cliniques et pathologiques : présence de marqueurs clonaux, dysplasie et cytopénies sanguines périphériques⁷². Ainsi on parle de CHIP, en présence d'une hématopoïèse clonale sans cytopénies périphériques ni de critères cytologiques en faveur d'un SMD. Les patients atteints de cytopénie peuvent être classés en cytopénie idiopathique de signification indéterminée (ICUS : *Idiopathic Cytopenia of Uncertain Significance*). ICUS est défini comme tout degré de cytopénie dans une ou plusieurs lignées qui persiste pendant au moins 6 mois et qui ne remplit pas les critères diagnostiques minimaux pour un SMD et ne peut pas être expliqué par d'autres conditions hématologiques ou non hématologiques. La dysplasie idiopathique de signification indéterminée (IDUS : *Idiopathic Dysplasia of Uncertain Significance*) est définie comme la présence de dysplasie dans le sang périphérique et dans la moelle, sans cytopénie, ni signe de clonalité et aucune cause évidente. IDUS est généralement un

processus réactif plutôt qu'un trouble médullaire primaire. Enfin, on parle de cytopénie clonale de signification indéterminée (CCUS : *Clonal Cytopenia of Undetermined Significance*) en présence d'une hématopoïèse clonale associée à de la cytopénie uni ou multi lignée. A la différence du CHIP où la VAF est fixé arbitrairement à 2%, celle du CCUS est beaucoup discuté, mais une VAF à 20% a été fixé. Cette valeur est basée pour permettre éventuellement de séparer les cytopénies dues au processus clonal (comme le CCUS) d'autres cytopénies qui coexistent avec des petits clones de CHIP de manière aléatoire et sans conséquence. Étant donné une probabilité de progression de CCUS de près de 100% sur 10 ans vers des tumeurs malignes myéloïdes, le terme de signification inconnue n'est peut-être pas adapté et le CCUS devrait être placé dans une catégorie de néoplasmes myéloïdes précoces^{71,72}.

Ainsi, on comprend qu'il existe une véritable hiérarchie qui en fonction de la profondeur des dysplasies, des cytopénies ou même de la clonalité, on peut distinguer ces état « pré-leucémique » des SMD et LAM.

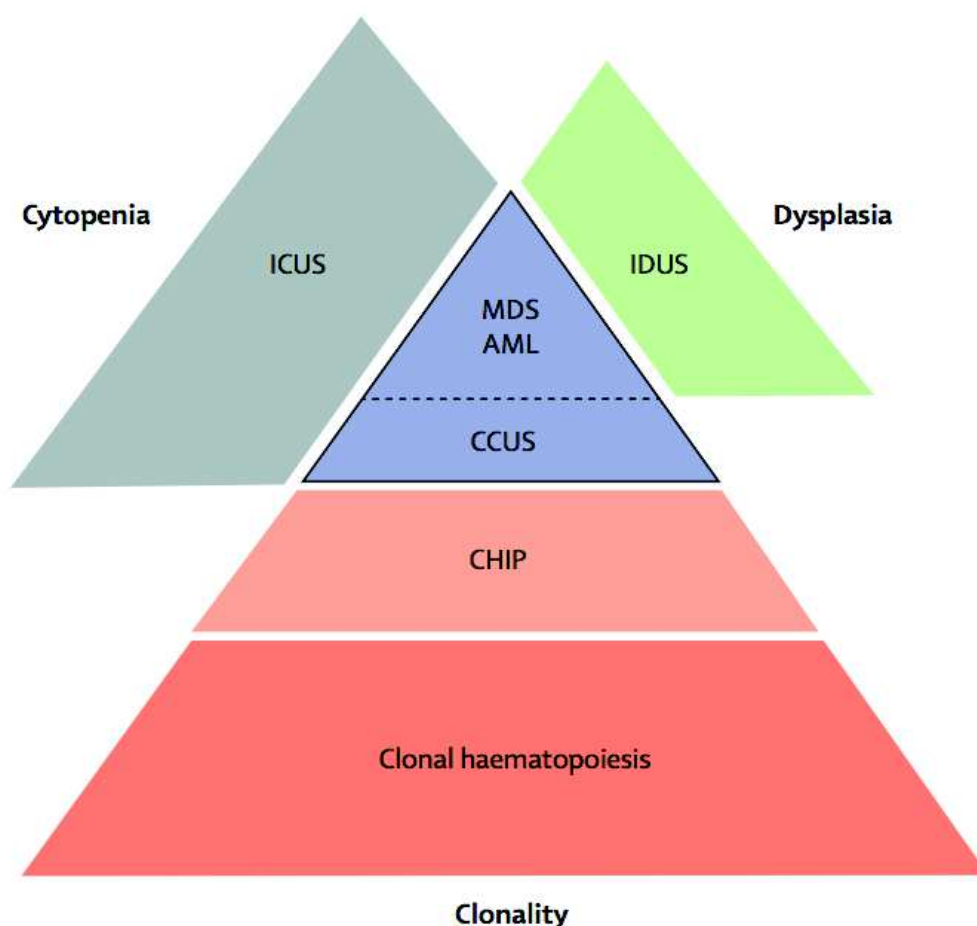


Figure 33 : Relation entre la cytopénie, la dysplasie et la clonalité dans les états précurseurs et le SMD.

L. P. Gondek and A. E. DeZern, *The Lancet Haematology* - 2020- Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benets of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states.⁷³

CHIP = Hématopoïèse Clonale de Signification Indéterminée.

ICUS = Cytopénie Idiopathique de Signification Indéterminée.

IDUS = Dysplasie Idiopathique de Signification Indéterminée.

CCUS = Cytopénie Clonale de Signification Indéterminée.

MDS = Syndrome MyéloDysplasique.

LMA = Leucémie Myéloïde Aiguë.

III. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic des SMD.

Le diagnostic d'un SMD est simple en présence d'anomalie objective clairement détectée, comme la présence d'une dysplasie supérieure à 10%, un caryotype anormal, une coloration de Perls positif ou des blastes médullaires supérieurs à 5%. En revanche, ce dernier est difficile à poser lorsque les anomalies morphologiques sont frustrées et que les critères décisifs sont absents. C'est dans ce contexte là que l'OMS préconise l'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic des SMD. Elle s'est imposée en tant que co-critère intéressant et comme une véritable technique complémentaire. En revanche, aucune méthode de CMF n'a atteint la sensibilité requise pour affirmer un diagnostic à elle seule.

A. Généralité sur cytométrie en flux.

La CMF est une technologie assez récente qui s'est développée principalement au cours des trente dernières années. C'est une technique d'analyse multiparamétrique qui permet une analyse individuelle, quantitative et qualitative de cellules en suspension dans un flux liquide. Cette méthode de typage cellulaire repose sur l'existence, à la surface des cellules ou dans leur cytoplasme de molécules spécifiques appelées antigènes de différenciation. Ces marqueurs sont désignés depuis 1982 par un terme générique : « *cluster of differentiation* ». En nomenclature internationale, on les désigne par les lettres CD suivies d'un nombre : par exemple CD45. L'identification cellulaire basée sur ces marqueurs est appelée plus communément un immunophénotypage. Son objectif est de déterminer les caractéristiques immunologiques de chaque cellule puis de les classer en populations homogènes. Pour cela, on utilise des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes ou molécules fluorescentes qui permettent de détecter les antigènes de différenciation voulus. L'immunophénotypage d'un prélèvement sanguin ou médullaire est donc constitué d'un panel de CD exprimés par les cellules de l'échantillon⁷⁴.

La CMF permet d'étudier les paramètres physiques et biologiques de chaque cellule individuellement, puis, en regroupant les informations issues d'un très grand nombre de cellules, d'en déduire les caractéristiques de la population étudiée⁷⁵. La CMF se décompose schématiquement en quatre éléments (**Fig.34**):

- Un système fluide : aspire l'échantillon et par un système de fluide sous pression permet d'aligner rapidement les cellules les unes derrière les autres, pour faire passer un maximum de cellules en un temps limité devant le faisceau laser.
- Un système lumineux : le faisceau lumineux du (ou des) laser(s) excite les fluorochromes fixés sur les cellules lorsqu'elles traversent la chambre d'écoulement.

- Un système optique : permet de transformer les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en informations lumineuses mesurables.
- Un système électronique : converti les différents signaux lumineux via des photomultiplicateurs en données informatiques exploitables par le biologiste.

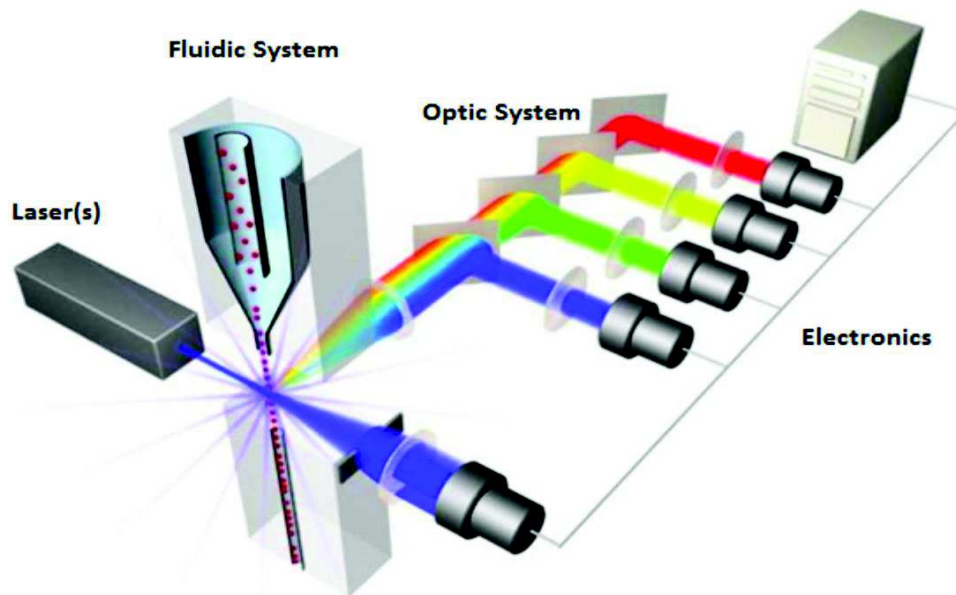


Figure 34: Les composants de base d'un cytomètre en flux.

Flow Cytometry - A Survey and the Basics [Internet]. Disponible sur: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>⁷⁵

Avant toute analyse par CMF, les cellules sont d'abord mises en suspension. Elles vont être aspirées et ainsi pouvoir défiler les unes derrière les autres, de manière rapide et régulière devant un faisceau laser. A ce stade, la lumière est réfractée ou diffusée dans toutes les directions. Le degré de déviation de la lumière dépend en grande partie des caractéristiques physiques de la cellule, en particulier de sa complexité et de sa taille. La forme cellulaire, la topographie de la surface, la membrane, le noyau et le matériel granulaire ont un impact sur la diffusion de la lumière⁷⁵. La diffusion de la lumière est collectée sous deux angles (**Fig.35**):

- diffusion vers l'avant (FSC : forward scatter) : mesure de la lumière principalement diffractée dans la direction du trajet du laser. Elle est proportionnelle à la surface ou la taille de la cellule.
- diffusion latérale (SSC : side scatter) : collectée à environ 90° du trajet du laser. Elle mesure principalement la lumière réfractée et réfléchiée par les éléments intracellulaires et, est proportionnelle à la granularité cellulaire ou à la complexité interne.

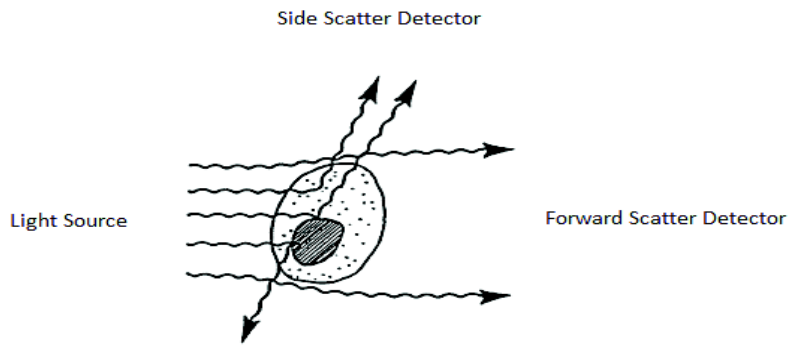


Figure 35: Propriété de diffusion de la lumière d'une cellule.

*Flow Cytometry - A Survey and the Basics [Internet]. Disponible sur: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>*⁷⁵

Ainsi, les données de diffusion directe et latérale peuvent être utilisées pour classer les échantillons par leur taille (FSC) et par leur complexité interne (SSC).

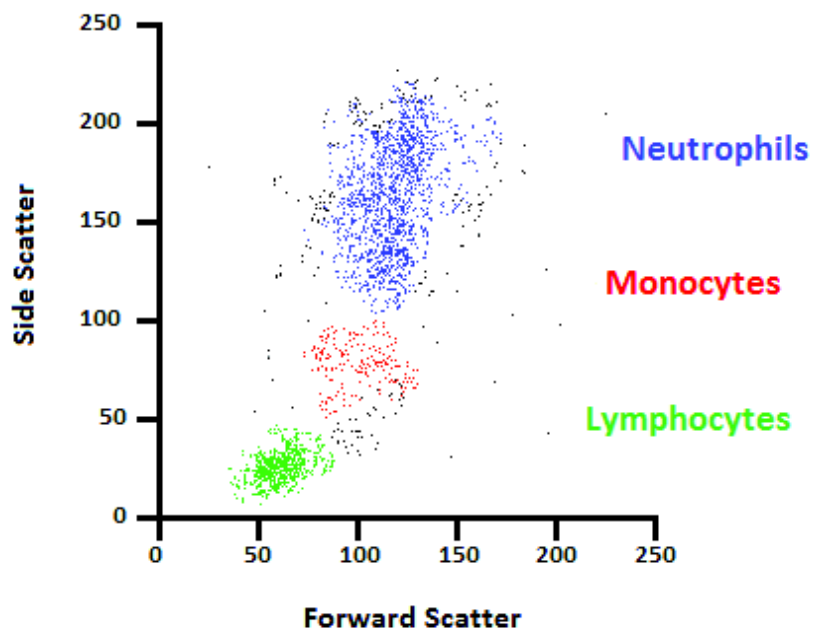


Figure 36 : Graphique SS/FS obtenu par CMF à partir d'un échantillon de sang périphérique.

*Flow Cytometry - A Survey and the Basics [Internet]. Disponible sur: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>*⁷⁵

Le graphique FSC/ SSC (**Fig. 36**) est systématiquement utilisé pour l'analyse des échantillons car il permet de distinguer les différentes lignées cellulaires. Ainsi, la FSC en x permet de faire la distinction des cellules par rapport à leurs tailles, tandis que la SSC en y permet de différencier les monocytes des polynucléaires neutrophiles de taille comparable en fonction de la granularité cellulaires⁷⁵.

En CMF, les cellules à analyser présentent des antigènes d'intérêt à leur surface ou en intracytoplasmique qui peuvent être détectés grâce à des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. Lorsque les anticorps se sont fixés à l'antigènes, les fluorochromes présents seront excités par le laser et vont émettre en retour une fluorescence de longueur d'onde spécifique. Ainsi, la combinaison des données FSC, SSC et de fluorescence permet d'exploiter plusieurs sous-populations de cellules à partir de leurs échantillons⁷⁵.

B. Développement de la CMF dans les SMD.

Bien que la CMF soit déjà largement utilisée pour le diagnostic, la caractérisation et la classification de diverses hémopathies et la détection de maladie résiduelle post-traitement, seules des données limitées ont été présentées concernant la signification diagnostique et pronostique de l'immunophénotypage chez les patients atteints de SMD. En effet, l'utilisation de la CMF dans les SMD a été principalement limitée à la caractérisation des cellules blastiques dans les LA secondaires à un SMD. Pour observer d'éventuelle dérégulation de l'hématopoïèse des SMD par CMF multiparamétrique, il a fallu dans un premier temps identifier l'expression antigénique normale de l'hématopoïèse. Par la suite, plusieurs anomalies chez les patients atteints de SMD ont été individuellement mises en évidence sur les précurseurs granuleux, les monocytes et les érythroblastes dont la première publication date de 1998 avec l'équipe d'Elghetany et al.⁷⁶. Or, aucune caractéristique immunophénotypique unique en CMF ne peut affirmer seule l'existence d'un SMD, car certaines de ces anomalies sont observées dans d'autres pathologies. Une stratégie de *scoring* a ainsi été développée pour permettre d'obtenir une sensibilité et une spécificité suffisantes pour le diagnostic des SMD⁷⁷. La CMF s'est donc révélée être une technique complémentaire aux analyses cytologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire pour le diagnostic de SMD.

1. Flow Cytometric Scoring System (2003): score pronostiques

Parmi les premières études, en 2003, un score cytométrique très complexe FCSS (*Flow Cytometric Scoring System*) a été proposé par Wells et al.⁷⁸. Cette étude a été menée sur une cohorte de 115 patients atteints de SMD, ce score repose sur des anomalies immunophénotypiques observées sur les myéloblastes, les cellules granuleuses et les cellules monocytaires de prélèvements médullaires. Le but de cette étude était d'identifier et de quantifier de multiples anomalies cytométriques en score de notation pronostique et de le corréliser avec l'IPSS. Les anomalies immunophénotypiques ont été classées comme normales/ légères (0-1), modérées (2-3) ou sévères (≥ 4)⁷⁸.

Cette étude a confirmé qu'une grande proportion des prélèvements médullaires des patients atteints de SMD avaient des caractéristiques phénotypiques divergentes de la normale concernant les trois lignées cellulaires étudiées, et également significativement différentes des résultats observés chez des patients atteints d'autres hémopathies. En effet, il a été mis en évidence une granularité anormale des PNN caractérisée par une diminution de la SSC par rapport aux PNN matures normaux, en corrélation avec une hypogranularité cytoplasmique. Mais aussi une diminution anormale de l'expression du CD45 signifiant une maturation anormale illustrée par une augmentation de la quantité de blastes (**Fig.37**).

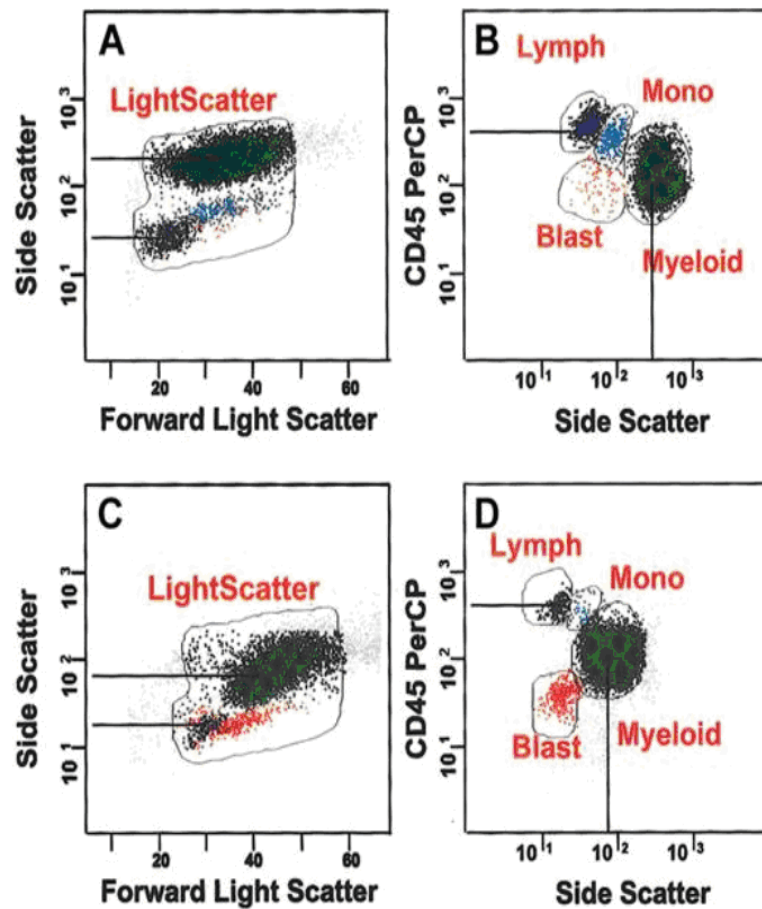


Figure 37: Exemple d'anomalies retrouvées dans des moelles de patients atteints de SMD.

Wells DA, Benesch M, Loken MR, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.⁷⁸

(A-B) : Immunophénotypage médullaire d'un sujet sain.

(C-D) : Immunophénotypage médullaire d'un patient atteint d'un SMD : hypogranularité des PNN, augmentation du pourcentage des blastes.

Par la suite, plusieurs études ont proposé une stratégie de *scoring* des anomalies immunophénotypiques observées dans les SMD. Ainsi, quelque soit le type de prélèvement (sanguin ou médullaire), le panel utilisé par le système de *scoring* a montré que le nombre d'anomalies immunophénotypiques était fortement corrélé avec le score pronostic IPSS⁷⁸⁻⁷⁹.

[2. Standardisation de la CMF dans les SMD par ELN.](#)

En mars 2008, un groupe de travail constitué de nombreux représentants de 18 centres européens ont participé à un atelier ELN (*European Leukemia Net*) tenu à Amsterdam permettant une première étape vers la standardisation de la CMF dans les SMD. La mission principale du groupe de travail était de fournir aux laboratoires des lignes directrices pour définir le rôle précis de la CMF dans le diagnostic et le pronostic des SMD. Ainsi, le groupe de travail a défini un consensus concernant les

méthodes standards optimales d'échantillonnage, de manipulation et de traitement des cellules médullaires pour la CMF (**Tab. 15**). Ils ont également permis de fixer des combinaisons minimales consensuelles d'anticorps monoclonaux pour analyser de manière explicite la dysplasie immunophénotypique des cellules de la MO dans les SMD connus ou suspectés. Les auteurs ont souligné la nécessité d'étudier différents compartiments médullaires tels que les cellules granuleuses matures, les cellules monocytaires, le compartiment érythroïde mais aussi d'analyser la modification du pourcentage des précurseurs CD34+, la modulation de l'expression de marqueurs antigéniques ou l'expression de marqueurs d'infidélité de lignée. Ainsi, lorsqu'ils les ont appliquées dans la pratique, les profils de CMF aberrant étaient bien corrélés à la morphologie, à la classification et aux systèmes de notation pronostique des SMD. Cependant, le groupe de travail a également conclu que malgré des preuves solides d'un impact de la CMF dans les SMD, de nouvelles études supplémentaires multicentriques plus poussées devaient être entreprises pour établir des modèles plus robustes, avec pour objectif ultime d'affiner les systèmes de diagnostic et de notation pronostique⁸⁰.

	Recommandation
Anticoagulant dans l'échantillon de MO	De préférence héparine (alternative: EDTA)
Température de stockage	Température ambiante
Temps de traitement	< 24 h
Prétraitement avant coloration (facultatif*)	Lyse des érythrocytes par le chlorure d'ammonium (sans fixateur)
Tampon de lavage (facultatif)	Solution saline tamponnée au phosphate avec 0,5% d'albumine sérique bovine ou humaine
Coloration	Cytométrie en flux à quatre couleurs minimales Minimum de 500 000 cellules incubées avec la combinaison d'anticorps
Préservation d'une expression antigénique stable après coloration	Fixation de paraformaldéhyde (0,5%)
Fenêtre pour cellules myéloïdes immatures	Identifier les progéniteurs des blastes
Doublets	À exclure par un graphique hauteur FSC / surface FSC
Neutrophiles dégranulés	Évalué en comparant leur SSC (à l'échelle linéaire ou logarithmique) à celle des lymphocytes; à noter, ces cellules chevaucheront des progéniteurs et / ou des monocytes et doivent être identifiées par des marqueurs appropriés
Antigènes ancrés au glycosyl-phosphatidylinositol (CD14, CD16, CD24)	L'expression sera modifiée si l'HPN est présente, mais cela n'entrave pas le diagnostic du SMD

* Aucune procédure de lavage ne peut être utilisée, pour l'identification des marqueurs présents sur les érythrocytes matures.

Tableau 15 : Résumé des recommandations de ELN concernant les méthodes standards d'échantillonnage, de manipulation et de traitement des cellules médullaires pour la CMF.

Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. Haematologica⁸⁰.

L'atelier ELN a été revu en 2009 et 2010 pour affiner les exigences minimales pour évaluer la dysplasie médullaire. L'objectif était de définir la manière dont les données cytométriques devaient être collectées et analysées. En effet, les marqueurs de base proposés devaient permettre une catégorisation des résultats en «normaux», «évocateurs de» ou «diagnostics de» SMD⁸¹. Le tableau 16 regroupe les paramètres minimaux considérés comme les plus pertinents pour le diagnostic des SMD.

Cellules de la MO	Analyses recommandés	Aberrance
Progéniteurs immatures myéloïdes et monocytaires	Pourcentage de cellules parmi la fraction cellulaire nucléée*	Augmentation du pourcentage
	Expression de CD45	Absence / Diminué / Augmenté
	Expression de CD34	Absence / Diminué / Augmenté
	Expression de CD117	(Homogène) sous / surexpression
	Expression de HLA-DR	Absence ou augmentation
	Expression de CD13 et CD33	Absence / diminution / augmentation
	Expression asynchrone de CD11b, CD15	Présence de marqueurs matures
	Expression de CD5, CD7, CD19, CD56**	Présence de marqueurs d'infidélité de lignée
Polynucléaires neutrophiles	Pourcentage de PNN par rapport aux lymphocytes	Diminué
	SSC des PNN rapport SSC des lymphocytes	Diminué
	Relation entre CD13 et CD11b	Modifié***
	Relation entre CD13 et CD16	Modifié***
	Relation entre CD15 et CD10	Modifié***
Monocytes	Pourcentage de cellules	Diminué / augmenté
	Distribution des stades de maturation	Passage à l'immature
	Relation entre HLA-DR et CD11b	Modifié***
	Relation entre CD36 et CD14	Modifié***
	Expression de CD13 et CD33	(Homogène) sous / surexpression
	Expression de CD56**	Présence d'un marqueur d'infidélité de lignée
Progéniteurs B	Dénombrement en tant que fraction du CD34 + total basé sur CD45 / CD34 / SSC en combinaison avec CD10 ou CD19	Diminué ou absent
Compartiment érythroïde (en cours d'évaluation)	Pourcentage de cellules érythroïdes nucléées	Augmenté
	Relation CD71 et CD235a	Modifié ***
	Expression de CD71	Diminué
	Expression de CD36	Diminué
	Pourcentage de précurseurs CD117 positifs	Augmenté

Tableau 16: Exigences minimales recommandées pour évaluer la dysplasie par CMF selon ELN.

Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* ⁸¹.

*Les écarts de dénombrement indiquent des aberrations.

**À utiliser avec prudence, car le CD56 peut être régulé à la hausse lors de l'activation, tenir compte des valeurs limites normales (également dans une moelle stimulée).

***Les schémas modifiés peuvent inclure une distribution modifiée des stades de maturation et / ou des niveaux d'expression modifiés des antigènes indiqués.

Ce groupe de travail a également permis d'examiner la spécificité de l'analyse de la CMF dans le SMD par rapport à une série d'autres maladies hématologiques ou de cytopénies non clonales⁸¹. Ainsi, ils ont montré qu'un nombre élevé d'aberrations immunophénotypiques était corrélé à une plus grande probabilité de SMD. Mais aucun diagnostic définitif ne devrait être donné si la CMF n'est pas intégrée aux autres informations diagnostiques telles que : la clinique, la cytologie sanguine et médullaire, la cytogénétique et la génétique moléculaire. Elle apparaît donc être une technique complémentaire aux analyses cytologiques, cytogénétiques et moléculaires surtout lorsque le diagnostic de SMD est difficile (anomalie morphologique non évidente et caryotype normal ou non concluant).

En revanche, ce groupe de travail utilise un panel d'anticorps important nécessitant une expertise approfondie pour l'interprétation des anomalies. Ce qui constitue ainsi une limite à son utilisation simple et reproductible en routine. Le but est donc de développer une analyse cytométrique pour le diagnostic des SMD basée sur des paramètres suffisamment sensibles et spécifiques, reproductibles entre les différents centres et facilement compréhensibles par le clinicien prescripteur⁸¹. Il a de ce fait été développé un score plus simple : le score d'Ogata.

3. Score d'Ogata : score diagnostic.

a) Création du Score d'Ogata (2009).

En 2009, une étude a conçu un score simple et reproductible en CMF pour le diagnostic des SMD, applicable dans de nombreux laboratoires, appelé score d'Ogata, du nom du premier auteur de la publication⁸². Il s'agit d'un score établi sur quatre paramètres explorant essentiellement la lignée granuleuse pour le diagnostic de SMD de bas grade⁸².

Dans un premier temps, il a fallu déterminer des intervalles de référence, en comparant les données entre des patients atteints de SMD de bas grade (diagnostic établi à partir de critères morphologiques ou/et cytogénétiques) et des patients cytopéniques non clonaux. A partir d'échantillons de moelle, trois anticorps : CD 34, CD 10, CD 45 ; réunis dans un unique tube ont permis l'analyse du score d'Ogata⁸².

Le choix de l'étude de ces anticorps s'appuie sur plusieurs critères. Il a été mis en évidence une proportion plus élevée de cellules CD 34 + chez les patients atteints de SMD que chez sujets sains, et la grande majorité des cellules sont engagées dans la lignée myéloïde. Ceci est à l'origine d'une évolution opposée de deux principaux composants du compartiment des cellules CD 34 + : l'augmentation des myéloblastes CD 34+ et la diminution des progéniteurs lymphoïdes B CD 34 +. Ainsi, l'analyse individuelle de ces deux populations cellulaires permet de mettre en évidence de manière précise et sensible ces variations. Le CD 34 + est donc un bon marqueur pour l'identification des SMD. De plus, il a été rapporté que l'intensité d'expression du CD 45 des lymphocytes par rapport aux myéloblastes CD 34+ peut varier dans les deux sens au cours d'un SMD. Enfin, il a été montré que la structure des cellules

granulocytaires diminuait chez les patients atteints de SMD ceci s'explique par une hypogranulation cellulaire (un des critères cytologique spécifique du SMD). Le CD10 est un marqueur des polynucléaires neutrophiles mature. Les précurseurs granuleux n'exprime pas le CD10, c'est donc un marqueur intéressant car il permet d'éliminer les PNN du sang périphériques notamment en cas de prélèvement médullaire hémodilué. Des paramètres complémentaires sur les myéloblastes ont été analysés tel que l'expression du CD 11b, CD 15 et du CD 56⁸².

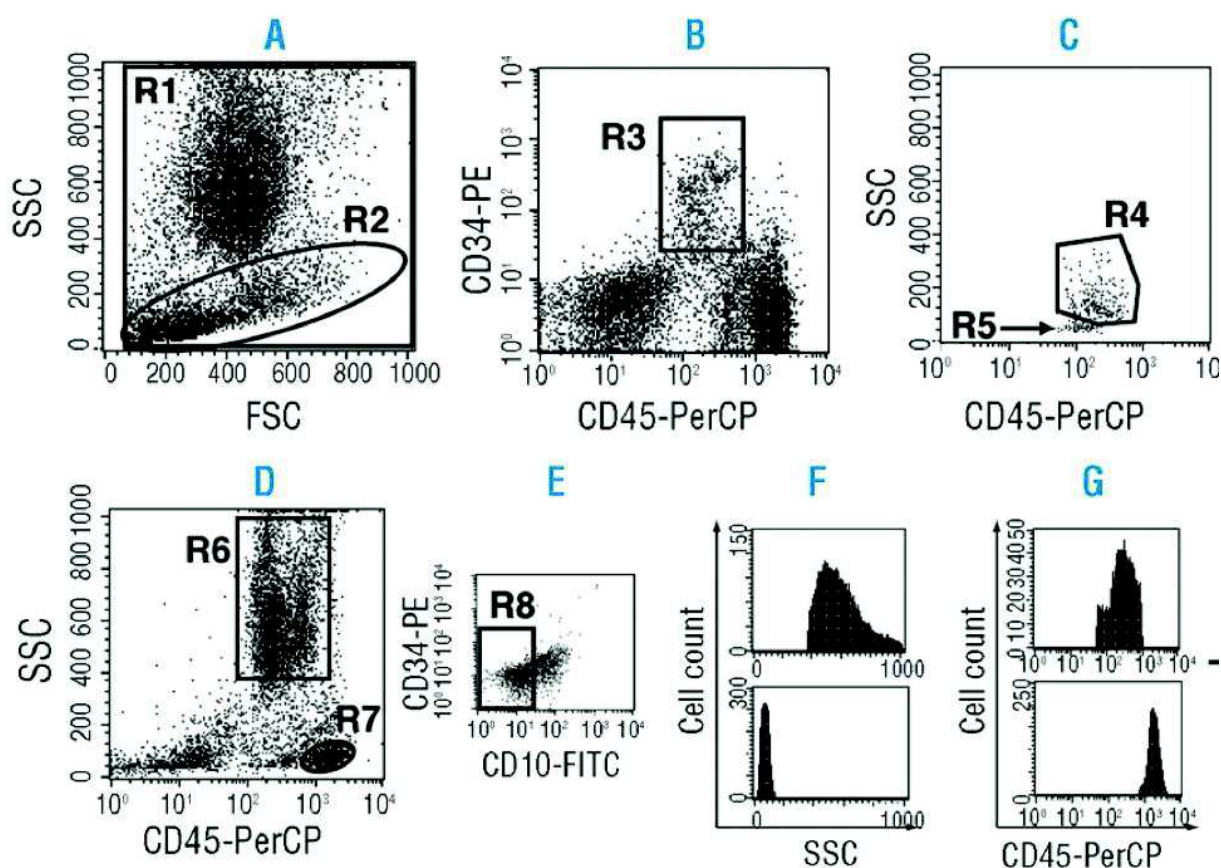


Figure 38: Analyse de quatre paramètres cardinaux à partir d'une aliquote de cellule unique marquée par les anticorps CD10-FITC, CD34-PE et CD45-PerCP.

Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* ⁸².

- (a) Toutes les cellules nucléées (R1) et les cellules avec une structure relativement plus faible (R2).
- (b) Les cellules de (R2) ont subi un marquage CD 34, CD 45, et les cellules CD 34 + avec une expression intermédiaire de CD 45 (R3) ont été isolées.
- (c) Les cellules (R3) ont ensuite été affichée sur un tracé CD 45 / SSC ce qui permet de distinguer les progéniteurs des lymphocytes B CD 34+ affichées par la flèche (R5) des myéloblastes CD 34+ (R4). Et ainsi examiner le pourcentage de myéloblaste CD34+ et le pourcentage de progéniteur B CD34+.
- (d) Par ailleurs, toutes les cellules (R1) ont été marquées par le CD 45 permettant ainsi d'isoler les cellules granulocytaires (R6) et les lymphocytes (R7)
- (e) La fraction cellulaire CD 10 - des cellules granulocytaires a été étudiée (R8)
- (f) Ratio des granuleux CD 10- (graphe supérieur) par rapport à celle des lymphocytes (graphe inférieur)
- (g) Ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes (graphe inférieur) par rapport à celle des myéloblastes (graphe supérieur).

Ainsi, l'analyse de ces quatre paramètres cardinaux sur une population témoin (patients cytopéniques non clonaux) a permis de déterminer des intervalles de référence pour ces paramètres et d'établir le score d'Ogata qui à la différence du score pronostic FSCC, est un test de dépistage. Ainsi le score Ogata est quantifié de 0 à 4 en attribuant un point par paramètre :

- pourcentage de myéloblastes CD 34 + par rapport aux cellules nucléées totales > 2.4%
- pourcentage de progéniteurs B CD 34 + par rapport aux cellules nucléées totales < 5%
- le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes par rapport à celle des myéloblastes] 4 - 7.8 [
- le ratio de la structure (SSC) des granuleux CD10 - par rapport à celle des lymphocytes < 6

Il a mis en évidence qu'aucun témoin cytopénique ne présentait un score supérieur à 1, démontrant qu'un score supérieur ou égal à 2 sur 4 était en faveur d'un SMD⁸². Par la suite, une étude prospective du score d'Ogata, sur des cohortes de validation japonaises et italiennes, retrouve des sensibilités de diagnostics de 65% et 89% et des spécificités de 98 % et 90% respectivement pour un seuil à 2⁸².

De plus, il a été montré que les expressions de CD 11b, CD 15, CD 56 sur les myéloblastes CD 34+ avaient en général des niveaux plus élevés pour les patients SMD. Mais aucun de ces paramètres n'a pas permis d'améliorer la puissance diagnostique du score. Ils présentaient d'ailleurs une grande variabilité inter-laboratoire⁸². Cependant, il est important de noter, qu'il existe toute de même des points critiques pour l'évaluation de la dysplasie médullaire, puisqu'en effet cette évaluation peut être entravée par la présence d'une hypocellularité médullaire, d'une fibrose, d'une quantité insuffisante d'échantillon ou d'une hémodilution⁸².

Donc, ce protocole de CMF a l'avantage d'être relativement simple, et applicable dans de nombreux laboratoires, basés sur quatre paramètres hautement reproductibles à partir d'un seul prélèvement de MO, ne nécessitant pas de nombreux panels d'anticorps coûteux. Il permet de faire la distinction entre les SMD de bas grade sans marqueurs conventionnels (difficiles à diagnostiquer) et les cytopénies non clonales. En revanche, une étude plus approfondie était nécessaire pour améliorer la puissance diagnostique de ce score et ainsi pouvoir l'utiliser en pratique clinique⁸². Ce score a donc fait l'objet d'une étude multicentrique.

b) Validation multicentrique du score d'Ogata (2012).

En 2012, une validation multicentrique du score d'Ogata a été réalisée dans le cadre de l'ELN dans le but de valider la reproductibilité de ces données cytométriques et de rendre ce score applicable dans la pratique clinique. Cette étude comprenait une première cohorte « cohorte d'apprentissage » de 538 patients permettant d'affiner les normes de référence des paramètres du score et dans un second temps une « cohorte de validation » de 259 patients pour confirmer la performance de la valeur diagnostique du score. Ainsi, six centres européens ont participé à cette étude dans laquelle seuls deux des trois anticorps de l'étude princeps ont été utilisés, le CD 34 et le CD 45. Le CD10 n'a pas été utilisé puisqu'en effet, il n'y avait pas de différence significative entre l'étude de l'ensemble des granuleux ou uniquement les précurseurs granuleux⁸³.

Cette étude par l'ELN a permis de modifier les seuils de référence de deux des quatre paramètres. Dorénavant, le pourcentage de myéloblastes CD 34+ par rapport aux cellules nucléées totales est strictement inférieur à 2% et le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes par rapport à celle des myéloblastes est compris entre 4 et 7.5. (**Tab.17**). Ces nouvelles valeurs seuils ont ainsi permis d'obtenir une spécificité de 92% et une sensibilité de 69% sur la cohorte de validation⁸³.

Paramètre analysé	Norme selon Ogata et al. 2009	Norme selon Della Porta et al. 2012
% de myéloblastes CD 34 +	< 2.4 %	< 2%
% de progéniteurs B CD 34 +	> 5 %	> 5 %
le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes par rapport à celle des myéloblastes] 4 – 7.8 [] 4 – 7.5 [
le ratio des granuleux CD10 - par rapport à celle des lymphocytes	> 6	> 6

Tableau 17 : Valeurs seuils définies pour les quatre paramètres analysés en CMF.

Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. Haematologica⁸³.

c) L'intérêt du score Ogata Étendu.

En 2015, une étude multicentrique prospective menée en parallèle dans quatre centres français (CHU Cochin-Paris, CHU Limoges, CHU Henri-Mondor-Créteil et CHU Dijon) a évalué la valeur ajoutée du score d'Ogata dans le diagnostic de routine des SMD en situation réelle. Au total 652 patients ont été recrutés prospectivement dans les quatre centres : 346 présentaient un SMD, 53 une LMMC et 253 témoins présentant des causes non hématologiques de cytopénies (carences vitaminiques, thrombocytopénies idiopathiques, cytopénies idiopathiques ou iatrogènes, insuffisance rénale...) ⁸⁴.

Les quatre paramètres du score Ogata ont été déterminés à l'aide du CD 45, CD 34 et du CD 10 comme l'étude princeps. Ce score a été amélioré par l'utilisation du CD 19 pour mieux cibler les progéniteurs des cellules B CD 34+. Puis il a été enrichi par l'évaluation de l'expression aberrante du CD 5 et du CD 7 sur les myéloblastes et du CD 56 sur les monocytes dans 2 des 4 centres (Cochin-Paris et Limoges). Le score d'Ogata a été calculé comme décrit par Della Porte et al⁸³. Puis ce score incrémenté de ces trois paramètres supplémentaires dénommé score d'Ogata étendu, a ainsi été établi en ajoutant un point supplémentaire si plus de 30% des myéloblastes exprimaient le CD 5 ou le CD 7 ou si plus de 30% des monocytes exprimaient le CD 56, soit un score sur 7 points au total. Un score de 2 ou plus a été considéré comme positif pour le score d'Ogata classique et étendu⁸⁴.

Les résultats du score d'Ogata classique dans cette étude montrent, une spécificité de 89% et une sensibilité de 53% pour les SMD de bas grade (prouvé et non prouvé), une sensibilité de 68% pour les SMD EB 1, de 84% pour les SMD EB 2 et de 72% pour les SMD/ SMP. On observe ainsi que la sensibilité augmente avec la gravité de la maladie. L'ajout du marqueur CD19 n'a amélioré que de peu la spécificité et n'a pas modifié la sensibilité mais il a permis de cibler plus facilement le compartiment des cellules B. L'ajout des paramètres du CD 56 et le CD 7 (CD 5 n'étant pas contributive), a permis une amélioration de la sensibilité du score d'Ogata étendu, quel que soit le type de SMD avec une sensibilité de 67% pour les SMD de bas grade, de 97 % pour les SMD EB 1, de 100% pour les SMD EB 2 et de 89% pour les SMP/SMD avec une spécificité qui reste inchangée (Fig. 39).

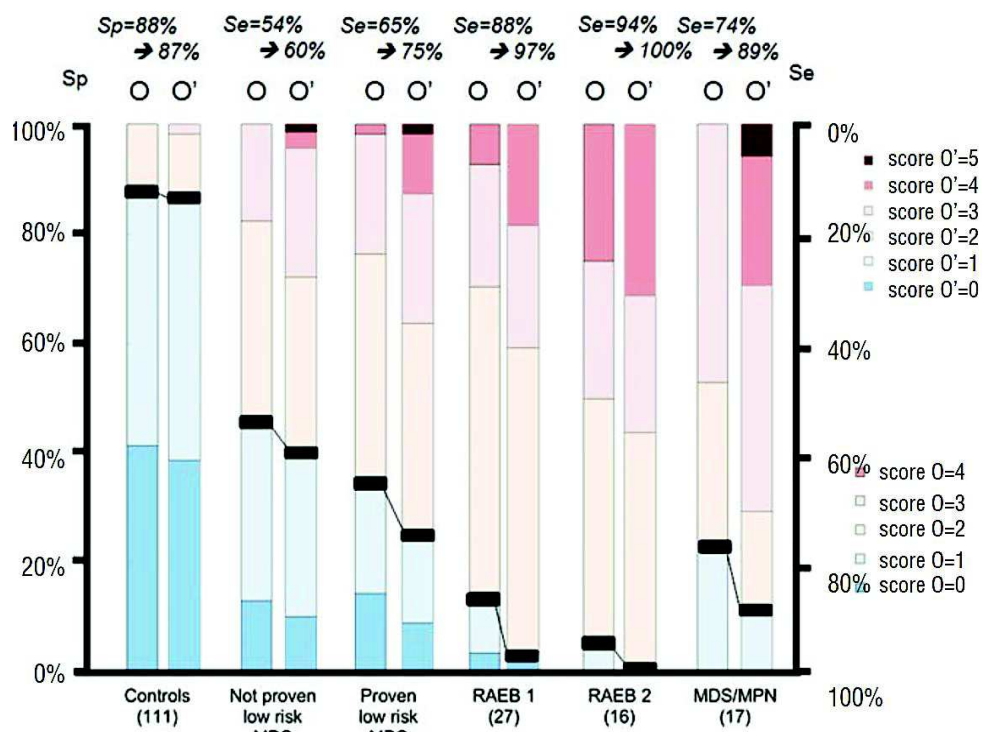


Figure 39: Comparaison entre les scores Ogata classique (à gauche) et étendu (à droite).

Les lignes en gras indiquent le seuil de 2. L'ordonnée de gauche indique la spécificité (sp), et l'ordonnée de droite la sensibilité (se).

Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, 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*⁸⁴

Une analyse complémentaire a été effectuée sur 413 échantillons dans 2 des 4 centres (CHU Cochin et CHU Mondor) afin d'analyser l'impact éventuel de l'hémodilution. Seule la quantification des progéniteurs myéloïdes CD 34+ serait sensible à l'hémodilution. L'analyse du score Ogata sur des échantillons hémodilués a montré des résultats similaires à ceux des échantillons non hémodilués avec une spécificité à 96% et une sensibilité à 59%, confirmant ainsi que l'impact de la dilution sanguine reste marginal. Il convient de mentionner que certaines anomalies immunophénotypiques peuvent être trouvées dans le sang périphérique des patients atteints de SMD⁸⁴.

Dans l'ensemble, cette étude montre que le score d'Ogata est reproductible et robuste, mais avec une mauvaise sensibilité, principalement dans les SMD à faible risque où des outils de diagnostic efficaces supplémentaires sont nécessaires. Le score d'Ogata peut également être positif chez des patients ne présentant pas de SMD, notamment lors de carences martiales ou vitaminiques, de cytopénies transitoires et dans des maladies auto-immunes, indiquant l'importance de ne pas interpréter le score d'Ogata seul, mais de l'utiliser conjointement au contexte clinique et à l'examen cytologique des frottis de MO. Le score d'Ogata étendu permet quant à lui d'améliorer la sensibilité de ce score sans modifier la spécificité. Étant donné la rapidité de rendu des résultats de CMF, elle peut utilement compléter les résultats cytomorphologiques dans un rapport intégré. Cependant, selon les recommandations du groupe de travail ELN un panel plus sophistiqué est encore nécessaire pour mieux exploiter l'identification des changements précoces associés aux SMD émergents⁸⁴.

C. L'analyse des différentes lignées par CMF dans les SMD

1. La lignée érythroïde

Les approches cytométriques pour le diagnostic des SMD se sont concentrées principalement sur la détection d'anomalies immunophénotypiques dans le compartiment des progéniteurs lymphoïdes, des monocytes en cours de maturation et des cellules myéloïdes comme on l'a vu dans le score d'Ogata. Mais parmi les différents compartiments médullaires, l'analyse du compartiment érythroïde paraît particulièrement intéressante pour l'approche diagnostique des SMD. En effet, l'anémie et les anomalies cytologiques caractérisant la dysérythropoïèse sont fréquentes, et souvent précoces dans les SMD de bas grade, mais généralement peu spécifiques. Le but étant d'identifier les marqueurs de la dysérythropoïèse pertinents.

a) Analyse de la lignée érythroïde normale par CMF

Le contingent érythroblastique est très faible dans une MO normale étudiée en CMF, en raison de la sensibilité de ces cellules à la lyse érythrocytaire. Les érythroblastes les plus immatures sont cependant identifiables par leur absence d'expression de CD 45 et leur faible signal en SSC (**Fig. 37**). Dès les premiers stades d'anémie réfractaire, ce contingent peut apparaître augmenté en cytométrie. La confirmation de la nature érythroblastique de ces cellules passe par un marquage avec le CD 36 (récepteur de la thrombospondine), le CD 71 (récepteur de la transferrine), ou avec un anticorps anti-glycophorine (CD 235). L'expression de ces marqueurs peut toutefois être anormale chez les patients SMD par rapport à des érythroblastes sains ⁸⁵.

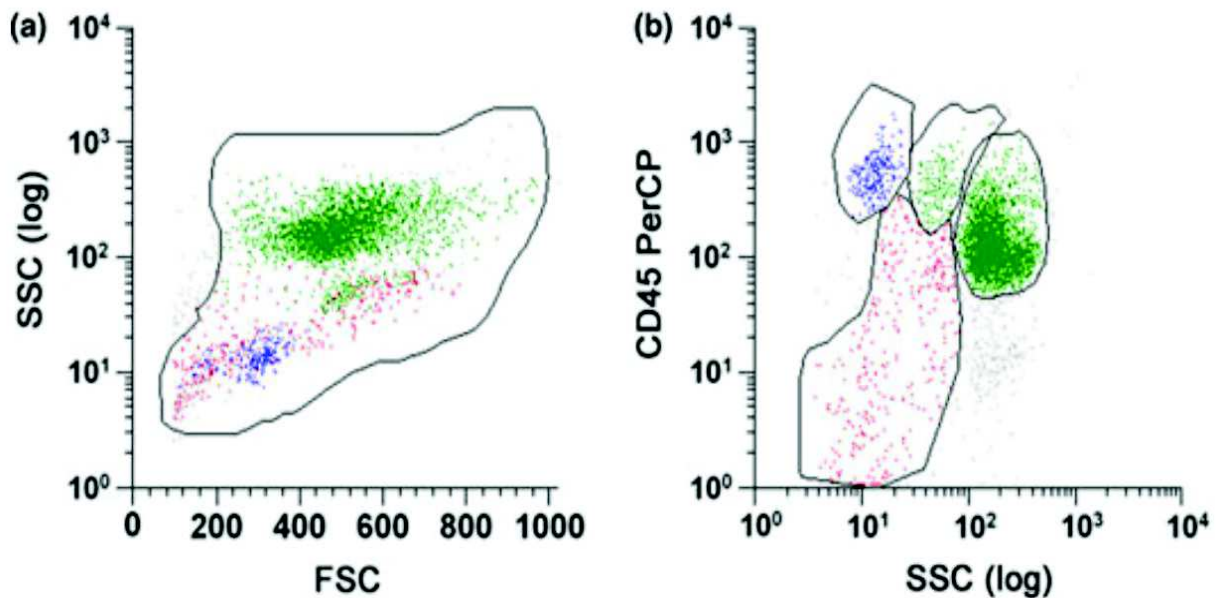


Figure 40 : Stratégie utilisée pour définir l'analyse du compartiment érythroïde sur un échantillon de MO lysée.

Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol* ⁸⁵.

(a) Une fenêtre taille (FSC)/ structure (SSC) est utilisée pour éliminer les débris. La fenêtre est adaptée sur FSC et SSC pour capturer les cellules érythroïdes matures.

(b) CD45 et SSC sont utilisés pour séparer les cellules érythroïdes (en rouge) des lymphocytes (bleu), des monocytes et des neutrophiles (vert). Le compartiment érythroïde est défini par un CD45 faible à négatif et un SSC faible.

La maturation de la lignée érythroïde peut être observée grâce à la relation entre CD235a et CD71. Les premières cellules progénitrices ne possèdent pas ces 2 antigènes. À mesure que les cellules progénitrices érythroïdes arrivent à maturité, le CD71 est acquis. Le CD235a commence à être exprimé lorsque le CD71 approche de son maximum. La population de cellules érythroïdes la plus fréquente dans la MO exprime des quantités maximales de CD71 et de CD235a (**Fig.41**).

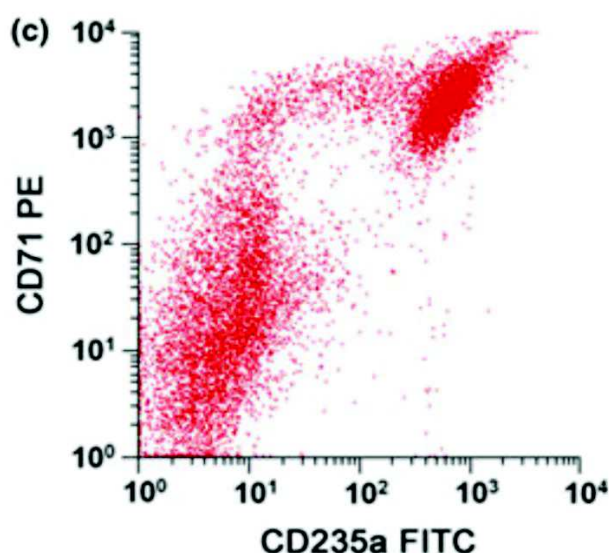


Figure 41 : Schéma caractéristique du développement érythroïde normal avec la cohérence de la corrélation entre l'expression de CD235a et CD71 sur des échantillons de MO.

Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. Int J Lab Hematol⁸⁵.

L'étude de Wangen et *al* a analysé 200 échantillons de MO de patients non suspectés de SMD⁸⁵. Elle a permis une compréhension plus complète du développement érythroïde normal. La maturation se produit dans un petit sous-ensemble de cellules érythroïdes nucléées (5 à 10%) sous la forme d'un processus en deux étapes observable par l'expression coordonnée de plusieurs antigènes de surface cellulaire. La première étape définit l'engagement envers la lignée érythroïde de la cellule souche hématopoïétique identifiée par l'apparition de CD71, CD36, CD105, une légère diminution de CD45 et une perte de CD34 (**Fig.42**). La deuxième étape de maturation du progéniteur érythroïde se fait par l'expression de CD235a, lorsque le CD71 a atteint son intensité maximale, l'intensité du CD36 diminue et les CD105, CD117 et CD45 sont perdus (**Fig.42**). Une fois que les niveaux maximaux de CD235a et CD71 sont atteints, aucun nouvel antigène de surface n'est identifié sur le progéniteur érythroïde, cependant, un niveau élevé de prolifération est maintenu dans la population érythroïde nucléée. Une diminution progressive de CD71 et CD36 est observée, cela suggère que les cellules ont cessé la production de ces deux produits géniques, et les intensités diminuées sont corrélées à la division cellulaire. En revanche, le

CD235a doit être produit en continu pendant cette phase de prolifération car l'intensité reste constante tout au long de multiples divisions cellulaires. Même après la progression vers le réticulocyte, on observe peu ou pas de diminution de l'intensité du CD235a. Enfin, la transition du réticulocyte à l'érythrocyte mature est définie par la perte complète de CD71 et CD36 et de l'ARN⁸⁵ (Fig.42).

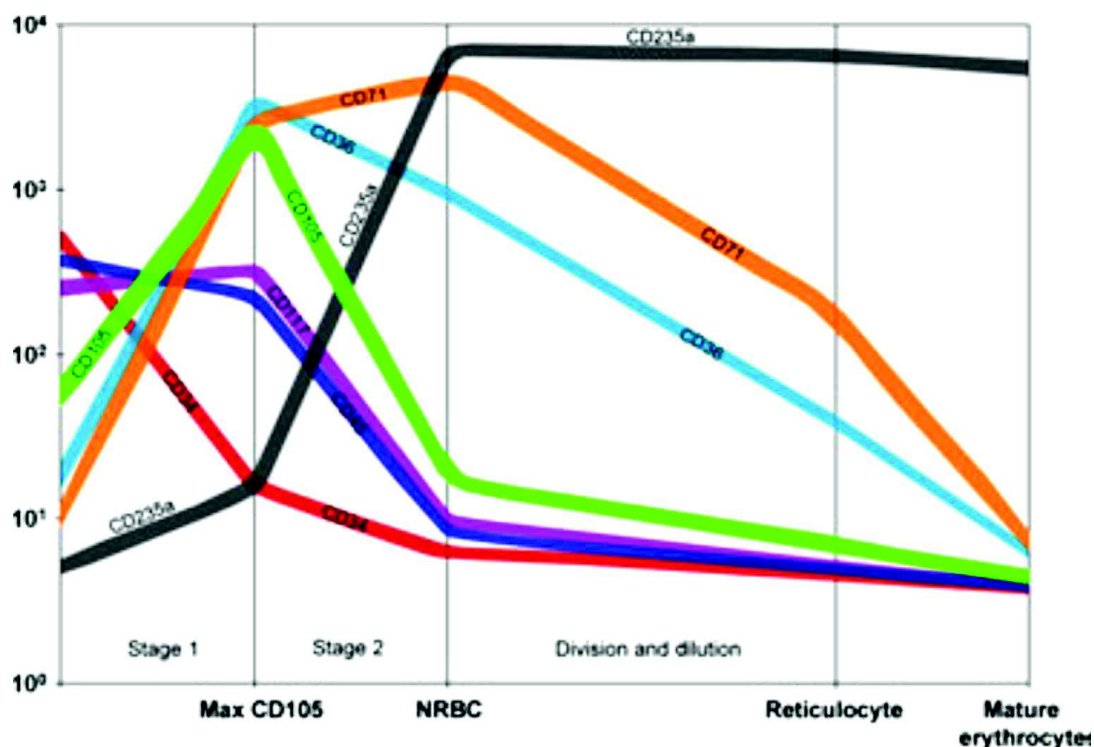


Figure 42 : Intensités de l'expression des antigènes de surface durant la maturation de la lignée érythroïde.

Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol*⁸⁵.

Bien qu'il y ait moins d'antigènes à évaluer pour mettre en évidence une dysérythropoïèse par CMF par rapport au compartiment myéloïde, l'évaluation cytométrique de la lignée érythroïde est intrinsèquement plus difficile. Premièrement, la plupart des anticorps dirigés contre la glycopherine A (CD235a) entraîne une agglutination des cellules érythroïdes entre elles ou entre les cellules érythroïdes et les cellules myéloïdes. L'autre limitation majeure réside dans l'utilisation d'un réactif de lyse des hématies, qui peut également altérer les précurseurs érythroblastiques en provoquant une plus grande variabilité dans les caractéristiques physiques des cellules jeunes érythroïdes nucléés et ainsi sous-estimer leur quantification. Or, il est nécessaire d'éliminer la majorité des érythrocytes matures pour se concentrer sur les cellules érythroïdes nucléées⁸⁵.

b) L'analyse de la dysérythropoïèse des patients SMD par CMF

En 2013, le groupe de travail ELN recommande l'étude du compartiment érythroïde par CMF pour l'aide au diagnostic de SMD, en utilisant six marqueurs différents: CD45, CD117, CD71, CD235a, CD36 et CD105⁸⁶. En effet, ce groupe de travail décrit des anomalies majeures, malgré le nombre limité d'études portant sur l'analyse de la dysérythropoïèse par CMF, à savoir :

- augmentation du pourcentage de précurseurs érythroïdes parmi les cellules nucléées totales
- augmentation ou diminution de la proportion des précurseurs érythroïdes les plus immatures (CD117+ et/ou CD105+);
- diminution de l'expression du CD36 et/ ou du CD71
- asynchronisme de maturation de l'expression du CD71 versus CD235a.

La même année, une équipe du CHU de Cochin menée par Mathis et *al*, a proposé un score cytométrique explorant la dysérythropoïèse, nommé *RED-Score*⁸⁷. Contrairement aux précédentes études publiées sur la dysérythropoïèse, aucune lyse des hématies n'est réalisée avant l'analyse des échantillons. En effet, l'élimination des cellules érythroïdes matures non nucléées est effectuée en routine en CMF avec divers réactifs. Cependant, ces derniers peuvent induire la lyse de certains érythroblastes acidophiles ou polychromatophiles les plus matures et entraîner une lyse incomplète des globules rouges altérant ainsi une analyse correcte des cellules. C'est pour cela qu'une approche alternative a été proposée par les auteurs, par l'ajout d'un marqueur nucléaire de l'ADN : le CyTRAK orange (anthraquinone intercalent de l'ADN double brin), qui permet la discrimination des cellules nucléées et non nucléées en CMF, et permet donc d'améliorer la précision de l'analyse de la totalité des précurseurs érythroïdes nucléés⁸⁷.

Dans un unique tube, en plus du CyTRAK, ont été ajoutés six marqueurs : CD36, CD71, CD64, CD117, CD235a et CD45. A partir d'une cohorte d'apprentissage constituée de 53 patients atteints de SMD sans équivoque avec des marqueurs spécifiques, il a été observé une différence significative entre les coefficients de variation et les moyennes d'intensité de fluorescence du CD71 et du CD36 chez les patients SMD versus les témoins, sans différence significative pour le CD235a. La figure 43 illustre en « a » que les moyennes d'intensité de fluorescence (GMean) du CD71 et du CD36 sont significativement plus faibles chez les patients atteints de SMD par rapport aux témoins et en « b » que les coefficients de variation sont plus élevés dans les SMD par rapport aux témoins pour CD71 et CD36⁸⁷.

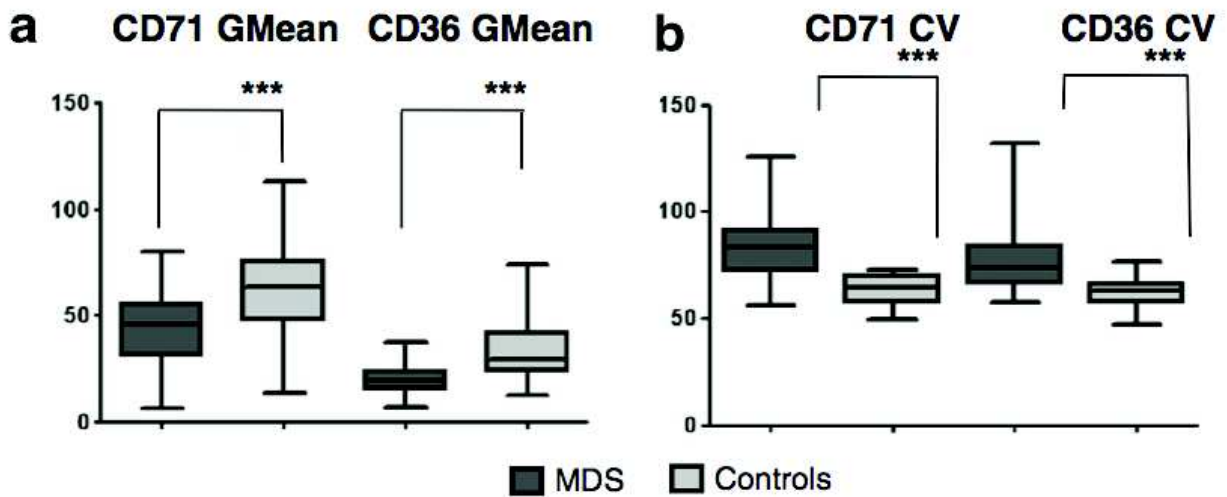


Figure 43 : Comparaison de l'expression de CD71 et CD36 chez les patients atteints de SMD et les témoins de la cohorte d'apprentissage.

Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia* ⁸⁷.

Ainsi, le RED-Score a été établi sur la base de trois paramètres, à savoir l'augmentation des coefficients de variation du CD36 et du CD71 sur les érythroblastes médullaires associée à la diminution du taux d'hémoglobine. Ce score est compris sur une échelle de 0 à 7 points (**Tab.18**). Un score supérieur ou égal à 3 est un marqueur de dysplasie et est fortement évocateur de SMD avec une sensibilité de 77,5% et une spécificité de 90%. Lorsqu'il est combiné au score d'Ogata, le RED-score améliore la prédiction de diagnostic de SMD avec une sensibilité de 88%, la spécificité restant inchangée⁸⁷.

Paramètre analysé	Valeur seuil	Points attribués
CV CD71 (%)	< 80	0
	≥ 80	3
CV CD36 (%)	< 65	0
	≥ 65	2
Taux d'Hb (g/dl)	> 10,5 (femme) ou > 11,5 (homme)	0
	≤ 10,5 (femme) ou ≤ 11,5 (homme)	2

Tableau 18 : Détails du calcul du RED-score basé sur 3 paramètres.

Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia* ⁸⁷.

D'autres anomalies phénotypiques ont été explorées telles que l'augmentation de cellules érythroïdes CD105+, marqueur de la prolifération de cellules érythroïdes immatures, associée à une perte de progéniteurs érythroïdes matures (**Fig.44**). Cette anomalie seule, n'étant pas assez fréquente, elle ne peut pas être considérée comme prédictive de l'existence de SMD mais son incorporation dans les scores de CMF peut permettre de mieux détecter des SMD de bas grade⁸⁸.

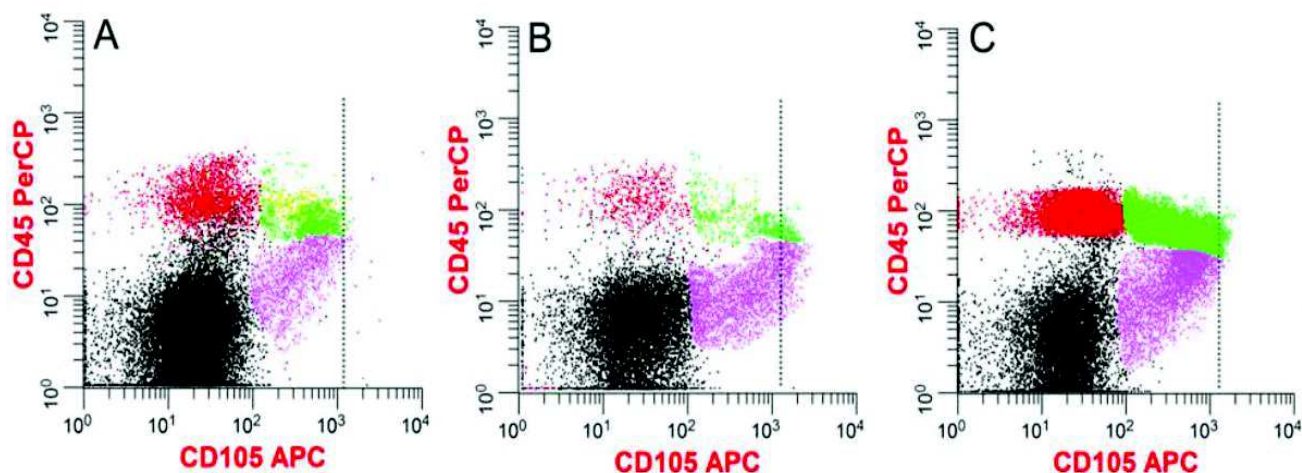


Figure 44 : Relation d'intensité entre CD105 et CD45.

Eidenschink Brodersen L, Menssen AJ, Wangen JR, et al. Assessment of erythroid dysplasia by "difference from normal" in routine clinical flow cytometry work-up: Erythroid Dysplasia in Routine Clinical Flow Cytometry Work-up. Cytometry⁸⁸.

La maturation des cellules progénitrices CD34 (rouge) en celles les plus matures, les réticulocytes (noir) est délimitée par l'acquisition de CD105 (vert) puis la perte de CD105 (violet).

A : Relations d'intensité et de fréquence normales entre le CD105 et CD45 dans une MO normale.

B : Cas de SMD avec une fréquence normale de cellules CD105 mais avec une intensité de CD105 accrue par rapport à la normale.

C : Cas de SMD avec une intensité de CD105 normale mais une augmentation anormale de la fréquence de progéniteurs érythroïdes CD105 +.

2. Étude de la lignée plaquettaire.

L'analyse des mégacaryocytes par cytométrie en flux n'est pas le meilleur outil pour apprécier leur dysplasie. En effet, en raison de leur grande taille, de la faible représentation de ce contingent cellulaire dans la MO, de leur fragilité accrue et leurs propriétés d'adhésion avec une tendance à l'agrégation, l'analyse des mégacaryocytes nécessite donc généralement de grand volume de MO et des procédures complexes de préparation des échantillons. Une alternative potentiellement utile pour évaluer la dysplasie mégacaryocytaire pourrait être l'analyse des plaquettes du sang périphérique⁸⁹.

Une étude de A. Sandes et *al*, a évalué l'expression de plusieurs glycoprotéines de surface sur les plaquettes du sang périphérique de 44 patients atteints de SMD en comparaison aux plaquettes de sujets sains, afin d'identifier les altérations potentielles qui pourraient contribuer au diagnostic de la dysplasie mégacaryocytaire dans le SMD⁹⁰. L'analyse des caractères immunophénotypiques a montré que les plaquettes des patients atteints de SMD présentent des altérations multiples comparées aux plaquettes des sujets sains. Ceux-ci incluent les caractéristiques altérées de la diffusion de la lumière (FSC et SSC), l'expression accrue ou diminuée des glycoprotéines de plaquettes aussi bien que l'expression aberrante de l'antigène de CD34. Aucune différence statistique significative n'a été trouvée entre les patients atteints de SMD et les contrôles normaux concernant l'expression de l'une des protéines

associées à l'activation plaquettaire (CD62P, CD63, PAC-A et anti-fibrinogène). En revanche, la diminution de l'expression du CD36, et du CD61 n'ont été détectés que chez les patients atteints de SMD (Fig. 45)⁹⁰.

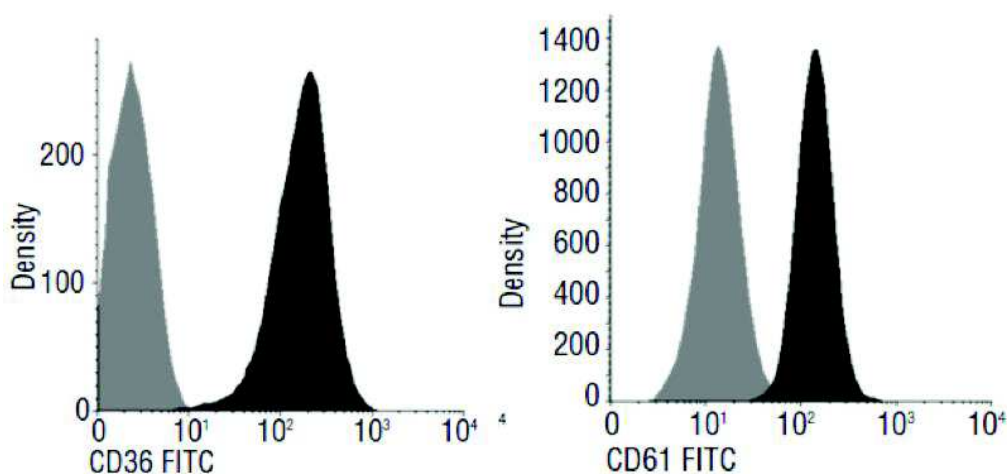


Figure 45 : Histogrammes mono paramétriques illustrant les aberrations immunophénotypiques présentes sur les plaquettes de sujets atteints de SMD (gris) et de sujets sains (noir).

Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2012⁹⁰.

3. Étude des progéniteurs lymphoïdes

Plusieurs études se sont intéressées à la quantité de cellules précurseurs hématopoïétiques (CPH) lymphoïdes B CD 34+, appelés lymphoblastes. Leur nombre est fonction de l'âge, significativement plus élevé chez les enfants, il diminue avec l'âge, mais leur nombre reste conservé même chez les personnes âgées (médiane de 10% chez les 65 ans et plus). Ces études ont montré que le pourcentage de CPH lymphoïdes B CD 34+ dans la MO des patients atteints de SMD est diminué voir complètement absent. Cette découverte a permis de mettre en évidence un marqueur supplémentaire pour l'aide au diagnostic des SMD par CMF⁹¹.

Une récente étude menée par Z. Chen et *al* sur 160 patients atteints de SMD de faible risque, a confirmé que la médiane des CPH lymphoïdes B CD 34+ est significativement diminuée chez les patients atteints de SMD par rapport aux patients cytopéniques non clonales⁹². Les CPH lymphoïdes B CD 34+ ont été détectées par CMF grâce au CD45, CD10, CD19. Cependant, leurs données ont également montré qu'environ 25% à 30% des patients atteints de SMD avaient conservé des taux normaux de CPH lymphoïdes B CD 34+ ($\geq 5\%$) dans leur MO. Ce phénomène n'a été attribué ni à l'âge, ni au sexe ou ni aux anomalies cytogénétiques clonales. Les cas de SMD présentant des taux de CPH lymphoïdes B CD 34+ conservés étaient surtout surreprésentés par les SMD avec des sidéroblastes en couronnes (SMD-RS) ou des cas sans mutations somatiques détectables. Ces derniers se sont avérés s'associer à un pronostic favorable⁹².

En effet, au cours de la période de suivi, les patients présentant un taux de CPH lymphoïdes B conservé ont une survie globale médiane significativement meilleure que les patients sans CPH lymphoïdes B conservés (**Fig. 46A**). Il n'a pas été observé de différences de survie entre les SMD-RS avec ou sans CPH lymphoïdes B CD 34+ préservées, ce qui pourrait être dû à une évolution généralement favorable de SMD-RS. Cependant, il a été montré que parmi les SMD sans RS, les patients avec un taux de CPH lymphoïdes B CD 34+ $\geq 5\%$ avaient significativement une meilleure survie globale, indépendamment des autres paramètres de risque IPSS (**Fig. 46B**)⁹².

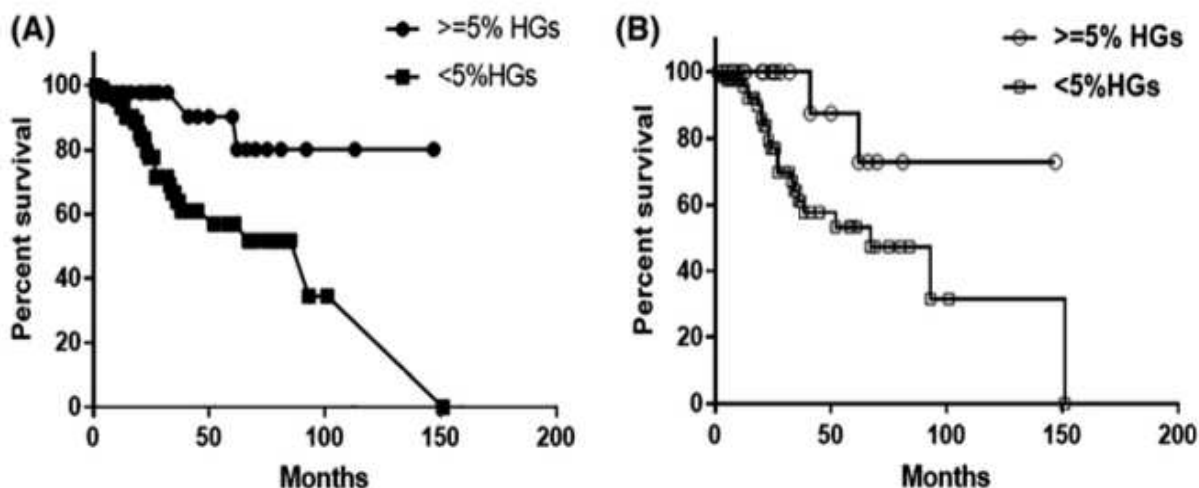


Figure 46 : Comparaison de la survie globale médiane.

Chen Z, Ok CY, Wang W, et al. Low-Grade Myelodysplastic Syndromes with Preserved CD34+ B-Cell Precursors (CD34+ Hematogones). *Cytometry* ⁹².

(A) : Le total des patients avec des CPH lymphoïdes B conservées versus les patients sans CPH lymphoïdes B conservées.

(B) : L'ensemble des patients sans sidéroblastes avec des CPH lymphoïdes B conservées versus l'ensemble des patients non atteints de SMD- RS.

Par ailleurs, d'autres études se sont intéressées à la dérégulation immunitaire identifiée fréquemment dans les SMD, visant ainsi à connaître l'impact pronostique d'un environnement immunodéprimé chez ces patients. Les données de cette étude ont démontré qu'un environnement immunosuppresseur, caractérisé par un nombre élevé de lymphocytes T régulateurs (CD4 + CD25 + FoxP3 +) et un faible nombre de cellules progénitrices B (CD34 +, CD10 +), est associé à une survie plus faible. Ainsi, cette analyse a permis de confirmer que le nombre de lymphocytes T régulateurs et de cellules progénitrices B peut prédire la survie indépendamment des facteurs pronostiques de IPSS⁹³.

4. Étude de la lignée blastique.

a) Identification des blastes.

En cytologie, la distinction des myéloblastes et des lymphoblastes peut parfois être difficile. La CMF permet l'identification des différents types de blastes dans la MO et pourrait donc permettre la quantification des blastes chez les patients atteints de SMD. Les blastes immatures dans la MO d'un sujet sain expriment des niveaux relativement faibles de CD 45 par rapport aux autres cellules en cours de maturation. Ainsi la combinaison du CD 45 et SSC fournit un moyen d'identifier les cellules immatures en les délimitant des lymphocytes, monocytes, cellules myéloïdes et des globules rouges nucléés (**Fig. 47**). La région blastique comprend : les lymphoblastes, les myéloblastes, les monoblastes, les cellules érythroïdes très immatures, les basophiles et les précurseurs des cellules dendritiques⁹⁴.

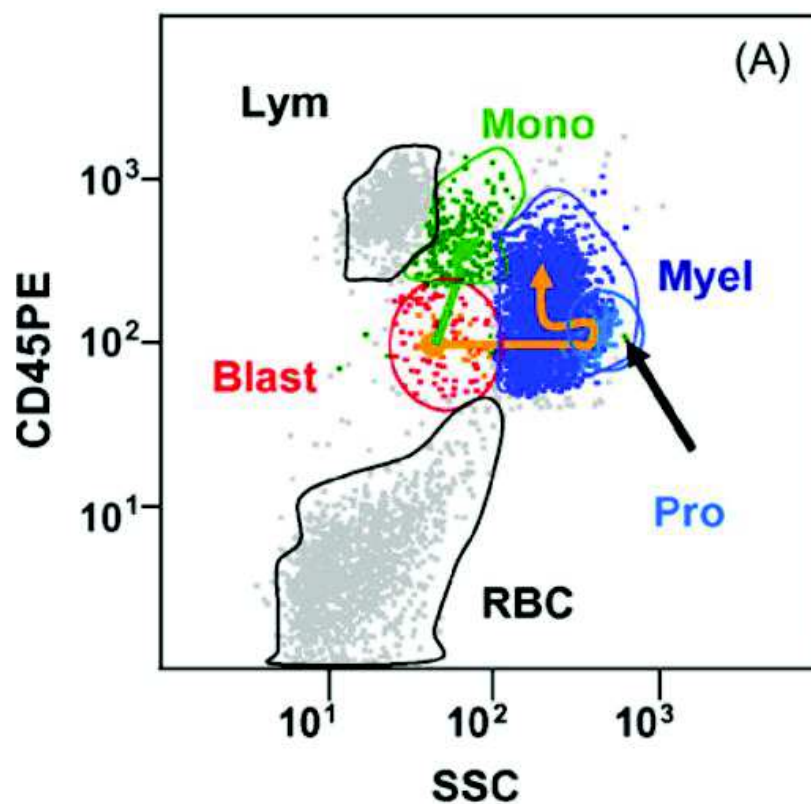


Figure 47 : Identification de la région blastique grâce au CD45 et SSC dans une MO d'un individu sain.

Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leukemia Research*⁹⁴.

Les monocytes se développent à partir des myéloblastes et gagnent en CD 45 (**Fig.47 flèche verte**). Les promyélocytes se développent également à partir des myéloblastes, gagnent en SSC sans changement d'expression du CD 45 puis perdent leur granularité à mesure qu'ils progressent vers les stades ultérieurs tout en gagnant une expression du CD45. (**Fig.47 flèche orange**). Les blastes sont limités à cette région (**en rouge**), cependant, ils présentent souvent chez les patients atteints de SMD une diminution de l'expression du CD 45 par rapport aux blastes d'un sujet sain. Pour mieux identifier les myéloblastes, il est nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs. La première possibilité est l'utilisation de l'association HLA-DR et CD11b (**Fig.48**). Les blastes expriment les antigènes d'histocompatibilité de

classe II, HLA-DR, mais n'expriment pas le CD11 b. Cela permet ainsi d'exclure les basophiles (HLA-DR négatif), les monocytes immatures (CD11 b positif) et les cellules érythroïdes. L'autre solution est d'utiliser l'appariement du CD 34 avec HLA-DR pour distinguer les blastes des basophiles (HLA-DR négatif) et d'aider à identifier les blastes anormaux qui pourraient exprimer des niveaux élevés de CD 34 sans HLA-DR (**Fig.48**). De plus, le CD 19 permet aussi d'identifier les précurseurs des cellules B, tout comme la combinaison CD 45 / CD 117 qui fournit un moyen supplémentaire d'identifier et d'énumérer les blastes par rapport aux précurseurs des cellules B (**Fig.48**)⁹⁴.

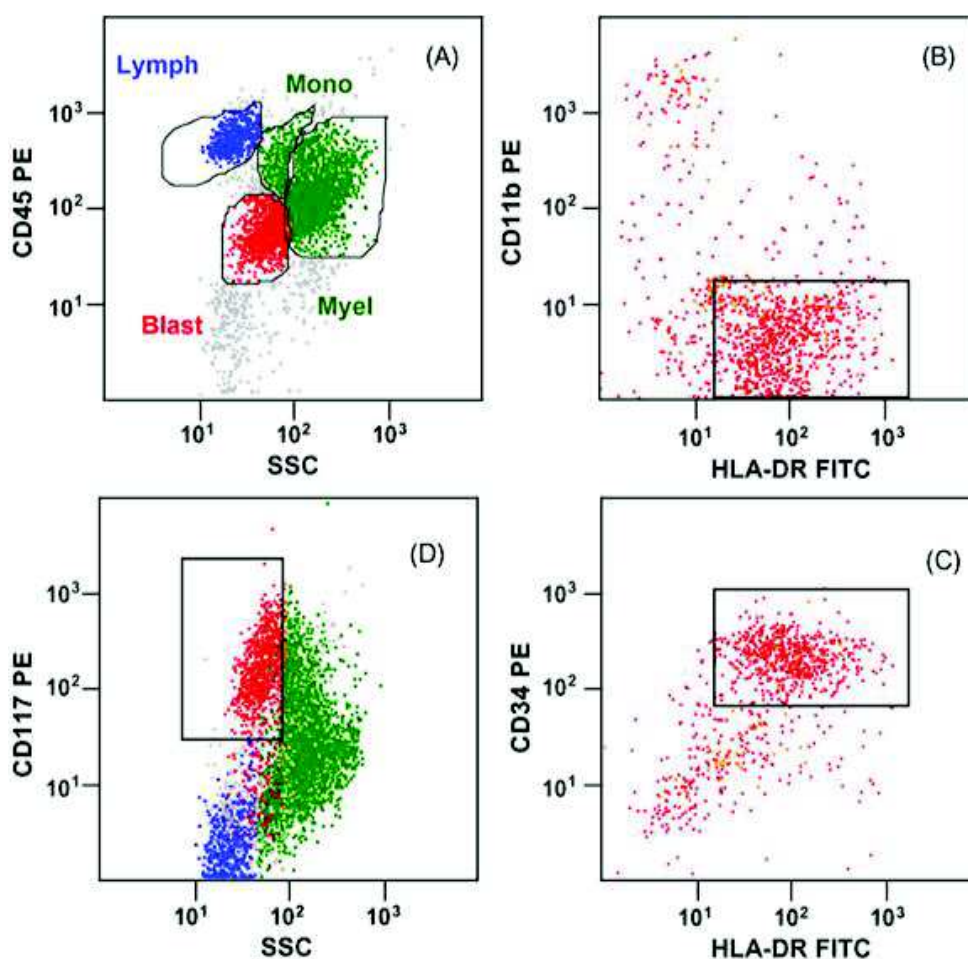


Figure 48 : Exemple de résultats obtenus pour le comptage des blastes chez un patient atteint de SMD.

Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leukemia Research* ⁹⁴.

(A) : Identification des blastes (rouge), les lymphocytes (bleu), les monocytes en cours de maturation et les cellules myéloïdes (vert) par le CD45/ SSC.

(B) : A partir de la région blastique en A : identification des blastes HLA-DR +, CD 11b négatif (environ 13,9%)

(C) : A partir de la région blastique en A : identification des blastes HLA-DR+ et CD 34 +(environ 13,3%)

(D) : A partir de la région blastique en A : identification des blastes CD 117+ (environ 14,1%)

Ainsi, ces trois stratégies différentes permettent de quantifier à l'identique le taux de blastes.

Ainsi, la combinaison de plusieurs stratégies d'identification fournit un moyen de déterminer le nombre de blastes de plusieurs manières, de telles sortes que la redondance du dénombrement renforce la précision du résultat. Comme tout antigène individuel peut être perdu pendant la dysrégulation de l'hématopoïèse dans le SMD, le comptage des cellules blastiques en utilisant plusieurs stratégies fournit un moyen de compter de manière cohérente les cellules aberrantes ainsi que d'identifier si les cellules immatures sont, en fait, anormales.

b) Hétérogénéité blastique.

En 2014, une étude menée par Jevremovic et al a analysé le schéma caractéristique d'expression de CD 13 et du HLA-DR sur les blastes CD 34+ de sujets sains et de patients atteints de SMD⁹⁵. Il a été mis en évidence que les blastes CD 34+ d'échantillons de MO provenant de donneurs sains (patient ayant subi une arthroplastie de la hanche) présentent un schéma caractéristique d'expression de CD 13 et HLA-DR sous la forme de trois sous populations facilement identifiables (Fig.49). En revanche, ce schéma est généralement perdu chez les patients atteints de SMD⁹⁵.

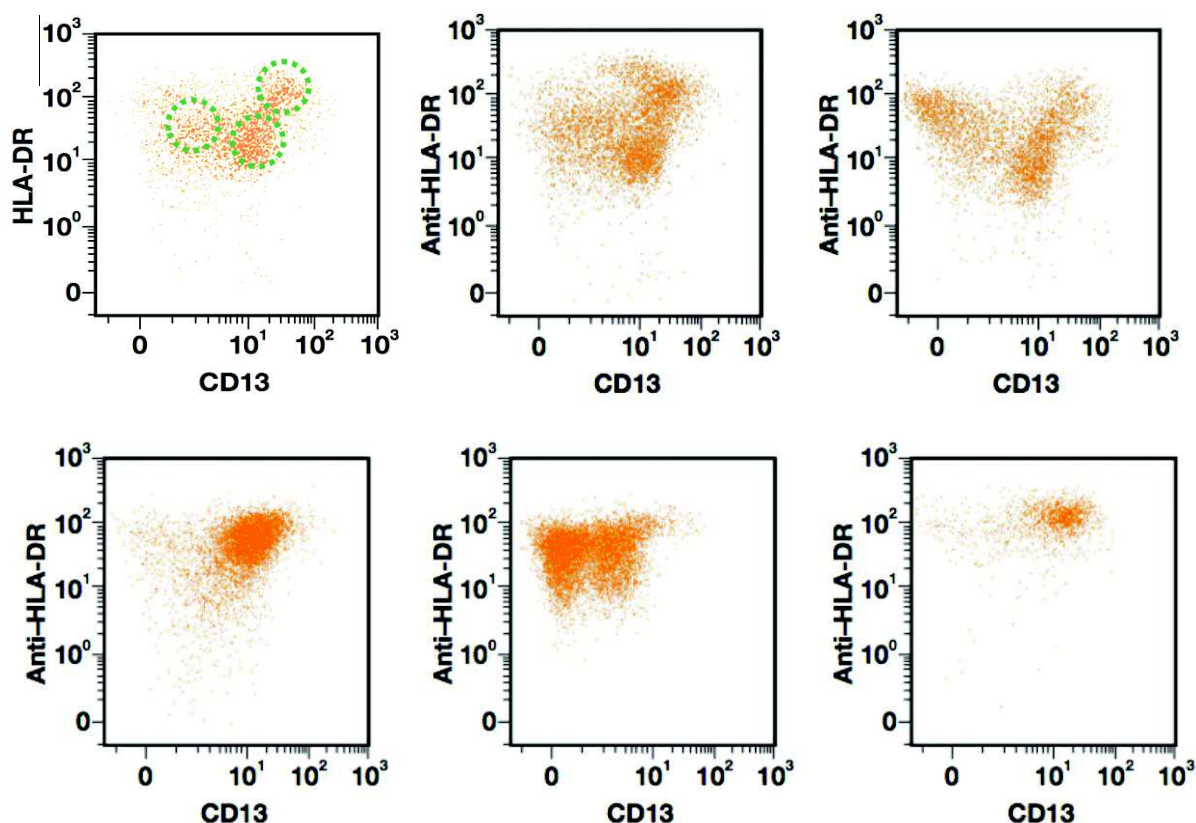


Figure 49 : Distinction entre le modèle d'expression des blastes (CD34+, CD13+, HLA-DR+) de sujets sains versus patients atteints de SMD.

Jevremovic D, Timm MM, Reichard KK, et al. Loss of Blast Heterogeneity in Myelodysplastic Syndrome and Other Chronic Myeloid Neoplasms. American Journal of Clinical Pathology⁹⁵.

Haut : trois échantillons de moelle osseuse de sujets normaux.

Bas : trois échantillons de moelle osseuse de patients atteints du SMD (< 5% de blastes).

Ainsi, il a été démontré que les patients atteints de SMD présentent une perte de l'hétérogénéité blastique par rapport à celle observée dans la MO d'individus en bonne santé. L'analyse de l'hétérogénéité blastique des CD 34+ par le CD 13 et HLA-DR permet d'atteindre une spécificité 95% et une sensibilité 71% pour le diagnostic de SMD et ceci grâce à un panel d'anticorps limité⁹⁵.

c) Relation de l'expression du CD38 sur les blastes CD34+.

Sachant que les SMD sont des troubles clonaux affectant les CSH, Monreal et al, ont étudié le modèle d'expression antigénique du HLA-DR et du CD 38 sur les cellules exprimant le CD 34 dans la MO de patients atteints de SMD pour déterminer les changements phénotypiques⁹⁶. Comme témoin, ils ont analysé des MO de donneurs sains et de patients ayant un diagnostic non myéloïde⁹⁶.

Le profil antigénique des cellules CD 34+ a été analysé avec la combinaison d'anticorps HLA-DR, CD 38. Les CSH ont été identifiés par la forte expression du CD 34 et faible expression du CD 38, générant souvent une population identifiée bien distincte (**Fig. 50, noires**). Les cellules CD 34+ myéloïdes sont distinguées par leurs CD 38 + fort, CD 34 + fort et HLA-DR fort (**rouges**), tandis que les CPH lymphoïdes B sont identifiées sur le graphique SSC/ FSC (**bleu**).

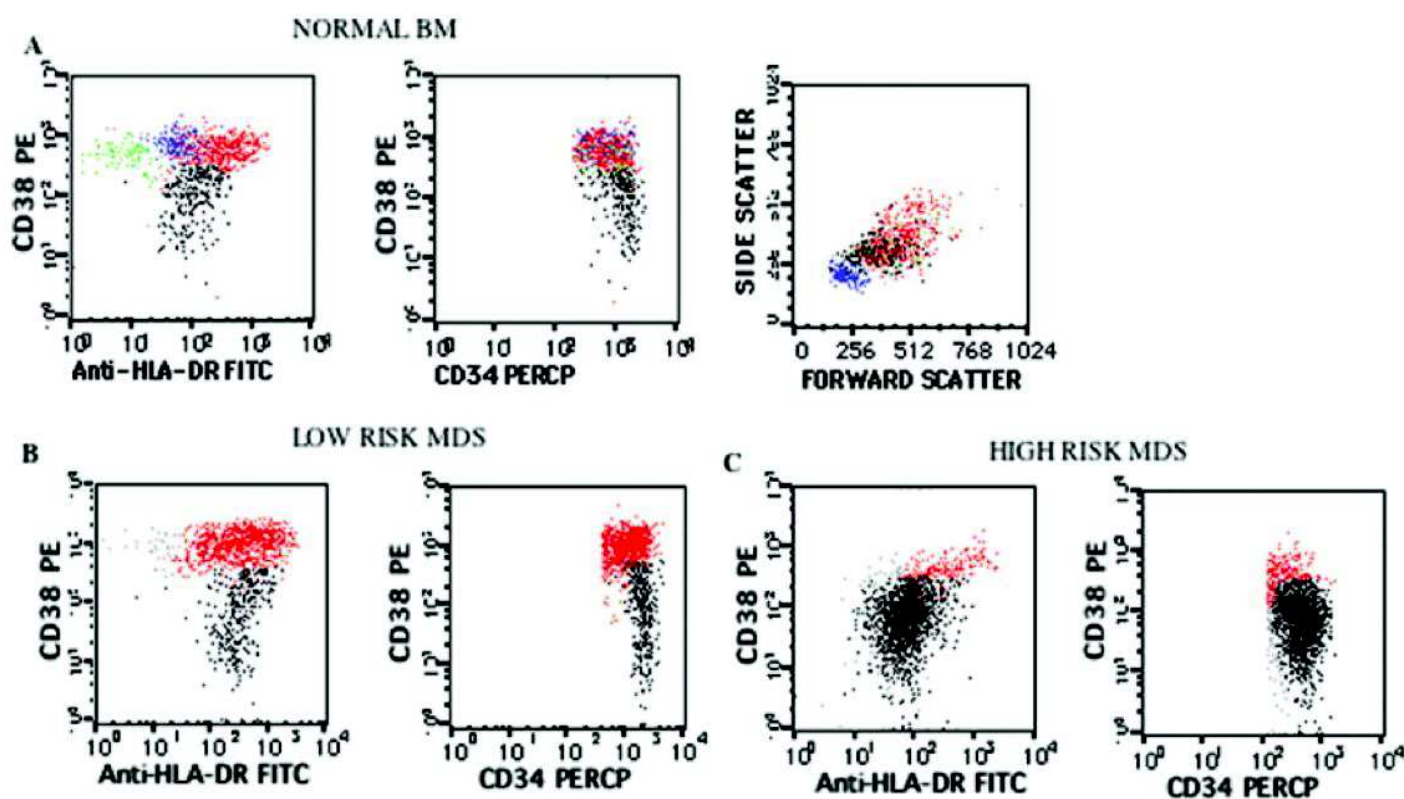


Figure 50: Modèle d'expression de HLA-DR et CD38 sur des CSH de MO de donneurs sains et de patients atteints de SMD de faible et de haut risque.

Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry*. 2006⁹⁶.

Il a été montré que les SMD de faible risque présentent un schéma similaire à celui des témoins avec une fraction relativement faible de CSH, dont la plupart montrent un engagement myéloïde (**rouge**) tandis que la sous population lymphoïde B (**bleu**) est fréquemment diminuée voir absente (**Fig.50**). En revanche, dans les SMD à haut risque, la fraction de CSH est significativement plus élevée et on observe un véritable changement dans la distribution des CSH (**Fig. 50**). Ainsi la fraction de CSH caractérisée par un CD 34 fort et un CD 38 faible est significativement augmentée dans les SDM à haut risque mais pas dans les SDM à faible risque. Une proportion accrue de CSH peut refléter une différenciation bloquée dans les cellules CD34+ et serait corrélée au score IPSS. Cette étude confirme que l'évaluation du modèle d'expression du CD 38 sur les cellules CD 34+ est un test facile et reproductible qui permet d'évaluer rapidement les CSH et ainsi de distinguer les SMD de faible risque et de haut risque.

L'une des anomalies la plus couramment documentée permettant de distinguer les SMD de faible risque et les cytopénies non clonales est la diminution du nombre de progéniteurs lymphoïdes B CD 34+⁹⁷. Les progéniteurs B sont caractérisés par un CD34+, une forte expression de CD 38+ donc d'une forte intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD 38. Ainsi, il a été émis l'hypothèse qu'une diminution de ces progéniteurs B au sein des patients atteints de SMD induirait une diminution de IMF du CD 38 sur les cellules CD 34+. Après avoir analysé 100 patients atteints de SMD et 70 patients témoins présentant des cytopénies non clonales. Les résultats de cette cohorte confirme qu'une valeur seuil IMF du CD 38 sur les cellules CD 34+ (< 110) permet de diagnostiquer un SMD de bas grade d'une cytopénie non clonale avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 92%⁹⁷.

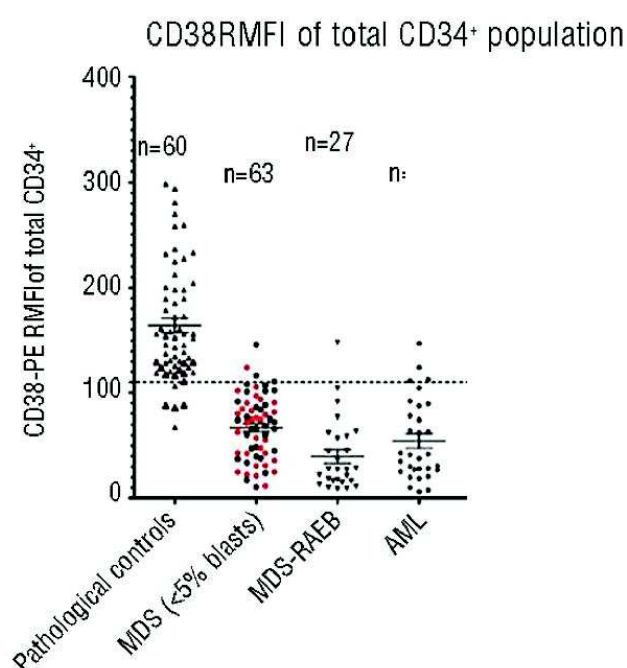


Figure 51 : Intensité moyenne de fluorescence du CD38+ de la population totale de CD34+ chez des patients atteints de SMD et les populations témoins.

Goardon N, Nikolousis E, Sternberg A, et al. Reduced CD38 expression on CD34+ cells as a diagnostic test in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009⁹⁷.

5. Étude de la lignée monocytaire.

Selon la classification de l'OMS 2016, le diagnostic de LMMC est basé sur cinq critères⁹⁸ :

- ① Monocytose persistante périphérique supérieure à 1 G/L, avec monocytes représentant au moins 10 % des cellules de la formule
- ② Absence de critère évoquant une LMC BCR-ABL 1 positive, une splénomégalie myéloïde chronique, une polyglobulie primitive ou une thrombocytémie essentielle
- ③ Absence de réarrangement PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou PCM1-JACK 2 (doivent être spécifiquement exclus en cas éosinophilie).
- ④ Moins de 20 % de blastes dans la moelle et le sang
- ⑤ Au moins l'un des critères suivants :
 - Dysplasie sur au moins 1 lignée, si la dysplasie est absente ou minime il faut que les autres critères soient présents et qu'une anomalie cytogénétique clonale ou moléculaire soit présente dans les cellules hématopoïétiques
 - Monocytose présente depuis au moins 3 mois et absence d'autre cause de monocytose (infection, inflammation, cancer)

La LMMC est un SMD/ SMP, c'est-à-dire une hémopathie qui présente une composante proliférative sur les monocytes (sans chromosome philadelphique ni réarrangement BCR-ABL), caractérisée par une hypercellularité de la MO et une composante dysplasique plus ou moins marquée. La dysplasie des cellules de la MO n'est donc pas une exigence absolue.

Le Comité de la Nomenclature de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie (NCIUIS) a approuvé une nomenclature qui subdivise les monocytes en trois sous-ensembles⁹⁹. Cette subdivision utilise l'expression du CD 14 ; récepteur des lipopolysaccharides et du CD16 ; récepteur de faible affinité pour l'immunoglobuline G. Dans le sang d'un sujet sain, on met ainsi en évidence trois catégories de monocytes :

- Monocytes classiques (CD 14 + / CD 16-) : au moins 80 % du total des monocytes, dont la fonction est dédiée à la phagocytose.
- Monocytes non classique (CD 14 + faible/ CD 16 +) : environ 15% du total des monocytes, agissent essentiellement dans la réponse inflammatoire.
- Monocytes intermédiaires (CD 14+/ CD 16+) : environ 5% du total des monocytes, ils sont transitionnelles entre les deux précédents, et présentent donc les deux fonctions (la phagocytose et un rôle dans l'inflammation).

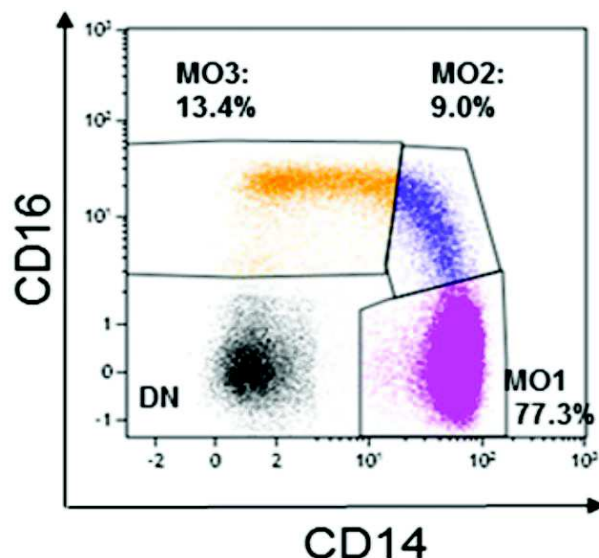
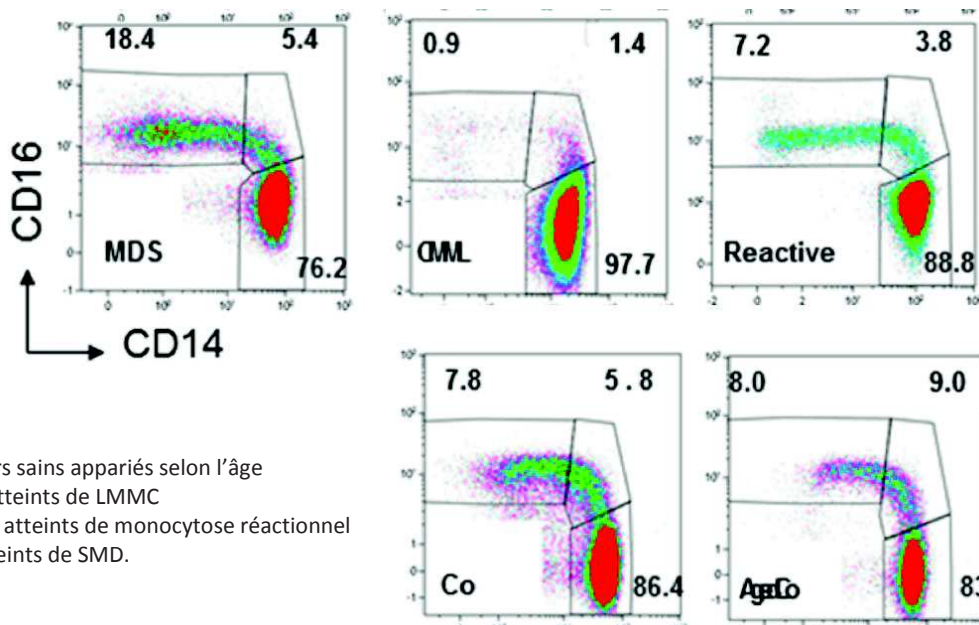


Figure 52 : Représentation des trois sous-types de monocytes, selon l'expression du CD14 et du CD16 chez un individu sain. (MO1 : monocyte classique, MO2 : intermédiaire, MO3 : non classique)

Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015⁹⁹

L'équipe de Selimoglu-Buet et al, a étudié la répartition des différents sous-types monocytaires, par CMF, dans le sang des patients atteints de LMMC⁹⁹. Dans cette étude, l'immunophénotypage monocyttaire était réalisé sur sang total anti-coagulé à l'EDTA. Au minimum, 50 000 monocytes étaient analysés. Les monocytes totaux étaient caractérisés par leur expression du CD 14 et du CD16 après avoir exclu les autres populations leucocytaires. Les sous-populations monocytaires ont alors été quantifiées à partir d'un graphe bi- paramétrique CD 14/CD 16, permettant de distinguer les trois catégories de monocytes. Dans cette étude, 2 cohortes de patients, dite d'« Apprentissage » et « Validation » ont été testées.



Co : donneur sains
 Aged-Co : donneurs sains appariés selon l'âge
 CMML : patients atteints de LMMC
 Reactive : patients atteints de monocytose réactionnel
 MDS : patients atteints de SMD.

Figure 53 : Représentation multicolore de la répartition des sous-ensembles de monocytes dans le sang périphérique recueilli auprès de groupes distincts de la cohorte d'apprentissage.

Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015⁹⁹.

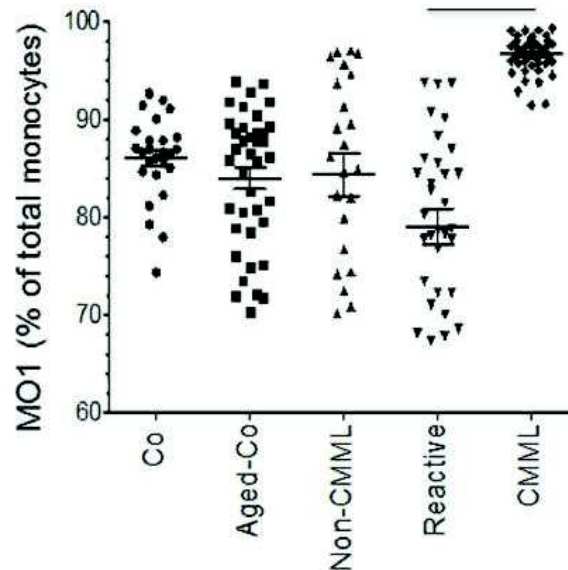


Figure 54 : Pourcentage de monocytes classiques (MO1) au sein des différentes catégories de patients de la cohorte d'apprentissage.

Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 2015⁹⁹.

Cette étude montre ainsi qu'une augmentation de la fraction des monocytes classiques responsable de la phagocytose au détriment des fractions intermédiaires et non classiques inflammatoires est un marqueur très spécifique qui distingue rapidement, précisément et simplement la LMMC des diagnostics confondants (**Fig. 53-54**). Il a été démontré dans l'étude qu'un pourcentage de monocytes classiques supérieur ou égal à 94% des monocytes totaux permettait de distinguer les cas de LMMC des autres causes de monocytoses avec une excellente spécificité de 95,1 % et sensibilité 90,6%⁹⁹. Ce travail a donc apporté un outil objectif pour le diagnostic de LMMC qui aujourd'hui est intégré dans l'algorithme décisionnel devant une monocytose persistante.

IV. Travail du mémoire de DES

Les SMD forment un groupe d'hémopathies clonales acquises, hétérogène tant sur le plan clinique que sur le plan biologique, dont le diagnostic est parfois délicat. En effet, des critères généraux ont été établis pour le diagnostic d'un SMD tels que la présence de cytopénies, de blastes médullaires, de sidéroblastes en couronne ou encore d'anomalies cytogénétiques récurrentes nécessaires au diagnostic de SMD. Ce dernier est cependant difficile à poser lorsque ces critères sont absents ou insuffisants. De surcroît, le nombre de blastes dans la MO est déterminant pour estimer la gravité des SMD, avec un impact sur le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique. Ce nombre est uniquement déterminé par le cytologiste au cours de la lecture du frottis médullaire. Le décompte des blastes est donc un élément fondamental, dont la quantification réalisée par le cytologiste peut s'avérer difficile au vu de la dysplasie présente chez ces patients. Partant de ce constat, il existe un besoin de marqueurs supplémentaires intervenant comme co-critères dans le diagnostic des SMD. La CMF, grâce au score reconnu d'Ogata, est un outil de diagnostic important permettant d'apporter ces informations et d'aider ainsi au diagnostic de SMD.

A l'heure actuelle, devant toute suspicion de SMD la pratique quotidienne du laboratoire d'hématologie du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Rouen utilise essentiellement l'examen cytologique des frottis médullaires pour la mise en évidence de blastes et de dysplasie des lignées hématopoïétiques pour établir un diagnostic de SMD ainsi qu'un caryotype et parfois de la biologie moléculaire. Dans ce contexte, les objectifs du travail du mémoire seront dans un premier temps de réaliser une étude du score d'Ogata par CMF dans le diagnostic de tous les patients suspectés de SMD pour en déterminer sa sensibilité et sa spécificité. Deuxièmement, s'intéresser à l'apport de la quantification des blastes par CMF dans l'aide au diagnostic d'un SMD. Dans le but de pouvoir comparer les résultats concernant l'évaluation de la dysplasie médullaire et la quantification blastique entre l'analyse par la CMF et la méthode de référence : l'examen cytologique. Mais aussi de réaliser la comparaison entre les résultats de la CMF, la cytologie et la cytogénétique dans le diagnostic et le pronostic des SMD.

L'étude consistera en pratique à une analyse prospective d'octobre 2020 à septembre 2021 dans le laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen. Le score Ogata et l'estimation des blastes seront réalisés à partir de prélèvements médullaires obtenus sur tube EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) provenant de patients pour lesquels un myélogramme sera effectué pour les indications suivantes : suspicion de SDM et suivi de SMD de tout âge. Une analyse cytologique des frottis médullaires (réalisée immédiatement après la ponction médullaire) sera systématiquement effectuée, ainsi qu'un caryotype et de la biologie moléculaire. L'analyse cytométrique devra se faire dans les vingt-quatre heures suivant le prélèvement.

Les perspectives de ce travail seront de proposer à terme la mise en place d'un examen supplémentaire en cas de diagnostic de SMD difficile à établir, en plus de la cytogénétique et la biologie moléculaire. Pour accroître nos capacités à diagnostiquer et suivre les patients porteurs de SMD.

Bibliographie.

1. Roux C, Roulin L. Généralités sur les syndromes myélodysplasiques : épidémiologie, diagnostic et principes de traitement. *Hématologie*. 2016;22(4):288-296. doi:10.1684/hma.2016.1171
2. Valent P, Horny H-P, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*. 2007;31(6):727-736. doi:10.1016/j.leukres.2006.11.009
3. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014;383(9936):2239-2252. doi:10.1016/S0140-6736(13)61901-7
4. Marisavljevic D, Savic A, Zeremski V, Stanisavljevic N, Jelic S. Myelodysplastic syndromes in adults aged less than 50 years: Incidence and clinicopathological data. :8.
5. Ma X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *The American Journal of Medicine*. 2012;125(7):S2-S5. doi:10.1016/j.amjmed.2012.04.014
6. Zeidan AM, Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Reviews*. 2019;34:1-15. doi:10.1016/j.blre.2018.09.001
7. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. Les Syndromes Myélodysplasiques [Internet] <http://hematocell.univangers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologiegenerale/117-les-syndromes-myelodysplasiques>.
8. Troussard X, Malet M, Duchenet V, Mouchel D, Chéze S, Collignon A. Épidémiologie des syndromes myélodysplasiques (SMD) et des syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs (SMD/SMP). *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;2009(413):25-29. doi:10.1016/S1773-035X(09)74244-3
9. Duchmann M, Fenaux P, Cluzeau T. Prise en charge des myélodysplasies. *Bulletin du Cancer*. 2015;102(11):946-957. doi:10.1016/j.bulcan.2015.07.007
10. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*. 2000;14(1):2-8. doi:10.1038/sj.leu.2401618
11. Jonveaux P, Fenaux P, Quiquandon I, et al. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. *Oncogene*. 1991;6(12):2243-2247.
12. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2020;188(2):224-239. doi:10.1111/bjh.16212
13. Dao K-HT. Myelodysplastic Syndromes. *Medical Clinics of North America*. 2017;101(2):333-350. doi:10.1016/j.mcna.2016.09.006
14. Armstrong RN, Steeples V, Singh S, Sanchi A, Boulwood J, Pellagatti A. Splicing factor mutations in the myelodysplastic syndromes: target genes and therapeutic approaches. *Advances in Biological Regulation*. 2018;67:13-29. doi:10.1016/j.jbior.2017.09.008
15. Follo MY, Pellagatti A, Ratti S, et al. Recent advances in MDS mutation landscape:

- Splicing and signalling. *Advances in Biological Regulation*. 2020;75:100673. doi:10.1016/j.jbior.2019.100673
16. Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2018;101(3):260-271. doi:10.1111/ejh.13092
 17. Ferrone CK, Blydt-Hansen M, Rauh MJ. Age-Associated TET2 Mutations: Common Drivers of Myeloid Dysfunction, Cancer and Cardiovascular Disease. *IJMS*. 2020;21(2):626. doi:10.3390/ijms21020626
 18. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci*. 2014;105(9):1093-1099. doi:10.1111/cas.12484
 19. Kitamura T. ASXL1 mutations gain a function. *Blood*. 2018;131(3):274-275. doi:10.1182/blood-2017-12-816595
 20. Martinez-Garcia E, Licht JD. Deregulation of H3K27 methylation in cancer. *Nat Genet*. 2010;42(2):100-101. doi:10.1038/ng0210-100
 21. Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Advances*. 2018;2(20):2787-2797. doi:10.1182/bloodadvances.2018015834
 22. Venugopal S, Mascarenhas J, Steensma DP. Loss of 5q in myeloid malignancies – A gain in understanding of biological and clinical consequences. *Blood Reviews*. Published online July 2020:100735. doi:10.1016/j.blre.2020.100735
 23. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1049-1059. doi:10.1182/blood-2018-10-844621
 24. Solomon DA, Kim J-S, Waldman T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. *BMB Reports*. 2014;47(6):299-310. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.6.092
 25. Eurofins- Biomis- Panel NGS.
 26. Calvi LM, Li AJ, Becker MW. What is the role of the microenvironment in MDS? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2019;32(4):101113. doi:10.1016/j.beha.2019.101113
 27. Li AJ, Calvi LM. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression. *Experimental Hematology*. 2017;55:3-18. doi:10.1016/j.exphem.2017.08.003
 28. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. doi:10.1038/nature09262
 29. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-857. doi:10.1038/nature08851
 30. Della Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, et al. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2008;22(3):530-537. doi:10.1038/sj.leu.2405069

31. Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, et al. Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2002;95(9):1923-1930. doi:10.1002/cncr.10900
32. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016;532(7599):323-328. doi:10.1038/nature17624
33. Braun T, Fenaux P. Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): Cause or consequence? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2013;26(4):327-336. doi:10.1016/j.beha.2013.09.003
34. Stalder G, Alberio L, Ribi C. Syndromes myélodysplasiques et auto-immunité. *Revue Médicale Suisse*. Published online 2015:5.
35. Hamidou MA. Prevalence of rheumatic manifestations and antineutrophil cytoplasmic antibodies in haematological malignancies. A prospective study. *Rheumatology*. 2000;39(4):417-420. doi:10.1093/rheumatology/39.4.417
36. Foran JM, Shammo JM. Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *The American Journal of Medicine*. 2012;125(7):S6-S13. doi:10.1016/j.amjmed.2012.04.015
37. Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2013;26(4):319-326. doi:10.1016/j.beha.2013.09.002
38. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
39. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51(2):189-199.
40. Vardiman J. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. *Leukemia Research*. 2012;36(12):1453-1458. doi:10.1016/j.leukres.2012.08.008
41. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
42. Hellström-Lindberg E, Tobiasson M, Greenberg P. Myelodysplastic syndromes: moving towards personalized management. *haematol*. 2020;105(7):1765-1779. doi:10.3324/haematol.2020.248955
43. Hoffbrand AV, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB, eds. WHO Classification: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues (2008). In: *Postgraduate Haematology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015:885-887. doi:10.1002/9781118853771.ch51
44. Bejar R, Tiu RV, Sekeres MA, Komrokji RS. Myelodysplastic Syndromes: Recent Advancements in Risk Stratification and Unmet Therapeutic Challenges. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2013;33:e256-e270. doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.e256

45. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *JCO*. 2007;25(23):3503-3510. doi:10.1200/JCO.2006.08.5696
46. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489
47. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *JCO*. 2012;30(27):3376-3382. doi:10.1200/JCO.2011.40.7379
48. Comont T, Delavigne K, Cougoul P, et al. Prise en charge des syndromes myélodysplasiques en 2019 : mise au point. *La Revue de Médecine Interne*. 2019;40(9):581-589. doi:10.1016/j.revmed.2019.04.001
49. Fontenay M, Raynaud S, Rose C, Gardin C, Varet B, Baumelou E, et al. Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies, www.gfmgroup.org;
50. Mangaonkar AA, Patnaik MM. Treatment of Acquired Sideroblastic Anemias. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2020;34(2):401-420. doi:10.1016/j.hoc.2019.11.002
51. Killick SB, Carter C, Culligan D, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2014;164(4):503-525. doi:10.1111/bjh.12694
52. Fenaux P, Ades L. Traitement des syndromes myélodysplasiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;2009(413):77-85. doi:10.1016/S1773-035X(09)74251-0
53. Jädersten M, Montgomery SM, Dybedal I, Porwit-MacDonald A, Hellström-Lindberg E. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood*. 2005;106(3):803-811. doi:10.1182/blood-2004-10-3872
54. Komrokji RS. Luspatercept in Myelodysplastic Syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2020;34(2):393-400. doi:10.1016/j.hoc.2019.10.004
55. Garcia-Manero G, Chien K, Montalban-Bravo G. Myelodysplastic Syndromes: 2021 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *Am J Hematol*. Published online August 3, 2020;ajh.25950. doi:10.1002/ajh.25950
56. Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2020;382(2):140-151. doi:10.1056/NEJMoa1908892
57. Komrokji RS. Activin Receptor II Ligand Traps: New Treatment Paradigm for Low-Risk MDS. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(4):346-351. doi:10.1007/s11899-019-00517-9
58. Feld J, Navada SC, Silverman LR. Myelo-deception: Luspatercept & TGF-Beta ligand traps in myeloid diseases & anemia. *Leukemia Research*. 2020;97:106430. doi:10.1016/j.leukres.2020.106430
59. Brierley CK, Steensma DP. Thrombopoiesis-stimulating agents and myelodysplastic

syndromes. *Br J Haematol*. 2015;169(3):309-323. doi:10.1111/bjh.13285

60. Fenaux P, Muus P, Kantarjian H, et al. Romiplostim monotherapy in thrombocytopenic patients with myelodysplastic syndromes: long-term safety and efficacy. *Br J Haematol*. 2017;178(6):906-913. doi:10.1111/bjh.14792

61. Cutler C. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndrome. *Hematology*. 2010;2010(1):325-329. doi:10.1182/asheducation-2010.1.325

62. Koreth J, Pidala J, Perez WS, et al. Role of Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Older Patients With De Novo Myelodysplastic Syndromes: An International Collaborative Decision Analysis. *JCO*. 2013;31(21):2662-2670. doi:10.1200/JCO.2012.46.8652

63. Foran JM, Shammo JM. Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *The American Journal of Medicine*. 2012;125(7):S6-S13. doi:10.1016/j.amjmed.2012.04.015

64. Haute Autorité de Santé (HAS). GUIDE DU PARCOURS DU SOIN- INSUFFISANCE MÉDULLAIRE ET AUTRES CYTOPÉNIES CHRONIQUES- SYNDROMES MYELODYSPLASIQUE.

65. Wagner-Ballon O, Imbert M. Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description – démarche diagnostique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;2009(413):39-47. doi:10.1016/S1773-035X(09)74246-7

66. Eclache V, Lafage-Pochitaloff M, Lefebvre C, Penther D, Raynaud S, Tigaud I. Cytogenetic place in managing myelodysplastic syndromes: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Annales de biologie clinique*. 2016;74(5):525-534. doi:10.1684/abc.2016.1154

67. Raynauda SD. Avancées cytogénétiques dans les syndromes myélodysplasiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;2009(413):59-66. doi:10.1016/S1773-035X(09)74248-0

68. Wiktor AE, Van Dyke DL, Hodnefield JM, Eckel-Passow J, Hanson CA. The significance of isolated Y chromosome loss in bone marrow metaphase cells from males over age 50 years. *Leukemia Research*. 2011;35(10):1297-1300. doi:10.1016/j.leukres.2011.05.002

69. Raus N, Karam M, Chebel R, et al. Modalités de capture des anomalies cytogénétiques et moléculaires pour la leucémie aiguë, le myélome multiple, le syndrome myélodysplasique, le syndrome myéloprolifératif et le syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer*. 2020;107(1):S52-S61. doi:10.1016/j.bulcan.2019.07.007

70. Guidelines for the diagnosis and treatment of Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia Nordic MDS Group - 2017.

71. Valent P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology*. 2019;86(1):30-38. doi:10.1159/000489042

72. Danlos F-X, Papo M, Micol J-B. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la

croisée des spécialités. *La Revue de Médecine Interne*. 2019;40(10):684-692. doi:10.1016/j.revmed.2019.05.005

73. Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *The Lancet Haematology*. 2020;7(1):e73-e81. doi:10.1016/S2352-3026(19)30211-X

74. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res*. 2001;61(11):4483-4489.

75. Rowley T. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. *MATER METHODS*. 2012;2. doi:10.13070/mm.en.2.125

76. Elghetany MT. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998;83(12):1104-1115.

77. Béné M-C. Développement de l'immunophénotypage dans les syndromes myélodysplasiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;2009(413):73-76. doi:10.1016/S1773-035X(09)74250-9

78. Wells DA, Benesch M, Loken MR, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(1):394-403. doi:10.1182/blood-2002-09-2768

79. Chu S-C, Wang T-F, Li C-C, et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2011;35(7):868-873. doi:10.1016/j.leukres.2011.02.016

80. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-1134. doi:10.3324/haematol.2009.005801

81. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730-1741. doi:10.1038/leu.2012.30

82. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009;94(8):1066-1074. doi:10.3324/haematol.2009.008532

83. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012;97(8):1209-1217. doi:10.3324/haematol.2011.048421

84. Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, 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*. 2015;100(4):472-478. doi:10.3324/haematol.2014.112755
85. Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(2):184-196. doi:10.1111/ijlh.12151
86. on behalf of IMDSFlow, Porwit A, van de Loosdrecht AA, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes—proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014;28(9):1793-1798. doi:10.1038/leu.2014.191
87. Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(10):1981-1987. doi:10.1038/leu.2013.178
88. Eidenschink Brodersen L, Menssen AJ, Wangen JR, et al. Assessment of erythroid dysplasia by “difference from normal” in routine clinical flow cytometry work-up: Erythroid Dysplasia in Routine Clinical Flow Cytometry Work-up. *Cytometry*. Published online October 2014:n/a-n/a. doi:10.1002/cytob.21199
89. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, et al. Amount of mpl on bone marrow haemopoietic precursor cells from healthy volunteers and patients with refractory anaemia. *Br J Haematol*. 1997;99(4):746-755. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.4923296.x
90. Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2012;97(6):895-902. doi:10.3324/haematol.2011.057158
91. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108(3):1037-1044. doi:10.1182/blood-2005-12-4916
92. Chen Z, Ok CY, Wang W, et al. Low-Grade Myelodysplastic Syndromes with Preserved CD34+ B-Cell Precursors (CD34+ Hematogones). *Cytometry*. 2020;98(1):36-42. doi:10.1002/cyto.b.21830
93. Kahn JD, Chamuleau MED, Westers TM, et al. Regulatory T cells and progenitor B cells are independent prognostic predictors in lower risk myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2015;100(6):e220-222. doi:10.3324/haematol.2014.116657
94. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leukemia Research*. 2008;32(1):5-17. doi:10.1016/j.leukres.2007.04.020
95. Jevremovic D, Timm MM, Reichard KK, et al. Loss of Blast Heterogeneity in Myelodysplastic Syndrome and Other Chronic Myeloid Neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;142(3):292-298. doi:10.1309/AJCP73QSLLYDEGXK

96. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry*. 2006;70B(2):63-70. doi:10.1002/cyto.b.20088
97. Goardon N, Nikolousis E, Sternberg A, et al. Reduced CD38 expression on CD34+ cells as a diagnostic test in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1160-1163. doi:10.3324/haematol.2008.004085
98. <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/60-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-granulocytaire-syndromes-myeloproliferatifs/105-leucemie-myeloide-chronique>. Hematocell LMMC.
99. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3618-3626. doi:10.1182/blood-2015-01-620781

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements



HADJ KHALIFA Ella

RESUME :

Les syndromes myélodysplasiques sont un groupe hétérogène d'affection clonales des cellules souches hématopoïétiques. La maladie se caractérise par une hématopoïèse inefficace par défaut de production de cellules matures, se traduisant par une ou plusieurs cytopénies périphériques contrastant avec une moelle riche, la plupart du temps. Il s'agit d'un état pré leucémique au vu de l'instabilité génétique, avec une évolution possible vers une LAM dans environ 1/3 des cas.

Le diagnostic d'un SMD est simple en présence d'anomalie objective clairement détectée, comme la présence d'une dysplasie supérieure à 10%, un caryotype anormal, une coloration de Perls positif ou des blastes médullaires supérieurs à 5%. En revanche, ce dernier est difficile à poser lorsque les anomalies morphologiques sont frustrées et que les critères décisifs sont absents. C'est dans ce contexte là que l'OMS préconise l'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic des SMD. Elle s'est imposée en tant que co-critère intéressant et comme une véritable technique complémentaire. En revanche, aucune méthode de CMF n'a atteint la sensibilité requise pour affirmer un diagnostic à elle seule.

Partant de ce constat, les objectifs du travail du mémoire seront dans un premier temps de réaliser une étude du score d'Ogata par CMF dans le diagnostic de tous les patients suspectés de SMD pour en déterminer sa sensibilité et sa spécificité. Deuxièmement, s'intéresser à l'apport de la quantification des blastes par CMF dans l'aide au diagnostic d'un SMD. Dans le but de comparer ces résultats à la méthode de référence : l'examen cytologique. Mais aussi de réaliser la comparaison entre les résultats de la CMF, la cytologie, la cytogénétique et la biologie moléculaire dans le diagnostic et le pronostic des SMD.

Les perspectives de ce travail seront de proposer à terme la mise en place d'un examen supplémentaire en cas de diagnostic de SMD difficile à établir, en plus de la cytogénétique et la biologie moléculaire. Pour accroître nos capacités à diagnostiquer et suivre les patients porteurs de SMD.

MOTS CLES : Syndrome Myélodysplasique – Cytométrie en flux – Score Ogata – Quantification blastique

JURY

Président : Pr. Loïc FAVENNEC, Pharmacien, PU-PH, CHU de Rouen

Directeur de thèse : Dr. Gérard BUCHONNET, Médecin, MCU-PH, CHU de Rouen

Membres :

- Dr. Elsa BERA, Médecin, PH, CHU de Rouen
- Pr. Fabrice JARDIN, Médecin, PU-PH, CHB
- Dr. Aspasia STAMATOULAS-BASTARD Médecin, PH, CHB

DATE DE SOUTENANCE : 30.09.2020
