



HAL
open science

Développement d'un test standardisé de quantification de l'expression de la myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique par cytométrie en flux pour le diagnostic d'exclusion des syndromes myélodysplasiques : évaluation de différentes méthodes de perméabilisation

Laura Scheffen

► To cite this version:

Laura Scheffen. Développement d'un test standardisé de quantification de l'expression de la myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique par cytométrie en flux pour le diagnostic d'exclusion des syndromes myélodysplasiques : évaluation de différentes méthodes de perméabilisation. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03215744

HAL Id: dumas-03215744

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03215744v1>

Submitted on 3 May 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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine
Pharmacie de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

DÉVELOPPEMENT D'UN TEST STANDARDISÉ DE QUANTIFICATION DE
L'EXPRESSION DE LA MYÉLOPEROXYDASE DES POLYNUCLÉAIRES
NEUTROPHILES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR LE
DIAGNOSTIC D'EXCLUSION DES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES :
ÉVALUATION DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PERMÉABILISATION

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE
DIPLÔME D'ÉTAT

Laura SCHEFFEN

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE
GRENOBLE

Le : 06/04/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Mme la Professeure Sophie PARK

Membres :

Mme la Docteure Tatiana RASKOVALOVA (directrice de thèse)

Mme la Docteure Marie-Christine JACOB

Mme la Docteure Claire VETTIER

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2020-2021

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre-Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PR Ass. Méd.	BOILLOT Bernard	
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH émérite	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH émérite	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur ; Addictologie
PU-PH émérite	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH émérite	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
MCF Ass.MG	CHAMBOREDON Benoît	Médecine Générale
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénéréologie
MCF Ass.MG	CHAUVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; a ddictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENO	Discipline universitaire
PU-PH émérite	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
PR Ass. Méd.	LARAMAS Mathieu	Cancérologie ; radiothérapie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH émérite	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
PR Ass. Méd.	MATHIEU Nicolas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie ; addictologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie ; radiothérapie
PU-PH émérite	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
PR Ass. Méd.	ORMEZANO Olivier	Cardiologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PERNOD Gilles	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes ; Addictologie
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PR Ass. Méd.	RECHE Fabian	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH émérite	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH émérite	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
PU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
PR Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
PU-PH émérite	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH émérite	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	THEVENON Julien	Génétique
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VALMARY-DEGANO Séverine	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAQUI Philippe	Néphrologie
PU-PH émérite	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale
PR Ass. Méd. : Professeur des Universités Associé de Médecine
PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale
MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

Remerciements

A Madame le Docteur Tatiana Raskovalova, pour avoir dirigé ce travail de thèse. Je te remercie de m'avoir confié ce sujet et de m'avoir impliqué dans toutes les étapes du projet. Merci pour ta disponibilité. Merci aussi pour le dynamisme dont tu as fait preuve pour l'encadrement du projet.

A Madame le Docteur Marie-Christine Jacob, pour le temps que tu as consacré à mon travail et les conseils apportés. Je te remercie également pour ton enseignement de l'immunophénotypage, merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises avec beaucoup de pédagogie.

A Madame le Docteur Claire Vettier, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour ton investissement et ton aide dans notre protocole de recherche.

A Madame la Professeure Sophie Park, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et pour l'intérêt porté à ce travail.

A toute l'équipe technique d'immunophénotypage, Ghislaine, Richard, Karine, Laure, Claire et Frédérique, un grand merci pour l'intégration au sein de l'équipe. Merci à tous pour votre aide dans mon projet et pour le temps que vous m'avez consacré.

Je tiens enfin à remercier toute personne qui a pu, de près ou de loin, m'accompagner ou m'encourager pendant mon parcours.

Table des matières

Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
1 Introduction	13
2 Rappels bibliographiques	15
2.1 Les syndromes myélodysplasiques	15
2.1.1 Définition.....	15
2.1.2 Physiopathologie	15
2.1.3 Épidémiologie.....	20
2.1.4 Étiologies	20
2.1.5 Présentation clinique	21
2.1.6 Diagnostic	22
2.1.7 Classification.....	31
2.1.8 Diagnostics différentiels.....	34
2.1.9 Pronostic.....	36
2.1.10 Prise en charge thérapeutique.....	38
2.2 Immunophénotypage par cytométrie en flux	41
2.2.1 Principes	41
2.2.2 Immunophénotypage.....	41
2.2.3 Cytométrie en flux.....	43
2.3 Applications de l'IPCMF dans les SMD	51
2.3.1 Anomalies décrites dans les SMD	51
2.3.2 Scores diagnostiques sur moelle.....	55
2.3.3 Scores diagnostiques sur sang périphérique	59
2.3.4 Utilité des scores diagnostiques en clinique	60

3	Présentation d'un test diagnostique d'exclusion des SMD sanguin	61
3.1	Préambule	61
3.2	Intérêt d'un test diagnostique d'exclusion sanguin.....	61
3.3	Étude cas-témoin.....	63
3.4	Études de validation.....	64
3.5	Protocole du test	65
3.6	Perspectives	67
3.6.1	Recherche clinique	67
3.6.2	Recherche fondamentale	67
3.7	Conclusion.....	69
4	Évaluation de différentes méthodes de perméabilisation membranaire	70
4.1	Introduction	70
4.2	Matériel et méthodes	71
4.2.1	Sélection des échantillons	71
4.2.2	Test diagnostique index	72
4.2.3	Standard de référence.....	73
4.2.4	Analyse statistique	73
4.3	Résultats	75
4.4	Discussion	83
5	Conclusion	88
	Bibliographie.....	92
	Annexe.....	99

Liste des figures

Figure 1: Hématopoïèse physiologique	16
Figure 2 : Physiopathologie des SMD	17
Figure 3 : CHIP, CCUS et SMD constituent un continuum.....	19
Figure 4 : Immunomarquage membranaire	42
Figure 5 : Focalisation hydrodynamique.....	43
Figure 6 : Caractéristiques d'une impulsion	46
Figure 7 : Calcul de l'écart type robuste (ETR) et du coefficient de variation robuste (CVR)	49
Figure 8 : Principe de fonctionnement de la CMF	50
Figure 9 : Histogrammes de CMF illustrant les phénotypes aberrants.....	54
Figure 10 : Illustration du calcul du Ne-WX	60
Figure 11 : Histogrammes monoparamétriques de l'expression de la MPO par les PN dans le sang périphérique	63
Figure 12 : Stratégie de fenêtrage pour la quantification de l'expression de la MPO des PN dans le sang périphérique	66
Figure 13 : Expression hétérogène de la MPO : reflet d'une hématopoïèse clonale ?.....	68
Figure 14 : Intérêt du test dans la stratégie diagnostique des SMD	69
Figure 15 : Protocoles de perméabilisation	74
Figure 16 : CVR de la MPO des PN par CMF	78
Figure 17 : Comparaison des CVR par méthode de Bland et Altman	80
Figure 18 : CVR de l'expression de la MPO des PN et seuil d'exclusion diagnostic	81

Liste des tableaux

Tableau I : Critères morphologiques de dysplasie.....	24
Tableau II : Anomalies chromosomiques récurrentes dans les SMD	26
Tableau III : Mutations génétiques récurrentes	29
Tableau IV : Classification OMS des SMD	33
Tableau V : Bilan sanguin à visée de diagnostic différentiel du SMD.....	34
Tableau VI : Score IPSS-R.....	37
Tableau VII : Groupes de risque cytogénétique du CCSS	37
Tableau VIII : Anomalies associées au SMD à rechercher en CMF.....	53
Tableau IX : Principaux scores CMF évaluant la myélodysplasie	58
Tableau X : Composition des réactifs.....	72
Tableau XI : Caractéristiques des patients.....	76
Tableau XII : CVR de l'expression de la MPO des PN selon différentes méthodes de perméabilisation	77
Tableau XIII : MFI de la MPO des PN selon différentes méthodes de perméabilisation	82

Liste des abréviations

ASE *agents stimulants de l'érythropoïèse*

BOM *biopsie ostéomédullaire*

CCUS *cytopénie clonale de signification indéterminé*

CD *cluster de différenciation*

CHIP *hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé*

CHU Centre Hospitalier Universitaire

CMF *cytométrie en flux*

CSH *cellule souche hématopoïétique*

CV *coefficient de variation*

DS *déviatiion standard*

DSR *déviatiion standard robuste*

ET *écart type*

ETR *écart type robuste*

FSC *forward scatter*

HAS *Haute Autorité de la Santé*

IMDSFlow *International Working Group for Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes*

INSEE *Institut National de la Statistique et des Études Économiques*

IPCMF *immunophénotypage par cytométrie en flux*

IPSS *International Pronostic Scoring System*

IPSS-R *Revised International Pronostic Scoring System*

LAM *leucémie aiguë myéloïde*

LMMC *leucémie myélomonocytaire chronique*

MFI *moyenne d'intensité de fluorescence*

MPO *myéloperoxydase*

NGS Next-Generation Sequencing, séquençage de nouvelle génération

OMS *Organisation Mondiale de la Santé*

PN *polynucléaire neutrophile*

SMD *syndrome myélodysplasique*

SMP *syndrome myéloprolifératif*

SSC *side scatter*

VIH *virus de l'immunodéficience humaine*

1 Introduction

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) désignent des hémopathies clonales acquises de la cellule souche hématopoïétique, caractérisées par une dysmyélopoïèse, une hématopoïèse inefficace et des cytopénies périphériques. Ils surviennent principalement chez des sujets dont la médiane d'âge est de 70 ans. La méthode diagnostique de référence est le myélogramme (1).

Sur l'ensemble des patients suspects de SMD, le diagnostic n'est retenu que dans 20% des cas. Du fait de cette faible prévalence, de nombreux sujets âgés sont non nécessairement exposés aux risques et aux inconforts du myélogramme.

Pour limiter les prélèvements de moelle dans cette population souvent fragile, un test à partir de sang périphérique a été développé pour exclure le diagnostic de SMD. Il s'agit d'un test basé sur la semi-quantification de la myéloperoxydase (MPO) dans les polynucléaires neutrophiles (PN) par cytométrie en flux (CMF). Les performances démontrées par ce test sont jusqu'à présent très prometteuses, avec une sensibilité et une valeur prédictive négative proches de 100%. Cette stratégie pourrait potentiellement éviter la réalisation d'un myélogramme chez un tiers des patients suspects de SMD.

Si l'on considère l'aspect technique du test, la détection de la MPO intracellulaire des PN nécessite une étape de perméabilisation membranaire. Dans le protocole de référence, l'agent de perméabilisation utilisé a été le kit commercial Intrasure™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Afin de s'assurer de la validité des résultats dans d'autres laboratoires utilisant d'autres agents de perméabilisation, il nous a paru pertinent de tester des réactifs alternatifs. L'objectif de ce travail a été d'évaluer les performances du test avec deux méthodes de perméabilisation différentes : le kit

Intrastain™ (Dako, Denmark) et le réactif BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) qui sont très largement utilisés dans l'immunophénoypage des hémopathies.

Cette étude comparative contribue à l'applicabilité externe du test et pourrait, si les résultats sont concluants, permettre aux différents laboratoires d'utiliser les réactifs de perméabilisation de leur choix pour le protocole du test.

2 Rappels bibliographiques

2.1 Les syndromes myélodysplasiques

2.1.1 Définition

Les SMD sont un groupe hétérogène d'affections clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH) de la moelle. Ils se caractérisent par une prolifération excessive des cellules progénitrices myéloïdes associée à une différenciation cellulaire anormale. Ils sont responsables d'un défaut de production de cellules matures par la moelle, qui se traduit dans le sang par des cytopénies. Les SMD évoluent dans approximativement 30% des cas en leucémie aiguë myéloïde (LAM) et constituent les plus fréquents des états préleucémiques chez l'adulte (2).

2.1.2 Physiopathologie

2.1.2.1 Physiologie de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui permet la production des cellules sanguines. Elle se déroule dans la moelle osseuse. Selon le modèle classique d'hématopoïèse pyramidale, les CSH sont à l'origine de tous les types de cellules hématopoïétiques. Deux propriétés fondamentales leur permettent d'assurer cette production (3) : l'auto-renouvellement (capacité de générer des CSH filles identiques) et la multipotence (capacité de se différencier en tout type de cellule hématopoïétique).

Au cours de l'hématopoïèse physiologique (Figure 1), les CSH perdent leur propriété d'auto-renouvellement. Les cellules résultantes, les progéniteurs multipotents (PM), s'orientent ensuite vers un versant myéloïde ou lymphoïde. Les progéniteurs

myéloïdes communs (PMC) se différencient en progéniteurs mégacaryocytaires (PMk), érythroblastiques (PE), granuleux (PG) et macrophagiques (PMa). A ce stade avancé de la différenciation, les progéniteurs ne peuvent évoluer que vers une seule lignée myéloïde : la lignée mégacaryocytaire pour les PMk, érythroblastique pour les PE, granuleuse pour les PG et macrophagique pour les PMA. En parallèle, les progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) se différencient en progéniteurs B (PB), T (PT) et NK (PNK) à l'origine des lignées lymphoïdes B, T et NK. Dans chaque lignée, les cellules acquièrent progressivement des caractéristiques spécifiques qui permettent de les distinguer morphologiquement les unes des autres. Ces cellules identifiables au microscope sont appelées des précurseurs. Après un processus de maturation complet, les précurseurs aboutissent à des cellules fonctionnelles qui sont libérées dans le sang.

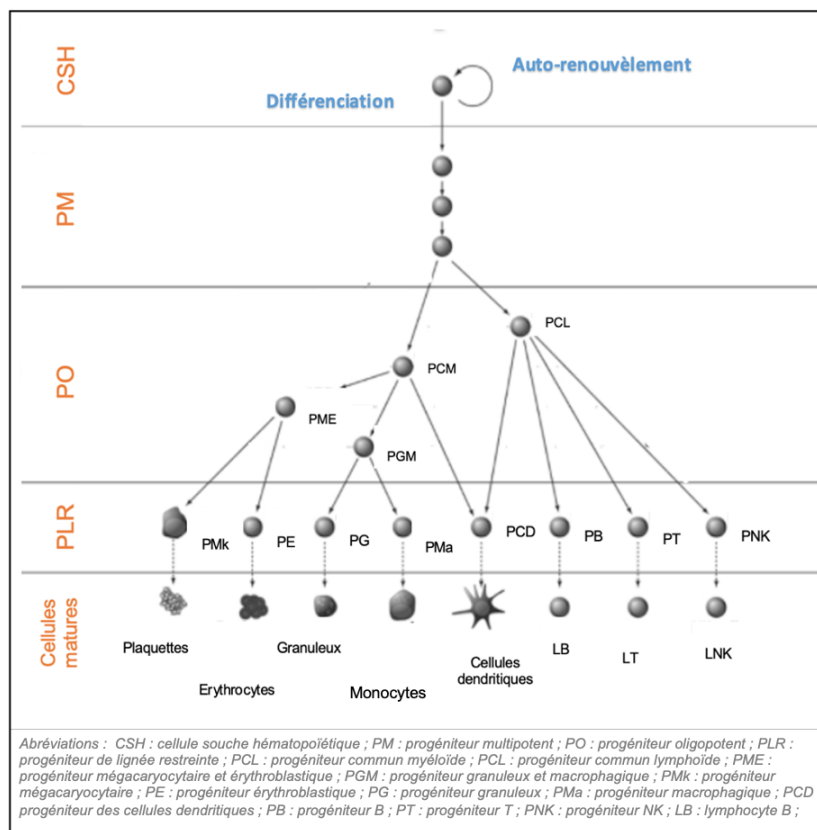


Figure 1: Hématopoïèse physiologique (3)

2.1.2.2 Physiopathologie des SMD

2.1.2.2.1 Hématopoïèse clonale

Dans les SMD, des mutations somatiques surviennent dans les CSH et génèrent un clone anormal qui impacte le versant myéloïde de l'hématopoïèse. Il est généralement admis qu'au moins deux mutations clonales sont nécessaires pour que la pathologie se développe (4). La première permet à la CSH d'augmenter sa capacité d'auto-renouveaulement ou bien à la cellule progénitrice d'acquérir cette capacité. Elle est primordiale car à l'origine de l'expansion d'un clone. La seconde altère la différenciation du progéniteur myéloïde. Il en résulte une accumulation de cellules myéloïdes morphologiquement anormales qualifiées de dysplasiques et un défaut de production de cellules matures dans le sang, responsable des cytopénies. L'hématopoïèse devient inefficace (Figure 2).

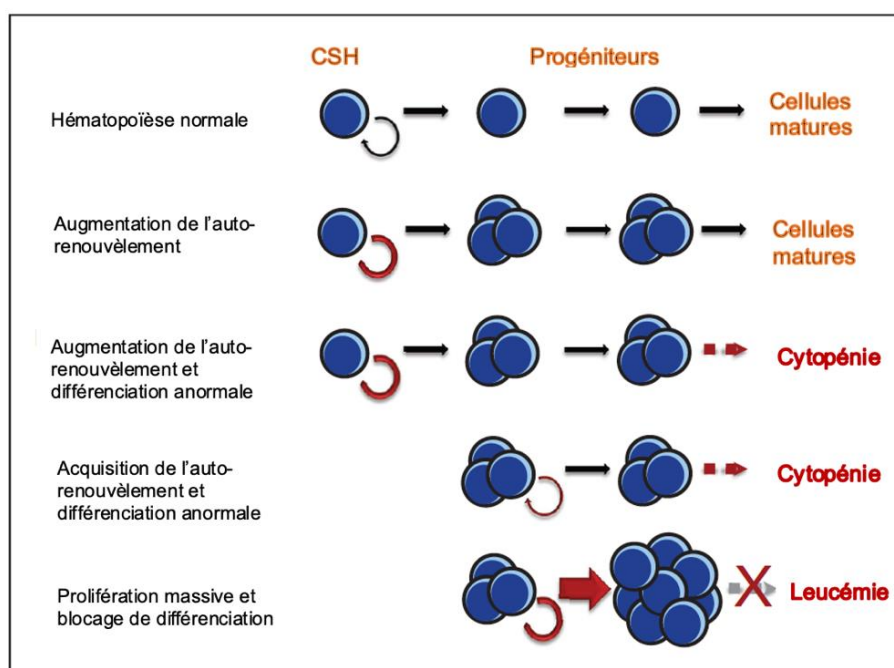


Figure 2 : Physiopathologie des SMD (4)

Au stade initial, la moelle élimine la majorité des cellules myéloïdes anormales par mécanisme d'apoptose, la situation est alors temporairement sous contrôle. De nouvelles mutations peuvent cependant survenir au cours du temps. Lorsqu'elles confèrent un avantage prolifératif ou une résistance à l'apoptose, la moelle ne parvient plus à contenir le clone. L'accumulation dans la moelle de ces cellules clonales immatures définit la transformation en leucémie aiguë myéloïde.

2.1.2.2.2 Phases pré-SMD

Au cours des dernières années, il a été démontré que l'hématopoïèse clonale n'avait pas toujours un caractère pathologique. Plusieurs études ont permis de détecter des clones dans une petite proportion d'individus sains, surtout chez les sujets âgés (5). Cette découverte a fait émerger le concept de « CHIP » (hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé), un état qui se caractérise par la présence de mutations somatiques sans maladie hématologique. Les mutations détectées sont souvent des mutations récurrentes dans les hémopathies qui permettent d'initier l'expansion du clone. Par définition, seuls les variants génétiques présentant une fréquence allélique supérieure à 2% sont considérés comme susceptibles d'évoluer en SMD. En dessous de ce seuil, la présence d'une mutation n'est pas prédictive d'évolution péjorative. Lorsque le clone s'étend dans la moelle et provoque l'apparition d'une cytopénie mais que les critères diagnostiques de SMD de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ne sont pas suffisants (absence de dysplasie > 10% sur une lignée myéloïde, absence d'excès de blaste et absence d'anomalie chromosomique récurrente), il est admis que cette phase correspond une « CCUS » (cytopénie clonale de signification indéterminé). La fréquence allélique requise pour employer ce terme est fixée à 20% (6).

Ainsi, la CHIP, la CCUS et le SMD constituent un continuum qui dépend de 3 paramètres : la fréquence allélique du variant, la survenue de cytopénies et l'apparition de dysplasie (Figure 3). De manière consensuelle, on considère ainsi que la CHIP et la CCUS sont des phases pré-SMD (1).

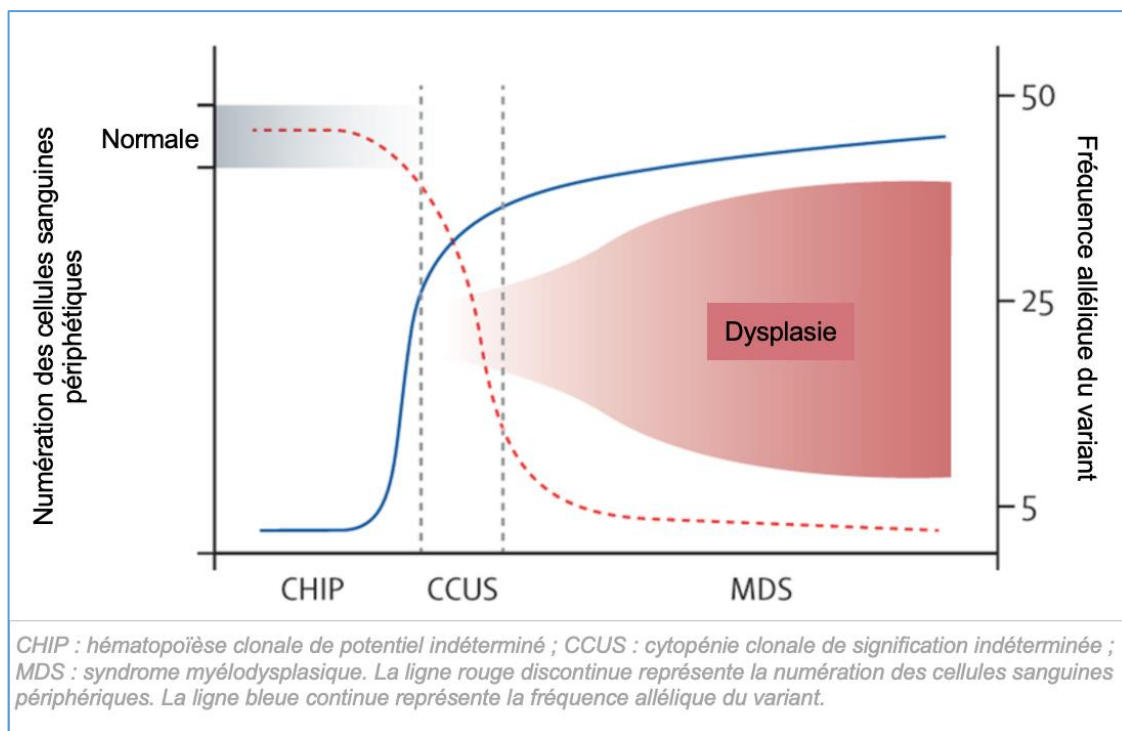


Figure 3 : CHIP, CCUS et SMD constituent un continuum (6)

2.1.3 Épidémiologie

Les SMD sont des hémopathies clonales rares qui touchent généralement les sujets âgés. Selon une étude réalisée à partir des registres des cancers du réseau Francim par l'INSEE (Institut National de la Statistique et des Études Économiques), le nombre de nouveaux cas incidents de SMD en 2018 est estimé à 4 735 en France (7). Le taux d'incidence standardisé est de 3,4 pour 100 000 personnes années chez l'homme et de 1,6 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes égal à 2,1. L'âge médian au diagnostic est de 78 ans chez l'homme et de 80 ans chez la femme.

2.1.4 Étiologies

Dans la très grande majorité des cas, la cause est idiopathique. Néanmoins, il existe des formes secondaires à des agents étiologiques clairement identifiés, qu'il convient de rechercher au cours de l'interrogatoire du patient.

Les SMD peuvent survenir dans les suites d'un traitement par chimiothérapie, surtout lorsqu'il s'agit d'un agent alkylant. Le traitement par radiothérapie est aussi un facteur de risque avéré (8).

Plus rarement, les SMD peuvent être secondaires à des agents environnementaux. L'exposition à des radiations ionisantes et au benzène sont des facteurs de risques de SMD bien établis dans la littérature (9). Il est important de connaître la profession du patient car la reconnaissance en maladie professionnelle est possible pour les travailleurs ayant été exposés. D'autres agents environnementaux ont également été incriminés comme étant des facteurs de risque probables de SMD (exposition aux pesticides (10), au tabac (11)). L'association entre la consommation chronique d'alcool et les SMD a été étudiée dans plusieurs travaux de recherche. Récemment,

une étude cas-témoin de Duffy et al. (12) a conclu à une absence d'association significative entre la consommation d'alcool chronique et la pathologie.

Exceptionnellement les SMD peuvent survenir dans le cadre d'une maladie d'origine génétique. On peut citer entre autres la maladie de Fanconi, le syndrome de Shwachman-Diamond ou encore la dyskératose congénitale (13). Dans ces contextes particuliers, les SMD apparaissent pendant l'enfance et sont généralement associés à des anomalies évocatrices de maladies héréditaires.

2.1.5 Présentation clinique

Les manifestations cliniques du SMD sont non spécifiques et varient selon les cytopénies et leur sévérité. La sensation de fatigue, liée à l'anémie, est la plus fréquente et est souvent responsable d'une altération de la qualité de vie du patient. Plus occasionnellement, la thrombopénie et la neutropénie peuvent provoquer des saignements et des infections (14). Dans 10 à 20% des cas il existe également des manifestations auto-immunes de type vascularite, connectivite, arthrite ou dermatose neutrophile (15). En pratique, les patients sont très souvent asymptomatiques et c'est la découverte d'une ou plusieurs cytopénies sur un bilan sanguin de routine qui fait suspecter le diagnostic.

2.1.6 Diagnostic

2.1.6.1 L'hémogramme

La présence d'une cytopénie est un élément indispensable au diagnostic de SMD. Elle doit avoir un caractère persistant d'au moins 6 mois (16). L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) recommande d'utiliser les définitions de cytopénie de l'IPSS (International Prognostic Scoring System) (17) : anémie si hémoglobine < 100 g/L, neutropénie si polynucléaires neutrophiles < $1,8 \times 10^9/L$ et thrombopénie si plaquettes < $100 \times 10^9/L$. L'anémie, la neutropénie et la thrombopénie sont respectivement présentes chez environ 80, 40 et 40% des patients SMD au moment du diagnostic (18). L'anémie, la cytopénie la plus fréquente observée dans les SMD, est classiquement macrocytaire et arégénérative.

Dans la pratique hématologique, un SMD est évoqué pour des cytopénies moins profondes que celles définies par l'IPSS. En effet, en analysant une cohorte de patients SMD, il a été observé que 18% des patients ne présentaient pas de tels niveaux de cytopénies (19). En utilisant les valeurs standards de cytopénies des laboratoires (hémoglobine < 130g/L chez les hommes ou < 120g/L chez les femmes ; polynucléaires neutrophiles < $1,8 \times 10^9/L$; plaquettes < $150 \times 10^9/L$), le pourcentage de patients de cette cohorte ne présentant pas de cytopénies était réduit à 1,8%. L'OMS recommande par conséquent de suspecter le diagnostic de SMD devant des cytopénies d'intensité modérée (20).

En plus des cytopénies, il est possible d'observer sur le frottis sanguin des signes de dysplasie sur les cellules myéloïdes (Tableau I) et la présence de cellule immatures communément appelées « blastes ».

Néanmoins la présence de cytopénies, de signes de dysplasie ou de blastes dans le sang ne sont pas des manifestations biologiques spécifiques du SMD. On peut les observer dans beaucoup d'autres situations qui sont à écarter lors du diagnostic différentiel.

2.1.6.2 Le myélogramme

La ponction de moelle est indispensable pour établir le diagnostic de SMD. C'est un acte médical invasif qui doit être réalisé par un médecin spécialisé en hématologie.

2.1.6.2.1 Cytologie médullaire

L'analyse cytologique requiert un examen microscopique minutieux, effectué par un cytologiste expérimenté. Le myélogramme dans les SMD est habituellement hypercellulaire. Plus rarement la densité cellulaire peut être normale ou diminuée (20). La présence de dysplasie est un élément central de la définition des SMD. L'OMS considère comme significatif un nombre de cellules dysplasiques supérieur ou égal à 10% dans au moins une des lignées myéloïdes. On emploie les termes de dysérythropoïèse, dysgranulopoïèse et dysmégacaryopoïèse lorsqu'il existe une dysplasie de la lignée érythroblastique, granuleuse et mégacaryocytaire respectivement. Paradoxalement, la ou les lignées qui apparaissent dysplasiques sur le myélogramme ne sont pas toujours corrélées aux cytopénies sanguines (17). Les critères morphologiques de dysplasie généralement retenus par les cytologistes sont répertoriés dans le Tableau I.

Il existe un signe de dysplasie particulièrement intéressant à rechercher car assez évocateur des SMD : la présence de sidéroblastes en couronne. La coloration de

Perls est une réaction chimique qui permet de les mettre en évidence, elle doit être réalisée devant toute suspicion. Un nombre de sidéroblastes en couronne supérieur ou égal à 15% permet de retenir le diagnostic de SMD. Le seuil diagnostique peut être abaissé à 5% si une mutation SF3B1 est associée (17).

Enfin, en lien avec la physiopathologie des SMD, on peut observer une augmentation du pourcentage de blastes mais toujours en quantité inférieure à 20%. Par définition, au-dessus de ce seuil, il ne s'agit plus d'un SMD mais d'une leucémie aiguë.

Sang périphérique		
Dysérythroïèse	Dysgranulopoïèse	Dysmégacaryopoïèse
anisocytose	défaut de segmentation	anisocytose
poïkilocytose	(pseudo-Pelger-Huët)	plaquettes géantes
ponctuations basophiles	hypogranulation/dégranulation	
Moelle osseuse		
Dysérythroïèse	Dysgranulopoïèse	Dysmégacaryopoïèse
multinucléarité	défaut de segmentation	micromégacaryocytes
pont inter-nucléaire	(pseudo-Pelger-Huët)	mégacaryocytes multinucléés
contours nucléaires irréguliers	hypersegmentation	mégacaryocytes hypolobés
mégaloblastes	anisocytose	
sidéroblastes en couronne	hypogranulation/dégranulation	
défaut d'hémoglobination	granulations anormales	
inclusions cytoplasmiques	(pseudo Chediak-Higashi)	
vacuoles cytoplasmiques	corps de Döhle	
	bâtons d'Auer	

Tableau I : Critères morphologiques de dysplasie (20)

En pratique, lorsque les signes de dysplasie sont francs ou que les blastes médullaires sont augmentés, le diagnostic est relativement simple car ce sont des anomalies facilement objectivables. En l'absence de ces arguments, le diagnostic cytologique de SMD est plus délicat. En effet, bien que les critères morphologiques de dysplasie soient clairement définis, l'évaluation de la dysplasie reste subjective. Il existe une variabilité inter-opérateur non négligeable, en particulier sur la lignée érythroblastique (21). De plus, il convient de rappeler que la dysplasie n'est pas un signe spécifique des SMD. Pour cette raison, lorsque la dysplasie est le seul argument cytologique observé, il faut rester prudent quant à l'interprétation du résultat, d'autant plus lorsqu'elle est proche du seuil de 10%.

2.1.6.2.2 Cytogénétique médullaire

Le caryotype médullaire est une analyse extrêmement informative pour le diagnostic puisqu'il permet de mettre en évidence le caractère clonal de l'hématopoïèse. Des anomalies chromosomiques sont retrouvées chez 50% des patients SMD (22). La classification OMS 2008 a répertorié une dizaine d'anomalies chromosomiques qui suffisent à établir le diagnostic de SMD par présomption, c'est-à-dire même lorsque les critères morphologiques de dysplasie sont absents chez un patient cytopénique (23). Plus récemment, la classification OMS 2016 a ajouté au répertoire des anomalies chromosomiques souvent présentes mais qui ne permettent pas à elles seules de conclure à un SMD, car elles sont peu spécifiques : il s'agit de la trisomie 8, la perte du chromosome Y et la délétion 20q (20). Elles ont une valeur diagnostique seulement si des signes de dysplasie sont associés. Les anomalies chromosomiques les plus fréquemment présentes au diagnostic sont la trisomie 8, la délétion 5q, la monosomie 7 ou la délétion 7q. (Tableau II

Anomalies chromosomiques	Fréquence (%)
gain du chromosome 8	10
del(5q)	10
perte du chromosome 7 ou del(7q)	10
del(20q)	5-8
perte du chromosome Y	5
i(17q) ou t(17p)	3-5
del(12p) ou t(12p)	3
perte du chromosome 13 ou del(13q)	3
del(11q)	3
del(9q)	1-2
idic(X)(q13)	1-2
inv(3)(q21q26.2)	1
t(6;9)(p23;q34)	1
t(1;3)(p36.3;q21.1)	1
t(3;3)(q21.3;q26.2)	1

Tableau II : Anomalies chromosomiques récurrentes dans les SMD (20)

Le caryotype permet aussi de diagnostiquer un sous-type spécifique de SMD : le SMD avec délétion 5q isolée. Cette entité, définie par la présence d'une délétion 5q isolée ou associée à une autre anomalie (à l'exception de la monosomie 7 ou délétion 7q), est caractérisée morphologiquement par la présence de mégacaryocytes de petite taille à noyau non lobé. C'est un SMD de bon pronostic, pour lequel il existe un traitement spécifique (20). La recherche de cette délétion présente donc un réel intérêt.

Lorsque le caryotype est en situation d'échec ou lorsque le nombre de mitoses anormales observé est très faible, l'analyse par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) est recommandée. C'est une technique utilisant des sondes de fluorescence qui se fixent spécifiquement sur un ou plusieurs gènes d'intérêts. La technique recherchera particulièrement une trisomie 8, une monosomie 7 ou une délétion 5q, ces anomalies cytogénétiques étant les plus fréquentes (24).

2.1.6.3 Biopsie ostéomédullaire

La biopsie ostéomédullaire (BOM) est un examen qui apporte des informations supplémentaires à celles du myélogramme dont la valeur est reconnue par l'OMS (20). Les signes caractéristiques de SMD observables sur la BOM associée à l'immunomarquage sont : 1) organisation architecturale de la moelle altérée 2) présence d'îlots de précurseurs myéloïdes immatures anormalement situés 3) expression aberrante de CD34 par les mégacaryocytes. Elle a l'avantage de permettre un compte de blastes plus précis que sur le myélogramme car elle évite la sous-estimation liée à la présence de fibrose ou de graisse médullaire (25).

En France, cette analyse ne fait pas partie des pratiques courantes pour le diagnostic des SMD (26). Elle est conseillée dans les cas où la moelle serait hypocellulaire pour faciliter le diagnostic différentiel avec une aplasie médullaire ou une myélofibrose.

2.1.6.4 Biologie moléculaire

2.1.6.4.1 Recherche de mutations germinales

Dans de rares cas, la survenue d'un SMD peut être liée à une prédisposition héréditaire. Il faut le suspecter à fortiori chez un enfant ou un sujet jeune chez lequel il existe une histoire personnelle ou familiale de cancers multiples. Dans ces situations particulières, il est recommandé d'adresser le patient à un conseiller en génétique afin qu'une enquête soit menée. Les éléments clinico-biologiques recueillis lors de l'entretien permettent généralement d'orienter vers un syndrome et de faire une recherche ciblée de mutations constitutionnelles (27). A titre d'exemple, un SMD associé à un lymphœdème et un déficit immunitaire doit faire rechercher une mutation GATA2. La mise en évidence d'une mutation constitutionnelle est importante pour la prise en charge thérapeutique et le suivi chez ces jeunes patients.

2.1.6.4.2 Recherche de mutations somatiques

Au cours de ces 10 dernières années, l'essor du séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing NGS) a permis d'identifier de très nombreuses mutations chez les patients SMD. Parmi elles, certaines ont été observées de manière récurrentes dans les études. Les plus fréquentes sont listées dans le Tableau III. La plupart sont des mutations qui surviennent sur des gènes codant pour des protéines ayant une fonction d'épissage de l'ARN (SF3B1, SRSF2, U2AF1 et ZRSR2) ou de méthylation de l'ADN (TET2, DNMT3A, IDH1 et IDH2).

Gène muté	Fonction	Fréquence
SF3B1	Epissage de l'ARN	20-30%
TET2	Méthylation de l'ADN	20-30%
ASXL1	Modification des histones	15-20%
SRSF2	Epissage de l'ARN	~15%
DNMT3A	Méthylation de l'ADN	~10%
RUNX1	Facteur de transcription	~10%
U2AF1	Epissage de l'ARN	5-10%
TP53	Suppresseur de tumeur	5-10%
EZH2	Modification des histones	5-10%
ZRSR2	Epissage de l'ARN	5-10%
STAG2	Cohésine	5-7%
IDH1/IDH2	Méthylation de l'ADN	~5%
CBL	Signalisation	~5%
NRAS	Facteur de transcription	~5%
BCOR	Facteur de transcription	~5%

Tableau III : Mutations génétiques récurrentes (20)

Des panels pan-myéloïdes ciblant ces mutations récurrentes ont été développés et sont actuellement en cours d'évaluation. La détection d'une ou plusieurs mutations clonales chez un patient suspect de SMD conforte le diagnostic. A terme, si l'utilité de ces panels pan-myéloïdes est démontrée, ils devraient vraisemblablement faire partie du bilan diagnostique des SMD (28). Le principal frein à son utilisation généralisée reste son coût élevé. Il est important de souligner que les mutations recherchées par ces panels peuvent être présentes chez des individus sains (CHIP) et dans d'autres hémopathies myéloïdes. Elles ne sont pas spécifiques des SMD, les résultats doivent donc toujours être interprétés avec l'ensemble des données clinico-biologiques

2.1.6.5 Immunophénotypage par cytométrie en flux

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (IPCMF) permet la détection d'anomalies phénotypiques des cellules myéloïdes. Cette analyse spécialisée peut être faite sur un prélèvement médullaire ou sanguin. A ce jour, elle n'est pas recommandée systématiquement dans le bilan diagnostique des SMD. Son utilité dans le diagnostic des SMD sera développé en détail dans la suite de la présentation.

2.1.6.6 Synthèse

L'hémogramme est un prérequis indispensable pour mettre en évidence au moins une cytopénie. Le diagnostic de SMD est retenu sur les arguments cytologiques et cytogénétiques de la moelle. La recherche de mutations par biologie moléculaire et IPCMF sont des examens complémentaires.

2.1.7 Classification

La première classification des SMD a été publiée en 1976 par un groupe de travail franco-américo-anglais (classification FAB) (29). L'OMS a repris cette classification et l'a modifiée à plusieurs reprises au cours du temps. Actuellement, la référence est la classification OMS des néoplasies myéloïdes et leucémies aiguës dans sa version révisée de 2016 (17). D'après celle-ci, les SMD peuvent être classés dans 3 catégories : SMD, SMD associé à un syndrome myéloprolifératif (SMD/SMP) ou tumeur myéloïde avec prédisposition germinale.

2.1.7.1 Catégorie SMD

Dans la catégorie des SMD, les sous-types sont définis selon plusieurs paramètres : le nombre de lignées dysplasiques, le nombre de cytopénies, le pourcentage de sidéroblastes en couronne, le pourcentage de myéloblastes et la présence d'anomalies chromosomiques. Ainsi, on distingue 7 sous-types de SMD (Tableau IV) : SMD avec dysplasie unilignée (MDS-SLD), SMD avec dysplasie multilignée (MDS-MLD), SMD avec sidéroblastes en couronne avec dysplasie soit unilignée (MDS-RS-SLD) soit multilignée (MDS-RS-MLD), SMD avec délétion 5q isolée, SMD avec excès de blastes (MDS-EB) de type 1 si les blastes sont compris entre 5% et 9% dans la moelle ou 2% et 4% dans le sang (MDS-EB-1) et de type 2 si les blastes sont entre 10% et 19% dans la moelle ou 5 et 19% dans le sang (MDS-EB-2), SMD inclassables (MDS-U) et cytopénie réfractaire de l'enfant.

De manière intéressante, on constate que la présence de dysplasie n'est pas un critère indispensable au diagnostic de SMD. Un pourcentage de blaste supérieur ou

égal à 5% dans la moelle ou bien la présence d'une anomalie cytogénétique typique sont des critères suffisants de SMD.

Une notion supplémentaire importante à détailler est la notion d'ICUS (cytopénie idiopathique de signification indéterminée). On parle d'ICUS en présence d'une cytopénie persistante sans signes de dysplasie suffisants pour établir le diagnostic et sans anomalie cytogénétique spécifique. L'OMS conseille de suivre ces patients avec attention afin de contrôler l'évolution de la morphologie cellulaire et du caryotype mais il n'existe pas de recommandations concernant les modalités précises de ce suivi (20)

2.1.7.2 Catégorie SMD/SMP

Elle regroupe les formes frontières entre les SMD et les syndromes myéloprolifératifs (SMP) c'est-à-dire qui présentent des caractéristiques de SMD (dysplasie) et de SMP (prolifération d'une lignée cellulaire). Parmi elles, on retrouve la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) la leucémie myéloïde chronique atypique, la leucémie myélomonocytaire juvénile, le SMD/SMP avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose et le SMD/SMP inclassable.

2.1.7.3 Catégorie tumeur myéloïde avec prédisposition germinale

Il s'agit d'une nouvelle entité diagnostique provisoire qui regroupe les SMD et LAM qui surviennent dans un contexte de mutations constitutionnelles.

	Lignées dysplasiques	Cytopénies	Sidéroblastes en couronne ^a	Blastes médullaires ^b (BM) et sanguins (BS)	Anomalies cytogénétiques
SMD avec dysplasie unilignée (MDS-SLD)	1	1-2	<15%/<5% ^c	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
SMD avec dysplasie multilignée (MDS-MLD)	2-3	1-3	<15%/<5% ^c	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
SMD avec sidéroblastes en couronne (MDS-RS)					
MDS-RS avec dysplasie unilignée (MDS-RS-SLD)	1	1-2	≥15%/≥5% ^c	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
MDS-RS avec dysplasie multilignée (MDS-RS-MLD)	2-3	1-3	≥15%/≥5% ^c	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
SMD del(5q) isolée	1-3	1-2	absents ou présents	BM<5%, BS<1% ^d , absence de corps d'Auer	del(5q) isolée ^e
SMD avec excès de blastes (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	absents ou présents	BM 5%-9% ou BS 2%-4%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
MDS-EB-2	0-3	1-3	absents ou présents	BM 10%-19% ou BS 5%-19% ou corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
SMD inclassable (MDS-U)					
avec 1% de blastes	1-3	1-3	absents ou présents	BM<5%, PB=1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
avec dysplasie unilignée et pancytopenie	1	3	absents ou présents	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	n'importe quelle anomalie chromosomique
définie par une anomalie cytogénétique	0	1-3	<15% ^f	BM<5%, BS<1%, absence de corps d'Auer	anomalies chromosomiques récurrentes
Cytopenie réfractaire de l'enfant	1-3	1-3	absents ou présents	BM<5%, BS<2%	n'importe quelle anomalie chromosomique
^a pourcentage de sidéroblastes en couronne médullaires par rapport aux cellules érythroblastiques ^b pourcentage de blastes médullaires par rapport aux cellules nucléés ^c si présence d'une mutation SF3B1 ^d si persistant à 2 reprises ^e ou si del(5q) avec une anomalie additionnelle exceptée -7 ou del(7q) ^f si les sidéroblastes en couronne sont ≥15% il s'agit par définition d'un signe de dysplasie érythroblastique, on classe alors le SMD en SMD-SLD					

Tableau IV : Classification OMS des SMD (20)

2.1.8 Diagnostics différentiels

En dehors des SMD, de nombreuses situations peuvent provoquer des cytopénies chroniques. Les principales sont la carence martiale, le déficit en vitamine B9 ou B12, la consommation d'alcool, l'insuffisance rénale ou hépatique, l'hypothyroïdie, l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), le syndrome hémolytique et le syndrome inflammatoire. L'HAS (Haute Autorité de la Santé) préconise d'éliminer ces étiologies de manière systématique en réalisant un bilan biologique sanguin (Tableau V). Si celui-ci ne retrouve pas d'étiologie évidente permettant d'expliquer la cytopénie, il convient de poursuivre les investigations et de prélever un myélogramme.

Bilan inflammatoire : VS ou CRP
Bilan ferrique : sidérémie et transferrine
Bilan rénal : ionogramme, urée, créatininémie et calcul de la clairance de la créatinine
Bilan hépatique : ASAT, ALAT, GGT, phosphatases alcalines, bilirubine totale
Bilan thyroïdien : TSH
Bilan vitaminique : vitamine B9 sérique ou intra-érythrocytaire et vitamine B12
Bilan sérologique : sérologies VIH, hépatite B et C
Bilan hémolytique : haptoglobine

Tableau V : Bilan sanguin à visée de diagnostic différentiel du SMD (26)

De même, les signes de dysplasie médullaire ne sont pas spécifiques des SMD. Ils apparaissent fréquemment dans le contexte d'un déficit en vitamine B9 ou B12. Ils peuvent aussi être liés à une toxicité médicamenteuse, surtout chez les patients traités par immunosuppresseurs ou biothérapie. Parmi les médicaments incriminés, on retrouve le méthotrexate, l'azathioprine, l'adalimumab, l'etanercept et l'infliximab (30). Enfin, dans les quelques situations où le myélogramme est hypocellulaire, il faut savoir exclure une pathologie associée à une myélofibrose ou une aplasie médullaire. La BOM apporte une aide précieuse dans ces situations complexes (24).

2.1.9 Pronostic

L'évolution du SMD se fait naturellement vers une transformation en LAM. Le délai de survenue est très variable, il dépend principalement du type de SMD. Par exemple, pour les MDS-SLD et les MDS-MLD, les taux de progression en LAM à 5 ans sont de 10% et 28% respectivement (20).

Concernant la survie globale, un premier score pronostic, l'IPSS (International Pronostic Scoring System), a été mis au point par Greenberg et al. en 1997 (31). Il a été amélioré par l'IPSS-R en 2012 (Revised International Pronostic Scoring System) (32). Cette version révisée a été jugée meilleur en terme de prédiction de survie que la version originale (33).

Le score IPSS-R est calculé en fonction de 5 paramètres (Tableau VI) : la concentration en hémoglobine, la numération des plaquettes, la valeur absolue des polynucléaires neutrophiles, le pourcentage de blastes médullaires et le groupe de risque cytogénétique CCSS (Comprehensive Cytogenetic Score System). Chaque paramètre, selon son résultat, correspond à un nombre de points. La somme des points attribués permet de classer le patient dans un groupe de risque, allant du risque très faible au risque très élevé. Les groupes de risque cytogénétiques du CCSS (Tableau VII) ont été déterminés grâce une étude de grande envergure menée par Schanz J & al sur des patients atteints de SMD (22) dans laquelle il a été analysé la survie globale et le risque de transformation en LAM pour chacune des anomalies cytogénétiques présentes au diagnostic. Les résultats ont permis de regrouper les anomalies chromosomiques en 5 sous-groupes pronostiques.

A titre indicatif, la médiane de survie globale tout âge confondu est de 8,8 années pour le groupe de risque IPSS-R très faible contre 0,8 années pour le groupe de risque très élevé.

Paramètres	Valeurs des points						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Groupe de risque cytogénétique CCSS	très bon	–	bon	–	intermédiaire	mauvais	très mauvais
Blastes médullaires, %	≤ 2	–	2-5	–	5-10	> 10	–
Hémoglobine, g/L	≥ 10	–	8-10	< 8	–	–	–
Plaquettes, x10 ⁹ /L	≥ 100	50-100	< 50	–	–	–	–
Polynucléaires neutrophiles, x10 ⁹ /L	≥ 0,8	< 0,8	–	–	–	–	–
5 groupes de risques sont définis suivant la somme des points							
Très faible	≤ 1,5						
Faible	> 1,5 à 3						
Intermédiaire	> 3 à 4,5						
Elevé	> 4,5 à 6						
Très élevé	> 6						

Tableau VI : Score IPSS-R (32)

Groupe pronostic	Très bon	Bon	Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
Anomalies cytogénétiques	perte du chromosome Y	caryotype normal	del(7q)	perte d'un chromosome 7	caryotype complexe (>3 anomalies)
	del(11q)	del(5q)	gain d'un chromosome 8	inv(3), t(3q) ou del(3q)	
		del(12p)	gain d'un chromosome 19	2 anomalies dont del(7q) ou perte d'un chromosome 7	
		del(20q)	isochromosome 17q	caryotype complexe (3 anomalies)	
		2 anomalies dont del(5q)	1 ou 2 anomalies non spécifiées dans les autres sous-groupes ≥ 2 clones indépendants non complexes	caryotype complexe (>3 anomalies)	

Tableau VII : Groupes de risque cytogénétique du CCSS (22)

2.1.10 Prise en charge thérapeutique

A ce jour, le seul traitement curatif est l'allogreffe de CSH. C'est une option thérapeutique généralement réservée aux patients de moins de 65-70 ans qui ont un risque IPSS-R élevé (24). Pour ceux qui ne peuvent bénéficier de la greffe, l'objectif de la prise en charge est d'améliorer la qualité de vie et limiter la progression du SMD. Les SMD font partie des affections longues durées (ALD), les frais sont donc pris en charge à 100% par la sécurité sociale.

De manière générale, les scores IPSS et IPSS-R permettent de distinguer deux groupes de patients : les patients à haut risque et les patients à faible risque. En plus des traitements médicamenteux spécifiques à chaque groupe, des traitements symptomatiques sont fondamentaux.

2.1.10.1 Traitements des patients à haut risque

Pour les patients à haut risque, l'azacitidine (VIDAZA®) offre un gain de survie globale important. C'est un agent hypométhylant qui a été mis sur le marché en 2008, pour lequel il existe aujourd'hui des formes génériques. Il s'administre par voie sous cutanée en milieu hospitalier au rythme de 7 jours toutes les 4 semaines. La durée de traitement n'est pas clairement établie et il est recommandé de le poursuivre jusqu'à réévalution. Des chimiothérapies intensives, associant anthracyclines et Ara-c, peuvent également être proposées aux patients de moins de 60 ans avec un caryotype normal présentant une blastose médullaire > 10% (24).

2.1.10.2 Traitements des patients à faible risque

Pour les patients à faible risque, les traitements médicamenteux visent avant tout à corriger les cytopénies lorsque celles-ci impactent leur qualité de vie. Les agents stimulants de l'érythropoïèse (ASE) sont une alternative à la transfusion chez les patients anémiques. Leur administration est recommandée chez les patients présentant un taux d'érythropoïétine sérique inférieur à 500 U/L. Une revue systématique a démontré que la darbépoïétine permettait d'obtenir un taux de réponse érythroïde compris entre 38% et 72% avec une durée médiane de réponse de 12 à 51 mois (34). A ce jour, l'érythropoïétine recombinante et la darbépoéine alpha n'ont pas encore l'autorisation de mise sur le marché mais font l'objet d'une mise à disposition dans le cadre d'un protocole d'utilisation thérapeutique (14). Les patients neutropéniques peuvent se voir proposer un traitement par G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), en particulier s'ils ont déjà présenté une infection grave. Quelques médicaments stimulant la synthèse de plaquettes sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques, comme eltrombopag (REVOLADE®).

Dans le cas des SMD avec délétion 5q isolée, le lénalidomide (REVLIMID®) a démontré une efficacité thérapeutique modérée chez les patients dépendants de transfusion.

2.1.10.3 Traitements symptomatiques

Lorsque les traitements médicamenteux sont en échec ou non envisagés, les transfusions sont nécessaires. Concernant le traitement de l'anémie, il est recommandé de transfuser des concentrés de globules rouges dès que l'hémoglobine descend sous le seuil des 80 g/L. Ce seuil est modulable selon la tolérance clinique et les comorbidités. En cas de surcharge ferrique liée aux transfusions répétées, des traitements chélateurs du fer peuvent être ajoutés par voie parentérale (déféroxamine) ou par voie orale (déférasirox ou défériprone). Chez les patients thrombopéniques, les transfusions plaquettaires sont limitées et elles sont faites uniquement en pré-opératoire chirurgical ou si un syndrome hémorragique se manifeste. Pour les patients neutropéniques, il est recommandé de prescrire d'avance des antibiotiques à large spectre à débiter au moindre problème infectieux (24).

2.2 Immunophénotypage par cytométrie en flux

2.2.1 Principes

L'immunophénotypage est une technique qui consiste à marquer des cellules en suspension avec des anticorps spécifiques d'antigènes couplés à des fluorochromes. Après marquage, les cellules sont analysées par CMF.

2.2.2 Immunophénotypage

Pour comprendre en quoi consiste l'immunophénotypage, quelques notions de biologie cellulaire sont nécessaires. Toutes les cellules hématopoïétiques possèdent à leur surface de nombreuses protéines membranaires. Leurs fonctions sont variées : elles peuvent servir de récepteur, de ligand, d'enzyme ou encore de molécules d'adhésion. Certaines d'entre elles sont particulièrement intéressantes car elles permettent d'identifier des populations cellulaires. Ces protéines d'intérêt ont été répertoriées et classées selon la nomenclature des clusters de différenciation (CD) et sont désignées par les lettres « CD » suivies d'un numéro. A ce jour, plus de 400 marqueurs ont été identifiés par l'organisation Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA). L'ensemble des CD exprimés par une cellule constitue ce que l'on appelle son phénotype.

Ainsi, les CD sont des marqueurs qui aident à l'identification des cellules hématopoïétiques. Afin de détecter leur présence, des anticorps dirigés spécifiquement contre les CD et couplés à des fluorochromes ont été élaborés. En présence du CD qui leur est spécifique et après un temps d'incubation, ces anticorps

se fixent sur la cellule. Ce procédé technique s'appelle l'immunomarquage membranaire (Figure 4).

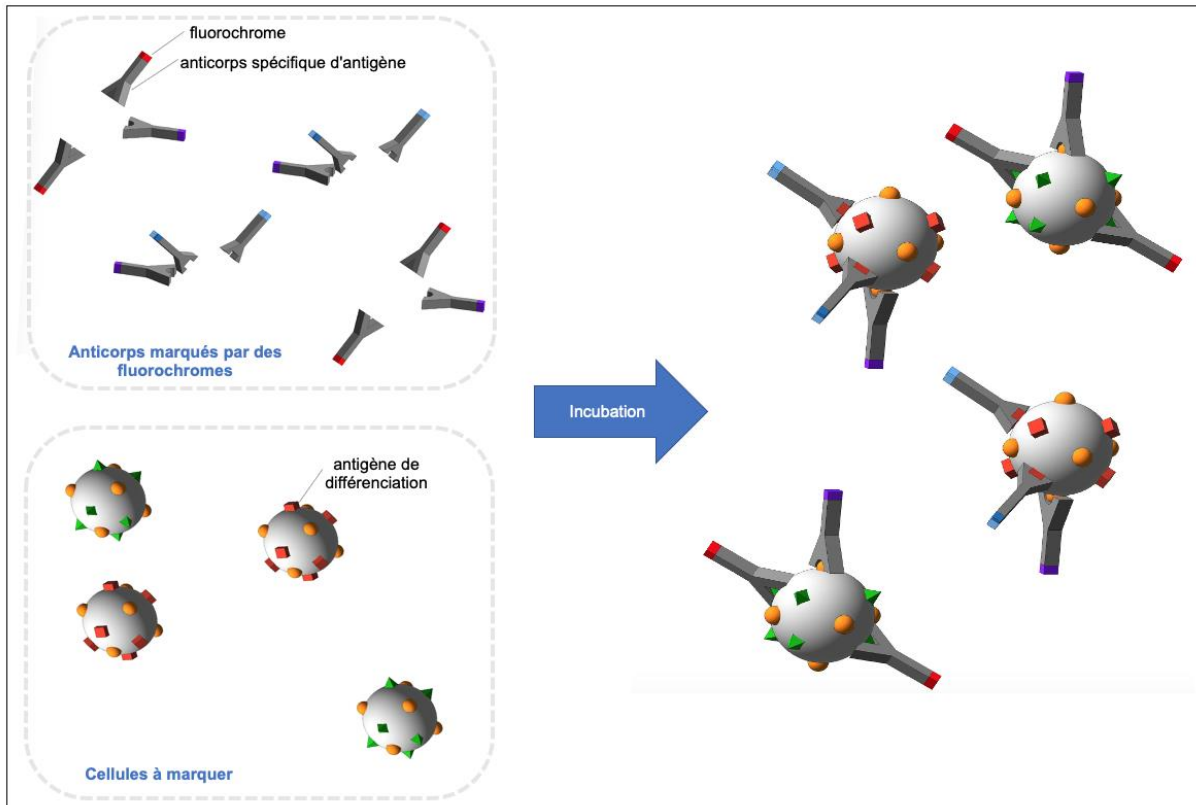


Figure 4 : Immunomarquage membranaire

Dans certains cas, il peut être intéressant de rechercher des marqueurs d'expression non pas membranaires mais intracellulaires. Pour parvenir à faire rentrer les anticorps spécifiques dans la cellule, une étape de perméabilisation membranaire est obligatoire. Les réactifs de perméabilisation créent des pores membranaires qui permettent aux anticorps d'accéder à l'intérieur de la cellule et de se fixer spécifiquement au marqueur. Ce procédé technique correspond à l'immunomarquage intracellulaire.

2.2.3 Cytométrie en flux

L'objectif de la CMF est de recueillir les signaux de fluorescence des cellules marquées afin de les caractériser et les identifier. L'automate utilisé, le cytomètre en flux, est capable d'analyser des paramètres multiples sur des cellules individualisées à très grande vitesse. Son fonctionnement détaillé est complexe, on peut néanmoins le simplifier en différentes étapes successives (35).

2.2.3.1 Focalisation hydrodynamique

Aussi appelée hydrofocalisation, cette première étape permet de faire défiler en jet les cellules les unes derrière les autres. Pour réaliser le flux, une pression est appliquée sur un liquide dit « de gaine » et sur la suspension cellulaire à analyser. Les deux fluides sont conduits dans une buse, appelée buse de focalisation, dont la sortie est un orifice de petite taille. Il en résulte la formation d'une gaine liquide au centre de laquelle défilent les cellules de manière rapide et individualisée (Figure 5).

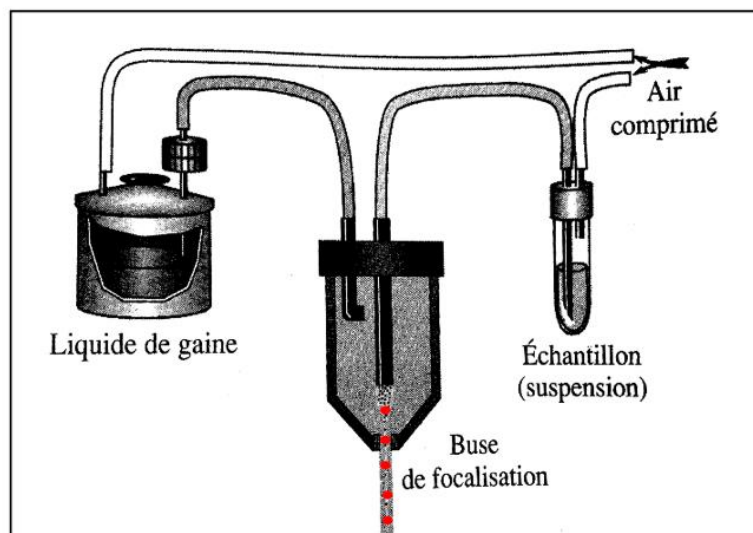


Figure 5 : Focalisation hydrodynamique (35)

2.2.3.2 Excitation lumineuse

Des lasers sont utilisés comme sources d'excitation lumineuse, les trois les plus utilisés étant le violet (émission à 405 nm), le bleu (émission à 488 nm) et le rouge (émission à 630 nm). Les longueurs d'ondes des lasers sont déterminants pour le choix des fluorochromes à utiliser car leurs spectres doivent être compatibles. Leurs faisceaux sont dirigés de manière extrêmement précise vers le jet de cellules. Chaque cellule frappée par le faisceau émet des signaux lumineux.

2.2.3.3 Collection des signaux lumineux

Les signaux lumineux produits puis collectés sont de 3 types :

1. la fluorescence

Elle est produite par les fluorochromes liés aux anticorps. Chaque type de fluorochrome émet une longueur d'onde qui lui est spécifique. La fluorescence est collectée à 90° par rapport à l'axe du faisceau laser par le biais d'un système optique complexe, défini comme le banc optique de l'appareil. Il est constitué d'un ensemble de miroirs semi-réfléchissants (miroirs dichroïques), de lentilles et de filtres dont la configuration permet de séparer la fluorescence en plusieurs couleurs et de les diriger vers les détecteurs appropriés. De cette manière, l'appareil est capable de détecter l'émission de plusieurs fluorochromes simultanément. Les bancs optiques actuels peuvent séparer plusieurs dizaines de couleurs différentes.

2. la diffusion aux petits angles (forward scatter FSC)

Elle est produite par diffraction et est collectée dans l'axe du faisceau. Elle donne une indication sur la taille de la cellule

3. la diffusion aux grands angles (side scatter SSC)

Elle est produite par un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction et est collectée à 90° par rapport à l'axe du faisceau. Elle reflète la structure interne de la cellule et donne une indication sur la granularité et le rapport nucléocytoplasmique.

La CMF est qualifiée de « multiparamétrique » car elle permet l'analyse concomitante de tous ces signaux. A titre d'exemple, un cytomètre avec 12 canaux de fluorescence est capable d'étudier simultanément 14 paramètres.

2.2.3.4 Traitement électronique

Les signaux lumineux collectés ne sont pas directement interprétables. Les stratégies de traitement du signal ont beaucoup évoluées au cours des dernières années et sont différentes selon les fabricants. Néanmoins, le signal passe globalement par 3 paliers de transformation pour aboutir à des données exploitables.

1. Détection

Le banc optique conduit chaque signal lumineux jusqu'au détecteur approprié. Le détecteur a pour fonction de transformer le signal lumineux en signal électrique. Il en existe 2 types : les photodiodes (PD) et les photomultiplicateurs (PMT).

Les PMT sont capables d'amplifier le signal électrique et sont par conséquent plus sensibles que les PD. Souvent, les PD sont choisies pour détecter les signaux FSC tandis que les PMT sont utilisées pour les signaux SSC et de fluorescence qui sont d'intensité moindre. Concernant les détecteurs de fluorescence, on en dénombre autant que de couleurs séparées par le banc optique. Après transformation du signal lumineux, on obtient une « impulsion » qui correspond à l'ensemble du signal électrique issu d'une cellule lors de son passage sur un détecteur. Une impulsion est caractérisée par son amplitude, (comprise entre 0 et 10 volts), sa largeur et son aire (Figure 6). Les caractéristiques des impulsions provenant des différents détecteurs sont transmises à un analyseur multicanaux dont la fonction est de traiter et digitaliser les informations.

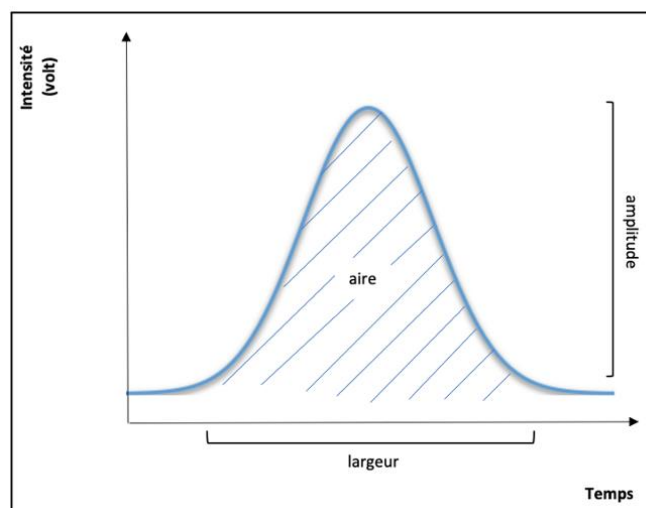


Figure 6 : Caractéristiques d'une impulsion

2. Traitement

Lorsque la CMF est multi couleur, les chevauchements des spectres de fluorescence des différents fluorochromes utilisés simultanément créent des interférences qu'il est nécessaire de corriger par compensation. Par conséquent, l'impulsion provenant de chaque détecteur de fluorescence est traitée par un circuit de compensation. Celui-ci soustrait à la valeur de base une valeur déterminée par l'utilisateur.

3. Digitalisation

La dernière phase consiste à transformer l'impulsion en valeur numérique afin d'obtenir des données transférables et exploitables sur ordinateur. Ce processus, appelé digitalisation, utilise un convertisseur analogique-numérique capable de convertir l'ensemble de l'impulsion en système binaire.

2.2.3.5 Traitement informatique

Pour chaque cellule analysée par le cytomètre, l'ordinateur reçoit des informations de 3 types : la taille via le canal FSC, la structure interne via le canal SSC et la présence de CD via les canaux de fluorescence (Figure 8). Lors de l'analyse d'un échantillon, ce sont les informations de plusieurs milliers de cellules qui sont acquises. Pour analyser ces données volumineuses, il existe des logiciels d'exploitations qui permettent de mettre en forme ces données afin de les interpréter. Les représentations les plus utilisés en travail de routine sont les histogrammes biparamétriques. Ce sont des graphiques en deux dimensions au visuel simple : chaque cellule est représentée par un point sur un axe orthonormé qui a pour abscisse et ordonnée deux paramètres choisis. Les populations cellulaires apparaissent alors sous forme de « nuages de points ».

Classiquement, un premier histogramme biparamétrique compare la taille et la structure des cellules. A partir de cet histogramme, il est possible de sélectionner une population à analyser, nommée population d'intérêt, en dessinant une fenêtre autour. L'objectif est ensuite de caractériser cette population en observant un à un les histogrammes qui étudient les paramètres de fluorescence.

Une analyse statistique des données est finalement possible. Le logiciel d'acquisition est capable de générer des statistiques à partir des valeurs issues des événements acquis. Les statistiques peuvent être affichées pour tout paramètre et calculées pour toute population définie.

Les statistiques les plus fréquemment employées sont les suivantes :

- Moyenne : valeur moyenne pour les événements de la population d'intérêt
- Médiane : valeur ayant un nombre égal de valeurs lui étant supérieures et inférieures
- Mode : valeur d'intensité relative la plus fréquemment obtenue pour un paramètre donné
- Déviation standard (DS) : mesure de l'écart type (ET) par rapport à la moyenne pour des événements d'une population d'intérêt.
- Déviation standard robuste (DSR) : mesure de l'écart type robuste (ETR) (Figure 7)
- Coefficient de variation (CV) : résultat de la division de l'ET par la moyenne dans une population définie, exprimé sous forme de pourcentage
- Coefficient de variation robuste (CVR) : Résultat de la division de l'ET robuste par la médiane dans une population définie, exprimé sous forme de pourcentage.

Écart type robuste (ETr)	<p>Écart type robuste (ETr) calculé comme suit :</p> <p>La médiane de l'échantillon de données est calculée comme suit :</p> $\theta_{\text{median}} = \text{med}_i \{x_i\}$ <p>L'écart absolu médian est alors calculé ainsi :</p> $\sigma_{\text{median}} = \text{med}_i \{ x_i - \theta_{\text{median}} \}$ <p>L'écart type robuste est ensuite calculé comme suit :</p> <p>La constante est : $\sigma_{\text{median}} = \sigma_{\text{median}} / \phi^{-1}(0.75)$</p>
Coefficient de variation robuste (CVR)	<p>Coefficient robuste de variation calculé comme suit :</p> $\% \text{CVR} = ((\text{ETr}) / \text{médiane}) * 100.$

Figure 7 : Calcul de l'écart type robuste (ETR) et du coefficient de variation robuste (CVR) (36)

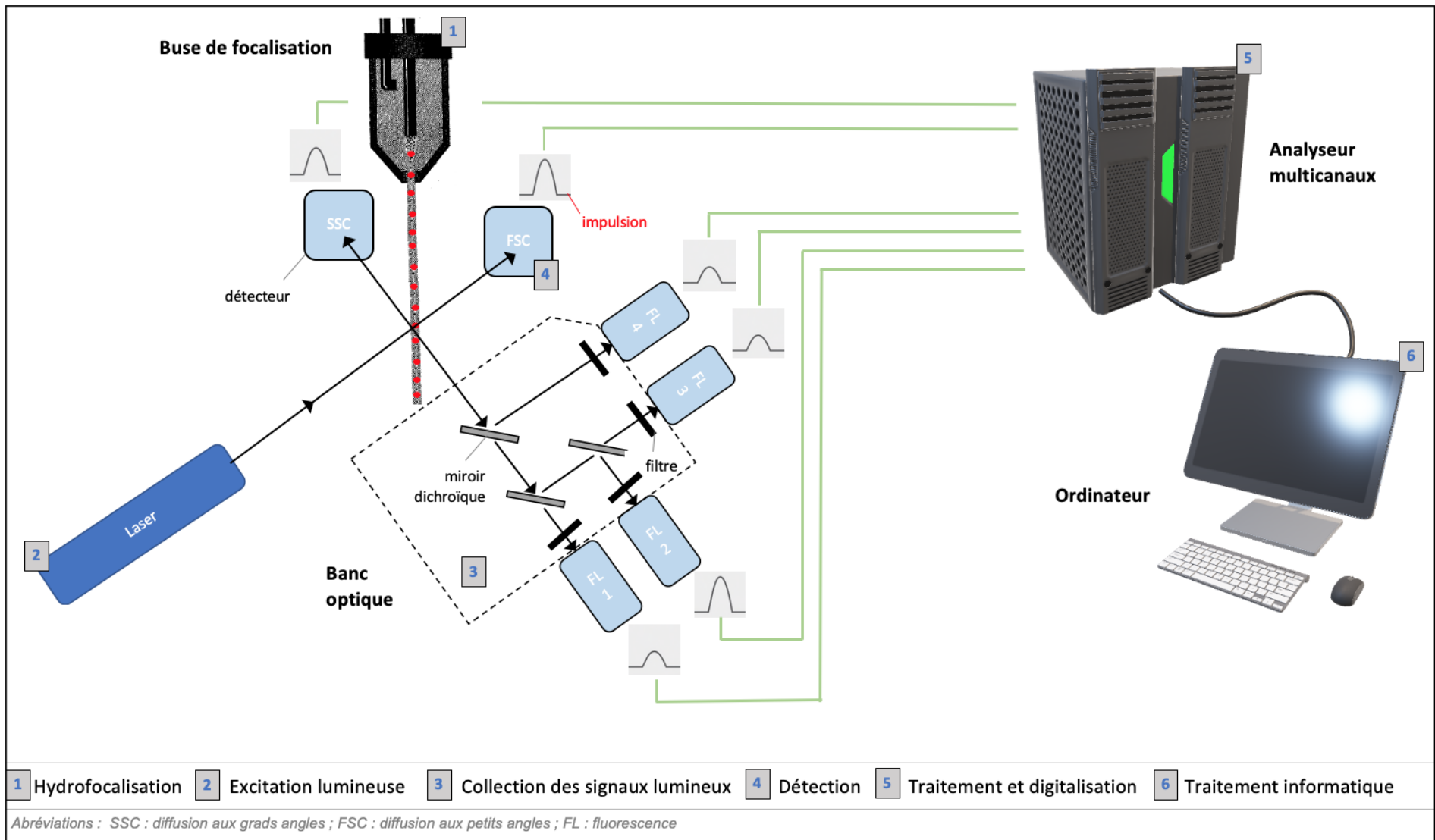


Figure 8 : Principe de fonctionnement de la CMF

2.3 Applications de l'IPCMF dans les SMD

Des anomalies des cellules de la moelle ont été fréquemment observées par IPCMF chez les patients SMD. Ces anomalies sont de deux types : proportion anormale de progéniteurs ou expression anormale d'antigènes sur les cellules myéloïdes. En combinant plusieurs de ces anomalies, des scores diagnostics ont été élaborés. Un score élevé est associé à une probabilité élevée de SMD.

2.3.1 Anomalies décrites dans les SMD

L'une des premières anomalies à avoir été décrite concerne les proportions de progéniteurs. Dans une étude menée en 2006, Ogata et al. ont comparé les proportions de progéniteurs myéloïdes (appelés aussi myéloblastes) et lymphoïdes (appelés aussi hématogones) de 27 patients SMD et 90 patients contrôles (37). Concernant la stratégie de fenêtrage, les progéniteurs ont été sélectionnés sur l'expression du CD34 puis distingués en myéloblastes et hématogones en fonction de leur SSC et de l'expression du CD45. Dans la cohorte SMD, il a été démontré que 1) le pourcentage de myéloblastes sur l'ensemble des cellules nucléées de la moelle était plus élevé 2) le pourcentage d'hématogones sur l'ensemble des progéniteurs était plus faible.

Par la suite, des anomalies d'expression d'antigènes, souvent regroupées sous le nom de phénotypes aberrants (expression anormale d'antigène et/ou asynchronisme de maturation), ont été rapportées dans plusieurs études, notamment celle réalisée par Kern et al. (38). Sur une cohorte de 1013 patients suspects de SMD, 511 étaient des SMD avérés cytologiquement. Chez ces derniers, des phénotypes aberrants ont été observés

de manière significative sur les progéniteurs myéloïdes, le compartiment granuleux, le compartiment monocytaire et les érythroblastes. La médiane du nombre de caractéristiques aberrantes par patient était de 3.

En s'appuyant sur les résultats de ces études et de plusieurs autres, l'IMDSFlow (International Working Group for Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes) a publié des recommandations sur l'utilisation de la CMF dans le diagnostic des SMD, parmi lesquelles figurent une liste d'anomalies associées aux SMD (Tableau VIII) (39). Elles sont à rechercher dans la moelle sur les progéniteurs, les compartiments granuleux et monocytaires et les érythroblastes. Des anomalies sur au moins 3 paramètres dans au moins 2 compartiments cellulaires différents sont fortement associés à un SMD ou un SMD/SMP. Quelques-unes d'entre elles sont représentées sur la Figure 9. Il est intéressant de noter que les mégacaryocytes, dont l'aspect cytogique est pourtant un élément important pour le diagnostic de SMD, ne sont pas pris en compte. En effet, ils sont présents en trop faible proportion dans la moelle pour pouvoir être analysés par CMF et donner des résultats exploitables.

Populations médullaires	Analyses recommandées	Anomalies
Progéniteurs lymphoïdes B	Pourcentage de CD34+ CD19+	≤ 5% des CD34+ totales
	Pourcentage de CD19+ CD10+	Diminution
Progéniteurs myéloïdes	SSC	Augmentation
	Expression de CD45	Diminution
	Expression de CD117	Diminution
	Pourcentage de CD34+ CD19-	Augmentation
	Pourcentage de HLA-DR ^{dim} CD34+	Augmentation
	Pourcentage de CD38 ^{dim} CD34+	Augmentation
	Expression de CD11b	Augmentation
	Expression de CD13 et CD33	Modèle anormal
	Expression de CD15	Présence de marqueur mature
	Expression de CD5, CD56, CD7	Présence de marqueur d'infidélité de lignée
Compartiment granuleux	SSC (ratio par rapport au SSC lymphocytes)	Diminution
	Expression de CD45	Diminution
	Expression de CD117	Augmentation
	Expression de CD34	Présence de marqueur immature
	Expression de HLA-DR	Augmentation
	Expression de HLA-DR et CD11b	Modèle anormal
	Expression de CD11b et CD16	Modèle anormal
	Expression de CD13 et CD11b	Modèle anormal
	Expression de CD13 et CD16	Modèle anormal
	Expression de CD13 et CD33	Modèle anormal
	Expression de CD15 et CD10	Modèle anormal
	Expression de CD19 CD5, CD56, CD7	Présence de marqueur d'infidélité de lignée
	Expression de CD36	Augmentation
Compartiment monocytaire	SSC	Diminution
	Expression de CD45	Diminution
	Expression de CD34	Présence de marqueur immature
	Expression de HLA-DR	Diminution
	Expression de CD11b	Diminution
	Expression de HLA-DR et CD11b	Modèle anormal
	Expression de CD11b et CD16	Modèle anormal
	Expression de CD13 et CD33	Modèle anormal
	Expression de CD14	Diminution
	Expression de CD36	Anormale
	Expression de CD36 et CD14	Modèle anormal
	Expression de CD5, CD56, CD7	Modèle anormal
Erythroblastes	Relation entre CD71 et CD235a	Modèle anormal
	Expression de CD71	Diminution ou hétérogène
	Expression de CD36	Diminution ou hétérogène
	Pourcentage de CD117+	Augmentation

Tableau VIII : Anomalies associées au SMD à rechercher en CMF (39)

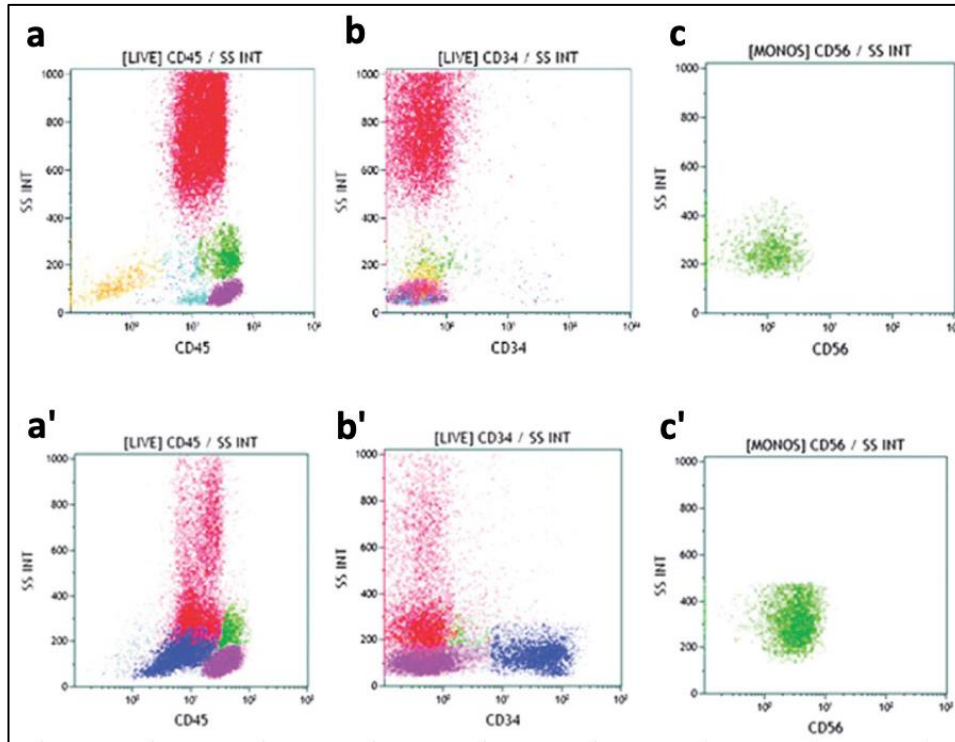


Figure 9 : Histogrammes de CMF illustrant les phénotypes aberrants (39)
 Comparaison des résultats d'un prélèvement médullaire normal (en haut) et pathologique de SMD (en bas). Les lymphocytes sont colorés en violet, les monocytes en vert, les granuleux en rouge, les érythroblastes en orange, les progéniteurs en bleu. (a vs a') Diminution du SSC des granuleux. (b vs b') Augmentation du pourcentage de progéniteurs CD34+. (c vs c') Expression aberrante du CD56 par les monocytes.

2.3.2 Scores diagnostiques sur moelle

Il peut être difficile de faire la distinction entre les SMD et les autres causes de cytopénies, notamment lorsque les signes cytologiques sont peu marqués (absence d'excès de blastes et de sidéroblastes en couronne, dysplasie modérée) et que le caryotype est normal. Dans le but de faciliter la différenciation entre les deux, des scores diagnostiques de CMF ont été élaborés à partir des anomalies découvertes. Ces scores sont calculés à partir de prélèvements médullaires. Le Tableau IX liste les principaux de manière non exhaustive. Le nombre de paramètres de CMF pris en compte pour le calcul et les populations analysées varient selon les équipes de recherche. Par exemple, Matarraz et al. (40) ont analysé 83 paramètres de CMF chez 56 patients SMD et 40 contrôles (20 contrôles pathologiques, 20 contrôles sains). Un score ≥ 2 a permis de distinguer correctement les SMD des contrôles pathologiques (sensibilité 100%, spécificité 100%). Cependant, l'intérêt d'un tel score est limité : analyser autant de paramètres n'est pas faisable dans les laboratoires hospitaliers non dédiés à la recherche, car bien trop coûteux, chronophage et difficile à standardiser.

Pour que les scores diagnostiques présentent un réel intérêt pour la pratique clinique, il faut qu'ils soient certes le plus sensible et spécifique possible, mais surtout qu'ils soient applicables en routine. Avec seulement 4 paramètres de CMF, le score d'Ogata (41) fait figure de bon compromis. Les anticorps nécessaires sont peu nombreux (CD45, CD34 et CD10) et les paramètres sont simples à analyser : 1) pourcentage de myéloblastes CD34+ par rapport aux cellules nucléées totales 2) pourcentage de progéniteurs B CD34+ par rapport aux cellules CD34+ 3) rapport de la moyenne de fluorescence (MFI) du CD45 des lymphocytes sur celle des myéloblastes CD34+ 4) rapport du pic SSC des granuleux

CD10- sur celui des lymphocytes. Un point était attribué pour chaque condition anormale suivante : 1) myéloblastes CD34+ $\geq 2,4\%$ 2) progéniteurs B CD34+ $\leq 5\%$ 3) rapport de la MFI du CD45 des lymphocytes sur celle des myéloblastes CD34+ ≤ 4 ou $\geq 7,8$ 4) rapport du pic SSC des granuleux CD10- sur celui des lymphocytes ≤ 6 . Pour les deux cohortes étudiées, les sensibilités diagnostiques étaient de 65% et 89% et les spécificités de 98% et 90% pour un score ≥ 2 . La simplicité de ce test associé à ses relativement bonnes performances font du score d'Ogata le score le plus utilisé dans les bilans de SMD. Son utilisation en tant que mini-panel de dépistage a d'ailleurs été recommandée par l'IMDSFlow (39).

Certains auteurs ont apporté des modifications au score d'Ogata « original ». L'ELN (European Leukemia Net) propose une version simplifiée, dans laquelle seuls deux anticorps monoclonaux sont utilisés (CD 45 et CD34, pas de CD10) (42). Les 4 paramètres analysés sont les mêmes que ceux de l'Ogata original à quelques différences près : 1) le rapport du pic SSC inclut l'ensemble des granuleux (et non les granuleux CD10-) 2) les valeurs seuil d'attribution des points sont modifiées pour les myéloblastes CD34+ (seuil abaissée de 2,4% à 2%) et pour le rapport de la MFI du CD45 des lymphocytes sur celle des myéloblastes CD34+ (seuil supérieur abaissé de 7,8 à 7,5). La sensibilité diagnostique du score de l'Ogata « ELN » est de 70% et la spécificité de 93%. Par la suite, un score d'Ogata « étendu » a été évalué par Bardet et al. (43). Ce score nécessite l'emploi de 3 anticorps supplémentaires, à savoir le CD5, CD7 et CD56. En plus des paramètres de l'Ogata ELN, deux points supplémentaires ont été ajoutés si : 1) présence anormale de CD5 ou CD7 sur les progéniteurs myéloïdes 2) présence du CD56 sur plus de 30% des monocytes. La sensibilité et la spécificité du score d'Ogata étendu ont été de 67% et 87% respectivement.

De manière très différente, Mathis et al. se sont focalisés sur la dysplasie érythroblastique (44). Les 3 paramètres combinés pour élaborer le RED-score ont été les suivants : 1) CV du CD71 des érythroblastes 2) CV du CD36 des érythroblastes 3) hémoglobine. Des résultats de CV élevés reflètent une hétérogénéité de la population érythroblastique, suggérant la coexistence d'une érythropoïèse normale et pathologique. Pour un score ≥ 3 , la sensibilité diagnostique était de 77,5% et la spécificité de 90%. Il a été démontré que le RED-score avait aussi un rôle pronostique concernant le taux de réponse érythroïde. Le taux d'amélioration hématologique érythroïde était de 39% pour les patients ayant un score > 4 versus 75% chez les patients ayant un score ≤ 4 (45).

Année	Référence	SMD/CP/CS	Sous populations analysées	Paramètres	Spécificité (%)	Sensibilité (%)
2001	Stetler-Stevenson et al. (46)	45/25/4	PM, CG, CM, érythroblastes et mégacaryocytes	>15	100	88
2005	Cherian et al. (47) ‡	26/20/16	Polynucléaires neutrophiles	5	90	73
2006	Ogata et al. (37)	27/76/14	PM et PL	13	100	59
2009	Ogata et al. (41) †	134/106/0	PM, PL et CG	4	92-98	44-71
2010	Matarraz et al. (40)	56/20/20	PM, CG, CM et érythroblastes	>15	100	100
2010	Kern et al. (38)	459/266/11	PM, PL, CG, CM et érythroblastes	>15	95	70
2011	Della Porta et al. (42) †	416/380/0	PM, PL et CG	4	93	70
2011	Chu et al. (48)	56/27/0	PM, CG et CM	>15	100	75
2013	Mathis et al. (44)	89/21/46	Erythroblastes	2	90	77,5
2015	Bardet et al. (43) †	183/111/0	PM, PL et CG	7	87	67
2018	Ogata et al. (49)	65/92/0	PM, PL et CG	5	95	50

- Score Ogata original
- Score Ogata ELN
- Score Ogata étendu
- RED-score

† étude multicentrique ‡ étude réalisée sur prélèvement sanguin CP : contrôles pathologiques CS : contrôles sains PM: progéniteurs myéloïdes PL : progéniteurs lymphoïdes CG : compartiment granuleux CM : compartiment monocytaire ELN : European Leukemia Net

Tableau IX : Principaux scores CMF évaluant la myélodysplasie

2.3.3 Scores diagnostiques sur sang périphérique

S'il existe une multitude de scores CMF médullaires, les scores sur sang périphérique sont rares. La raison qui l'explique est assez simple : dans le sang, le champ de vision est bien plus restreint puisque seules les cellules matures circulent, peut-être les moins pathologiques puisque les cellules dysplasiques ont été éliminées par apoptose. Élaborer un score en se basant uniquement sur les caractéristiques des cellules matures semble moins évident. Quelques équipes ont pourtant relevé le défi et proposé des scores sanguins basés sur l'analyse des PN. Par exemple, Cherian et al. (50) ont imaginé un score diagnostique de SMD dont les paramètres étaient le SSC, l'expression du CD66, du CD11a, du CD10 et du CD116 sur les PN sanguins. Pour un score > 3, la sensibilité était de 73% et la spécificité 90%.

Plus récemment, Boutault et al. (51) ont développé un score à partir d'un analyseur d'hématologie, le XN-10TM (Sysmex[®] Corporation, Kobe, Japon), un automate dont le fonctionnement repose sur de la CMF. Les auteurs se sont intéressés à un nouveau paramètre disponible sur les automates de cette gamme, le Ne-WX. Il est calculé par une formule simple (Figure 10) et reflète la dispersion de la granulosité des PN intra-individuel. Le Ne-WX a été analysé chez 109 patients SMD et 399 patients cytopéniques non SMD dans une étude prospective. Il s'est avéré que le Ne-WX était significativement plus élevé chez les patients SMD que chez les patients cytopéniques non SMD. Pour une valeur supérieure à 352, la sensibilité diagnostique était de 71% et la spécificité de 86%. En combinant le Ne-WX à deux paramètres supplémentaires (volume globulaire moyen des globules rouges et valeur absolue des PN), il a été possible d'améliorer la sensibilité et la spécificité à 86% et 88% pour un score supérieur à 0,20.

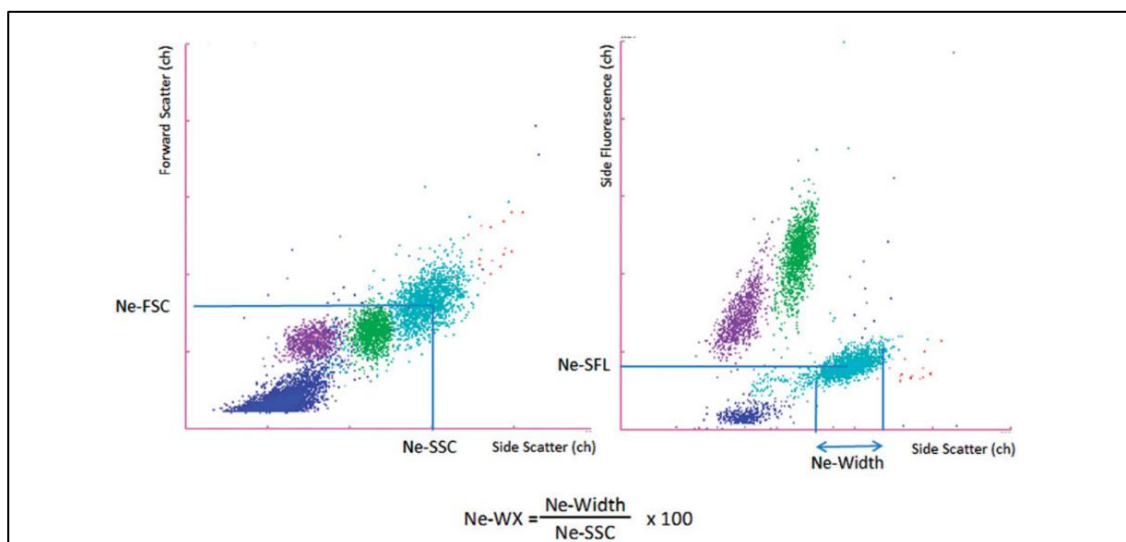


Figure 10 : Illustration du calcul du Ne-WX (52)

Ne-WX : dispersion des polynucléaires neutrophiles ; Ne-FSC : médiane FSC des polynucléaires neutrophiles ; Ne-SSC : médiane SSC des polynucléaires neutrophiles ; Ne-SFL : médiane de fluorescence latérale des polynucléaires neutrophiles ; Ne-Width : largeur du nuage des polynucléaires neutrophiles

De manière plus spécifique, pour le diagnostic des LMMC, un test sanguin basé sur l'analyse des monocytes a démontré d'excellentes performances. Une fraction de monocytes CD14+/CD16- (nommée MO1) supérieure à 94% des monocytes totaux est associée à une sensibilité de 90,6% et une spécificité de 95,1% (53).

2.3.4 Utilité des scores diagnostiques en clinique

A ce jour, aucun score de CMF ne fait partie des critères diagnostiques de SMD. L'un d'entre eux est néanmoins très souvent demandé et pris en compte pour établir le diagnostic : le score d'Ogata. Plus le score est élevé, plus la probabilité qu'il s'agisse d'un SMD est élevée. Néanmoins la spécificité et surtout la sensibilité sont imparfaites : le score peut être à l'origine de faux positifs et de faux négatifs. Les résultats sont donc toujours à interpréter avec les résultats de cytologie et cytogénétique, qui restent la méthode de référence.

3 Présentation d'un test diagnostique d'exclusion des SMD sanguin

3.1 Préambule

L'objectif de ce chapitre est de présenter au lecteur le test diagnostique qui a été utilisé pour mon travail de thèse. Il s'agit d'un test dont le protocole a été élaboré conjointement par les laboratoires d'hématologie biologiques des CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Clermont-Ferrand et Saint-Etienne et le laboratoire d'immunologie du CHU de Grenoble. Les performances du test pour l'exclusion du diagnostic de SMD ont été détaillées dans un article paru en 2019 dans la revue *Haematologica* (54)

3.2 Intérêt d'un test diagnostique d'exclusion sanguin

Sur l'ensemble des patients cytopéniques chez lesquels un myélogramme est réalisé pour suspicion de SMD, le diagnostic n'est retenu que dans environ 20% des cas (55). Du fait de cette faible prévalence, de nombreux patients âgés sont non nécessairement exposés aux risques et aux inconforts du myélogramme. En effet, le prélèvement de moelle est un geste anxiogène et douloureux (56) qui peut être à l'origine d'effets indésirables rares mais graves (hémorragies, infections et exceptionnellement décès du patient) (57).

Quelques équipes de recherche ont élaboré des tests diagnostiques de SMD à partir de sang périphérique, comme déjà décrit précédemment (47) (51). Pour la plupart d'entre eux, la dégranulation des PN était une caractéristique qui contribuait au diagnostic. Il s'agit en effet d'un aspect cytologique classiquement décrit dans les SMD, sur les PN médullaires et sanguins (58). Le Roux et al. ont analysé la granulosité des PN sanguins via des automates de numération d'hématologie et ont constaté que le NEUT-X (valeur moyenne du SSC) était significativement diminué dans le groupe SMD par rapport au groupe contrôle (59). En étudiant les frottis sanguins

au microscope, ils ont également pu mettre en évidence que le NEUT-X était corrélé à la granulosité cytoplasmique des PN.

Les granulations cytoplasmiques des PN contiennent en grande majorité de la MPO, une enzyme jouant un rôle clé dans la destruction des agents microbiens (60). Il s'agit d'une enzyme synthétisée abondamment par les promyélocytes et stockée ensuite dans le cytoplasme des PN au sein des granulations primaires. En présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, elle catalyse la formation de l'acide hypochloreux HOCl, une espèce réactive de l'oxygène extrêmement pro-oxydante. La détection de la MPO peut être faite sur le myélogramme par cytochimie enzymatique. En utilisant cette technique, sur l'ensemble des patients SMD, environ 25% des cas présentent un déficit en MPO (58). Elle présente plusieurs inconvénients, parmi lesquels on peut citer une sensibilité modérée, une variabilité inter-opérateur non négligeable et un risque cancérigène lié au réactif (61). Il existe aussi une technique de détection cytochimique à partir de sang périphérique. Les analyseurs d'hématologie ADVIA™ (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) utilisent la cytochimie de la peroxydase pour effectuer les formules leucocytaires. Rocco et al. ont évalué les performances de 5 alarmes (« MDS flag ») générées par ADVIA™ pour le dépistage de SMD : la sensibilité de cette méthode a été de 83% (62). Enfin, la MPO peut également être détectée par CMF par des anticorps anti-MPO. Dans les travaux menés par Vikentiou et al., le pourcentage de PN 16+/MPO+ médullaires était plus faible chez les patients SMD que chez les patients contrôles (63). Cependant, aucune étude de CMF n'a étudié l'expression de la MPO des PN sanguins pour le diagnostic de SMD.

Le test qui a été développé est basé sur l'analyse de l'expression de la MPO des PN sanguins par CMF. Il est caractérisé par deux originalités : 1) il s'agit d'un test qui est réalisé à partir de sang périphérique 2) les résultats permettent l'exclusion du diagnostic de SMD.

3.3 Étude cas-témoin

Dans un premier temps, une étude cas-témoin rétrospective de 44 patients SMD et 44 patients contrôles a été réalisée. L'expression de la MPO par les PN du sang périphérique a été mesurée selon 3 paramètres : la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), la médiane d'intensité de fluorescence et le CVR. Comparativement aux cas contrôles, les cas SMD présentaient une moyenne et une médiane de fluorescence de la MPO des PN comparables alors que le CVR était significativement plus élevé (Figure 11). Autrement dit, les PN des patients SMD exprimaient la MPO de manière plus hétérogène que les PN des patients contrôles. Les valeurs de CVR étaient hautes pour tous les SMD quelle que soit la catégorie OMS. L'aire sous la courbe ROC pour le CVR (0,94 ; 95%CI : 0,86-0,97) était supérieure à celle de la moyenne et la médiane. Une valeur de CVR inférieure à 30% permettait d'exclure le diagnostic de SMD avec une sensibilité de 98% (54).

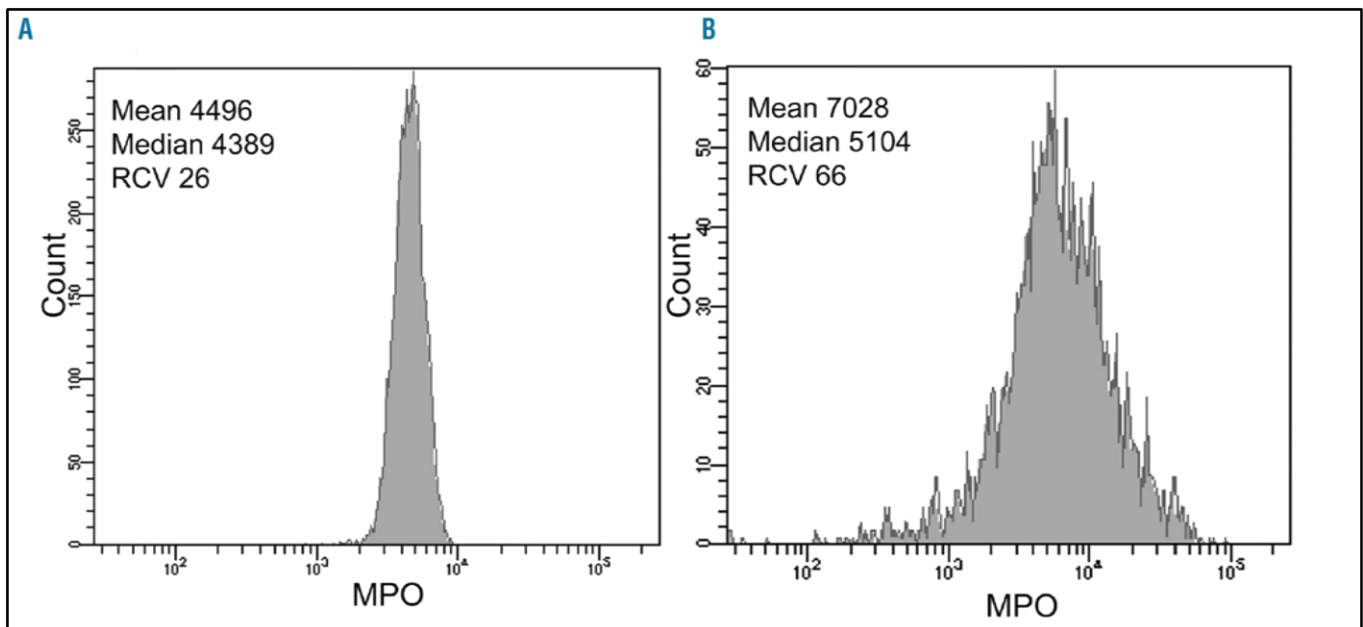


Figure 11 : Histogrammes monoparamétriques de l'expression de la MPO par les PN dans le sang périphérique (54)
Les valeurs sont en intensité de fluorescence pour la moyenne et la médiane, en % pour le coefficient de variation robuste (RCV). A : cas témoin. B : cas syndrome myélodysplasique

3.4 Études de validation

Dans un deuxième temps, une série de 68 patients consécutifs suspects de SMD (inclus par les centres hospitaliers universitaires de Grenoble et Clermont-Ferrand entre 2015 et 2016) a été analysée. Le diagnostic de référence était basé sur les résultats du myélogramme comme préconisé par les recommandations de l'OMS (20). Une valeur de CVR inférieure à 30% permettait d'exclure le diagnostic de SMD chez 29% des patients avec une sensibilité de 100% (54).

En 2018, une cohorte de 55 patients suspects de SMD inclus par le centre hospitalier de Grenoble a conforté ces résultats : une valeur de CVR inférieure à 30% permettait d'exclure le diagnostic de SMD chez 35% des patients avec une sensibilité de 100% (64) (article disponible en Annexe).

Au total, le test sanguin a été réalisé chez 123 patients suspects de SMD. Sur l'ensemble des patients, 38 ont été diagnostiqué d'un SMD avec la méthode de référence. Une valeur de CVR inférieure à 30% a exclu le diagnostic de SMD chez 32% des patients avec une sensibilité de 100%. L'utilisation de ce test sanguin en routine pourrait donc éviter le prélèvement de moelle dans près d'un tiers des cas.

3.5 Protocole du test

Les échantillons sanguins ont été marqués avec le panel d'anticorps suivants : CD64 FITC, CD15-PerCPCy55, CD11b-APC, CD16-APCH7, CD14-V450, CD45-V500. De manière simplifiée, le protocole d'immunomarquage se déroule de la manière suivante : 1) Marquage membranaire : incubation des anticorps avec le sang périphérique 2) Marquage intracellulaire : fixation et perméabilisation membranaire avec le kit BD Intrasure (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) et ajout de l'anticorps anti-MPO (MPO-PE).

Pour chaque tube, un minimum de 10 000 PN a été acquis sur FACSCanto-II™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) à vitesse médium et analysé avec le logiciel FACSDiva.

Pour identifier les PN, la maquette utilise la stratégie de fenêtrage détaillée dans la Figure 12.

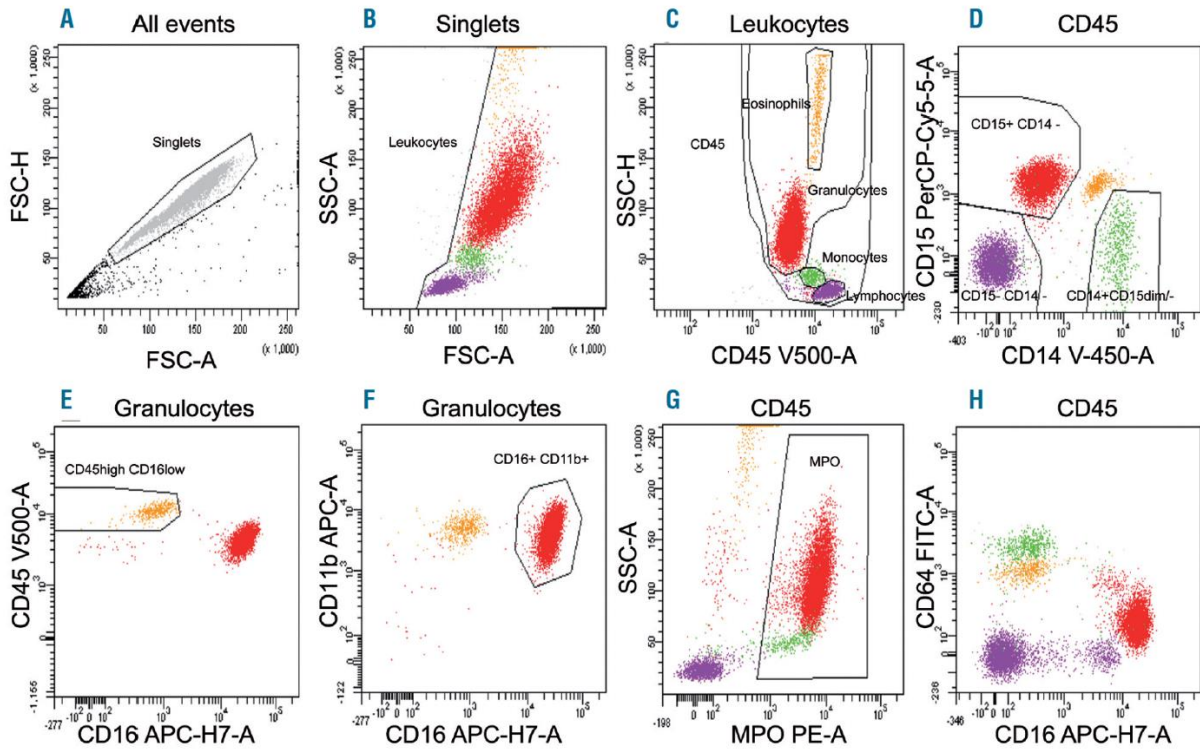


Figure 12 : Stratégie de fenêtrage pour la quantification de l'expression de la MPO des PN dans le sang périphérique (54)

Les cellules CD45+ viables ont d'abord été individualisées en croisant la fenêtre singlet (A), les leucocytes FSC-SSC (B) et la fenêtre CD45+ (C). Trois populations incluant les granuleux (CD15+ CD14-), les monocytes (CD14+ CD15^{low/-}) et les lymphocytes (CD15- CD14-) ont été identifiées (D). Les éosinophiles ont été individualisés par CD45^{high} CD16^{low} (E). Les neutrophiles matures ont été individualisés par intersection Booléenne : [CD15+ CD14-] (D) AND NOT [CD45^{high} CD16^{low}] (E) AND NOT [CD14+ CD15^{low/-}] (D) AND [CD16+ CD11b+] (F). Le coefficient de variation robuste (CVR) de la MPO a été évalué sur la population résultante (G). L'histogramme CD16 CD64 (H) a été utilisé pour vérifier la sélection des neutrophiles matures, qui apparaissent CD16^{high} CD64^{low}. Les lymphocytes sont identifiés en violet, les monocytes en vert, les éosinophiles en orange, les neutrophiles matures exprimant la MPO en rouge. CD : cluster of differentiation ; FSC-H: forward scatter height; FSC-A: forward scatter area; SSC-H: side scatter height

3.6 Perspectives

3.6.1 Recherche clinique

Dans le but de valider l'efficacité de ce test, une étude multicentrique va être menée dans plusieurs établissements hospitaliers français (PHRCIR : MPO-MDS-Valid, PHRC inter-régional PHRCI-19-064, FINESS 380780080). Ce projet a été retenu par le programme hospitalier de recherche clinique et débutera au cours de l'année 2021. Pour faciliter la mise en place du test dans les différents centres, le protocole nécessite d'être standardisé et simplifié.

Afin de répondre à cette demande, deux pistes ont été envisagées :

1. Utilisation d'un tube unique prêt à l'emploi contenant des anticorps lyophilisés

Son évaluation est en cours (MPO-MDS-develop, IDRCB 2019-A03341-56 ; objectif d'inclusion n=103) et sera l'objet de mon mémoire.

2. Utilisation de kits de perméabilisation alternatifs

Cette évaluation préliminaire est l'objet de ma thèse.

3.6.2 Recherche fondamentale

De manière surprenante, les PN des patients SMD avaient en moyenne une expression de la MPO (estimée par la moyenne des MFI) semblable aux patients non SMD. En revanche, l'indice de distribution intra-individuel de la MPO des PN était bien plus hétérogène au sein de ce groupe : les PN d'un même sujet avaient des quantités de MPO très variables d'une cellule à l'autre, comme le démontraient les CVR élevés.

Cette observation pourrait être expliquée par la coexistence de PN normaux et dysplasiques et par la physiopathologie de la maladie. Pour rappel, les SMD sont caractérisés par une hématoïèse clonale. La survenue de mutations sur des gènes impliqués dans la synthèse de la MPO ou sa régulation pourrait avoir un impact sur la quantité de MPO cytoplasmique des PN du clone. Ainsi, un CVR de la MPO des PN augmenté pourrait être le reflet de la présence de plusieurs clones (Figure 13). Afin de le démontrer, il serait intéressant d'étudier la corrélation entre le CVR de la MPO et la présence de mutations génétiques détectées par NGS.

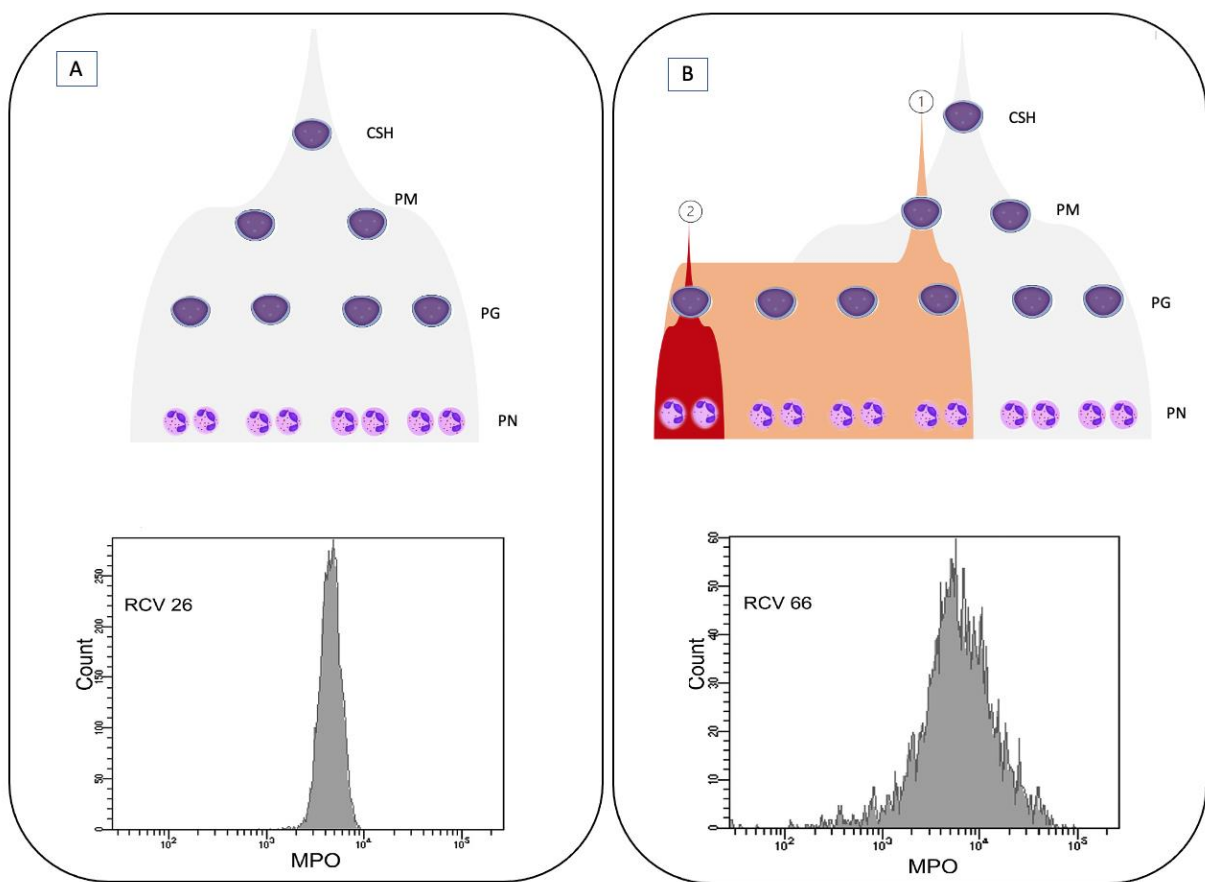


Figure 13 : Expression hétérogène de la MPO : reflet d'une hématoïèse clonale ?

A : Hématoïèse physiologique. L'expression de la MPO par les PN est homogène (CVR faible). B : Hématoïèse clonale. Une première mutation induit une expansion clonale (1). Au sein du clone, une seconde mutation induit un caractère pathogène (2) L'expression de la MPO par les PN clonaux et non clonaux est hétérogène (CVR élevé). CSH : cellule souche hématoïétique ; PM : progéniteur myéloïde ; PG : progéniteur granuleux ; PN : polynucléaire neutrophile ; CVR : coefficient de variation robuste

3.7 Conclusion

Le test mis au point a pour objectif d'exclure le diagnostic de SMD sans avoir recours au myélogramme. Le protocole est basé sur la semi-quantification de la MPO des PN du sang périphérique par CMF. Le paramètre discriminant est le CVR de la MPO des PN. Un CVR < 30% écarte le diagnostic de SMD (54) (Figure 14).

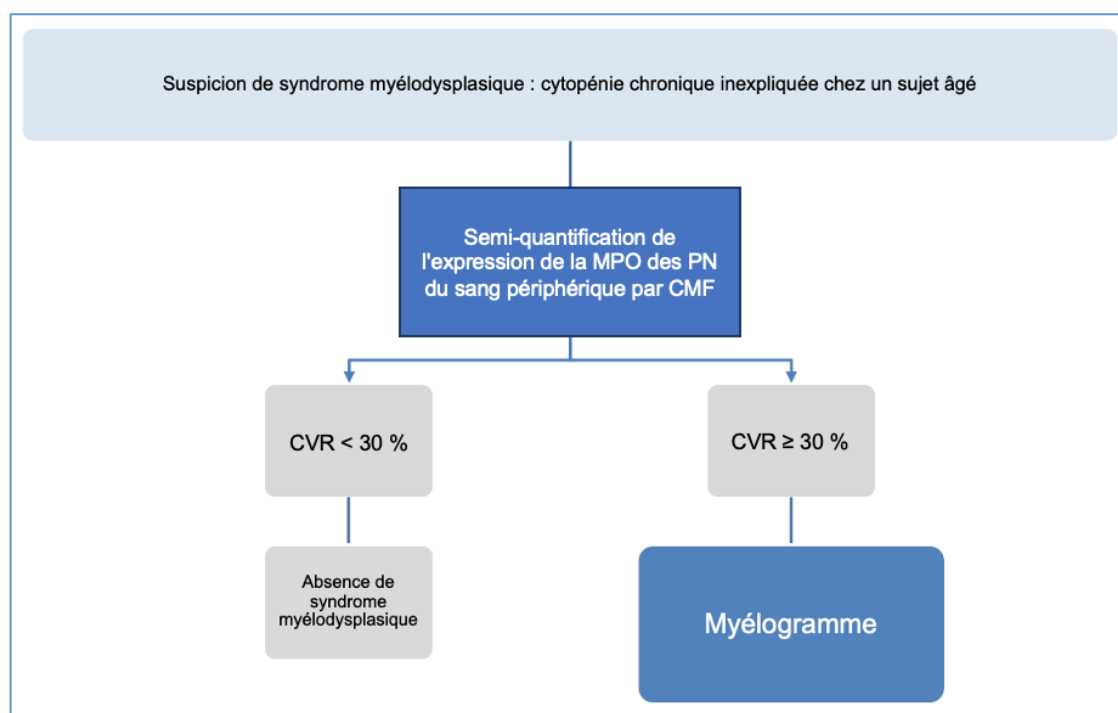


Figure 14 : Intérêt du test dans la stratégie diagnostique des SMD

4 Évaluation de différentes méthodes de perméabilisation membranaire

4.1 Introduction

La quantification de l'expression de la MPO des PN du sang périphérique nécessite une étape de perméabilisation membranaire préalable au marquage intracellulaire. Le choix du protocole de perméabilisation optimal dépend de la nature de la cible antigénique, de sa stabilité et de sa localisation (cytoplasmique ou nucléaire en particulier). Classiquement, la perméabilisation de la bicouche lipidique membranaire se fait en deux temps. Dans un premier temps, une fixation cellulaire est effectuée afin de maintenir la structure membranaire. Le principal fixateur employé est le formaldéhyde. Dans un deuxième temps, un agent perméabilisant est ajouté. Il peut s'agir d'un détergent (saponine) ou d'un solvant organique (méthanol, éthanol, acétone). Cet agent perméabilisant a la capacité de générer des pores suffisamment larges pour permettre le passage des anticorps sans dissoudre complètement la membrane. Pour simplifier le procédé technique, plusieurs kits de perméabilisation contenant les deux réactifs sont proposés sur le marché. Avant leur utilisation, il est recommandé de les tester pour évaluer leur performance vis-à-vis de la cible antigénique (65).

Le groupe Euroflow recommande d'utiliser le kit Fix&Perm™ (An der Grub, Vienna, Austria) pour la détection de la MPO dans les blastes pour le tube d'orientation des leucémies aiguës (66). Kappelmayer et al. ont comparé les performances de détection intracellulaire de la MPO de 5 kits commerciaux (Cytofix/Cytoperm™, Fix&Perm™, Intraprep™, Intrastain™, et Permeafix™) sur des blastes de leucémie aiguë. Il a été démontré que les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de la MPO n'étaient pas significativement différentes entre les kits (67). A notre connaissance, aucune étude n'a comparé les performances de ces kits pour la détection de MPO dans les PN. Dans le protocole de notre test, le kit de perméabilisation que nous utilisons pour la quantification

de l'expression de la MPO est le kit BD IntraSure™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cependant, les laboratoires peuvent utiliser selon leurs habitudes et préférences d'autres kits de perméabilisation et il est important de s'assurer de la possibilité de les utiliser pour notre test.

L'objectif de ce travail a été de comparer les performances de quantification de l'expression de la MPO obtenues avec le kit Intrastain (Dako, Denmark), qui est utilisé en routine dans notre laboratoire pour le tube d'orientation des leucémies aiguës, et le réactif BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), fourni par notre partenaire commercial.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Sélection des échantillons

Un total de 20 échantillons de sang périphérique incluant 10 échantillons issus de sujets non SMD et 10 échantillons de sujets SMD ont été analysés au laboratoire du CHU de Grenoble. Les sujets non SMD étaient des patients suspects de SMD présentant au moins une cytopénie périphérique. Les cytopénies étaient définies par les seuils suivants : concentration en hémoglobine < 130 g/L chez les hommes ou < 120g/L chez les femmes, concentration en plaquettes < 150 G/L et concentration en polynucléaire neutrophiles < 1,8 G/L (19). Les sujets SMD étaient des patients en abstention thérapeutique ou recevant des traitements symptomatiques, les traitement par allogreffe de CSH ou par médicaments spécifiques ont été des critères d'exclusion. Tous les patients inclus ont eu un myélogramme de prélevé. Le diagnostic de référence non SMD ou SMD était établi selon les recommandations de l'OMS (20). Pour les patients non SMD, le diagnostic différentiel retenu a été établi selon les données du dossier clinique.

4.2.2 Test diagnostique index

Pour l'ensemble des patients (n=20), l'analyse a été faite à partir de sang périphérique prélevé le jour même sur tube anticoagulé à l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique acid). Nous avons utilisé le matériel restant après la numération de routine réalisée par les analyseurs d'hématologie Sysmex XN-10 (Kobe, Japan).

Chaque échantillon a été perméabilisé en parallèle par 3 kits de perméabilisation : le kit de référence IntraSure™ (BD Bioscience), Intrastain™ (Dako) et BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience). Les kits ont été utilisés en suivant strictement les recommandations des fabricants (Figure 15). Selon les consignes des kits IntraSure™ et BD FACS™ Permeabilizing Solution 2, une lyse a été réalisée par l'intermédiaire de BD FACS™ Lysing Solution (BD Bioscience). Le contenu de chaque réactif est détaillé dans le Tableau X. Le panel d'anticorps utilisé pour le marquage membranaire était composé de CD15-PerCP-Cy5.5 (clone HI98), CD11b-APC (clone D12), CD16-APC-H7 (clone 3G8), CD14-V450 (clone MfP9) et CD45-V500 (clone HI30). L'anticorps anti-CD64 n'a pas été inclus dans le panel car il ne présente pas d'utilité dans la stratégie de fenêtrage (64). Pour le marquage intracellulaire, des anticorps MPO-PE (clone 5B8) ont été ajoutés pendant l'étape de perméabilisation.

Réactifs	Composition
BD Intrasure	Solution A : 1,0% formaldéhyde, 0,35% méthanol Solution B : agent perméabilisant
Intrastain	Réactif A : 5 à 10% formaldéhyde Réactif B : agent perméabilisant
BD FACS Permeabilizing Solution 2	< 15% formaldéhyde, < 50% diéthylène glycol, agent perméabilisant
BD FACS Lysing Solution	9,99% formaldéhyde, 30% diéthylène glycol, 3,51% méthanol

Tableau X : Composition des réactifs

L'acquisition a été faite sur un cytomètre BD FACSCanto-II™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) à vitesse médium et l'analyse sur le logiciel BD FACSDiva. Pour chaque tube, un minimum de 10.000 PN a été acquis. L'expression de la MPO des PN au sein d'un individu était objectivée par le coefficient de variation robuste (CVR) exprimé en pourcentage.

4.2.3 Standard de référence

Le diagnostic de référence de SMD était établi selon les recommandations actuelles (20). La morphologie cellulaire et le pourcentage de blastes dans la moelle ont été évalués par des biologistes spécialisés en cytologie hématologique. La catégorisation du sous type de SMD était basé sur le nombre de lignées dysplasiques, le pourcentage de blastes dans la moelle et le sang, le pourcentage de sidéroblastes en couronne et le caryotype. Pour la LMMC, le critère diagnostique était la présence d'une monocytose sanguine $\geq 1 \times 10^9/L$ persistante représentant plus de 10% des leucocytes de la formule sanguine associée à des signes de dysplasie dans la moelle (20).

4.2.4 Analyse statistique

L'analyse d'accord entre les valeurs du test diagnostique sera réalisée conformément à Bland et Altman (68).

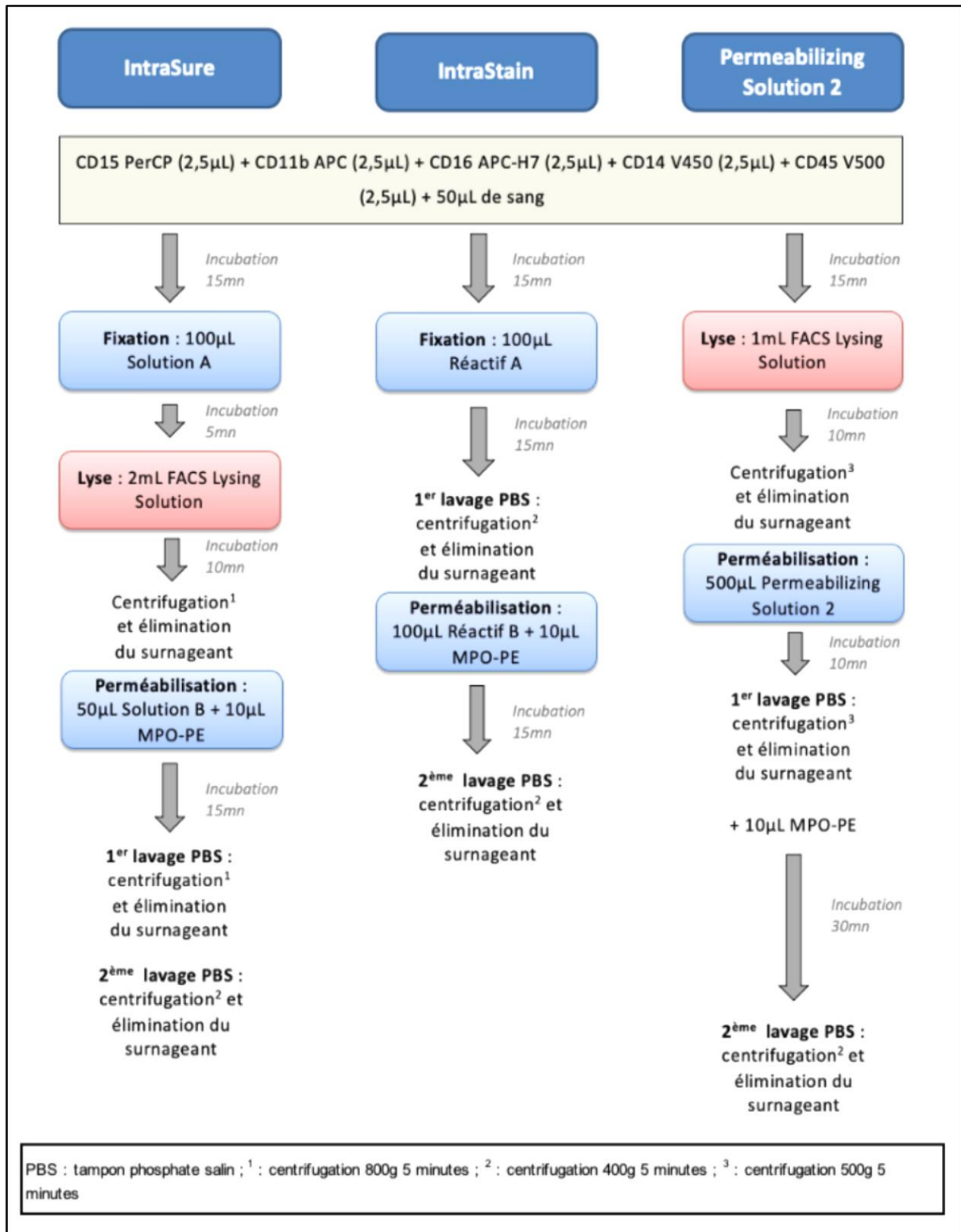


Figure 15 : Protocoles de perméabilisation

4.3 Résultats

La moyenne d'âge des patients inclus était de 71 ans et 50% des patients étaient des femmes. 7 patients provenaient des consultations d'hématologie et 3 du service d'hospitalisation d'hématologie. Le reste des patients provenaient de différents services d'hospitalisation du CHU. Parmi les cas SMD (n=10), la majorité était de type LMMC (n=4) et MDS-MLD (n=3), les autres étaient des MDS-ULD (n=1), MDS-EB-1 (n=1) et MDS-EB-2 (n=1). Le diagnostic différentiel le plus fréquemment retenu chez les cas non SMD était l'anémie inflammatoire (n=3) et l'insuffisance rénale (n=2) (Tableau XI).

Les valeurs du CVR de la MPO des PN obtenues après perméabilisation avec IntraSure, Intrastain et Permeabilizing Solution 2 sont présentés dans le Tableau XII. Conformément aux résultats des précédentes études obtenus avec IntraSure, les valeurs de CVR des patients SMD étaient toutes supérieures à 30% (moyenne de CVR de 38,8%), indépendamment du type de SMD. En comparaison avec la perméabilisation par IntraSure, la valeur moyenne des CVR avec Intrastain était plus élevée (+22,7 points de pourcentage ; +64% en changement relatif). La perméabilisation par Permeabilizing Solution 2 permettait d'obtenir une valeur moyenne des CVR comparable à celle d'IntraSure (-0,3 points de pourcentage ; -1% en changement relatif) avec des changements relatifs maximales allant de -17% à +16%.

Patients	Sexe	Age	Cytopénies	Diagnostic	Diagnostic différentiel
1	H	68	Anémie, thrombopénie	Non SMD	Anémie inflammatoire
2	H	80	Anémie	Non SMD	Insuffisance rénale
3	H	54	Anémie	Non SMD	Déficit en pyruvate kinase
4	F	84	Neutropénie	Non SMD	Neutropénie auto-immune
5	F	88	Anémie	Non SMD	Anémie inflammatoire
6	F	32	Neutropénie	Non SMD	T-LGLL
7	H	78	Anémie, thrombopénie	Non SMD	Insuffisance rénale
8	F	59	Anémie, thrombopénie, neutropénie	Non SMD	Aplasie médullaire
9	H	71	Anémie	Non SMD	Anémie inflammatoire
10	F	74	Anémie, thrombopénie	Non SMD	Déficit vitamine B9
11	F	62	Anémie, thrombopénie	LMMC	
12	F	75	Anémie	MDS-EB1	
13	H	70	Thrombopénie	LMMC	
14	F	79	Anémie, thrombopénie	MDS-SLD	
15	H	90	Anémie, thrombopénie	LMMC	
16	F	79	Anémie	MDS-MLD	
17	H	63	Anémie, thrombopénie	MDS-MLD	
18	F	76	Anémie, thrombopénie	MDS-EB2	
19	H	78	Anémie, thrombopénie	MDS-MLD	
20	H	60	Anémie	LMMC	

H : Homme ; F : Femme ; LMMC : leucémie myéomonocytaire chronique ; MDS-EB1 : syndrome myélodysplasique avec excès de blaste de type 1 ; MDS-EB2 : syndrome myélodysplasique avec excès de blaste de type 2 ; MDS-SLD : syndrome myélodysplasique avec dysplasie unilignée ; MDS-MLD : syndrome myélodysplasique avec dysplasie multilignée ; T-LGLL : leucémie à grands lymphocytes granuleux T

Tableau XI : Caractéristiques des patients

	IntraSure	Intrastain		Permeabilizing Solution 2	
	CVR (%)	CVR (%)	*	CVR (%)	*
<i>Patients non SMD</i>					
1	29,6	45,9	(+55)	29,1	(-2)
2	29,7	43,4	(+46)	28,2	(-5)
3	34,4	38,7	(+13)	36,0	(+5)
4	28,9	43,3	(+50)	28,5	(-1)
5	32,9	45,2	(+37)	31,8	(-3)
6	27,4	108,1	(+295)	27,6	(+1)
7	43,2	48,6	(+13)	35,9	(-17)
8	30,5	46,4	(+52)	31,3	(+3)
9	25,7	115,7	(+350)	26,4	(+3)
10	34,6	40,9	(+18)	34,0	(-2)
Moyenne	31,7	57,6	(+82)	30,9	(-3)
<i>Patients SMD</i>					
11	48,9	55,1	(+13)	49,6	(+1)
12	37,1	47,5	(+28)	36,8	(-1)
13	40,1	107,6	(+168)	38,0	(-5)
14	32,3	65,4	(+102)	37,6	(+16)
15	36,0	41,3	(+15)	30,4	(-16)
16	38,8	49,5	(+28)	40,3	(+4)
17	40,9	50,9	(+24)	44,9	(+10)
18	31,7	71,2	(+125)	31,6	(0)
19	44,3	50,7	(+14)	39,5	(-11)
20	37,7	41,6	(+10)	40,3	(+7)
Moyenne	38,8	58,1	(+50)	38,9	(0)
<i>Totalité des patients</i>					
Moyenne	35,2	57,9	(+64)	34,9	(-1)

* changement relatif par rapport à la méthode de référence (IntraSure) exprimé en pourcentage ; CVR : coefficient de variation robuste

Tableau XII : CVR de l'expression de la MPO des PN selon différentes méthodes de perméabilisation

La Figure 16 illustre les résultats du Tableau XII. Avec le protocole de perméabilisation IntraStain, pour tous les patients (non SMD et SMD) l'expression de la MPO dans les PN est plus hétérogène qu'avec le protocole IntraSure. En revanche, on obtient un indice de distribution de la MPO superposable entre le protocole de perméabilisation Permeabilizing Solution 2 et le protocole IntraSure, pour les patients SMD et non SMD.

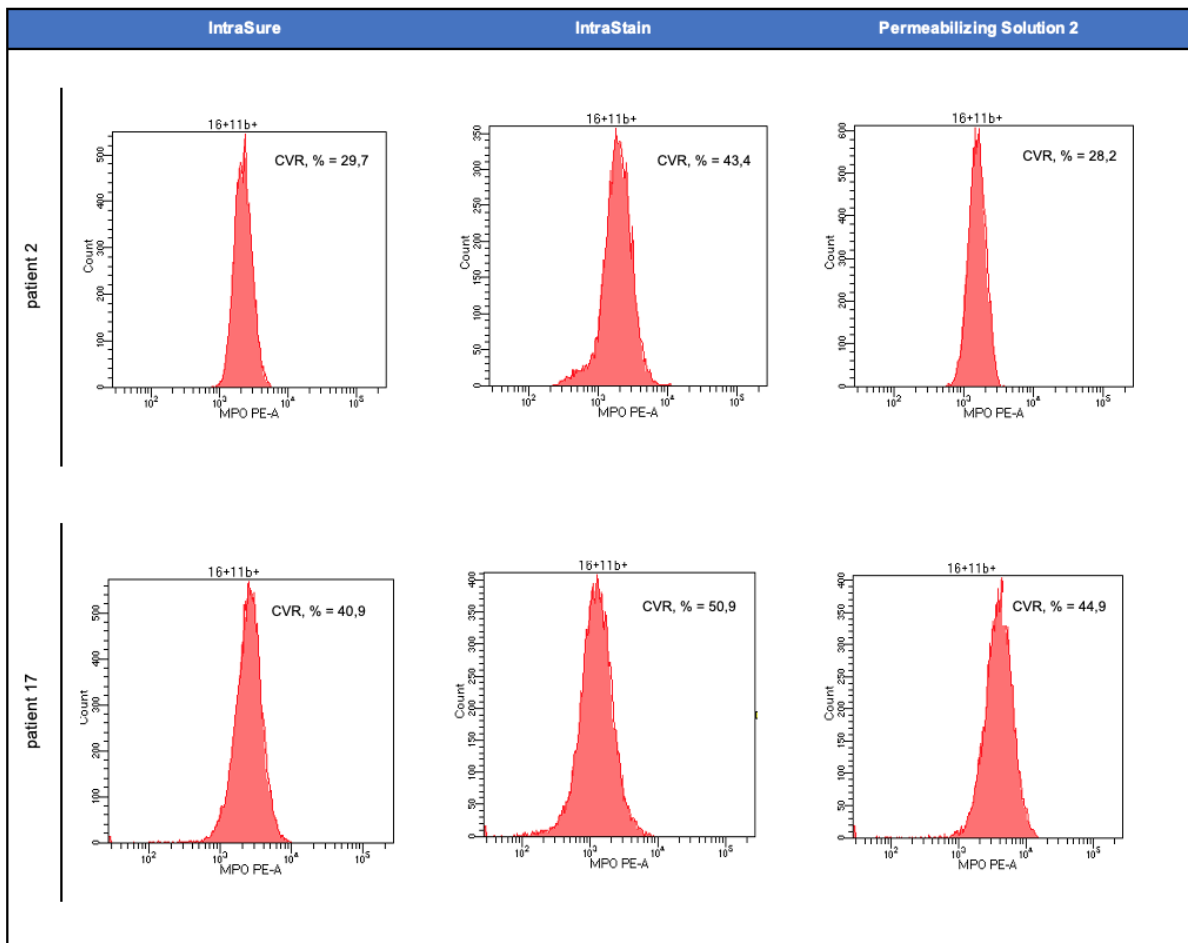


Figure 16 : CVR de la MPO des PN par CMF

Le patient 2 (en haut) est un patient non atteint de syndrome myélodysplasique (SMD) tandis que le patient 17 (en bas) est atteint de SMD. Histogrammes monoparamétriques de l'expression de la MPO par les polynucléaires neutrophiles matures avec le coefficient de variation robuste (CVR) en pourcentage.

La concordance des CVR obtenus avec Intrastain et Permeabilizing Solution 2 par rapport à IntraSure a été appréciée en utilisant la méthode de Bland et Altman (Figure 17). Les CVR du protocole Permeabilizing Solution 2 sont globalement concordants à ceux du protocole de référence (biais = -0,3 points de pourcentage), la différence maximale étant de -7 points de pourcentage. Concernant les CVR du protocole Intrastain, ils sont tous plus élevés que ceux du protocole de référence (biais = +22,6 points de pourcentage).

Finalement, nous nous sommes demandés si la valeur du seuil d'exclusion prédéterminée dans la méthode de référence (CVR < 30%) pouvait être utilisée dans les protocoles de perméabilisation Intrastain et Permeabilizing Solution 2. La Figure 18 permet de visualiser la répartition des valeurs pour chaque protocole de perméabilisation par rapport à la valeur de CVR de 30%. Avec Intrastain, les CVR sont tous supérieurs au seuil de 30%. De plus, les CVR des patients SMD et des patients non SMD étant très hétérogènes, il est difficile d'établir un seuil de distinction. En revanche, l'interprétation des CVR obtenus avec la Permeabilizing Solution 2 est identique à celle de la méthode de référence pour l'ensemble des patients. De manière concordante, 15 patients (10 SMD et 5 non SMD) ont un CVR \geq 30% et 5 patients (tous non SMD) ont un CVR < 30%.

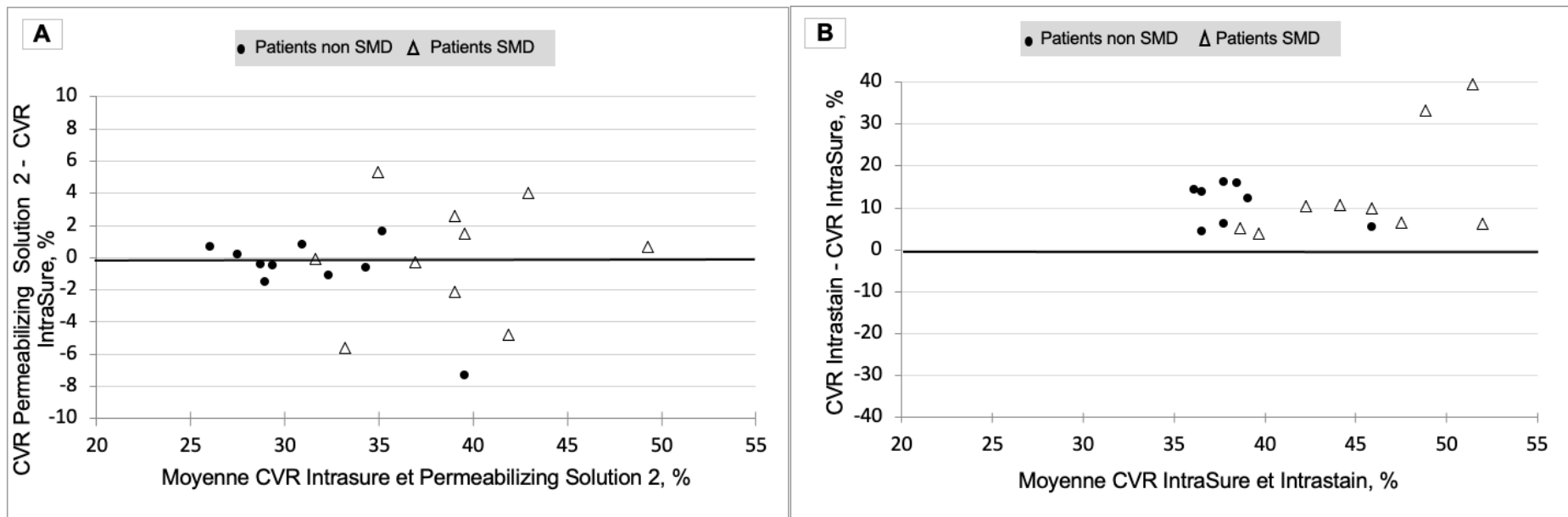


Figure 17 : Comparaison des CVR par méthode de Bland et Altman

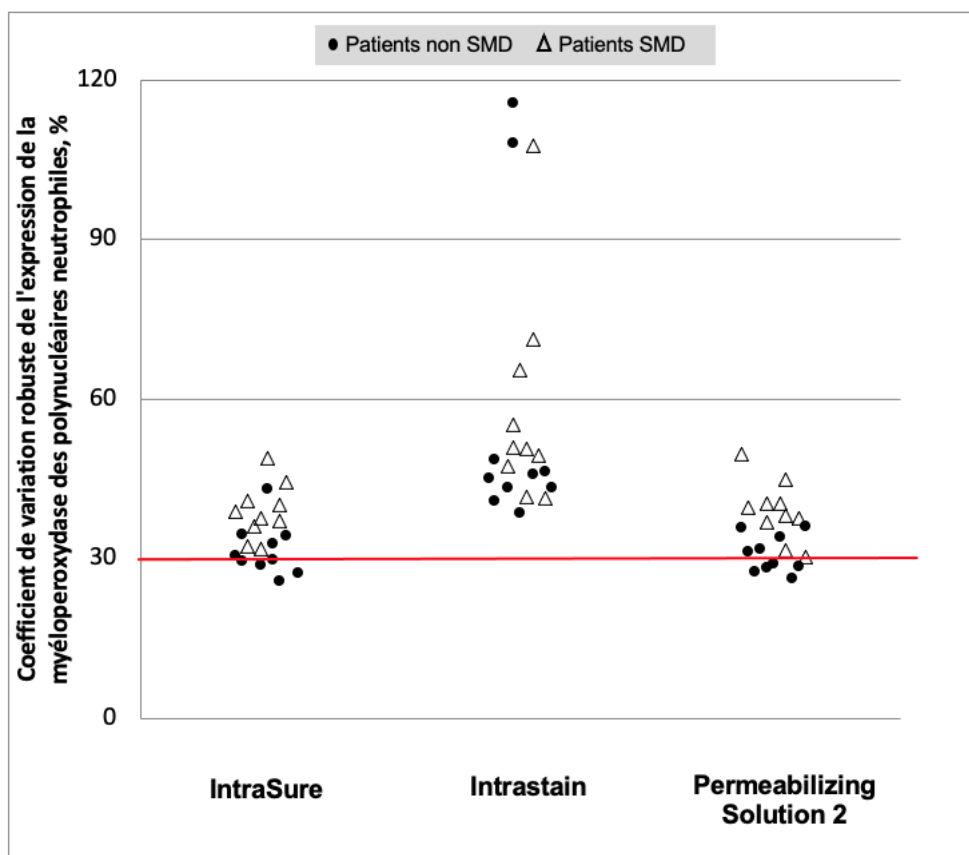


Figure 18 : CVR de l'expression de la MPO des PN et seuil d'exclusion diagnostic
La ligne rouge représente le seuil d'exclusion diagnostic (CVR < 30%).

A titre informatif, nous avons également comparé les MFI de la MPO des PN des 3 protocoles de perméabilisation (Tableau XIII). Conformément aux résultats des précédentes études obtenus avec IntraSure, la MFI de la MPO des patients SMD et des patients non SMD étaient comparables. La valeur moyenne des MFI obtenues avec Intrastain étaient plus faibles par rapport à IntraSure (-791 en intensité de fluorescence, -30% en changement relatif). Concernant le protocole Permeabilizing Solution 2, la valeur moyenne des MFI étaient plus élevées par rapport à IntraSure (+1916 en intensité de fluorescence, +74% en changement relatif).

	IntraSure	Intrastain		Permeabilizing Solution 2	
	MFI	MFI	*	MFI	*
<i>Patients non SMD</i>					
1	1630	811	(-50)	3849	(+136)
2	2065	1968	(-5)	1507	(-27)
3	1537	1539	(0)	1571	(+2)
4	2994	1813	(-39)	4280	(+43)
5	1903	1533	(-19)	3664	(+93)
6	3258	1322	(-59)	6473	(+99)
7	3117	4863	(+56)	5074	(+63)
8	3106	3358	(+8)	6712	(+116)
9	2366	1118	(-53)	5002	(+111)
10	1653	1668	(+1)	5119	(+210)
Moyenne	2363	1999	(-15)	4325	(+83)
<i>Patients SMD</i>					
11	4064	2063	(-49)	4300	(+6)
12	3866	2353	(-39)	1989	(-49)
13	1392	815	(-41)	2939	(+111)
14	2868	2722	(-5)	5030	(+75)
15	3331	1638	(-51)	5815	(+75)
16	1327	1058	(-20)	2679	(+102)
17	2518	1348	(-46)	4022	(+60)
18	3467	988	(-72)	7032	(+103)
19	2704	2141	(-21)	4795	(+77)
20	2872	1102	(-62)	8515	(+196)
Moyenne	2841	1623	(-43)	4712	(+66)
<i>Totalité des patients</i>					
Moyenne	2602	1811	(-30)	4518	(+74)

* changement relatif par rapport à la méthode de référence (IntraSure) exprimé en pourcentage ; MFI : moyenne d'intensité de fluorescence

Tableau XIII : MFI de la MPO des PN selon différentes méthodes de perméabilisation

4.4 Discussion

Dans les études précédemment menées, nous avons utilisé le kit de perméabilisation IntraSure dans notre protocole de semi-quantification de la MPO exprimée par les PN du sang périphérique par CMF (54) (64). Cependant, les laboratoires peuvent utiliser en routine d'autres kits de perméabilisation et il est important de s'assurer de la validité externe de nos résultats.

L'objectif de cette étude a été de tester deux méthodes de perméabilisation différentes, à savoir Intrastain et Permeabilizing Solution 2, afin d'évaluer la concordance du CVR de l'expression de la MPO des PN qui est le paramètre d'intérêt de notre test. Nous avons comparé les CVR obtenus avec les 3 méthodes de perméabilisation pour 10 patients suspects mais non SMD et 10 patients SMD. Ce travail a été entrepris pour répondre à la question d'un critique avant parution de notre dernier article dans la revue *Annals of Hematology* (64).

A notre connaissance, cette étude est la première à avoir comparé des réactifs de perméabilisation en se basant sur le CVR comme critère de jugement. De plus, notre étude est la seule à avoir testé le réactif Permeabilizing Solution 2 pour l'analyse de la MPO dans les PN. Le point fort de ce travail a été de sélectionner des patients SMD et des patients suspects non SMD afin de limiter le biais de sélection.

Avec le protocole Permeabilizing Solution 2, les CVR de l'expression la MPO des PN sont concordants avec ceux obtenus avec le protocole de référence (-0,3 points de pourcentage ; -1% en changement relatif). Par ailleurs, les MFI de la MPO des PN sont plus élevées (+1916 en intensité de fluorescence, +74% en changement relatif).

Ce dernier résultat suggèrent que la saturation des sites antigéniques est plus importante avec le protocole Permeabilizing Solution 2 qu'avec le protocole IntraSure. La première hypothèse est que le réactif perméabilisant de la Permeabilizing Solution 2 perce davantage la membrane cellulaire que le protocole IntraSure, facilitant ainsi le passage des anticorps anti-MPO. Il est également possible que la Permeabilizing Solution 2 ait une performance de perméabilisation supérieure sur notre compartiment cellulaire cible (granulations primaires des PN). En effet, dans une étude comparant les performances de 3 kits de perméabilisation (Cytotfix/Cytoperm, Fix&Perm et Foxp3 Staining buffer set), Papagno et al. suggéraient que la perméabilisation des granules cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ était différente selon le réactif utilisé (69). Il y avait des différences significatives d'expression de la granzyme A, la granzyme B et la perforine selon le kit utilisé. Enfin, une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'augmentation des MFI serait le délai d'incubation prolongé des anticorps anti-MPO après la perméabilisation (30 minutes contre 15 minutes pour le protocole de référence).

Avec le protocole Intrastain, les CVR de l'expression de la MPO des PN sont hétérogènes chez les patients SMD et non SMD et sont plus élevés qu'avec le protocole de référence (+22,7 points de pourcentage ; +64% en changement relatif). Les patients 6, 9 et 13 avaient des CVR particulièrement élevés (108,1%, 115,7% et 107,6%). Pour les deux premiers, l'augmentation des CVR étaient liés à l'absence d'expression de MPO d'une partie des PN. Pour le troisième, on suppose que la perméabilisation a été inefficace en raison d'une lyse minime des globules rouges. Nous avons également observé que les MFI de la MPO étaient inférieures à celles

obtenues avec le protocole de référence (-791 en intensité de fluorescence, -30% en changement relatif). En accord avec les résultats de Kappelmayer et al. (67), nous avons aussi constaté que le SSC des PN était particulièrement bien conservé. Compte tenu de l'ensemble des résultats, la première hypothèse que nous pouvons formuler est que le protocole Intrastain perfore moins la membrane cellulaire que le protocole IntraSure, expliquant ainsi un accès intracellulaire restreint pour les anticorps anti-MPO (MFI diminuée) et au contraire une meilleure conservation de la structure intracellulaire (SSC conservé). Une autre hypothèse pourrait être que l'action des réactifs Intrastain et IntraSure soit différente sur la membrane des granulations primaires des PN. En conclusion, les résultats obtenus avec Intrastain suggèrent que la perméabilisation des PN est hétérogène et non optimale au sein de l'échantillon. Du fait de ces performances, le kit n'est pas adapté à notre utilisation.

Le réactif BD FACS Lysing Solution, utilisé dans les protocoles IntraSure et Permeabilizing Solution 2 et absent du protocole Intrastain, semble également jouer un rôle important sur la perméabilisation. Il s'agit d'un réactif de lyse des globules rouges communément employé en routine. En plus de lyser les érythrocytes, BD FACS Lysing Solution a une action perméabilisante sur la membrane leucocytaire. Son utilisation est d'ailleurs recommandée par EuroFlow pour le marquage intracellulaire de la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) dans le panel LAM/SMD (66). Dans une étude menée par Lanza et al., la BD FACS Lysing Solution permettait d'obtenir un marquage intracellulaire de la MPO intense et homogène sur l'ensemble des PN (après perméabilisation par BD FACS Lysing Solution, sur la totalité des PN, 97% des étaient positifs en MPO) (70). Par

conséquent, l'utilisation combinée de BD FACS Lysing Solution et d'un agent perméabilisant pourrait améliorer l'efficacité de perméabilisation.

Nous avons pu démontrer que pour les 20 échantillons analysés, les CVR de la MPO obtenus par Permeabilizing Solution 2 étaient concordants à ceux obtenus avec IntraSure. Le principal avantage de Permeabilizing Solution 2 est sa facilité d'emploi : un seul réactif est nécessaire pour la fixation et la perméabilisation au lieu de deux réactifs distincts habituellement. En revanche, le protocole est plus long et demande un temps technique plus important par rapport à IntraSure (1h40 pour Permeabilizing Solution 2 contre 1h20 pour IntraSure). Pour réduire ce temps technique, nous nous sommes demandés s'il était possible de diminuer le délai d'incubation des anticorps anti-MPO à 15 minutes au lieu des 30 minutes préconisées par le fabricant. Nous avons comparés les CVR et les MFI de la MPO obtenus après 15 minutes et 30 minutes d'incubation pour un échantillon (patient 20). Les MFI de la MPO après 15mn d'incubation étaient diminuées par rapport au protocole avec les 30 minutes d'incubation (4301 en unité de fluorescence à 15 minutes contre 8515 à 30 minutes). En revanche, les CVR étaient comparables (39,8% à 15 minutes contre 40,3 à 30 minutes). L'expérience suggère que bien que la saturation des sites antigéniques de la MPO est incomplète après 15mn mais qu'elle influence peu le CVR.

Afin de diminuer le temps technique et simplifier davantage le protocole de perméabilisation, il pourrait être utile de tester les performances du kit PerFix-nc (no centrifuge assay kit—Beckman Coulter, Brea). Il s'agit d'un kit de perméabilisation sans aucune étape de lavage dont le protocole à une durée totale de 1h qui a déjà démontré ses performances. Dans une étude menée par Demaret et al. (71), le kit a

servi à doser l'expression de la MPO dans les PN et il avait notamment été démontré que la MFI de la MPO était significativement diminuée chez les patients atteints de chocs septiques par rapport à des patients contrôles.

Notre étude présente certaines limites qui méritent d'être mentionnées : le nombre d'échantillons et le nombre de kits de perméabilisation testés étaient restreints. Cette étude est un travail préliminaire qui devra être complétée par une étude de plus grande envergure avec plusieurs autres kits commerciaux. Nous avons présenté ce projet (intitulé « Comparaison de 4 kits de perméabilisation dans un test diagnostique d'exclusion des syndromes myélodysplasiques basé sur la semi-quantification de la myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique par cytométrie en flux ») à un appel d'offre de la Fondation de l'Avenir 2021. Notre lettre d'intention a été retenue, le contenu détaillé du projet est en cours de rédaction.

En conclusion, les performances du réactif Permeabilizing Solution 2 sont en accord avec les résultats de notre méthode de référence. Ces résultats encourageants nous permettraient de proposer Permeabilizing Solution 2 comme réactif perméabilisant alternatif pour notre protocole. Cependant, ces résultats nécessitent d'être validés par une étude de plus grande envergure.

5 Conclusion

THÈSE SOUTENUE PAR Laura SCHEFFEN

TITRE : DÉVELOPPEMENT D'UN TEST STANDARDISÉ DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA MYÉLOPEROXYDASE DES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC D'EXCLUSION DES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES : ÉVALUATION DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PERMÉABILISATION

CONCLUSION :

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont un groupe hétérogène d'hémopathies clonales qui affectent les sujets âgés. Pour établir le diagnostic, la cytologie et la cytogénétique médullaire sont les méthodes de référence. Le matériel requis pour ces analyses étant la moelle, un myélogramme est prélevé chez tout patient suspect de SMD. Or, la prévalence de la maladie parmi les patients suspects est en réalité faible puisqu'elle est estimée à 20%. Par conséquent, de nombreux patients âgés sont non nécessairement exposés aux risques et aux inconforts du myélogramme.

Le test diagnostique d'exclusion des SMD, basé sur la quantification de la myéloperoxydase (MPO) dans les polynucléaires neutrophiles (PN) sanguins par cytométrie en flux (CMF), a été mis au point conjointement par les CHU de Grenoble, Clermont-Ferrand et Saint-Etienne. Il s'agit d'un test qui a la particularité d'être réalisé à partir de sang périphérique et dont l'objectif est innovant puisqu'il permet d'exclure le diagnostic de SMD. Un coefficient de variation robuste (CVR) de

l'expression de la MPO des PN sanguins inférieur à 30% exclut avec une sensibilité proche de 100% le diagnostic de SMD. Le concept du test a été validé au CHU de Grenoble et un PHRC inter-régional (MPO-MDS-Valid, PHRCI-19-064) a été accepté pour une validation multicentrique. Si les résultats se confirment, ce test facile à utiliser permettrait d'éviter un myélogramme à un tiers des patients suspects de SMD.

Pour une application future dans l'activité de soins, des évolutions techniques du protocole du test sont nécessaires. Premièrement, l'utilisation de tubes prêts à l'emploi contenant les anticorps lyophilisés est une solution envisagée pour standardiser le protocole. Leurs performances sont en cours d'évaluation (MPO-MDS-Develop NCT04399018). Deuxièmement, pour faciliter l'usage du test dans différents laboratoires, il est important de s'assurer de la possibilité d'utiliser d'autres réactifs que ceux que nous avons employés, notamment pour la perméabilisation membranaire. De nombreux kits commerciaux sont disponibles sur le marché et il est indispensable de les tester avant de pouvoir valider leur usage dans le protocole. C'est dans ce contexte et pour répondre à ce besoin que nous avons été amenées à tester différents kits de perméabilisation.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les performances de deux kits de perméabilisation, à savoir Intrastain™ (Dako, Denmark) et BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), par rapport à la méthode de référence utilisant le kit Intrasure™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Nous avons comparé les CVR de l'expression de la MPO des PN sanguins obtenus avec les 3 méthodes de perméabilisation pour 10 patients suspects non

SMD et 10 patients SMD. Les CVR obtenus avec la Permeabilizing Solution 2 étaient quantitativement comparables à la méthode de référence (changement relatif de -1% en moyenne). Vis-à-vis du seuil prédéfini à 30%, les interprétations étaient toutes concordantes entre les deux protocoles. Le protocole Intrastain générait des CVR très hétérogènes et plus élevés que la méthode de référence (changement relatif de +64% en moyenne) et sans discrimination entre SMD et non SMD.

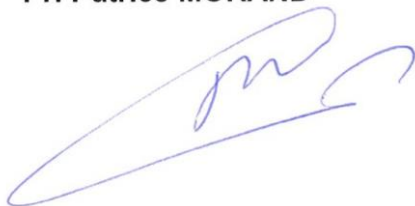
En conclusion, notre étude indique que le kit Permeabilizing Solution 2 pourrait être employé en tant que réactif de perméabilisation dans notre protocole. En revanche, l'hétérogénéité des CVR obtenus avec le kit Intrastain suggère qu'il ne convient pas dans le cadre de notre test. Cette étude est un travail préliminaire qui sera complétée par une étude de plus grande envergure avec d'autres kits commerciaux. Nous avons présenté ce projet à un appel d'offre de la Fondation de l'Avenir 2021 pour lequel notre lettre d'intention a été retenue. A terme, cette étude permettrait de valider l'emploi de plusieurs kits de perméabilisation compatibles avec le protocole du test.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 17/03/2022

LE DOYEN

Pr. Patrice MORAND

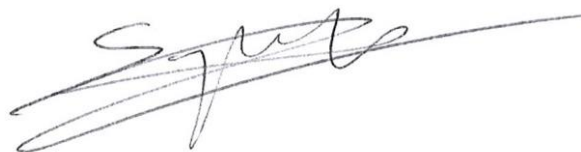


Pour le Président
et par délégation

—
Le Doyen de Médecine
Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Pr. Sophie PARK



Remerciements

Nous souhaitons remercier Becton Dickinson Bioscience, qui nous a fourni les kits de perméabilisation Intrasure™ et BD FACS™ Permeabilizing Solution 2.

Bibliographie

1. Cazzola M. Myelodysplastic Syndromes. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2020 Oct 1;383(14):1358–74.
2. Menssen AJ, Walter MJ. Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. *Blood*. 2020 Jul 2;136(1):50–60.
3. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640–53.
4. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):504–15.
5. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9–16.
6. Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *Lancet Haematol*. 2020 Jan;7(1):e73–81.
7. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. :169.
8. Sun L-M, Lin C-L, Lin M-C, Liang J-A, Kao C-H. Radiotherapy- and Chemotherapy-Induced Myelodysplasia Syndrome: A Nationwide Population-Based Nested Case–Control Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015 May;94(17):e737.
9. Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013 Dec;26(4):319–26.
10. Jin J, Yu M, Hu C, Ye L, Xie L, Jin J, et al. Pesticide Exposure as a Risk Factor for Myelodysplastic Syndromes: A Meta-Analysis Based on 1,942 Cases and 5,359 Controls. *PLOS ONE*. 2014 Oct 21;9(10):e110850.
11. Du Y, Fryzek J, Sekeres MA, Taioli E. Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*. 2010 Jan;34(1):1–5.
12. Duffy EA, Nguyen PL, Cioc A, Warlick E, Roesler MA, Poynter JN. Alcohol use is not a significant contributor to myelodysplastic syndromes. *Cancer Causes Control*. 2020 Jun;31(6):549–57.
13. Bannon SA, DiNardo CD. Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun;17(6):838.

14. Haute Autorité de la Santé. Guide du parcours de soins Insuffisances médullaires et autres cytopénies chroniques Syndromes myélodysplasiques [Internet]. 2015. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/guidem_syndrome_myelo_version_web_2008_05_20__8_32_46_696.pdf
15. Mekinian A, Grignano E, Braun T, Decaux O, Liozon E, Costedoat-Chalumeau N, et al. Systemic inflammatory and autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia: a French multicentre retrospective study. *Rheumatology*. 2016 Feb 1;55(2):291–300.
16. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Jan;15(1):60–87.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
18. Steensma DP, Bennett JM. The Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006 Jan;81(1):104–30.
19. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2016 Oct 20;128(16):2096–7.
20. Swerdlow SHH ed. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 24]. 594 p. Available from: <http://archive.org/details/whoclassificatio00swer>
21. Senent L, Arenillas L, Luño E, Ruiz JC, Sanz G, Florensa L. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013 Apr 1;98(4):568–75.
22. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):820–9.
23. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.
24. Groupe Francophone des Myélodysplasies. Consensus français sur les

syndromes myélodysplasiques et la leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic, classifications, traitement [Internet]. 2015. Available from: <http://www.gfmgroup.org/fichiers/recommandations/ConsensusGFM2015.pdf>

25. Orazi A. Histopathology in the Diagnosis and Classification of Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases. *Pathobiology*. 2007;74(2):97–114.
26. Haute Autorité de la Santé. Actes et prestations - Affection de longue durée Insuffisances médullaires et autres cytopénies chroniques Syndromes myélodysplasiques [Internet]. 2018. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/lap_syndrome_myelo_version_web.pdf
27. Czuchlewski DR, Peterson LC. Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition. *Surg Pathol Clin*. 2016 Mar;9(1):165–76.
28. Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T. Mutational profiling in patients with MDS: Ready for every-day use in the clinic? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015 Mar;28(1):32–42.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451–8.
30. Steensma DP. Dysplasia Has A Differential Diagnosis: Distinguishing Genuine Myelodysplastic Syndromes (MDS) From Mimics, Imitators, Copycats and Impostors. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Dec;7(4):310–20.
31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079–88.
32. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2454–65.
33. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, Buccisano F, Piciocchi A, Aloe-Spiriti MA, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) Predicts Survival and Leukemic Evolution of Myelodysplastic Syndromes Significantly Better Than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: Validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 20;31(21):2671–7.
34. Park S, Fenau P, Greenberg P, Mehta B, Callaghan F, Kim C, et al. Efficacy and safety of darbepoetin alpha in patients with myelodysplastic syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):730–47.
35. Ronot X. La cytométrie en flux. Lavoisier; 2006.

36. BD Biosciences. BD FACSDiva Software 6.0 Reference Manual. 2007.
37. 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 Aug 1;108(3):1037–44.
38. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2010;116(19):4549–63.
39. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, 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 Sep;28(9):1793–8.
40. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: A pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78B(3):154–68.
41. Ogata K, Porta MGD, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009 Aug 1;94(8):1066–74.
42. Porta MGD, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, 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 Aug 1;97(8):1209–17.
43. Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, Morvan C, Debord C, Trimoreau F, et al. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015 Apr 1;100(4):472–8.
44. Mathis S, Chapuis N, Debord C, Rouquette A, Radford-Weiss I, Park S, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013 Oct;27(10):1981–7.
45. Park S, Kosmider O, Maloisel F, Drenou B, Chapuis N, Lefebvre T, et al. Dyserythropoiesis evaluated by the RED score and hepcidin:ferritin ratio predicts response to erythropoietin in lower-risk myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2019 Mar;104(3):497–504.
46. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et

- al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):979–87.
47. Cherian S, Moore J, Bantly A, Vergilio J-A, Klein P, Luger S, et al. Peripheral blood MDS score: A new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64B(1):9–17.
 48. Chu S-C, Wang T-F, Li C-C, Kao R-H, Li D-K, Su Y-C, et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2011 Jul;35(7):868–73.
 49. Ogata K, Sei K, Saft L, Kawahara N, Porta MGD, Chapuis N, et al. Revising flow cytometric mini-panel for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes: Introducing a parameter quantifying CD33 expression on CD34+ cells. *Leuk Res*. 2018 Aug;71:75–81.
 50. Cherian S, Moore J, Bantly A, Vergilio J-A, Klein P, Luger S, et al. Flow-cytometric analysis of peripheral blood neutrophils: A simple, objective, independent and potentially clinically useful assay to facilitate the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2005;79(3):243–5.
 51. Boutault R, Peterlin P, Boubaya M, Sockel K, Chevallier P, Garnier A, et al. A novel complete blood count-based score to screen for myelodysplastic syndrome in cytopenic patients. *Br J Haematol*. 2018;183(5):736–46.
 52. Schillinger F, Sourdeau E, Boubaya M, Baseggio L, Clauser S, Cornet E, et al. A new approach for diagnosing chronic myelomonocytic leukemia using structural parameters of Sysmex XN™ analyzers in routine laboratory practice. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018 Apr 3;78(3):159–64.
 53. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3618–26.
 54. Raskovalova T, Berger MG, Jacob M-C, Park S, Campos L, Aanei CM, et al. Flow cytometric analysis of neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood for ruling out myelodysplastic syndromes: a diagnostic accuracy study. *Haematologica*. 2019 Dec;104(12):2382–90.
 55. Buckstein R, Jang K, Friedlich J, Zhang L, Reis M, Chesney A, et al. Estimating the prevalence of myelodysplastic syndromes in patients with unexplained cytopenias: A retrospective study of 322 bone marrows. *Leuk Res*. 2009 Oct;33(10):1313–8.
 56. Gendron N, Chahabi SZ, Poenou G, Rivet N, Belleville-Rolland T, Lemaire P, et al. Pain assessment and factors influencing pain during bone marrow aspiration: A prospective study. *PLOS ONE*. 2019 Aug 29;14(8):e0221534.
 57. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity and mortality. *Br J Haematol*.

2003;121(6):949–51.

58. Germing U. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2012;8.
59. Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon J-F, Gantier M, et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100TM: ROUTINE DIAGNOSTIC PROCEDURES OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. *Int J Lab Hematol.* 2010 Dec;32(6p1):e237–43.
60. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J Immunol Res.* 2016;2016:1–11.
61. Mahjoub FE, Karder FF, Jahanzad I, Vaziri S, Sharifian RA, Farahani Z. Introducing a Rapid and Safe Method for Myeloperoxidase Staining. *Open J Pathol.* 2015;05(02):38–41.
62. Rocco V, Maconi M, Gioia M, Silvestri MG, Tanca D, Catalano T, et al. Possibility of myelodysplastic syndromes screening using a complete blood automated cell count. *Leuk Res.* 2011 Dec;35(12):1623–7.
63. Vikentiou M, Psarra K, Kapsimali V, Liapis K, Michael M, Tsionos K, et al. Distinct neutrophil subpopulations phenotype by flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2009 Jan;50(3):401–9.
64. Raskovalova T, Jacob M-C, Bulabois C-E, Mariette C, Scheffen L, Park S, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression for ruling out myelodysplastic syndrome. A prospective validation study. *Ann Hematol.* 2021;
65. Basso G, Buldini B, Zen LD, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. 2001;86:19.
66. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1986–2010.
67. Kappelmayer J, Gratama JW, Ciudad J, Rivas R, Orfao A. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. *J Immunol Methods.* 2000;13.
68. Martin Bland J, Altman Douglas G. STATISTICAL METHODS FOR ASSESSING AGREEMENT BETWEEN TWO METHODS OF CLINICAL MEASUREMENT. *The Lancet.* 1986 Feb;327(8476):307–10.

69. Papagno L, Almeida JR, Nemes E, Autran B, Appay V. Cell permeabilization for the assessment of T lymphocyte polyfunctional capacity. *J Immunol Methods*. 2007 Dec;328(1–2):182–8.
70. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry*. 1997;30(3):134–44.
71. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis M-A, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2015 Dec;98(6):1081–90.

Annexe

Tatiana Raskovalova,¹ Marie-Christine Jacob,¹ Claude-Eric Bulabois,² Clara Mariette,² Laura Scheffen,¹ Sophie Park,^{2,3} José Labarère^{4,5}

Flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression for ruling out myelodysplastic syndrome. A prospective validation study.

Affiliations:

1. Laboratoire d'immunologie, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble University Hospital, F-38043 Grenoble, France.
2. Clinique Universitaire d'Hématologie, Grenoble University Hospital, F-38043 Grenoble, France.
3. Institute for Advanced Biosciences (IAB), INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Univ. Grenoble Alpes, France.
4. Quality of Care Unit, INSERM CIC 1406, Grenoble University Hospital, F-38043 Grenoble, France.
5. TIMC-IMAG, UMR 5525, CNRS, Univ. Grenoble Alpes, F-38043 Grenoble, France

Corresponding Author: Dr Tatiana Raskovalova, Laboratoire d'immunologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France, TRaskovalova@chu-grenoble.fr

Abstract word count: 237

Text word count: 3166

Tables: 4

Figures: 2

References: 26

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Frédéric Garban, Lysiane Molina, Martin Carré, Stéphane Courby, Brigitte Pégourié, Anne Thiebaut-Bertrand, Rémy Gressin for patient recruitment and Drs. Christine Lefebvre, Sylvie Tondeur, Claire Vettier for cytogenetic, molecular, and cytomorphological analysis. The authors are indebted to Séverine Beatrix, Laure Dusset, Ghislaine Del-Vecchio, Richard Di Schiena, Michel Drouin, Claire Gasquez, Frédérique Martinez, Karine Nicolino and Christine Vallet for their technical assistance. The authors also thank Nicolas Gonnet for administrative support.

ABSTRACT

Suspicion of myelodysplastic syndromes (MDS) is the commonest reason for bone marrow aspirate in elderly patients. This study aimed to prospectively validate the accuracy for flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in ruling out MDS. We enrolled 62 consecutive patients who were referred for suspected MDS, based on medical history and peripheral blood cytopenia. The accuracy of intra-individual robust coefficient of variation (RCV) for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression was assessed with a prespecified 30% threshold. Cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate performed by experienced hematopathologists confirmed MDS in 23 patients (prevalence, 37%), unconfirmed MDS in 32 patients (52%, including 3 patients with idiopathic cytopenia of unknown significance [ICUS]), and was uninterpretable in 7 patients (11%). The median intra-individual RCV values for neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood were 37.4% (range, 30.7–54.1), 29.2% (range, 28.1–32.1), and 29.1% (range, 24.7–37.8) for patients with confirmed suspicion of MDS, ICUS, and unconfirmed suspicion of MDS, respectively ($P < 0.001$). The area under the ROC curve was 0.92 (95% confidence interval, 0.86–0.99). An intra-individual RCV value lower than 30% ruled out MDS for 35% (i.e., 19/55) patients referred for suspected disease, with 100% sensitivity (95% CI, 85%–100%) and 100% negative predictive value (95% CI, 82%–100%) estimates. This study shows that flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression might obviate the need for bone marrow aspirate for 35% of patients with suspected MDS.

Trial registration: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03363399 (First posted on December 6, 2017).

Keywords: Myelodysplastic syndromes; Flow cytometry; Diagnosis; Neutrophils; Prospective studies; ROC curve

DECLARATIONS

FUNDING

Becton Dickinson Bioscience provided antibodies free of charge. Statistical analysis was performed within the Grenoble Alpes Data Institute (ANR-15-IDEX-02). This research received no other specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interest in relation to this study.

ETHICS APPROVAL

An institutional review board (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I, Marseille, France) reviewed and approved the study protocol and the information form, prior to study initiation.

CONSENT TO PARTICIPATE

According to French regulations, the consent to participate was sought under a regime of “non-opposition” (opt-out): after appropriate written information was delivered, data were collected except in case of opposition from the patient.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The de-identified datasets analyzed as part of the current study are available upon request to the corresponding author after arranging a data sharing agreement.

CODE AVAILABILITY

Not applicable.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tatiana Raskovalova provided project leadership, had full access to the data in the study, and takes responsibility for data integrity and accuracy of data analysis.

Tatiana Raskovalova and Marie-Christine Jacob contributed to the study design, data acquisition, interpretation of the results, and manuscript preparation.

Laura Scheffen contributed to data acquisition, interpretation of the results, and critical revision of the manuscript.

Claude-Eric Bulabois, Clara Mariette, and Sophie Park enrolled participants, contributed to interpretation of the results, and critically revised the manuscript.

José Labarère contributed to data management, statistical analysis, interpretation of the results, and manuscript preparation.

All authors approved the final version of the manuscript.

BACKGROUND

Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of clonal bone marrow neoplasms characterized by recurrent cytogenetic and molecular abnormalities, morphologic dysplasia for one or more hematopoietic cell lineage, ineffective hematopoiesis, peripheral blood cytopenia, and an increased risk of progression to acute myeloid leukemia [1]. MDS predominate in the elderly, with a median age at diagnosis of 70 years [1, 2]. Patients with MDS have poor long-term prognosis, with median survival time from diagnosis ranging from 12.7 months for MDS with excess of blasts to 56.1 months for MDS with single-lineage dysplasia [3].

The diagnostic work-up of MDS relies on bone marrow aspirate for evaluation of cellular morphology and percentage of excess blasts [4]. Information obtained from additional studies of bone marrow aspiration including conventional cytogenetic, flow cytometry, and molecular analysis by next generation sequencing techniques may help refine MDS diagnosis [4, 5]. Because of the relatively low prevalence of disease among subjects referred for suspected MDS [6], many patients are exposed to unnecessary bone marrow aspiration-related discomfort and harms [7, 8]. Therefore, an objective assay based on a peripheral blood sample that accurately discriminates MDS from other cytopenia etiologies is highly desirable [9, 10].

We have previously reported on the diagnostic accuracy for flow cytometric parameters of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in MDS and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) [11]. Using a retrospective case-control

study design, we found that the intra-individual robust coefficient of variation (RCV) for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression accurately discriminated MDS cases and healthy controls, with an area under the receiver operating characteristic (ROC) curve estimates of 0.94 (95% confidence interval [CI], 0.86–0.97). Interestingly, an intra-individual RCV value for neutrophil myeloperoxidase expression lower than 30.0% accurately ruled out MDS, with 100% sensitivity and 100% negative predictive value estimates, in consecutive patients with suspected disease [11]. Although promising, these preliminary results require replication in an independent external validation sample [12].

The aim of this study was to examine the diagnostic accuracy of intra-individual RCV for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression quantified by flow cytometric analysis among consecutive unselected patients referred for suspected MDS or CMML.

METHODS

Study design

We carried out a prospective diagnostic accuracy study of an index test by comparison with a reference standard in consecutive unselected patients [12]. The rationale and methods were pre-specified and reported in a protocol registered at Clinicaltrials.org (NCT03363399). An institutional review board (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I, Marseille, France) reviewed and approved the study protocol and the information form, prior to study initiation. All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. This paper complies with the 2015 update of the Standards for the reporting of diagnostic accuracy studies (STARD) guidelines [13].

Participants

Participants were recruited 5 days a week between February and September 2018. Consecutive adults aged 50 years and older were eligible if they were referred for suspected MDS, based on medical history and peripheral blood cytopenia. According to current guidelines [5], peripheral blood cytopenia was defined by hemoglobin concentration <10 g/dL, platelet count <100×10⁹/L, and/or absolute neutrophil count <1.8×10⁹/L. Patients were excluded if they had a previous history of documented MDS, milder levels of peripheral blood cytopenia, hematological disorder requiring

cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate or biopsy for reasons other than suspicion of MDS, were hospitalized in intensive care unit, homeless, incarcerated as prisoner, unaffiliated with a social security system, or unable to understand research information, because of language restriction, dementia, or altered mental status.

Index test

Using the same gating strategy as previously reported [11], flow cytometry analysis of peripheral blood samples was performed within 24 h of bone marrow cytomorphological evaluation and blinded to the reference diagnosis. Peripheral blood samples were collected in BD Vacutainer® 5 ml K2E (EDTA) anticoagulant plastic tubes (Ref 368861, BD Diagnostics, Le Pont de Claix Cedex, France) and processed within 24 h maximum of collection. Peripheral blood samples were stored at 4°C overnight and processed within 24 h of collection.

Blood samples were incubated with a panel of antibodies conjugated to fluorochromes, according to the manufacturers' recommendations. CD64 FITC (clone 10.1), CD15-PerCPCy55 (clone HI98), CD11b-APC (clone D12), CD16-APCH7 (clone 3G8), CD14-V450 (clone MΦP9), and CD45-V500 (clone HI30) antibodies were added. Aliquots were stained for 15 min at room temperature. The fixation and permeabilization phases were performed using the BD IntraSure™ kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and MPO-PE was added (clone 5B8) during the permeabilization phase. All antibodies, BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences,

San Jose, CA, USA) and BD IntraSure™ kit were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). At least 10,000 neutrophils were acquired on a three-laser, eight-color BD FACSCanto-II™ flow cytometer (BD Biosciences, San José, CA, USA) and analyzed using BD FACSDiva Software.

Myeloperoxidase expression in the peripheral blood neutrophil population within an individual subject was expressed as RCV [11]. The intra-individual RCV was calculated as the robust standard deviation divided by the median. The robust standard deviation is a function of the deviation of individual data points to the median of the study population [11]. Intra-individual RCV was expressed as percentage and reflected the variability in myeloperoxidase expression in the peripheral blood neutrophil population within an individual subject.

The FranceFlow standard operating procedure was used to standardize instrument settings. Rainbow calibration particles (BD Sphero™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were analyzed daily and photomultiplier tubes were adjusted if needed.

Reference standard

The reference diagnosis of MDS was established according to current guidelines [5]. Cellular morphology and percentage of excess blasts in bone marrow were evaluated by experienced hematopathologists who were blinded to the index test results. The criteria for MDS diagnosis were 1) the presence of $\geq 10\%$ dysplastic cells in any hematopoietic lineage, 2) the exclusion of acute myeloid leukemia (defined by the

presence of $\geq 20\%$ peripheral blood or bone marrow blasts), and 3) the exclusion of reactive etiologies of cytopenia and dysplasia. Morphologic assessment could be complemented by bone marrow flow cytometric score [14], karyotype, and molecular profiling, where relevant [1, 5]. Consistent with the 2016 revision of the WHO classification [15], MDS subtype categorization was based on the numbers of dysplastic lineages, the percentages of blasts in bone marrow and peripheral blood, the percentages of ring sideroblasts, and conventional karyotype analysis. Idiopathic cytopenia of uncertain significance (ICUS) was defined by unexplained mild cytopenia for 6 months of follow-up not fulfilling MDS criteria [16].

The criteria for CMML diagnosis were 1) the presence of persistent peripheral blood monocytosis $\geq 1 \times 10^9/L$ and 2) monocytes accounting for more than 10% of the white blood cell differential count [17]. Confirmed suspicions of MDS were categorized as low, intermediate-1, intermediate-2, and high risk categories, using the International Prognostic Scoring System (IPSS) [18].

Sample size

Assuming an area under the ROC curve point estimate of 0.95, we estimated that an effective sample size of 60 participants with a 20% prevalence of MDS would provide a precision of ± 0.07 (95% CI ranging from 0.88 to 1.00).

Reproducibility assessment

To assess specimen stability, peripheral blood samples from 10 healthy individuals were assayed by the same operator at baseline and at 24 h and 48h, under two different storage conditions (i.e., room temperature and 4°C). We also assessed reproducibility of intra-individual RCV value obtained with different fixation and permeabilization kits. For this purpose, peripheral blood samples from 10 healthy individuals were assayed by the same operator at baseline using BD IntraSure™ kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and Dako IntraStain™ kit (Dako, DK-2600, Glostrup, Denmark) according to manufacturer recommendations.

Statistical analysis

Baseline patient characteristics were reported as numbers and percentages for categorical variables and median along with 25th and 75th percentiles or range for continuous variables. We compared baseline characteristics according to MDS status with the use of the χ^2 test, replaced by the Fisher exact test where appropriate, for categorical variables, and the nonparametric Wilcoxon test, for continuous variables.

We assessed the independent associations of MDS with intra-individual RCV for neutrophil myeloperoxidase expression measured by flow cytometric analysis in peripheral blood, using multivariable logistic regression. Odds ratio estimates were adjusted for demographics (i.e., age and gender), C-reactive protein concentration, and hematological parameters that were significantly associated with MDS in univariable analysis (monocyte [$P=.008$] and absolute neutrophil count [$P=.001$]).

Seventeen observations were imputed because of missing values for C-reactive protein concentration, monocyte or absolute neutrophil count. Additional variables entered in the imputation model included age, gender, RCV, and MDS diagnosis. Fifty imputed data sets were created with a total run length of 50,000 iterations and imputations made every 1,000 iterations. We examined trends toward higher intra-individual RCV values across increasing IPSS categories, using the nonparametric Wilcoxon-type test for trend.

We quantified the accuracy of intra-individual RCV for neutrophil myeloperoxidase expression in discriminating patients with confirmed versus unconfirmed MDS by the area under the ROC curve. We reported sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and likelihood ratio point estimates along with 95% CI for intra-individual RCV with a prespecified threshold of 30.0%. This threshold was selected because an intra-individual RCV value for neutrophil myeloperoxidase expression lower than 30.0% accurately ruled out MDS, with both sensitivity and negative predictive value estimates of 100%, in a previous study [11].

Two-tailed *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using Stata Special Edition version 14.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

RESULTS

Of 104 consecutive patients screened for eligibility, 42 were excluded and 62 were enrolled in the study (Figure 1). Cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate confirmed MDS in 23 patients (prevalence, 37%), unconfirmed MDS in 32 patients (52%, including 3 patients [4.8%] with ICUS), and was uninterpretable in 7 patients (11%). Yet, cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate was not contributive for establishing alternate diagnosis for any of 32 patients with unconfirmed suspicion of MDS.

The median age for all participants was 72 years (25–75th percentiles, 64–82) and 27 (43%) were female (Table 1). Comparable distributions were observed for baseline characteristics among patients with confirmed and unconfirmed suspicions of MDS, with the exception of absolute neutrophil and monocyte counts (Table 1). Unsurprisingly, patients with confirmed suspicions of MDS were more likely to have bone marrow flow cytometric scores of two or more (Table 1).

The median intra-individual RCV values for neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood were 37.4% (range, 30.7–54.1), 29.2% (range, 28.1–32.1), and 29.1% (range, 24.7–37.8) for patients with confirmed suspicion of MDS, ICUS, and unconfirmed suspicion of MDS, respectively ($P<0.001$). The odds ratios of confirmed suspicion of MDS associated with a 1% increase in intra-individual RCV were 1.78 (95% CI, 1.30–2.45) in univariable analysis and 1.82 (95% CI, 1.29–2.56) in multivariable analysis adjusting for age, gender, C-reactive protein concentration, monocyte and absolute neutrophil count.

Intra-individual RCV values for neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood were elevated across all MDS types (Table 2). Median intra-individual RCV values were 35.5%, 37.4%, 41.4%, and 40.9% for 6 low, 11 intermediate-1, 5 intermediate-2, and 1 high risk patients with MDS, according to IPSS (P for trend = 0.22, Table 2).

Intra-individual RCV for neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood discriminated patients with confirmed versus unconfirmed suspicions of MDS with an area under the ROC curve estimate of 0.92 (95% CI, 0.86–0.99) (Figure 2). An intra-individual RCV value <30.0% ruled out MDS for 35% (19 of 55) consecutive patients referred for suspected disease, with both sensitivity and negative predictive value point estimates of 100% (Table 3).

Compared with baseline values, the mean changes in RCV were -1.4 (95% CI, -2.1 to -0.6) and 9.4 (95% CI, 5.8 to 12.9) percentage points for 10 samples stored for 24 h at 4°C and room temperature, respectively (P <0.001, Table S1). The corresponding values were -0.7 (95% CI, -2.3 to 0.9) and 7.3 (95% CI, 4.0 to 10.6) percentage points after 48 h of storage (P <0.001). Compared with permeabilization and fixation using BD IntraSure™ kit, the mean differences in RCV were -0.8 (95% CI, -2.6 to 1.0) and 25.9 (95% CI, 3.3 to 48.6) percentage points for 10 samples assayed with BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 and Dako IntraStain™ kit, respectively (Table S2). The intraclass coefficient quantifying the absolute agreement between BD IntraSure™ kit and BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 was 0.83 (95% CI, 0.49 to 0.96, P <0.001).

DISCUSSION

This study provides additional evidence on the accuracy and reliability of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression quantified by flow cytometric analysis for ruling out MDS, without requiring cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate. Our findings also corroborate the preliminary estimates of sensitivity and negative predictive value for intra-individual RCV values lower than 30% derived from previous studies.

Overall, the accuracy of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in discriminating MDS patients is supported by three primary studies totaling 211 individuals, of those 82 had MDS (Table 4). One study used a retrospective case-control design while the two others were prospective validation studies. Despite heterogeneous definitions of peripheral blood cytopenia and varying prevalence of high-risk MDS, the accuracy of intra-individual RCV was consistent across primary studies, with area under the ROC curve point estimates ranging from 0.87 to 0.94.

Using a prespecified threshold of 30%, intra-individual RCV ruled out MDS for 29–35% of consecutive patients referred for suspected disease, with 100% sensitivity and 100% negative predictive value estimates, within the two prospective validation studies (Table 4). In the retrospective case-control study, all MDS cases but one yielded intra-individual RCV values higher than 30%. The exception was a 72-year old female with isolated peripheral thrombocytopenia and multilineage dysplasia on bone marrow aspirate.

Noticeably, flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression does not add relevant information to cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate for ruling in MDS. Indeed, specificity point estimates ranged from 32 to 59% across primary studies, with positive predictive values as low as 31–64% (Table 4).

It has been assumed that bone marrow aspirate may establish alternate diagnosis for patients with unconfirmed MDS suspicions. Yet, cytomorphological evaluation of bone marrow aspirate was not contributive for any of the 77 unconfirmed suspicions of MDS ruled out by RCV for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression, within the two prospective validation studies. This latter observation questions the relevance of performing bone marrow aspirate in patients with intra-individual RCV values lower than 30%.

To our knowledge, only few studies have investigated the value of aberrant phenotypic expression of peripheral blood leukocytes in the diagnostic work-up of MDS [19-23]. Rachidi et al. reported that the mean level of CD10 expression in peripheral blood was decreased for patients with high – but not low – grade MDS compared with cytopenic controls [22]. The area under the ROC curve estimate was 0.87 (95% CI, 0.70 to 0.96) for a previously derived peripheral blood MDS scoring system based on four neutrophil immunophenotypic variables (i.e., CD11a, CD66, CD10, and CD116 antigen expression) [20].

Skewed low neutrophil CD177 expression in both peripheral blood and bone marrow has been described in MDS cases [21]. Various altered immunophenotypic

features of peripheral blood platelets, including abnormal light scatter characteristics, over or under expression of several platelet glycoproteins, decreased expression of CD36, CD42a and CD61 have been evidenced in patients with MDS compared with healthy controls and non-MDS cases [23].

More recently, Aires et al derived an immunophenotyping score predictive of MDS based on flow cytometry analysis of eight parameters for neutrophils (FSC, SSC, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD16 and CD45) and three parameters for monocytes (CD14, CD16, CD56) from peripheral blood [19]. This immunophenotyping score discriminated 14 MDS cases and 14 non-cytopenic controls, with 93% sensitivity and 100% specificity [19].

Fewer studies investigated the value of peripheral blood flow cytometric analysis for the diagnosis of CMML. Selimoglu-Buet et al reported that a ratio of CD14(+)/CD16(-) mononucleated cells (classical monocytes, MO1) higher than 94.0% in peripheral blood had 95% specificity and 92% sensitivity for the diagnosis of CMML [24].

Overall, these studies used a case-control design, which was prone to spectrum bias [25], lacked replication of their findings in external validation samples [12], or yielded imprecise diagnostic accuracy estimates due to relatively limited sample sizes. In contrast, intra-individual RCV for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression consistently yielded 100% sensitivity and 100% negative predictive value estimates, across two prospective validation samples.

The present study confirms that our assay based on a peripheral blood sample accurately rules out MDS, with the potential to reduce unnecessary exposure of patients to bone marrow aspirate-related discomfort and associated costs. Yet, prospective management studies or randomized controlled trials are needed to demonstrate the effectiveness of this assay in altering physician practices without compromising patient safety [12].

Our study also suggests that fixation and permeabilization with BD IntraSure™ kit and BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 yield excellent agreement (intraclass coefficient, 0.83) for intra-individual RCV values although this finding warrants confirmation on a larger sample size. In contrast, intra-individual RCV values were inconsistent with the use of Dako IntraStain™ kit for the fixation and permeabilization phase. The reasons for this latter observation are unclear and deserve further investigations before recommending the use of this kit for flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in the diagnostic work-up of suspected MDS. Because CD64 is not contributive to the gating strategy, incubation of blood samples with CD64 FITC (clone 10.1) is not required and this step can be skipped [11].

Interestingly, intra-individual RCV for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression appeared to be stable for up to 48 h of storage at 4°C - but not at room temperature. Hence blood samples can be shipped to a central facility, without altering reliability [11].

Several limitations of our study deserve mention. First, our study was carried out at a single hospital laboratory and our findings may not apply to other settings.

Second, our relatively limited sample size may not reflect the full spectrum of MDS subtypes or disease severity. Yet, consistent accuracy estimates were found across three primary studies totaling 82 patients with various MDS subtypes.

Third, peripheral blood cytopenia was defined according to current guidelines [5] and our findings might have been different for patients with milder levels of cytopenia [26]. However, we previously reported comparable accuracy estimates, using standard laboratory values for defining cytopenia [11]. Fourth, our study population was restricted to patients aged 50 years or more although some patients (less than 10% [5]) may be younger than 50 years at MDS diagnosis.

CONCLUSION

This prospective validation study confirms that intra-individual RCV values lower than 30% accurately rule out MDS, with 100% sensitivity and 100% negative predictive value estimates. Our findings suggest that flow cytometric analysis of peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression might obviate the need for bone marrow aspirate for 29–35% of patients referred for suspected MDS. Firm recommendations for the use of this assay in routine practice will depend on future randomized controlled trials demonstrating its effectiveness and safety.

REFERENCES

1. Cazzola M (2020) Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 383:1358-1374
2. Nachtkamp K, Stark R, Strupp C, Kündgen A, Giagounidis A, Aul C, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N, Germing U (2016) Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 95:937-944
3. Zeidan AM, Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X (2019) Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood rev* 34:1-15
4. Garcia-Manero G, Chien K, Montalban-Bravo G (2020) Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 95:1399-1420
5. Fenaux P, Haase D, Santini V, Sanz GF, Platzbecker U, Mey U (2021) Myelodysplastic syndromes: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 32: 142-156
6. Buckstein R, Jang K, Friedlich J, Zhang L, Reis M, Chesney A, Wells RA (2009) Estimating the prevalence of myelodysplastic syndromes in patients with unexplained cytopenias: a retrospective study of 322 bone marrows. *Leuk Res* 33:1313-1318
7. Gendron N, Zia Chahabi S, Poenou G, Rivet N, Belleville-Rolland T, Lemaire P et al (2019) Pain assessment and factors influencing pain during bone marrow aspiration: A prospective study. *PloS one* 14:e0221534

8. Bain BJ (2006) Morbidity associated with bone marrow aspiration and trephine biopsy - a review of UK data for 2004. *Haematologica* 91:1293-1294.
9. Shestakova A, Nael A, Nora V, Rezk S, Zhao X (2020) Automated leukocyte parameters are useful in the assessment of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom.* <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21947>
10. Boutault R, Peterlin P, Boubaya M, Sockel K, Chevallier P, Garnier A et al (2018) A novel complete blood count-based score to screen for myelodysplastic syndrome in cytopenic patients. *Br J Haematol* 183:736-746
11. Raskovalova T, Berger MG, Jacob MC, Park S, Campos L, Aanei CM et al (2019) Flow cytometric analysis of neutrophil myeloperoxidase expression in peripheral blood for ruling out myelodysplastic syndromes: a diagnostic accuracy study. *Haematologica* 104:2382-2390
12. Sackett DL, Haynes RB (2002) The architecture of diagnostic research. *BMJ* 324:539-541
13. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L et al (2015) STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 351:h5527
14. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H et al (2012) Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 97:1209-1217

15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391-2405
16. Valent P (2019) ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic criteria, separation from MDS and clinical implications. *Pathobiology* 86:30-38
17. Patnaik MM, Tefferi A (2020) Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol* 95:97-115
18. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079-2088
19. Aires A, Teixeira MDA, Lau C, Moreira C, Spinola A, Mota A et al (2018) A pilot study on the usefulness of peripheral blood flow cytometry for the diagnosis of lower risk myelodysplastic syndromes: the "MDS thermometer". *BMC hematology* 18:6
20. Cherian S, Moore J, Bantly A, Vergilio JA, Klein P, Luger S, Bagg A (2005) Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom* 64:9-17
21. Meyerson HJ, Osei E, Schweitzer K, Blidaru G, Edinger A, Balog A (2013) CD177 expression on neutrophils: in search of a clonal assay for myeloid neoplasia by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 140:658-669

22. Rashidi HH, Xu X, Wang HY, Shafi NQ, Rameshkumar K, Messer K et al (2012) Utility of peripheral blood flow cytometry in differentiating low grade versus high grade myelodysplastic syndromes (MDS) and in the evaluation of cytopenias. *Int J Clin Exp Pathol* 5:224-230
23. Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, Chauffaille Mde L, Quijano S, Lopez A et al (2012) Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 97:895-902
24. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L et al (2015) Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 125:3618-3626
25. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB et al (2011) QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 155:529-536
26. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F et al (2016) Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood* 128:2096-2097

FIGURE CAPTION LIST

Figure 1. Flow of participants through the study.

Figure 2. Area under the receiver operating characteristic curve for intra-individual robust coefficient of variation for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in discriminating myelodysplastic syndromes.

Abbreviations: CI, confidence interval; ROC, receiver operating characteristic.

Figure 1.

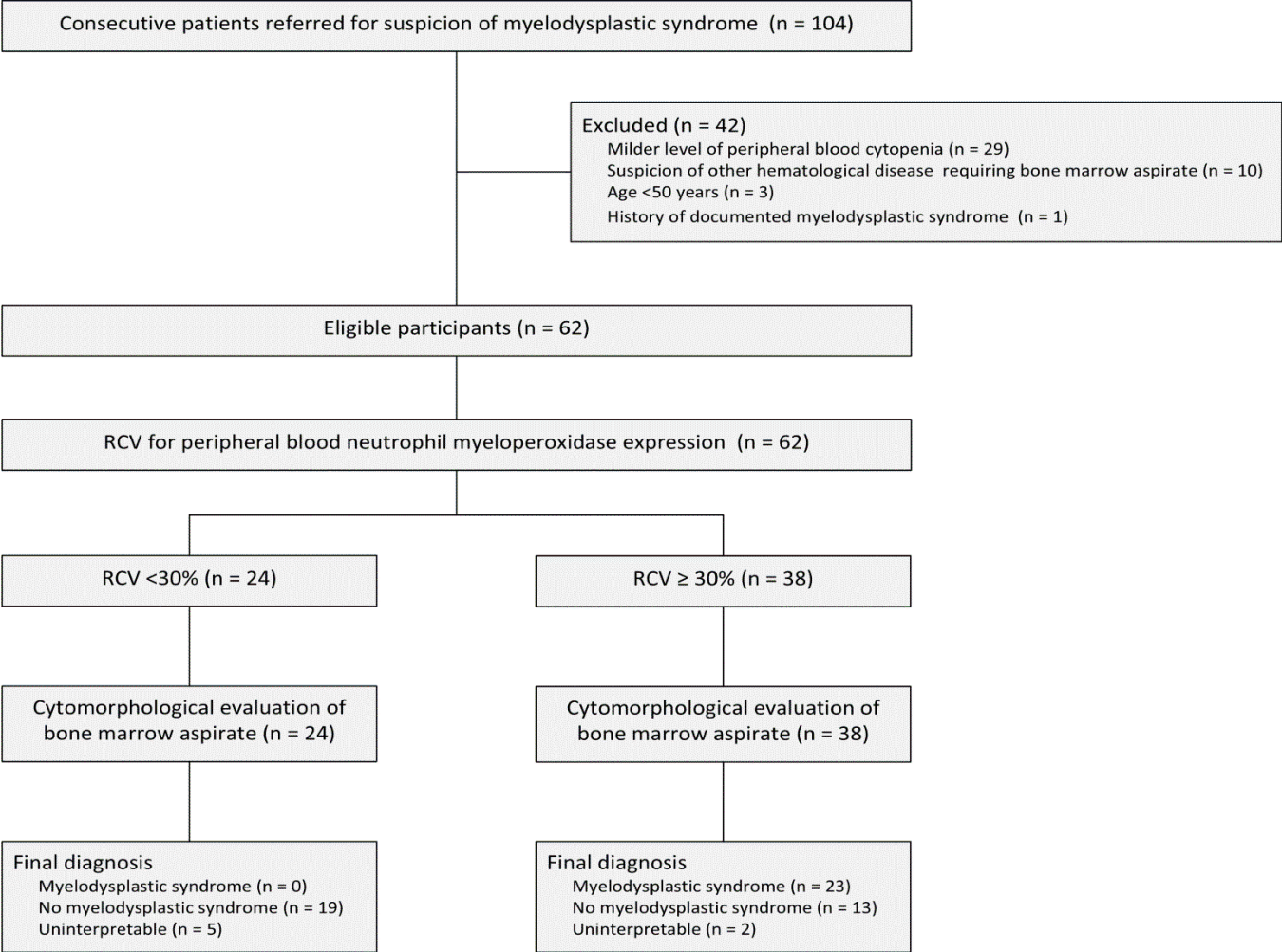


Figure 2.

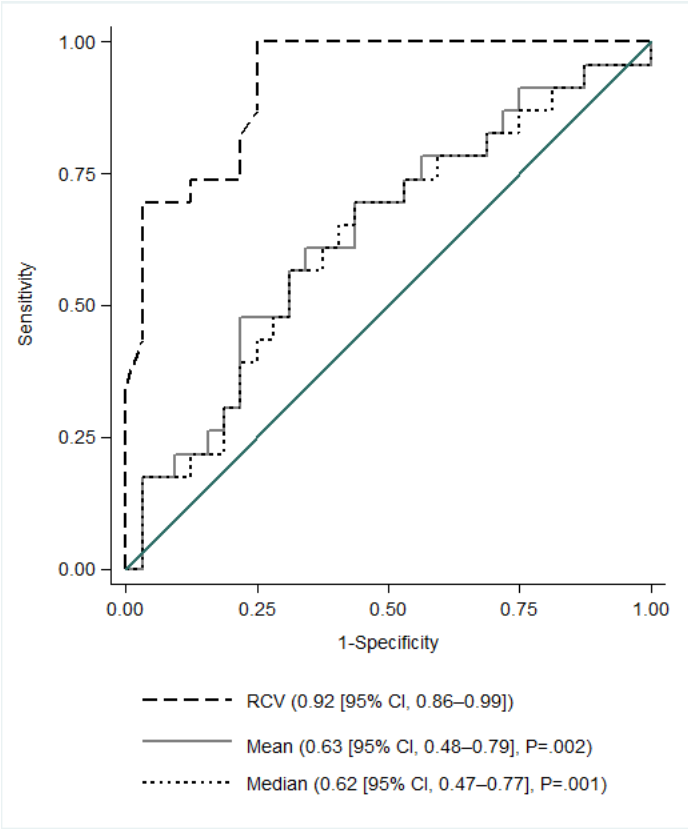


Table 1. Baseline characteristics for consecutive patients with suspicion of myelodysplastic syndromes.

Characteristics ^a	Suspicion of MDS ^b						<i>P</i>
	All patients (<i>n</i> = 62)		Unconfirmed (<i>n</i> = 32)		Confirmed (<i>n</i> = 23)		
Female gender, <i>n</i> (%)	27	(43)	12	(37)	11	(48)	.44
Age, median (IQR), <i>y</i>	72	(64–82)	71	(64–81)	73	(64–82)	.69
Hemoglobin, median (IQR), <i>g/dL</i>	9.7	(8.7–11.9)	9.6	(8.7–11.7)	9.4	(8.6–11.9)	.64
Platelet, median (IQR), $\times 10^9/L$	146	(63–232)	142	(65–258)	145	(62–188)	.90
ANC, median (IQR), $\times 10^9/L$	2.3	(1.4–5.1)	3.8	(1.9–6.0)	1.4	(1.0–3.5)	.001
Lymphocytes, median (IQR), $\times 10^9/L$	1.0	(0.8–1.4)	1.0	(0.8–1.2)	1.1	(0.7–1.5)	.91
Monocytes, median (IQR), $\times 10^9/L$	0.5	(0.2–0.6)	0.6	(0.3–0.7)	0.2	(0.1–0.5)	.008
Creatinine, median (IQR), $\mu\text{mol/L}$	87	(64–109)	90	(71–115)	79	(59–95)	.10
C-reactive protein, median (IQR), <i>mg/L</i>	12	(5–38)	13	(5–38)	8	(4–36)	.62
ICUS, <i>n</i> (%)	3	(4.8)	3	(9.4)	...	(...)	...
Bone marrow flow cytometric score ≥ 2 , <i>n</i> (%) ^c	22	(44)	4	(14)	18	(86)	<.001
Intra-individual RCV, median (IQR), %	30.6	(28.5–34.8)	29.2	(28.4–31.0)	37.4	(31.9–41.4)	<.001

Abbreviations: ANC, absolute neutrophil count; ICUS, idiopathic cytopenia of undetermined significance; IQR, interquartile range (i.e., 25–75th percentiles); MDS, myelodysplastic syndrome; RCV, robust coefficient of variation for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression.

^a Values were missing for absolute neutrophil count ($n=2$), monocytes ($n=2$), C-reactive protein ($n=20$), creatinine ($n=11$) concentrations, and bone marrow flow cytometric score ($n=5$).

^b Bone marrow cytomorphology was uninterpretable for seven patients (See Figure 1).

^c Bone marrow flow cytometric score was computed as the number of parameters with values outside of the reference ranges among myeloblast-related cluster size in all nucleated cells (%), B-progenitor-related cluster size in all CD34+ cells (%), lymphocytes to myeloblast CD45 ratio, and granulocyte to lymphocyte SSC ratio for an individual [14].

Table 2. Demographics, bone marrow cytogenetics, molecular profiling, flow cytometric scoring, and peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression for patients with confirmed suspicions of myelodysplastic syndromes ($n = 23$).

Age, y	Gender	WHO MDS subtype	Cytogenetic abnormalities	Molecular profiling	FCS ^a	IPSS	RCV, % ^b
54	Female	MDS with excess blast type 1	Normal Karyotype	DNMT3A	2	Intermediate-1	31.4
64	Male	MDS with excess blast type 1	Normal Karyotype	TET2, RAD21	3	Intermediate-1	37.5
68	Male	MDS with excess blast type 1	Normal Karyotype	SF3B1, DNMT3A, CBL	...	Intermediate-1	54.1
69	Female	MDS with excess blast type 1	Normal Karyotype	No mutation	1	Intermediate-1	30.7
73	Male	MDS with excess blast type 1	+8	DNMT3A, IDH1, SF3B1	3	Intermediate-2	34.4
78	Female	MDS with excess blast type 1	del(20q), del(5q)	Not performed	2	Intermediate-2	41.8
81	Male	MDS with excess blast type 1	structural abnormality of 2q	Not performed	3	Intermediate-1	37.4
82	Male	MDS with excess blast type 1	+8	Not performed	3	Intermediate-1	30.7
91	Female	MDS with excess blast type 1	Complex karyotype ^c	Not performed	2	Intermediate-2	31.9
82	Female	MDS with excess blast type 2	del(20q), del(5q)	Not performed	3	High	40.9
91	Female	MDS with excess blast type 2	Normal Karyotype	Not performed	...	Intermediate-2	41.4
53	Female	MDS with multilineage dysplasia	Normal Karyotype	No mutation	0	Intermediate-1	35.4
55	Male	MDS with multilineage dysplasia	Normal Karyotype	TET2, ZRSR2	2	Intermediate-1	42.2
61	Male	MDS with multilineage dysplasia	Normal Karyotype	Not performed	3	Low	37.8
80	Male	MDS with multilineage dysplasia	Normal Karyotype	Not performed	2	Intermediate-1	38.3
87	Female	MDS with isolated del(5q)	del(5q)	Not performed	2	Low	32.6
72	Female	MDS with single lineage dysplasia	Normal Karyotype	Not performed	2	Low	37.8
81	Male	MDS with single lineage dysplasia	Normal Karyotype	Not performed	2	Low	34.8

(Continued)

Table 2. (Continued)

Age, y	Gender	WHO MDS subtype	Cytogenetic abnormalities	Molecular profiling	FCS*	IPSS	RCV, % [†]
76	Female	MDS with ring sideroblasts and multilineage dysplasia	Normal Karyotype	Not performed	0	Low	31.9
69	Male	Chronic myelomonocytic leukemia	Normal Karyotype	TET2, SRSF2, ASXL1, CBL	2	Intermediate-2	43.3
84	Male	Chronic myelomonocytic leukemia	Loss of chromosome Y	Not performed	2	Low	36.1
55	Female	MDS, unclassifiable	del(20q)	SRSF2, DNMT3A, STAG2	3	Intermediate-1	47.9
73	Male	MDS, unclassifiable	Complex karyotype ^d	Not performed	3	Intermediate-1	31.0

Abbreviations: FCM, flow cytometric score; IPSS, International Prognostic Scoring System; MDS, myelodysplastic syndrome; RCV, robust coefficient of variation; WHO, World Health Organization.

^a Bone marrow flow cytometric score was computed as the number of parameters with values outside of the reference ranges among Myeloblast-related cluster size in all nucleated cells (%), B-progenitor-related cluster size in all CD34+ cells (%), Lymphocytes to myeloblast CD45 ratio, and Granulocyte to lymphocyte SSC ratio for an individual [14].

^b Robust coefficient of variation quantified myeloperoxidase expression in the peripheral blood neutrophil population for an individual [11].

^c 48,XX,del(5)(q14q35),+19,+mar,+2min[2]/ 48,sl,add(4)(p16),?del(20)(q12),-22,+r[2]/ 79,81,idemx2,-2,-3,-3,-4,-8,-9,-10,-10,-10,-11,-12,-17,-18,-19,-19,-22[3]

^d 45,X,-Y,del(11)(q21q25)[12]/45,sl,del(15)(q15q21)[6]/46,XY[2]

Table 3. Accuracy point estimates (95% confidence interval) for 30.0% predefined threshold of robust coefficient of variation for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in discriminating confirmed suspicions of myelodysplastic syndromes.

RCV, %	No. patients ^a				Sensitivity, %	Specificity, %	PPV, %	NPV, %	LR+	LR-
	True positive	False negative	False positive	True negative						
30.0	23	0	13	19	100 (85–100)	59 (41–76)	64 (46–79)	100 (82–100)	2.46 (1.62–3.74)	0.00 (...)

Abbreviations: LR+, likelihood ratio of a positive result; LR-, likelihood ratio of a negative result; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; RCV, robust coefficient of variation.

^a The analytical sample consisted of 23 confirmed and 32 unconfirmed suspicions of myelodysplastic syndrome, after excluding 7 patients with uninterpretable bone marrow cytomorphology.

Table 4. Accuracy of robust coefficient of variation for peripheral blood neutrophil myeloperoxidase expression in discriminating myelodysplastic syndromes across primary studies.

Author, year	Raskovalova, 2019-a [11]		Raskovalova, 2019-b [11]		Present study	
Country	France		France		France	
No. study sites	2		2		1	
Study design	Retrospective		Prospective		Prospective	
Enrollment	Case-control		Consecutive patients		Consecutive patients	
No. patients	88		68		55 ^a	
Age, y, mean (SD)	73	(10)	75	(9)	72	(11)
Female gender, <i>n</i> (%)	38	(43)	29	(43)	23	(42)
Peripheral blood cytopenia criteria						
Hemoglobin, <i>g/dL</i>	<12 (female), <13 (male)		<12 (female), <13 (male)		<10	
Platelet count, $10^9/L$	<150		<150		<100	
ANC, $10^9/L$	<1.8		<1.8		<1.8	
Confirmed MDS cases, <i>n</i> (%)	44	(50)	15	(22)	23	(42)
High-risk MDS cases, <i>n/N</i> (%) ^b	19/44	(43)	1/15	(6.6)	6/23	(26)
ICUS, <i>n</i> (%)	...	(...)	8	(12)	3	(4.8)
AUC (95% CI)	0.94	(0.86–0.97)	0.87	(0.76–0.94)	0.92	(0.86–0.99)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Author, year	Raskovalova, 2019-a [11]		Raskovalova, 2019-b [11]		Present study	
RCV <30.0%, <i>n</i> (%)	15	(34)	20	(29)	19	(35)
Sensitivity, % (95% CI)	98	(88–100)	100	(78–100)	100	(85–100)
Specificity, % (95% CI)	32	(19–48)	38	(25–52)	59	(41–76)
PPV, % (95%CI)	59	(47–70)	31	(19–46)	64	(46–79)
NPV, % (95% CI)	93	(68–100)	100	(83–100)	100	(82–100)

Abbreviations: ANC, absolute neutrophil count; AUC, area under the curve; CI, confidence interval; MDS, myelodysplastic syndrome; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; RCV, robust coefficient of variation; SD, standard deviation.

^a Bone marrow cytomorphology examination was uninterpretable for 7 out of 62 enrolled patients, leaving an analytical sample made of 55 patients.

^b MDS patients were categorized as low-risk (low- and intermediate-1 risk categories) versus high-risk (intermediate-2- and high-risk categories), using the International Prognostic Scoring System [18].

Le serment d'Hippocrate

Texte revu par l'Ordre des médecins en 2012

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

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

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

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

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

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

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

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

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque. ”

Laura SCHEFFEN

DÉVELOPPEMENT D'UN TEST STANDARDISÉ DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA MYÉLOPEROXYDASE DES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC D'EXCLUSION DES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES : ÉVALUATION DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PERMÉABILISATION

RÉSUMÉ :

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies clonales qui surviennent chez des sujets âgés dont le diagnostic repose sur le myélogramme. Pour limiter les risques et l'inconfort liés aux prélèvements de moelle, un test à partir de sang périphérique basé sur la semi-quantification de la myéloperoxydase (MPO) dans les polynucléaires neutrophiles (PN) par cytométrie en flux (CMF) a été développé conjointement par les CHU de Grenoble, Clermont-Ferrand et Saint-Etienne. Un coefficient de variation robuste (CVR) intra-individuel de la distribution de la MPO inférieur à 30% exclut le diagnostic avec une sensibilité proche de 100%. Le concept a été validé au CHU de Grenoble et un PHRC inter-régional a été accepté pour une validation multicentrique. Pour faciliter l'usage du test en routine dans d'autres laboratoires, il est important de s'assurer de la possibilité d'utiliser d'autres réactifs que ceux que nous avons employés, notamment pour la perméabilisation membranaire. De nombreux kits commerciaux sont en effet disponibles sur le marché.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les performances de deux kits de perméabilisation, à savoir Intrastain™ (Dako, Denmark) et BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), par rapport à la méthode de référence utilisant le kit Intrasure™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Nous avons comparé les CVR de l'expression de la MPO des PN sanguins obtenus avec les 3 méthodes de perméabilisation pour 10 patients suspects non SMD et 10 patients SMD. Les CVR obtenus avec la Permeabilizing Solution 2 étaient quantitativement comparables à la méthode de référence (changement relatif de -1% en moyenne). Vis-à-vis du seuil prédéfini à 30%, les interprétations étaient toutes concordantes entre les deux protocoles. Le protocole Intrastain générait des CVR très hétérogènes et plus élevés que la méthode de référence (changement relatif de +64% en moyenne) et sans discrimination entre SMD et non SMD.

En conclusion, notre étude indique que le kit Permeabilizing Solution 2 pourrait être employé en tant que réactif de perméabilisation dans notre protocole. En revanche, l'hétérogénéité des CVR obtenus avec le kit Intrastain suggère qu'il ne convient pas dans le cadre de notre test. Cette étude est un travail préliminaire qui sera complétée par une étude de plus grande envergure avec d'autres kits commerciaux. A terme, elle permettrait de valider l'emploi de plusieurs kits de perméabilisation compatibles avec le test.

MOTS CLÉS : syndrome myélodysplasique, myéloperoxydase, sang, cytométrie en flux, perméabilisation