

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2017

THESE 2017 TOU3 - 2061

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Julien LACOMBE

**INTERÊT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC
DE LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE**

02 octobre 2017

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur VERGEZ François

JURY :

Président : Monsieur le Professeur SEGUI Bruno
1er assesseur : Monsieur le Docteur VERGEZ François
2ème assesseur : Madame le Professeur BEYNE-RAUZY Odile
3ème assesseur : Monsieur le Docteur RIEU Jean-Baptiste

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2017

THESE 2017 TOU3 - 2061

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Julien LACOMBE

**INTERÊT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC
DE LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE**

02 octobre 2017

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur VERGEZ François

JURY :

Président : Monsieur le Professeur SEGUI Bruno
1er assesseur : Monsieur le Docteur VERGEZ François
2ème assesseur : Madame le Professeur BEYNE-RAUZY Odile
3ème assesseur : Monsieur le Docteur RIEU Jean-Baptiste

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 17 février 2017

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIÉ P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
M. HOUIN G.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme GANDIA-MAILLY P. (*)	Pharmacologie	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme BON C.	Biophysique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
Mme SÉRONIE-VIVIEN S.	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAÈVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		PEM. PERE D.	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G.	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE A.	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
Mme FONTAN C.	Biophysique
Mme KELLER L.	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

Remerciements

A Monsieur le Professeur Bruno Segui, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Votre présence et vos conseils depuis les bancs de la faculté lors du projet tutoré jusqu'à aujourd'hui pour ce travail, en passant par mon stage de Master 1, m'ont été d'une immense aide. Soyez assuré de mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Odile Beyne-Rauzy, je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail et d'être membre du jury. Soyez assurée de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur François Vergez, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse, et de m'avoir accompagné tout au long ce travail. Tes qualités humaines et professionnelles ainsi que ta disponibilité m'ont été d'un très grand soutien.

A Monsieur le Docteur Jean-Baptiste Rieu, je te remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury, et pour toute l'aide que tu m'as apportée dans ce travail. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes précieux conseils.

A Monsieur le Docteur Michael Peres, je te remercie également pour m'avoir aidé à initier ce travail. Tu as su me donner l'envie et la curiosité qui m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe de cytométrie en flux qui a réalisé l'ensemble des analyses, et qui a su prendre le temps de m'expliquer et de me montrer cette technique particulière. Vos compétences et votre gentillesse m'ont été d'une immense aide dans ce travail.

A toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie des 3 sites, je tiens à vous remercier pour ces 3 semestres passés parmi vous. Merci aux biologistes de m'avoir donné le goût pour la cytologie et l'hémostase, et d'avoir su me responsabiliser au fur et à mesure de ma formation pour devenir, à mon tour, biologiste. J'ai énormément apprécié vos compétences, votre gentillesse et votre disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions. Je tiens à remercier également toute l'équipe technique pour son professionnalisme et sa gentillesse.

C'est à vos côtés que j'ai appris le métier de biologiste, toujours dans le sérieux et la bonne humeur, et je garderai en mémoire tous les souvenirs et anecdotes, notamment lors de gardes de week-end ou de nuit, à Ranguel et à Purpan. J'espère que vous montrerez autant d'attention aux futures générations d'internes.

A toute l'équipe du CH de Rodez, les 6 mois de stage passés parmi vous ont été tellement formateurs et agréables. Vous avez su me donner le goût de la biologie polyvalente et m'avez montré la richesse d'un plateau polyvalent. J'ai énormément apprécié votre gentillesse et votre disponibilité, tout en me responsabilisant en tant que biologiste. Merci à Madame Dubourdieu, Hélène, Julie, Olivier, Carole, ainsi qu'à l'ensemble des techniciens, et notamment Evelyne, ma sébazacoise préférée.

A l'équipe du CH de Auch, merci pour votre gentillesse et pour m'avoir impliqué dans votre laboratoire lors de mon dernier semestre.

A tous mes co-internes qui m'auront supporté pendant ces 4 années d'internat, ceux qui m'ont tout appris à mes débuts, et ceux qui se souviendront avec nostalgie de mes blagues nulles. Grâce à votre énergie et votre enthousiasme, j'ai pu venir au labo tous les matins avec le sourire aux lèvres. Ensemble, nous avons travaillé avec sérieux et dans la bonne humeur et je pense entre autres aux discussions lors de la pause-café, aux baby-foots du midi après un curry d'agneau mérité, au débriefing après les journées de championnat ou de ligue des champions et les plaidoyers sur l'Aveyron. Je tiens donc à remercier profondément : Carole, Angèle, Arnaud, Laurie, Barny, Youyou, Thomas (blastés !), Agnès, Thierry, Romain, Ginger, Bénichou (Allez !), Jules, Inès (« je vois des moneuh »), Professeur Juvin (cher confrère), Louis-Thomas, Antho et ses imitations, Sam, Laurie, Elodie, Karen, Hélène, Hadrien, Camille, Jean, Romain, JK, Lucie, Claire, Morgane, Martial. Je tiens également à remercier ceux avec qui je n'ai jamais été en stage mais avec qui j'aurai adoré : Alice-Anne, Sheshe, Manu, Cedric. Si je devais vous dire un dernier mot ça serait : GAZ !

A mes amis aveyronnais, merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces études, même si certains d'entre vous ont souvent été perdus sur ce que je faisais vraiment dans la vie.

Merci aux sébazacois de m'avoir permis de décompresser les week-ends où je rentrais dans mon village natal : Charly, Jojo, Mae, Clouz, Rob, Coco, Vincent, Rodo, Carter et tous les autres... Les éternelles parties de pétanques me manquent !

Aux Genex qui, même si nous nous voyons trop peu, m'ont toujours apporté leur soutien : Thomas, Loïc, Dimi, Kevin, Berthod, Bibou, Elias, Lucie, Laura et Laura, Blandine, Margaux, Sophie, Anne.

Aux toulousains ruthénois et expatriés, pour nos éternels covoiturages et retrouvailles du dimanche soir avant de commencer la semaine : Laure, Titi, Kiki, Croquette, Caribou volant, Sanglier furtif, Tourteau pugnace, François, Furet furibond, Renard malicieux et Renard superfétatoire. Alors : up ?

Merci aux limougeaud de m'avoir fait découvrir le Limousin à vos côtés et d'avoir partagé des moments inoubliables : Fred, Céline, Audrey, Gary (reggggiano), Emilie, Lucie, Caro et bien d'autres. Vive le parmigiano reggiano.

Un immense merci à toi Boris, mon meilleur ami, qui a toujours été là pour moi. Tu es le frère sur qui je pourrai toujours compter.

Un grand merci à toute ma famille, qui même si elle n'a pas toujours su où j'en étais vraiment dans mon cursus, m'a toujours soutenu. Je vous dois à tous plus que je ne saurais dire.

A mes grands-parents, mes modèles. Quel plaisir de vous revoir chaque fois autour d'une grande table de 40 et devant une galantine.

A mes parents, pour toutes les gamelles du dimanche qui m'ont permis de ne pas mourir de faim à la fac. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour mes études, et pour les coups de main déménagement et bricolage. Je vous aime.

A ma nièce Shaïna, mon neveu Kingsley et mon beau-frère Jean-Paul, ou le miracle de l'émulsion entre Cayenne et Sébazac.

A ma sœur, Marion, pour la joie que tu apportes autour de toi, et pour toutes les fois où nous imitons nos parents (« Atche que ça rébourdelle »).

A Camille, pour tous les moments passés et à venir, la vie paraît tellement facile à tes côtés. Je t'aime.

Table des matières

Liste des annexes.....	10
Liste des illustrations.....	11
Liste des abréviations.....	13
1 Introduction	16
2 La LMMC	17
2.1 Epidémiologie	17
2.2 Clinique.....	18
2.3 Diagnostic	19
2.3.1 Critères OMS 2016	19
2.3.2 Examens biologiques.....	20
2.3.3 Diagnostic différentiel	21
2.3.4 Aspect cytologique	21
2.3.5 Aspect cytogénétique.....	24
2.3.6 Aspect moléculaire	24
2.4 Prise en charge	26
2.4.1 Pronostic.....	26
2.4.2 Traitement symptomatique	27
2.4.3 Traitement spécifique	29
2.4.4 Traitement curatif	30
3 Phénotypage monocytaire.....	31
3.1 Introduction	31
3.1.1 Principe de la cytométrie en flux	31
3.1.2 Le Monocyte.....	33
3.2 Phénotypage des monocytes hors LMMC.....	34

3.2.1	Situation physiologique.....	36
3.2.2	Situations réactionnelles.....	37
3.3	Phénotypage des monocytes dans la LMMC.....	40
4	Etude au CHU de Toulouse	41
4.1	Objectifs.....	41
4.2	Matériel et méthode	42
4.2.1	Echantillons de patients	42
4.2.2	Cytométrie en flux.....	43
4.2.3	Cytologie.....	44
4.2.4	Tests statistiques.....	44
4.3	Résultats	45
4.3.1	Stratégie de fenêtrage.....	45
4.3.2	Démographie de l'étude.....	47
4.3.3	Comportement des sous-populations dans la LMMC et le groupe contrôle.....	47
4.3.4	Définition des seuils des sous-populations	51
4.3.5	Suivi de patients dans le temps.....	59
5	Discussion.....	60
5.1	Limites de l'étude	60
5.2	Points forts de l'étude	61
5.3	Intérêt dans le diagnostic de LMMC.....	62
5.3.1	Au sein de la cohorte globale	62
5.3.2	Au sein de la cohorte dysplasique.....	63
5.3.3	Au sein de la cohorte proliférative.....	63
5.4	Proposition d'un arbre décisionnel	65
5.5	Intérêt dans le suivi de LMMC.....	68
5.6	Perspectives.....	69

6	Conclusion.....	71
7	Bibliographie	72
8	Annexes.....	79

Liste des annexes

Annexe 1. Différents scores pronostics de LMMC proposés dans la littérature	79
Annexe 2. Algorithme thérapeutique proposé pour la prise en charge de la LMMC.....	80
Annexe 3. Proposition de critères pour évaluer la réponse aux traitements dans la LMMC..	81
Annexe 4. Valeurs prédictives positives et négatives obtenues avec les différentes populations monocytaires dans les deux formes de LMMC	82

Liste des illustrations

FIGURES

Figure 1. Cellules sanguines chez un patient en situation réactionnelle (syndrome inflammatoire) à l'objectif x600.	23
Figure 2. Cellules sanguines chez un patient atteint de LMMC à l'objectif x600.	23
Figure 3. Les différentes voies de signalisation et les gènes touchés dans la LMMC.....	25
Figure 4. Schéma du phénomène de focalisation hydrodynamique, permettant le passage individuel des cellules devant un faisceau laser	31
Figure 5. Schéma du système optique de la cytométrie en flux.....	32
Figure 6. Exemple d'histogramme représentant les 3 sous-populations leucocytaires principales, définies selon les informations recueillies par la diffusion aux petits angles (FSC) et aux grands angles (SSC).....	33
Figure 7. Distribution des trois sous-populations de monocytes chez un individu sain.....	36
Figure 8. Modèle d'enrichissement en monocytes CD16 ⁺ au cours des maladies inflammatoires de l'intestin.....	40
Figure 9. Répartition des cas de non-LMMC selon les différentes pathologies.	43
Figure 10. Stratégie de fenêtrage des sous-populations de monocytes à partir de sang total	46
Figure 11. Graphe définissant les trois sous-populations de monocytes.	47
Figure 12. Exemples de graphes obtenus par cytométrie en flux.....	48
Figure 13. Différences sur les sous-populations de monocytes classiques entre les LMMC (groupe malade) et non-LMMC (groupe non-malade), en pourcentage (à gauche) et valeur absolue (à droite).	50
Figure 14. Courbe ROC et distribution des monocytes classiques sur la cohorte globale.	52
Figure 15. Courbe ROC et distribution des monocytes intermédiaires sur la cohorte globale	53
Figure 16. Courbe ROC et distribution des monocytes non-classiques sur la cohorte globale	54
Figure 17. Répartition des cas LMMC (0, 1 et 2) et du groupe contrôle (en orange) dans les deux expressions de la maladie	55
Figure 18. Courbes ROC et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte dysplasique	57
Figure 19. Courbes ROC et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte proliférative	58
Figure 20. Evolution de la proportion de monocytes CD14-/CD16+ au cours du suivi chez douze patients.....	59

Figure 21. Evolution dans le temps de la sous-population CD14-/CD16+ avec les résultats des numérations et formules sanguines (A) et les différents graphes (B) chez le patient 11.....	60
Figure 22. Distribution des patients du groupe SMP avec les faux négatifs et les faux positifs. Le nouveau seuil établi à 96% est indiqué (trait rouge).....	65
Figure 23. Algorithme d'orientation devant une monocytose chronique.	66

TABLEAUX

Tableau 1. Classification des différentes formes de LMMC et survie à 5 ans.....	20
Tableau 2. Classification du risque cytogénétique spécifique à la LMMC.....	24
Tableau 3. Exemple des principaux fluorochromes utilisés.	32
Tableau 4. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude.....	43
Tableau 5. Liste des différents anticorps couplés à leurs fluorochromes.	44
Tableau 6. Pourcentage moyen des sous-populations de monocytes	49
Tableau 7. Valeur absolue moyenne des sous-populations de monocytes.....	50
Tableau 8. Pourcentage moyen des sous-populations de monocytes au niveau des formes leucocytaires ou non-leucocytaires	51
Tableau 9. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes classiques au seuil de 93.6%.	52
Tableau 10. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes intermédiaires au seuil de 2.47%.	53
Tableau 11. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes non-classiques au seuil de 1.90%.	54
Tableau 12. Caractéristiques des patients ayant eu un suivi dans le temps	59

Liste des abréviations

5-hmC = 5-hydroxyméthylcytosine

5-mC = 5-méthylcytosine

AA750 = Allophycocyanine Alexa fluor 750

ADCC = Cytotoxicité cellulaire dépendante
d'anticorps

ADN = Acide désoxyribonucléique

AMM = Autorisation de mise sur le
marché

APC = Allophycocyanine

ARN = Acide ribonucléique

ASE = Agent stimulant l'érythropoïèse

ASXL1 = Additional Sex Combs Like 1

AUC = Aire sous la courbe

BCR-ABL = B cell receptor - Abelson

BV510 = Brillant violet 510

CALR = Calréticuline

CBL = Casitas B-lineage lymphoma

CD = Cluster de différenciation

CFU-GM = Unité formant colonie
granulocytes-monocytes

CMH = Complexe majeur
d'histocompatibilité

CPA = Cellule présentatrice d'antigènes

CPSS = CMML-specific Prognostic Scoring
System

CSF3 = Colony stimulating factor 3

CSH = Cellule souche hématopoïétique

CX3CL1 = C-X3-C Motif Chemokine Ligand1

EDTA = acide éthylène diamine tétra-
acétique

EPO = Erythropoïétine

EZH2 = Enhancer of zeste 2 polycomb
repressive complex 2 subunit

FAB = Franco-américano-britannique

FGFR1 = Fibroblast growth factor
receptor1

FISH = Fluorescence par hybridation in situ

FITC = Fluorescein Isothiocyanate

FLT3 = Fms-like tyrosine kinase 3

FN = Faux négatif

FP = Faux positif

FSC = Forward Scatter

G-CSF = Granulocyte colony-stimulating
factor

GM-CSF = Granulocyte-monocyte colony-
stimulating factor

GMP = Précurseur granulocyte-monocyte

GPI = Glycosyl-phosphatidyl-inositol

HAS = Haute autorité de santé

HDAC = Histone désacétylase

HLA = Antigène leucocytaire humain

ICAM1 = Molécule d'adhésion
intercellulaire 1

IDH1/IDH2 = Isocitrate déshydrogénase

IFN γ = Interféron gamma

IL = Interleukine

JAK2 = Janus kinase 2

KRAS = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LAM = Leucémie aiguë myéloïde

LES = Lupus érythémateux systémique

LFA1 = Leukocyte function-associated antigen 1

LMC = Leucémie myéloïde chronique

LMCa = Leucémie myéloïde chronique atypique

LMMC = Leucémie myélomonocytaire chronique

LMMCj = Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile

LPS = Lipopolysaccharide

M-CSF = Monocyte colony-stimulating factor

MGG = May-Grünwald Giemsa

MPL = Myeloproliferative Leukemia Protein

MPO = Myéloperoxydase

NK = Natural killer

NO = Monoxyde d'azote

NRAS = Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

OMS = Organisation mondiale de la santé

PCM1-JAK2 = Pericentriolar Material 1 Protein - Janus kinase 2

PDGFR = platelet-derived growth factor receptor alpha

PE = Phycoerythrin

PECF594 = Phycoerythrin-cyaninfluor 594

PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein

PNN = Polynucléaire neutrophile

PV = Polyglobulie de Vaquez

RFcγ = Récepteur à la fraction Fc gamma

ROC = Receiver Operating Characteristic

RRM = Motif de reconnaissance de l'ARN

RUNX1 = Runt Related Transcription Factor 1

SF3B1 = Splicing Factor 3b Subunit 1

SMC = Splénomégalie myéloïde chronique

SMD = Syndrome myélodysplasique

SMD/SMP = Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif

SMD/SMP-RS-T = Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif avec sidéroblastes en couronnes et thrombocytose

SMD/SMP-U = Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif inclassable

SMP = Syndrome myéloprolifératif

SRSF2 = Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2

SSC = Side scatter

TCR = T cell récepteur

TE = Thrombocytémie essentielle

TET2 = Ten-Eleven Translocation 2 Gene Protein

TGF-β = Transforming Growth Factor Beta

TLR = Toll-like receptor

TNF = Tumor necrosis factor

TP53 = Tumor protein p53

TSH = thyroïdostimuline

VIH = Virus de l'immunodéficience
humaine

VN = Vrai négatif

VP = Vrai positif

VPN = Valeur prédictive négative

VPP = Valeur prédictive positive

ZRSR2 = Zinc Finger CCCH-Type, RNA

Binding Motif And Serine/Arginine Rich2

1 Introduction

Le développement des techniques de cytogénétique, de biologie moléculaire et de cytométrie en flux a permis, globalement, d'améliorer la définition et la prise en charge des hémopathies malignes. Le diagnostic de certaines pathologies reste tout de même, à ce jour, complexe. Parmi elles, nous retrouvons les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/SMP).

En effet, cette entité fut initialement individualisée dans la troisième édition (2008) de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des hémopathies ¹, car elle formait un groupe charnière d'hémopathies entre les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et les syndromes myélodysplasiques (SMD). Ce groupe est composé de cinq pathologies selon la révision 2016 de la classification OMS :

- La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)
- La leucémie myéloïde chronique atypique BCR-ABL1 négative (LMCa)
- La leucémie myélomonocytaire chronique juvénile (LMMCj)
- Le syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (SMD/SMP-RS-T)
- Les syndromes myélodysplasique/myéloprolifératif inclassables (SMD/SMP-U)

Le diagnostic de LMMC est évoqué devant une monocytose chronique, associée à des signes de dysmyélopoïèse (dysgranulopoïèse en particulier). Mais la distinction entre une LMMC et un SMD avec une monocytose, chronique ou fluctuante, est souvent délicate².

De plus, le diagnostic de LMMC comporte de nombreux critères d'exclusion qui doivent donc être explorés. Par exemple, les mutations définissant les principaux SMP doivent être recherchées. Les mutations touchant les gènes *JAK2*, *MPL*, *CALR* devront donc être absentes ainsi que les réarrangements des gènes *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *PCM1-JAK2*, notamment en cas d'hyperéosinophilie sanguine, afin d'éliminer une hémopathie myéloïde/lymphoïde avec éosinophilie¹. Ces techniques ne peuvent être réalisées que dans des centres spécialisés.

Enfin, l'évaluation de la dysmyélopoïèse, laissée à l'appréciation de l'hématocytologiste, difficile à standardiser, prend une part importante dans le diagnostic.

Les critères de diagnostic de certains SMD/SMP ont été restreints, notamment grâce à la biologie moléculaire. La présence de la mutation du gène *SF3B1* par exemple, est un élément permettant de définir le SMD/SMP-RS-T, surtout lorsqu'elle est associée à la mutation de *JAK2*. De nombreuses mutations ont également été décrites dans la LMMC, mais celles-ci sont souvent communes aux SMD³.

Deux difficultés persistent pour le diagnostic de la LMMC :

- il existe de nombreuses causes de monocytoses réactionnelles qu'il convient d'exclure
- le caractère chronique de la monocytose doit être objectivé sur une durée d'au moins trois mois

Le diagnostic de LMMC n'est donc pas toujours très aisé. Il apparaît nécessaire de développer de nouvelles approches techniques, afin de définir de façon plus rapide et précise le diagnostic, et de proposer une prise en charge adaptée aux patients. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la cytométrie en flux, technique rapide et adaptée à la caractérisation de sous-populations cellulaires. Nous avons focalisé notre étude sur l'apport de l'immunophénotypage des sous-populations monocytaires dans le diagnostic de la LMMC.

2 La LMMC

2.1 Epidémiologie

La LMMC est une maladie clonale acquise des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui présente des caractéristiques à la fois myéloproliférative et myélodysplasique. Elle est définie par une monocytose supérieure 1 G/L³. C'est une maladie rare avec une incidence estimée à moins de 1 cas/100000 personnes/an. Elle touche plutôt les sujets âgés, avec une médiane d'âge au moment du diagnostic de 70 ans⁴, mais peut être détectée avant 60 ans. Les hommes sont préférentiellement atteints avec un sexe ratio de deux hommes pour une femme.

On estime que la LMMC représente environ 10% de l'ensemble des syndromes myélodysplasiques⁵. Environ 15 à 20% des LMMC se transforment en leucémie aiguë myéloïde (LAM). La médiane de survie est de 2 à 3 ans⁶.

2.2 Clinique

Initialement, la LMMC avait été définie en 1982, dans la classification FAB (franco-américano-britannique), comme faisant partie des syndromes myélodysplasiques⁷. La classification OMS de 2008 l'a incluse dans le groupe des SMD/SMP. En effet, une dualité a été constatée dans l'expression biologique et clinique de cette hémopathie et a permis de définir deux formes de LMMC⁵ :

- La forme proliférative, avec un compte de leucocytes circulants ≥ 13 G/L, et dont la présentation clinique se rapprochait des SMP
- La forme myélodysplasique, avec des leucocytes < 13 G/L, se rapprochant davantage des SMD (forme majoritaire)

Cette distinction est encore utilisée de nos jours. Il n'y a donc pas de présentation biologique et clinique spécifique de la LMMC.

Généralement, dans la LMMC, comme dans la plupart des SMD, il y a un contraste entre les cytopénies périphériques et la densité cellulaire médullaire importante : l'hématopoïèse médullaire est inefficace. Il s'en suit un défaut quantitatif et qualitatif de production de cellules matures, avec avortements précoces intramédullaires, à l'origine des cytopénies sanguines⁸. Les signes cliniques de la LMMC seront surtout ceux liés aux cytopénies⁹ :

- Pour la lignée érythrocytaire, on retrouvera une anémie plus ou moins profonde, pouvant provoquer : asthénie, pâleur, dyspnée d'effort, tachycardie... La tolérance de l'anémie sera dépendante du contexte et de l'état général du malade².
- Concernant la lignée leucocytaire, une leuco-neutropénie sera à l'origine d'infections, et ce d'autant plus que le taux de polynucléaires neutrophiles (PNN)

circulants sera faible : infections à bacille Gram négatif, chocs septiques, candidoses systémiques...

- La baisse plus ou moins sévère du taux de plaquettes sera à l'origine de signes hémorragiques, pouvant aller du purpura cutanéomuqueux à une hémorragie viscérale (beaucoup plus rare). A noter que l'importance des signes hémorragiques n'est pas forcément proportionnelle à la profondeur de la thrombopénie car il peut exister, ou non, une thrombopathie associée, liée à la dysmyélopoïèse².

Des symptômes communs avec les SMP peuvent également être retrouvés : fièvre, perte de poids, syndrome tumoral avec hépato-splénomégalie, et atteintes cutanées ou viscérales⁹.

Enfin, il n'est pas rare que la LMMC soit associée à des anomalies auto-immunes, tels que manifestations rhumatismales, vascularites ou périartérites noueuses, répondant bien aux corticoïdes².

2.3 Diagnostic

2.3.1 Critères OMS 2016

La révision 2016 de la classification OMS définit la LMMC selon cinq critères¹ :

- Monocytose persistante supérieure à 1G/L et représentant au moins 10% des éléments de la formule sanguine
- Absence de critères OMS évoquant une leucémie myéloïde chronique (LMC) BCR-ABL1 positive, une splénomégalie myéloïde chronique (SMC), une polyglobulie de Vaquez (PV) ou une thrombocytémie essentielle (TE)
- Absence de réarrangement des gènes *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *PCM1-JAK2*
- Pourcentage de blastes inférieur à 20% dans le sang et dans la moelle osseuse (sont intégrés dans le compte blastes, myéloblastes, monoblastes et promonocytes)
- Au moins un critère suivant :
 - o Dysplasie significative (>10%) sur au moins une lignée au myélogramme, et/ou présence d'une anomalie cytogénétique ou moléculaire acquise des cellules hématopoïétiques

- Monocytose persistante depuis au moins 3 mois, et exclusion d'autres causes de monocytose

L'OMS a également défini trois types de LMMC, basés sur le taux de blastes sanguins et médullaires (Tableau 1). La survie et le risque d'évolution en LAM sont corrélés à l'importance de l'infiltration blastique.

Tableau 1. Classification des différentes formes de LMMC et survie à 5 ans.

	% blastes sanguins	% blastes médullaires	Survie à 5 ans
LMMC Type 0	<2%	<5%	>50%
LMMC Type 1	2-4%	5-9%	35%
LMMC Type 2	5-19%	10-19% ou corps d'Auer	12%

2.3.2 Examens biologiques

Les deux examens principaux du diagnostic sont l'hémogramme et le myélogramme¹⁰ :

- L'hémogramme objective la monocytose et permet d'évaluer l'importance des cytopénies et de la blastose sanguine. L'analyse morphologique du frottis peut mettre en évidence des signes de dysplasies sur les différentes lignées (polynucléaires neutrophiles dégranulés ou pelgérés, poïkilocytose des hématies, macroplaquettes...).
- Le myélogramme quant à lui, permet d'évaluer l'infiltration blastique et de quantifier la dysmyélopoïèse, lignée par lignée. Par définition, une lignée est dysplasique si au moins 10% des éléments de la lignée présentent des anomalies morphologiques¹ (taille, noyau, cytoplasme...).

Un caryotype et une FISH (fluorescence par hybridation in situ) sur le prélèvement médullaire peuvent être effectués en vue de rechercher des anomalies cytogénétiques, ainsi que des anomalies moléculaires acquises. La biopsie ostéo-médullaire peut devenir nécessaire en cas d'aspiration médullaire non contributive ou difficile. La Haute Autorité de Santé (HAS) recommande également un dosage de la ferritinémie en vue d'établir un support transfusionnel et éviter la surcharge en fer¹⁰.

Les typages HLA et érythrocytaires sont aussi nécessaires, surtout dans le cas où une allogreffe de CSH serait envisagée.

D'autres examens complémentaires sont recommandés à titre systématique, afin d'éliminer les causes supplémentaires d'anémie^{8,10} : fer sérique, transferrine, vitamines B9 et B12, créatinine, bilan hépatique, bilirubine, haptoglobine, TSH, sérologies VIH, hépatite B et C.

2.3.3 Diagnostic différentiel

Le monocyte est, par nature, une cellule sanguine éphémère. Son délai de circulation dans le sang oscille entre trois et quatre jours, car il migre rapidement dans les tissus pour exercer sa fonction immunitaire. La monocytose est donc souvent associée à une hyperleucocytose dans un contexte inflammatoire biologique et clinique subaigu ou chronique.

Une difficulté du diagnostic d'une LMMC repose ainsi sur le fait qu'il existe de multiples autres causes à une monocytose : infection (parasitaire, bactérienne...), pathologie inflammatoire chronique (maladie auto-immune, maladie inflammatoire chronique, cancer...), autre hémopathie (LMC, leucémie aigue myélomonocytaire, maladie de Hodgkin, lymphome non hodgkinien), sortie d'aplasie⁹...

Avant de poser le diagnostic de LMMC, il faudra donc écarter toute cause réactionnelle et secondaire.

2.3.4 Aspect cytologique

Dans un prélèvement sanguin, les monocytes, qui représentent toujours au moins 10% du total des leucocytes, et par définition plus de 1 G/L, ne sont habituellement pas morphologiquement différents de monocytes issus de patients sains ou ayant une monocytose réactionnelle. Toutefois, il est parfois possible d'observer des monocytes hyperlobulés ou présentant des signes d'immaturation comme une basophilie plus prononcée du cytoplasme ou des granulations cytoplasmiques de grande taille. Des promonocytes peuvent également être présents. C'est principalement la lignée granuleuse qui présente des signes de dysplasies : polynucléaires neutrophiles hyposegmentés, hypercondensation chromatinienne, signes de pelgérization, dégranulation. Une anémie est parfois présente et

est le plus souvent normocytaire et normochrome. Les hématies peuvent également être dystrophiques, avec des anomalies de formes et de taille. Il est ainsi possible de retrouver une poïkilocytose chez les patients atteints de LMMC. Les plaquettes sont en nombre normal ou diminué, avec des signes de dysplasie parfois présents (macroplaquettes par exemple). Une blastose sanguine peut être retrouvée (de 1 à 19%) mais généralement inférieure à 5%^{11,12} (Figure 1, Figure 2).

Dans la pratique du laboratoire, en cas de monocytose chronique, le cytologiste s'attarde sur les anomalies éventuelles de la lignée neutrophile sanguine et sur la morphologie des hématies et des plaquettes. Les critères retenus en faveur ou non d'une LMMC orientent le clinicien sur l'intérêt de la réalisation d'un myélogramme afin de confirmer le diagnostic.

Le myélogramme est dans la majorité des cas hypercellulaire, avec une prolifération marquée de la lignée granuleuse. Parfois la lignée érythroïde est prédominante. De façon inconstante, on peut retrouver des promonocytes et l'excès de monocytes médullaires n'est pas toujours présent. Parmi les principales anomalies morphologiques décrites, les plus fréquentes concernent la lignée granuleuse avec une dysgranulopoïèse plus ou moins marquée, pouvant toucher les éléments matures et immatures (hyposégmentation, pelgérification, dégranulation). La lignée érythroblastique peut également être altérée avec des anomalies de dénucléation, présence de lacunes cytoplasmiques ou de ponctuations basophiles. La coloration de Perls peut mettre en évidence des sidéoblastes en couronne. Concernant les mégacaryocytes, on peut observer essentiellement des anomalies nucléaires ou des micromégacaryocytes. Une dysplasie est considérée comme significative si au moins 10% des éléments de la lignée présentent des anomalies morphologiques. La blastose médullaire n'excède jamais 20% (l'hémopathie serait alors classée en leucémie aiguë)¹².

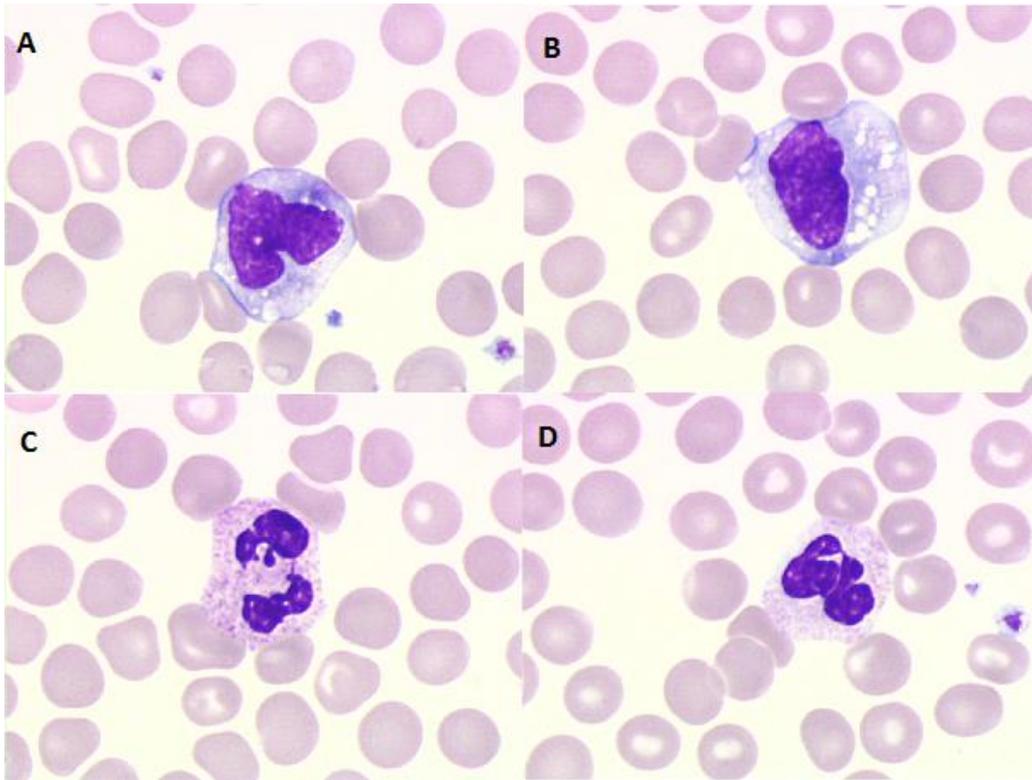


Figure 1. Cellules sanguines chez un patient en situation réactionnelle (syndrome inflammatoire) à l'objectif x600. A et B : Monocytes d'allure classique au noyau réniforme avec le cytoplasme gris-bleu, quelques vacuoles et granulations azurophiles. C et D : Polynucléaire neutrophile à noyau plurilobé et cytoplasme riche en granulations

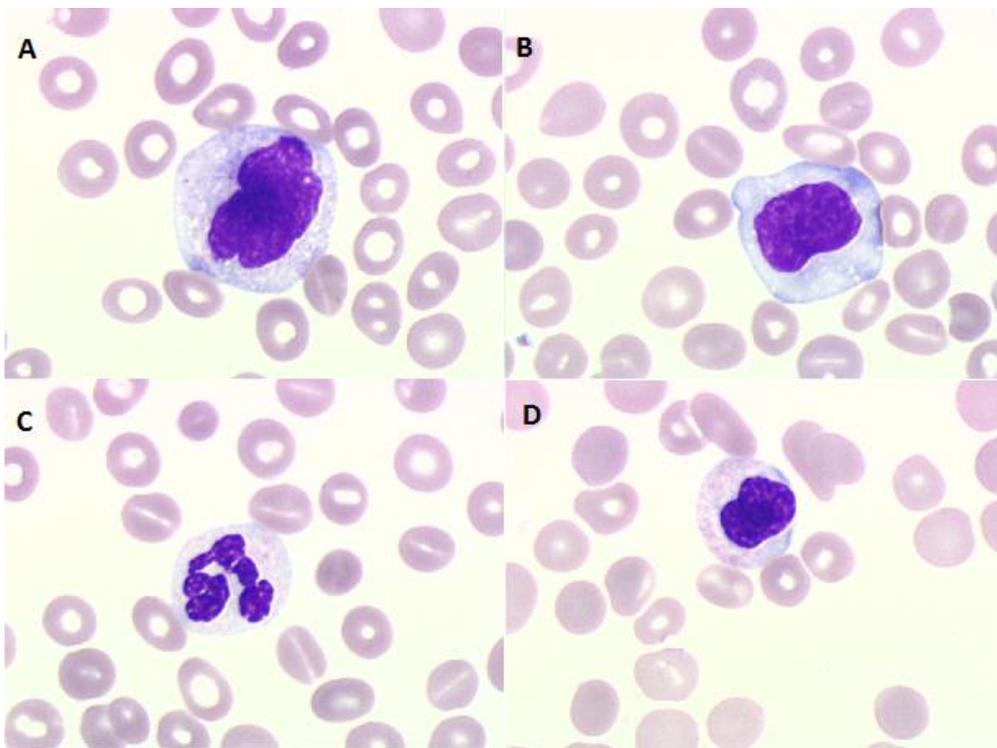


Figure 2. Cellules sanguines chez un patient atteint de LMMC à l'objectif x600. A et B : Monocytes d'allure immature. C : Polynucléaire neutrophile dégranulé et quelques stomatocytes. D : Polynucléaire neutrophile pelgésisé.

2.3.5 Aspect cytogénétique

Environ 30% (de 20 à 40% selon les études) des patients atteints de LMMC présentent des anomalies cytogénétiques chez la cellule souche hématopoïétique¹³. Parmi elles, les plus fréquemment retrouvées sont : la trisomie 8, le caryotype complexe (≥ 3 anomalies) et les anomalies sur le chromosome 7 (monosomie 7 ou del(7q))¹⁴. D'autres anomalies peuvent également être rencontrées mais de manière moins fréquente : del(11p), del(20q), hypodiploïdie, del(Y)...

La caractérisation de ces anomalies cytogénétiques a permis de stratifier trois groupes de patients, en matière de risque d'évolution péjorative en leucémie aiguë et de survie¹⁵ (Tableau 2).

Tableau 2. Classification du risque cytogénétique spécifique à la LMMC¹⁵

	Anomalies cytogénétiques	Risque d'évolution en LAM à 5 ans	Survie à 5 ans
Faible risque	del(Y), caryotype normal	27%	35%
Risque intermédiaire	Autres anomalies	33%	26%
Haut risque	Caryotype complexe, anomalies du chromosome 7, trisomie 8	42%	4%

2.3.6 Aspect moléculaire

On retrouve une ou plusieurs anomalies moléculaires chez environ 90% des patients atteints de LMMC. Ces mutations ne sont pas spécifiques et sont retrouvées dans d'autres hémopathies (SMP, SMD, LAM...)¹⁶. Notamment, différentes voies de signalisation cellulaire peuvent être touchées (Figure 3)¹⁷.

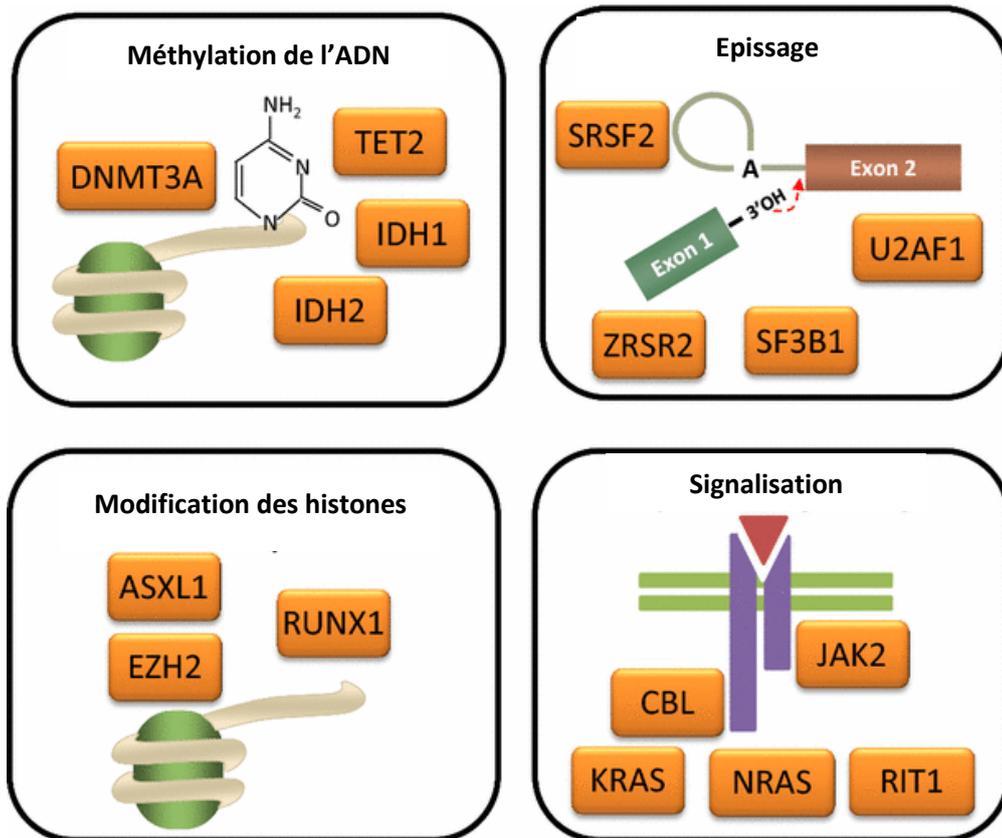


Figure 3. Les différentes voies de signalisation et les gènes touchés dans la LMMC (modifié d'après Itzykson *et al*¹⁷).

Certaines mutations impliquent les gènes régulateurs épigénétiques et donc la synthèse d'ADN. Il peut s'agir de gènes affectant la méthylation de l'ADN : *TET2* surtout, et *IDH1/IDH2* ; ou de gènes affectant la modification des histones : *ASXL1* principalement, et *EZH2*. *TET2* code pour une enzyme permettant la conversion de la 5-méthylcytosine (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), nucléotide intermédiaire dans la voie de déméthylation de l'ADN. Sa mutation (prédominante au niveau du site catalytique) va entraîner une diminution du taux de méthylation des sites CpG, à l'origine de la tumorigenèse myéloïde¹⁸. Pour sa part, la mutation de *ASXL1* va induire une diminution de la triméthylation de l'histone H3, à l'origine d'une dérégulation transcriptionnelle¹⁹. *EZH2* a aussi une fonction de triméthylation de l'histone H3 et sa mutation aboutira également à une augmentation de la transcription dans le clone leucémique²⁰.

Des mutations peuvent également toucher la voie du spliceosome, permettant l'épissage de l'ARN : *SRSF2* surtout, *SF3B1*, *ZRSF2*. *SRSF2* est de la famille des protéines riches en arginine/sérine et contribue à la fois à l'épissage constitutif et alternatif, grâce à sa liaison au motif de reconnaissance de l'ARN (RRM). La mutation va induire une altération de la

fonction, à l'origine du clone malin²¹. De plus, les mutations de *SRSF2* sont souvent associées à celles de *TET2*^{16,20}.

D'autres mutations affectent les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, parmi lesquelles *RUNX1*, *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *FLT3*, *CBL*, *TP53*... *RUNX1* est un facteur de transcription qui joue un rôle important pour l'hématopoïèse normale car il permet la régulation de la différenciation érythrocytaire, granulocytaire et monocytaire (régulation de l'expression de *CSF3*, *IL3*, *TCR* et *MPO*)²⁰. Les mutations de *RUNX1* peuvent être de plusieurs types (non-sens, faux-sens, silencieuses ou décalage du cadre de lecture) et sont associées à un risque accru d'évolution en LAM, surtout si la mutation touche la partie C-terminale²².

Parmi toutes ces mutations, certaines sont retrouvées de manière récurrente dans la LMMC : *TET2* (58%), *SRSF2* (46%), *ASXL1* (40%) et *RUNX1* (15%)²⁰. Certains patients peuvent présenter jusqu'à quatre voire cinq anomalies moléculaires pour un même clone¹⁶. Les mutations de *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL* et *IDH2* semblent être associées à un mauvais pronostic⁶.

2.4 Prise en charge

Même s'il n'existe pas de consensus international sur le traitement de la LMMC, la prise en charge globale aura des objectifs identiques, à savoir²³ :

- Corriger les cytopénies, ou pallier à leurs conséquences
- Retarder la transformation en leucémie aiguë myéloïde
- Prolonger la survie
- Améliorer la qualité de vie

Pour cela, il sera nécessaire d'évaluer le score pronostic du patient, en tenant compte de l'état général, de l'âge et des comorbidités.

2.4.1 Pronostic

Contrairement aux syndromes myélodysplasiques, il n'y a pas de consensus concernant un score pronostique sur la LMMC. Le score IPSS (International Prognostic Scoring System) qui a été établi pour les syndromes myélodysplasiques, ne semble pas être adapté

pour la LMMC, notamment pour la forme myéloproliférative (leucocytes > 13 G/L)³. Par conséquent, plusieurs scores pronostiques ont été proposés dans la littérature³ (Annexe1).

Parmi ces différents scores, certains paramètres semblent être de mauvais pronostic, tant en matière de survie, que d'évolution en LAM : une blastose importante (blastés circulants ou infiltration médullaire), la leucocytose (> 13 G/L ou > 15 G/L selon les auteurs), une anémie (< 10 g/dL), une thrombopénie (< 100 G/L). Plus récemment, les mutations de *ASXL1* ont été associées à un mauvais pronostic, à l'exclusion d'une mutation faux-sens qui n'aurait pas d'impact^{3,6}.

Cette stratification du risque permet de définir la prise en charge du patient. Pour les formes de faible risque, la priorité est donnée aux soins de support (il s'agit essentiellement de corriger des cytopénies). Pour les formes de risque plus élevé, l'objectif est de contrôler l'histoire naturelle de la maladie, en retardant l'évolution en leucémie aiguë myéloïde, stade ultime de la LMMC, à l'aide d'agents hypométhylants essentiellement et de greffe de CSH quand cela est possible¹⁷.

2.4.2 Traitement symptomatique

Pour la LMMC de faible risque, la prise en charge est sensiblement identique à celle des syndromes myélodysplasiques (bien que les données manquent pour la prise en charge spécifique de la LMMC) : le risque de transformation en LAM étant faible, le principal problème reste la prise en charge des cytopénies. En effet, les principaux signes cliniques sont ceux liés à l'anémie, présente chez plus de 80% des patients²³. Les traitements non toxiques ont ainsi pour objectif l'amélioration de la qualité de vie. Leur utilisation est indiquée pour les LMMC de faible risque, d'autant plus que la médiane d'âge dans cette population est élevée. Ces traitements de support sont aussi importants pour les LMMC de haut risque, et ce d'autant plus que les chimiothérapies cytotoxiques accentuent ces cytopénies.

i) Traitement de l'anémie

Il s'agit essentiellement d'un programme transfusionnel de culots globulaires. Il est recommandé par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

(ANSM) de réaliser des transfusions pour des taux d'hémoglobine inférieurs à 8 g/dL, ou à un seuil plus élevé, en cas de comorbidité ou de retentissement clinique. Cela induit un certain nombre d'effets indésirables : (i) une surcharge en fer, possible en cas de transfusions répétées et nécessitant un traitement chélateur de fer, (ii) un risque infectieux, très faible mais non nul, (iii) un risque d'hémolyse, (iv) un risque d'allo-immunisation et (iv) un risque de surcharge volémique, surtout chez les patients âgés²³. En raison de ces effets indésirables, l'attitude est d'avoir de plus en plus recours à des agents stimulant l'érythropoïèse (ASE), comme par exemple l'érythropoïétine (EPO) ou un dérivé synthétique, la darbépoétine alpha, d'action plus prolongée. Mais ces molécules n'ont pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans le cadre des SMD et de la LMMC²⁴.

ii) Traitement de la thrombopénie

La thrombopénie est présente chez environ 20% des patients au diagnostic. Elle est sévère (taux de plaquettes inférieurs à 20 G/L) chez seulement 3% des patients. Outre la diminution de la numération plaquettaire, la LMMC, comme les SMD, s'accompagne d'une thrombopathie liée à la dysmyélopoïèse²³. L'androgénothérapie (notamment par danazol ou DANATROL®), permet d'améliorer la thrombopénie chez environ 30% des patients, mais cette réponse est souvent de courte durée²³. Le romiplostim, un peptidomimétique activant le récepteur de la thrombopoïétine, a montré de bonnes réponses chez des patients présentant un SMD, mais n'a pas actuellement l'AMM en France pour cette indication^{23,24}.

iii) Traitement de la neutropénie

En dehors des chimiothérapies, les facteurs de croissance granulocytaire (G-CSF) comme le filgrastim ou lénograstim n'ont pas l'AMM en France pour le traitement de la neutropénie dans les SMD. La prise en charge consiste en une antibiothérapie à large spectre en cas d'infection²³.

2.4.3 Traitement spécifique

Les agents déméthylants sont aujourd'hui les plus utilisés dans la LMMC : 5-azacytidine (5-AZA ou VIDAZA®) et la décitabine (5-aza-2'-désoxycytidine ou DACOGEN®). L'azacytidine est un analogue de la pyrimidine dont le mécanisme d'action n'est pas parfaitement élucidé. Plusieurs mécanismes entreraient en jeu : une incorporation à l'ADN entraînant l'inactivation des ADN méthyltransférases et un mécanisme cytotoxique sur la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. L'hypométhylation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire entraînerait une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et la restauration de leur fonction. En France, l'azacytidine a l'AMM pour les LMMC et LAM ayant entre 10 et 29% de blastes médullaires, sans syndrome myéloprolifératif²⁴. Selon les différentes études, le taux de réponse globale (comprenant rémission complète, rémission partielle et rémission hématologique) est compris entre 25 et 73% et la médiane de survie est compris entre 12 et 37 mois³. Le schéma d'administration utilisé est une injection par voie sous-cutanée de 75mg/m²/j pendant un cycle de 7 jours, tous les 28 jours, pour un minimum de 6 cycles. Les principaux effets indésirables sont ceux liés aux cytopénies (infections, saignements, anémies) et peuvent entraîner un décalage des cycles ou une diminution des doses. La décitabine ne semble pas avoir démontré un bénéfice de survie et n'a pas l'AMM en France²³. Par ailleurs, aucune des mutations décrites dans la LMMC n'est prédictive de la réponse à ces traitements²⁵.

De nouvelles molécules sont en cours d'essais, que ce soit seules ou utilisées en association avec les agents hypométhylants. On y trouve les inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire en G1/S ou G2 et activent les voies d'apoptose, comme le panobinostat, le vorinostat ou l'entinostat. On y trouve également les inhibiteurs de farnésyl-transférase, ciblant la voie de signalisation Ras, comme tipifarnib ou lonafarnib^{20,23}.

En cas de signes de myéloprolifération, en revanche, le traitement pharmacologique utilisé est l'hydroxyurée (ou hydroxycarbamide, HYDREA®). Il s'agit d'un agent myélosuppresseur dont le mécanisme d'action est peu connu. Il inhibe la granulopoïèse, la

thrombopoïèse et l'érythropoïèse en inhibant la synthèse d'ADN sans altérer la synthèse d'ARN²⁴. Il permet de réduire la leucocytose et éventuellement la splénomégalie.

La chimiothérapie intensive, utilisant des anthracyclines, des inhibiteurs de topoisomérase ou la cytarabine, est moins utilisée aujourd'hui au profit de l'azacytidine. Ces chimiothérapies, comparables à celles administrées dans le traitement des LAM, sont surtout utilisées pour diminuer rapidement la blastose médullaire en vue d'une allogreffe de CSH^{5,23}.

2.4.4 Traitement curatif

A ce jour, l'allogreffe de CSH reste le seul traitement curatif de la LMMC. Il s'agit cependant d'un traitement à risque, particulièrement chez les patients âgés, ce qui est majoritairement le cas au moment du diagnostic de LMMC. En raison de la morbi-mortalité importante liée à la procédure de l'allogreffe et de l'âge au moment du diagnostic, peu de patient en bénéficient. Elle est réservée aux patients jeunes (généralement moins de 65 ans) et ayant des facteurs de mauvais pronostic, avec un risque élevé d'évolution en LAM. Le rapport bénéfice-risque d'une telle procédure doit être discutée en réunion pluridisciplinaire⁵. Les taux de rechute et de mortalité sont plus élevés que pour le traitement des autres hémopathies, avec une survie globale de l'ordre de 30 à 40%²⁶.

En 2013, une étude Suisse a proposé un algorithme décisionnel de prise en charge des LMMC, basé sur le score pronostique CPPS (new CMML-specific Prognostic Scoring System) défini en 2013 par Such *et al*^{9,15}. Un algorithme a également été proposé par Patnaik *et al*, en 2014 dans le British Journal of Heamatology³ (Annexe 2).

Afin d'harmoniser les différents essais autour de la LMMC et d'augmenter la puissance statistique des tests, une étude internationale a proposé en 2015 des critères de réponse au traitement (Annexe 3)²⁷.

3 Phénotypage monocytaire

3.1 Introduction

Depuis quelques dizaines d'années, les laboratoires ont accès à une technique qui permet de caractériser les différentes populations et sous-populations cellulaires sanguines et médullaires : la cytométrie en flux. Cette technique permet l'analyse sur un grand nombre d'éléments (plusieurs dizaines de milliers d'évènements par passage) individuellement (cellule par cellule), de plusieurs paramètres simultanément, à partir d'une suspension cellulaire hétérogène. L'identification de chaque cellule se fera à l'aide d'une combinaison d'anticorps, couplés à des fluorochromes, spécifiques d'antigènes membranaires ou cytoplasmiques.

3.1.1 Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux repose sur quatre systèmes successifs : la fluidique, l'optique, l'électronique et l'interface informatique.

i) La fluidique

A l'aide d'un liquide de gaine, le cytomètre va aspirer les éléments en suspension (le plus souvent du sang total) et entraîner les cellules une à une par un phénomène de focalisation hydrodynamique dans un courant continu de tampon isotonique (PBS le plus souvent). Chaque élément en suspension rencontre alors un faisceau laser qui va permettre d'en définir les caractéristiques (Figure 4)²⁸.

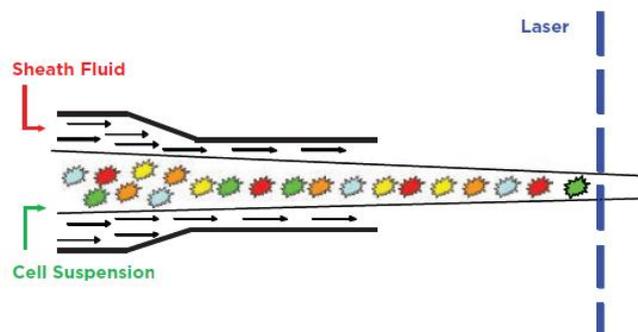


Figure 4. Schéma du phénomène de focalisation hydrodynamique, permettant le passage individuel des cellules devant un faisceau laser (d'après Betters et al, 2015²⁹)

ii) L'optique

Lors de la rencontre avec le faisceau laser, chaque cellule va disperser la lumière et donner des informations sur ses caractéristiques. La taille sera donnée par la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter ou FSC), tandis que la forme, la structure interne et la granulométrie seront données par la lumière diffusée aux grands angles, à 90° (Side Scatter ou SSC). En marquant les cellules par des anticorps couplés à des fluorochromes, le cytomètre sera également capable d'identifier les sous-populations, grâce à différents filtres et la sélection d'une longueur d'onde spécifique du fluorochrome. Les fluorochromes sont des molécules qui absorbent l'énergie lumineuse du faisceau laser, rentrent dans un état de plus haute énergie, et émettent de la lumière à une longueur d'onde précise, qui va varier selon le fluorochrome choisi (Tableau 3)³⁰.

Tableau 3. Exemple des principaux fluorochromes utilisés. FITC, isothiocyanate de fluorescéine ; PE, phycoerythrin ; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein ; APC, allophycocyanine. D'après Virgo et al, 2012³⁰.

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission	Couleur émise
FITC	488 nm	519 nm	Vert
PE	488 nm	578 nm	Jaune
PerCP	488 nm	678 nm	Rouge
APC	630 nm	660 nm	Rouge

Des photomultiplicateurs (classiquement appelés FL1, FL2, FL3, FL4...) détecteront ces signaux lumineux et les transformeront en signaux électriques (Figure 5).

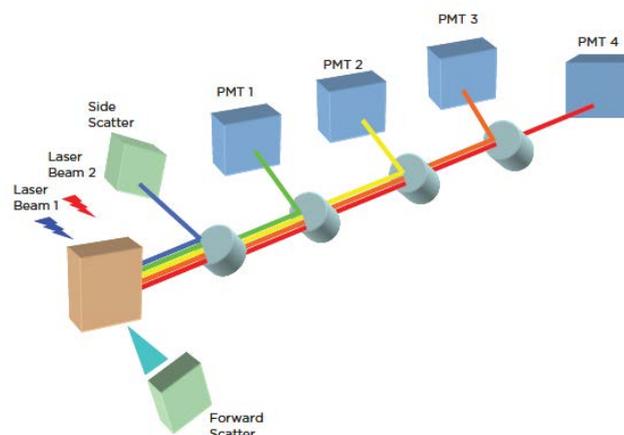


Figure 5. Schéma du système optique de la cytométrie en flux. (d'après Betters et al, 2015²⁹)

iii) *Electronique et informatique*

Les détecteurs de fluorescence sont des tubes photomultiplicateurs qui amplifient le faible signal lumineux émis par les cellules en un signal électronique. Celui-ci sera retranscrit par le système informatique sous forme d'histogramme, où chaque cellule (ou « évènement ») sera représentée par un point. Selon les caractéristiques des différents éléments, et l'expression de tel ou tel marqueur, l'utilisateur sera capable de définir les populations et sous-populations cellulaires cibles (Figure 6)³⁰.

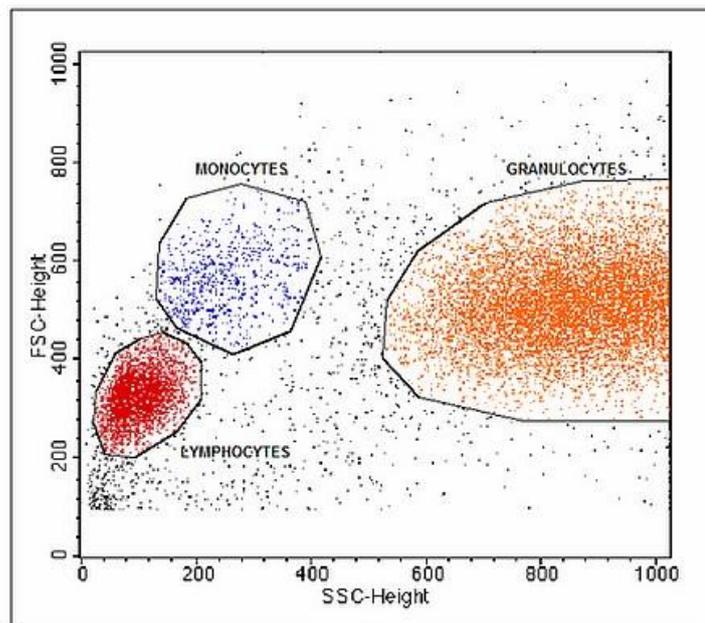


Figure 6. Exemple d'histogramme représentant les 3 sous-populations leucocytaires principales, définies selon les informations recueillies par la diffusion aux petits angles (FSC) et aux grands angles (SSC)

La cytométrie en flux est ainsi complémentaire de la lecture sur frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG), notamment lorsque la distinction morphologique des différentes sous-populations est délicate.

3.1.2 Le Monocyte

Le monocyte est une cellule qui appartient à la lignée myéloïde. Elle dérive d'une CSH qui a été orientée dans la voie de la granulo-monopoïèse pour devenir un précurseur granulocyte-monocyte (GMP) ou CFU-GM (colony forming unit granulocyte-monocyte). Puis

ce précurseur va se différencier, notamment sous l'action de l'interleukine-3 (IL-3), du GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et du M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), en monoblaste, promonocyte, puis monocyte³¹. La durée de maturation de la CSH jusqu'au monocyte mature est de cinq à sept jours. Celui-ci réside dans la moelle osseuse un jour avant de migrer dans la circulation sanguine où il persiste entre trois et quatre jours. Puis il va migrer par diapédèse au sein des divers tissus de l'organisme, devenir un macrophage (ou histiocyte) ou une cellule dendritique et exercer sa fonction dans l'immunité innée et adaptative. Il sera en outre capable de phagocyter les débris cellulaires et les agents pathogènes et de migrer dans des territoires précis en réponse à des agents chimiotactiques. Le monocyte fait également partie de la famille des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et pourra présenter les épitopes antigéniques des agents phagocytés aux cellules effectrices de l'immunité adaptatives (lymphocytes B, lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8) afin de déclencher la réaction immunitaire. Il a, en outre, une fonction de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). De plus, il a une importante fonction de sécrétion de cytokines. Après stimulation, il va synthétiser et sécréter des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 (interleukine-6), des molécules antivirales et anti-tumorales (interférons), des facteurs de croissances (G-CSF, GM-CSF, M-CSF), ainsi que des chimiokines pour amplifier la réponse immunitaire^{32,33}.

Dans la population générale, les monocytes circulants représentent environ 5 à 10% des éléments de la formule leucocytaire, pour un compte absolu compris entre 0.2 et 1.0 G/L.

Morphologiquement, le monocyte est une cellule de grande taille (entre 20 et 25µm de diamètre), arrondie ou quadrangulaire, à contour parfois irrégulier. Le cytoplasme est de couleur grise dite « en ciel d'orage » présentant quelques granulations azurophiles, des vacuoles peuvent également être présentes. Le noyau est réniforme, irrégulier, lobulé, avec une chromatine dense (Figure 1).

3.2 Phénotypage des monocytes hors LMMC

A partir des années 1980, différentes sous-populations de monocytes ont été identifiées. Chez les donneurs de sang sains, Akiyama *et al*, a isolé deux populations de monocytes par

centrifugation et élutriation. La population majoritaire, constituée de monocytes de grande taille, exprime une activité myéloperoxydase et phosphatase acide nettement plus marquée que la population de monocytes de plus petite taille. La première population a par ailleurs une fonction plus importante de phagocytose tandis que la deuxième a davantage une fonction de sécrétion de cytokines (IL-1, interféron) notamment après stimulation, et serait préférentiellement mobilisée du réservoir extracellulaire^{34,35}.

L'apparition de la cytométrie en flux a permis une description plus précise des monocytes, car les critères morphologiques et fonctionnels étaient peu spécifiques. Les monocytes présentent des marqueurs de surface³⁶ :

- CD45, qui est un antigène panleucocytaire
- CD13, CD33 et CD11b qui sont des marqueurs myéloïdes
- CD16, CD32 et CD64 qui sont des récepteurs pour la fraction Fc des immunoglobulines G (RFcy)
- Récepteurs du complément
- CD14 qui est récepteur du lipopolysaccharide (LPS) et possède une ancre GPI. C'est également l'antigène monocytaire
- D'autres molécules telles que : HLA-DR, CD38, CD163...

Les monocytes ont donc d'abord été définis par l'expression du CD14 puis dans un second temps, différenciés selon l'expression de CD16. C'est ainsi qu'ont été identifiées plusieurs populations de monocytes : ceux dits « classiques », CD16⁻, correspondant aux grands monocytes décrits plus haut, et ceux dits « non-classiques », CD16⁺, correspondant aux petits monocytes. Ces derniers ont une plus forte expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II d'une part, et de TNF (tumor necrosis factor) après stimulation des TLR (Toll-like receptor) d'autre part³⁷.

3.2.1 Situation physiologique

Désormais, trois populations de monocytes sont définies par cytométrie en flux (Figure 7)^{30,35,36} :

- Les monocytes « classiques » $CD14^+/CD16^-$, représentant environ 85% des monocytes chez l'individu sain. Ils se caractérisent essentiellement par leur fonction de phagocytose et par un haut niveau de sécrétion de cytokines (IL-10, G-CSF, CCL2 et IL-6, notamment sous l'action du LPS), d'expression de récepteur de chimiokines CCR2 et un faible niveau de CX3CR1.
- Les monocytes « non-classiques » $CD14^{low}/CD16^+$ qui représentent 10% des monocytes. Leur principale fonction est la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-12, IFN γ , TNF α ainsi que des molécules oxydantes comme le NO). Ils sont liés au processus inflammatoire. Ils expriment fortement CX3CR1.
- Les monocytes « intermédiaires » $CD14^+/CD16^+$, représentant 5% des monocytes. Ils ont des fonctions à la fois de phagocytose et dans l'inflammation, avec des capacités de migration en réponse aux chimiokines et de présentation d'antigène aux cellules responsables de l'immunité acquise.

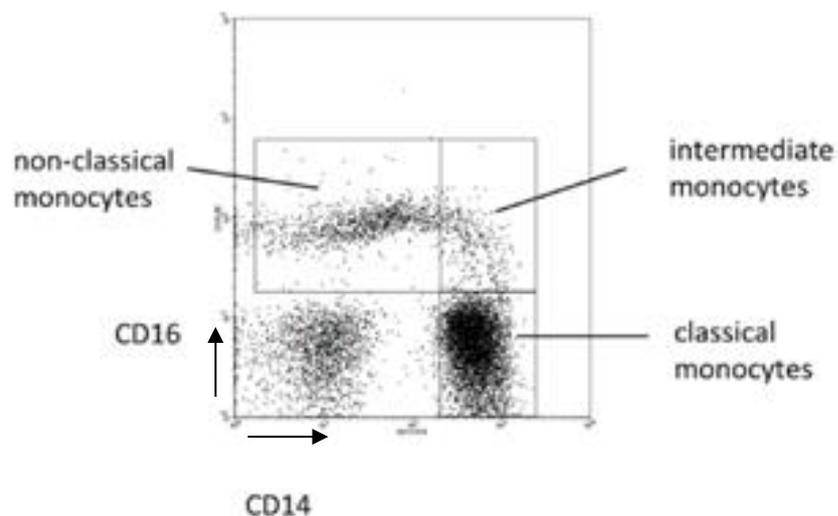


Figure 7. Distribution des trois sous-populations de monocytes chez un individu sain. Adapté de Ziegler-Heitbrock et al³².

3.2.2 Situations réactionnelles

Le nombre de monocytes sanguins augmente de manière significative lors de nombreuses situations inflammatoires. Cette monocytose est réactionnelle et le plus souvent transitoire : elle peut durer de quelques jours à quelques mois puis disparaît avec le traitement de la cause sous-jacente. Parmi ces situations réactionnelles, on retrouve entre autres les infections bactériennes (dans ce cas, la monocytose est souvent associée à une polynucléose neutrophile), les parasitoses, les états inflammatoires chroniques (lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde), les maladies cancéreuses (tumeurs solides, lymphomes non hodgkinien et lymphome de Hodgkin), les phases de régénération médullaire en sortie d'aplasie, les hépatopathies chroniques... Plusieurs études ont analysé la distribution des sous-populations monocytaires, dans ces différents contextes.

i) Pathologies auto-immunes

En 2002, Kawanaka *et al*, montrent que le taux de monocytes exprimant le CD16 augmente de manière significative dans la polyarthrite rhumatoïde (PAR) par rapport aux individus sains. Ces monocytes expriment davantage CCR1, CCR5 et la protéine d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule)³⁸. Cette étude rejoint celle qui fut réalisée par Mukherjee *et al*, décrivant une augmentation significative de l'expression de CD16, et donc un nombre accru de monocytes intermédiaires et non-classiques, au cours du sepsis et du lupus érythémateux systémique (LES)³⁹. Paradoxalement, dans un article paru en 2014 dans *Arthritis and Rheumatology*, l'équipe de Rojas montre que la proportion de monocytes intermédiaires est plus faible dans le LES actif, par rapport au LES inactif, au groupe contrôle ou aux autres pathologies auto-immunes. En outre, ils montrent une plus faible expression de HLA-DR sur les monocytes classiques et suggèrent l'existence d'un rétrocontrôle de cette expression sous l'influence de l'IL-10⁴⁰.

Dans la maladie de Crohn, il a été observé une augmentation des monocytes intermédiaires, et une diminution de cette population sous glucocorticoïdes⁴¹. Dans le cas de la PAR traitée, une équipe italienne a mis en évidence une diminution du taux de monocytes intermédiaires, par rapport aux patients non traités⁴². Une autre étude a montré que la population CD14⁺/CD16⁺ était augmentée dans la sarcoïdose cardiaque, et diminuait après

traitement par des corticoïdes, ce qui pourrait constituer un éventuel marqueur de l'inflammation dans ce contexte⁴³. Il semblerait donc que cette population monocyttaire intermédiaire soit augmentée dans différentes pathologies auto-immunes et diminuerait après traitement de la cause sous-jacente.

ii) Contextes infectieux

Les infections, qu'elles soient bactériennes (notamment les infections à bacilles Gram négatif, la tuberculose, ou le sepsis néonatal), virales (principalement VIH), ou parasitaires (paludisme par exemple), entraînent également une augmentation du taux de monocytes intermédiaires et non-classiques. Dès 1996, une étude a décrit une augmentation de l'expression de RFcγ III (récepteur III à la fraction Fc des immunoglobulines, équivalent au CD16) sur les monocytes en cas d'hémocultures positives à bactéries, notamment à bacilles Gram négatifs. Cette expression serait liée au rôle joué par le lipopolysaccharide (LPS) présent à la membrane des bactéries qui activerait entre autres les lymphocytes T et NK producteurs d'IFNγ. Ce dernier exerçant son action sur les monocytes qui expriment alors le CD16⁴⁴. Dans un cas de bactériémie induite, il a été mis en évidence une élévation de la température corporelle et une augmentation des taux de cytokines (telles que TNFα, IL-6, M-CSF) avant le pic sanguin de monocytes intermédiaires, ce qui suggère un lien entre ces deux événements⁴⁵. De même, il semblerait qu'il y ait une augmentation de l'expression du CD16 sur les monocytes participant à la lutte contre l'infection à *Plasmodium falciparum*, par un mécanisme de phagocytose et d'opsonisation des hématies infectées à l'aide d'anticorps et du complément⁴⁶.

iii) Pathologies cardiovasculaires

D'autres situations semblent accroître l'expression du CD16 par les monocytes, comme l'athérosclérose, la dialyse et autres circuits extra-corporels, mais également le stress. Cette augmentation est probablement due à la démargination des populations monocytaires intermédiaires et non-classiques, liée aux catécholamines. En effet, la dopamine augmenterait les capacités de migration et d'adhésion des monocytes CD14⁺/CD16⁺⁴⁷. Récemment, une étude a montré un lien entre les monocytes CD14⁺/CD16⁺ et la physiopathologie de la

fibrillation atriale, car ils sembleraient impliqués dans le remodelage fonctionnel de l'oreillette gauche⁴⁸. Il semblerait également que l'expression du CD16 augmente dans un contexte d'insuffisance cardiaque ischémique, aiguë ou stable, et qu'un taux élevé de monocytes intermédiaires serait associé à un plus mauvais pronostic dans l'ischémie aiguë⁴⁹. Une étude similaire décrit une diminution du taux de monocytes classiques et une augmentation du taux des monocytes intermédiaires et non-classiques au cours du diagnostic de l'insuffisance cardiaque décompensée, par rapport aux individus sains. Inversement, il y aurait une augmentation des monocytes classiques CD14⁺/CD16⁻ après la prise en charge de la cardiopathie⁵⁰.

Dans la pré-éclampsie, l'expression du CD16 serait augmentée par rapport aux grossesses normales, et le taux de monocytes CD14⁺/CD16⁺ serait corrélé à la sévérité de la pré-éclampsie⁵¹.

iv) Cancer et néoplasies

L'étude des populations monocytaires dans le cancer a été étudiée depuis les années 1990. Dès 1995, dans un article paru dans *Blood*, une équipe décrit une augmentation de l'expression du CD16 dans le carcinome gastro-intestinal par rapport au groupe contrôle, bien que le rôle de cette sous-population ne fût à l'époque pas décrit. Par la suite, d'autres travaux montreront un phénomène similaire dans d'autres cancers solides⁵².

D'après Jiang *et al*, il y aurait une proportion élevée de monocytes CD16⁺ au diagnostic des leucémies aiguës, par rapport aux patients en rémission ou non malade⁵³. Dans le cancer du sein, notamment à un stade précoce, il aurait été observé un taux plus élevé de monocytes CD16⁺ par rapport au groupe contrôle. Dans cette même étude, après obtention d'une suspension cellulaire à partir d'une tumeur, un taux élevé de monocytes CD16⁺ a également été décrit, ce qui laisserait supposer un lien entre l'expression de CD16 et la tumorigenèse⁵⁴.

La population de monocytes CD16⁺ (intermédiaires et non-classiques) est donc augmentée dans divers processus inflammatoires, infectieux ou néoplasiques et diminue le plus souvent après traitement de la cause initiale.

Un modèle a été proposé par l'équipe de Koch en 2010, concernant le comportement des populations monocytaires dans les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn. Les monocytes classiques $CD14^+/CD16^-$, majoritaires dans la circulation, exprimeraient le CD11a sous l'action de facteurs chimiotactiques, comme le $TNF\alpha$ ou l' $IL-1\beta$. CD11a, aussi appelé LFA-1 (leucocyte function-associated antigen-1 α -chain) va permettre l'extravasation des monocytes au sein des tissus cibles. Sous l'action de cytokines telles que M-CSF, $TGF-\beta$ et IL-10, les monocytes vont alors exprimer le CD16, et de manière concomitante le CD54, aussi appelé ICAM-1 qui est un facteur d'adhésion, ce qui renforcera l'ancrage tissulaire des monocytes. Parallèlement, l'expression de CX3CL1 sera augmentée ce qui favorisera l'adhésion des monocytes. Ces monocytes, alors de phénotypes $CD14^+/CD16^+$, occuperont leur fonction de sécrétion de cytokines, de phagocytose et de présentation d'antigènes afin d'orienter la réponse immunitaire. Cette population va également être capable de retourner dans la circulation sanguine, ce qui tend à prouver que le principal réservoir des monocytes pro-inflammatoires $CD16^+$ est tissulaire et non circulant (Figure 8)⁴¹.

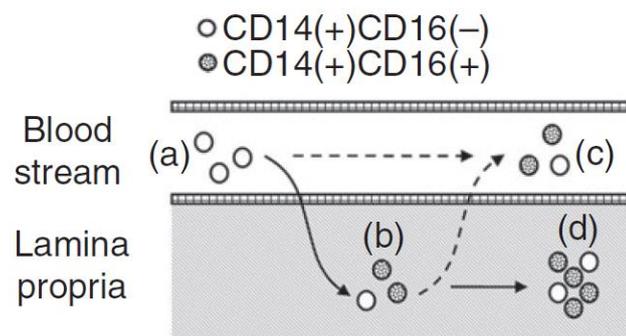


Figure 8. Modèle d'enrichissement en monocytes $CD16^+$ au cours des maladies inflammatoires de l'intestin. D'après Koch et al⁴¹.

3.3 Phénotypage des monocytes dans la LMMC

Dans une étude publiée dans *Blood* en 2015, une équipe du groupe francophone des myélodysplasies a étudié la distribution des différentes populations monocytaires dans le cadre de la LMMC. Ils ont décrit une augmentation significative du pourcentage de monocytes classiques dans la LMMC par rapport aux autres sous-populations (non-classiques et intermédiaires), et ce indépendamment du compte absolu des monocytes circulants. Un seuil décisionnel de 94% de monocytes classiques a été défini à partir d'une analyse de courbe ROC

(Receiver Operating Characteristic). Un taux de monocytes classique supérieur au seuil de 94% serait en faveur du diagnostic de LMMC, avec une spécificité et une sensibilité respectivement de 94.5% et 91.7%. Par ailleurs, chez les patients traités par azacytidine, il y aurait une diminution du taux de monocytes classiques, parallèlement à une diminution du compte absolu de monocytes.

Les auteurs ont également comparé les critères « compte absolu de monocytes > 1G/L » dans les critères OMS et « taux de monocytes classiques > 94% ». Ils ont conclu à une spécificité équivalente (respectivement 94.1% et 95.3%) mais une sensibilité supérieure (respectivement 91.9% et 62.0%) pour le diagnostic de LMMC lorsque ce seuil est appliqué. Ils montrent en effet que la plupart des patients diagnostiqués SMD avec une monocytose fluctuante autour de 1G/L seraient en réalité des vrais cas de LMMC.

En revanche, le pourcentage de monocytes classiques est indépendant du statut de la LMMC, avec des taux similaires pour les LMMC dysplasiques ou prolifératives, et du sous-type OMS (LMMC 1 ou 2), la LMMC 0 n'ayant pas été étudiée car l'étude est antérieure à la classification OMS 2016.

D'après cette étude, le pourcentage de monocytes classiques pourrait ainsi constituer un marqueur de diagnostic de LMMC, et de suivi chez les patients traités par agents déméthylants. De plus, ce nouvel outil permettrait d'être plus rapide dans le diagnostic de la LMMC et de s'affranchir du délais de 3 mois nécessaire pour objectiver la chronicité de la monocytose⁵⁵.

4 Etude au CHU de Toulouse

4.1 Objectifs

L'objectif de cette étude a été de vérifier que le seuil proposé dans cet article (94% de monocytes CD14⁺/CD16⁻) peut être appliqué en pratique quotidienne au CHU de Toulouse, pour le diagnostic de la LMMC. En collaboration étroite avec les cliniciens, nous avons récupéré des échantillons de sang total de différents patients atteints de LMMC ou non, et nous avons mis au point une stratégie de fenêtrage des leucocytes pour cibler les différentes populations de monocytes. Outre la population de monocytes « classiques », nous avons

également étudié la répartition des autres sous-populations. Les critères retenus pour le diagnostic de la LMMC sont ceux de la classification OMS 2016.

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 Echantillons de patients

Le sang périphérique de patients a été collecté sur tube EDTA. Au total 99 patients ont été inclus dans l'étude : 44 cas de LMMC et 55 cas non-LMMC. Les patients ont été inclus d'août 2015 à avril 2017, et ont entre 27 et 91 ans (moyenne : 68.8 ans).

Les critères d'inclusion en LMMC sont ceux de la classification OMS 2016 :

- Monocytose chronique > 1G/L et représentant au moins 10% du total des leucocytes.
- Absence de critères OMS en faveur d'une LMC, d'une PV, d'une SMC ou d'une TE
- Absence de réarrangement de PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, ou PCM1-JAK2
- Moins de 20% de blastes sanguins ou médullaires
- Au moins un critère suivant :
 - o Dysplasie significative (>10%) sur au moins une lignée au myélogramme, et/ou présence d'une anomalie cytogénétique ou moléculaire acquise
 - o Monocytose persistante depuis au moins 3 mois, et exclusion d'autres causes de monocytose

Dans les cas où le prélèvement médullaire n'a pas été effectué, et où on ne retrouve pas de blaste circulant et si tous les autres critères sont présents, les patients sont classés par défaut en LMMC-0.

Les patients ayant un taux de monocytes inférieur à 1 G/L ont été toutefois inclus dans l'étude lorsque ce taux était compris dans l'intervalle de l'incertitude de mesure de 23% (établie lors de la validation de méthode des monocytes), soit des taux de monocytes supérieurs à 0.8 G/L. Les caractéristiques des patients de l'étude sont détaillées dans le Tableau 4 et les cas non-LMMC sont précisés dans la Figure 9.

Au total, 30 patients ont un taux de monocytes inférieur à 10% (28 non-LMMC et 2 LMMC) et 5 patients ont entre 0.8 et 1G/L de monocytes (3 non-LMMC et 2 LMMC).

Tableau 4. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude

	LMMC (n=44)	Non-LMMC (n=55)
Age médian en années (intervalle)	76.5 (42-91)	68 (27-89)
Masculin/Féminin	31/13	37/18
Leucocytes en G/L (intervalle)	9.22 (4.74-52.11)	16.34 (3.78-718.9)
Leucocytes <13 / >13	30/14	16/39
Hémoglobine en g/dL (intervalle)	11.55 (6.8-16.9)	10.7 (3.9-17.2)
Taux plaquettaire en G/L (intervalle)	104 (22-352)	257 (8-1744)
Taux de monocytes en G/L (intervalle)	2.45 (0.9-18.2)	1.6 (0.8-21.6)
Taux de monocytes en % (intervalle)	28.4 (6.1-68.1)	12.4 (2.0-56.0)
LMMC type 0/1/2	24/13/7	

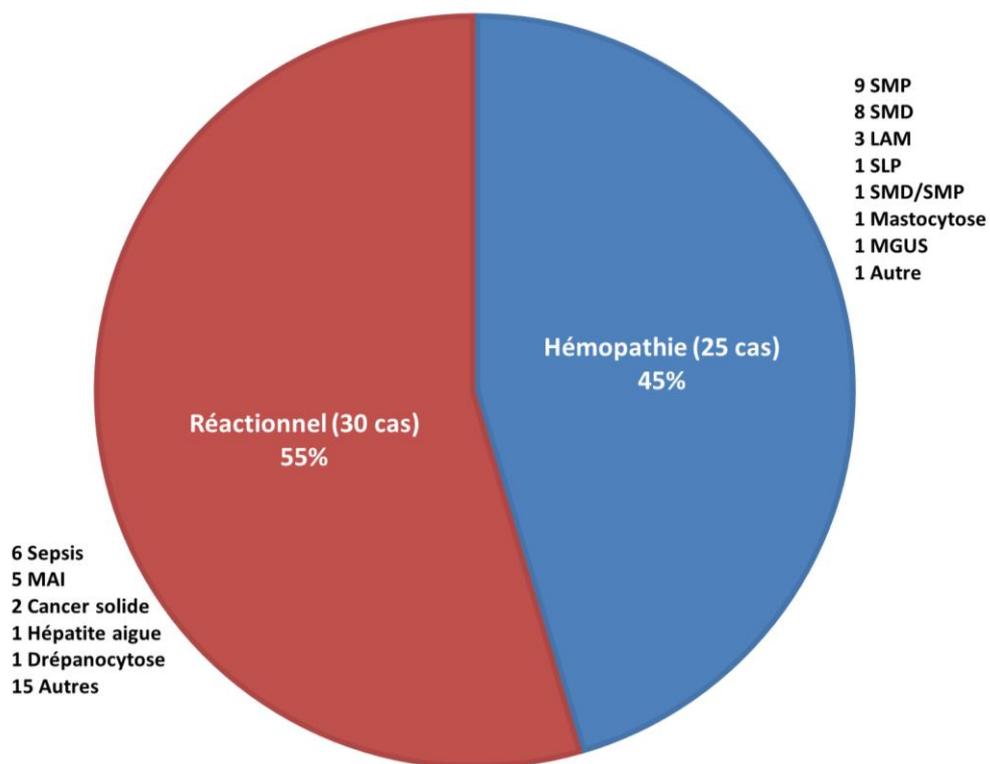


Figure 9. Répartition des cas de non-LMMC selon les différentes pathologies. SMP : syndrome myéloprolifératif ; SMD : syndrome myélodysplasique ; LAM : leucémie aigüe myéloïde ; SLP : syndrome lymphoprolifératif ; SMD/SMP : syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif ; MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée ; MAI : maladie auto-immune.

4.2.2 Cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé est le NAVIOS® (BECKMAN COULTER®). 100µL de sang total EDTA est mis en contact avec un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes (Tableau 5).

Les globules rouges sont ensuite lysés par 2mL de tampon de lyse (obtenu en diluant au 1/10^e la solution BD FACS lysing Solution 10X), et incubés 10 minutes à l’abri de la lumière à température ambiante, puis centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minutes à 22°C. Le culot contenant les cellules nucléées est mis en contact avec 2mL de Cell Wash, puis de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions. Enfin, les cellules restantes du culot sont mises en suspension dans 250µL de Cell Wash. L’acquisition a été effectuée sur au moins 40 000 événements. L’analyse des données obtenues est enfin réalisée à l’aide du logiciel Kaluza®.

Tableau 5. Liste des différents anticorps couplés à leurs fluorochromes.

Fluorochrome	Cible	Volume (µL)	Canal
FITC	CD2	10	FL1
PE	CD16	10	FL2
PECF594	CD56	5	FL3
APC	CD14	2	FL6
AA750	CD24	5	FL8
BV510	CD45	5	FL10

4.2.3 Cytologie

Les numérations et formules sanguines ont été réalisées sur l’automate XN2000 de la société Sysmex® au CHU de Toulouse à partir de prélèvements EDTA.

Les frottis sanguins et médullaires nécessaires à l’analyse morphologique des cellules ont été obtenus par l’étalement sur lame d’une goutte de sang ou de moelle osseuse, puis coloration au May-Grünwald-Giemsa. Cette analyse a permis d’orienter ou non sur le diagnostic de LMMC selon les critères de l’OMS.

4.2.4 Tests statistiques

Les courbes ROC ont été construites à l’aide du logiciel Medcalc® pour chaque sous-population de monocytes, et pour l’ensemble de la cohorte et également pour les deux sous-cohortes : les formes dysplasiques (leucocytose inférieure à 13 G/L) et les formes prolifératives (leucocytose supérieure ou égale à 13 G/L). Le point d’inflexion de ces courbes a permis de définir le seuil diagnostique de chaque population, correspondant au meilleur

compromis statistique entre la valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN). L'objectif sera d'obtenir une AUC (aire sous la courbe) calculée la plus proche de 1 (correspondant théoriquement à une sensibilité et une spécificité de 100%). Rappelons que la VPP est la probabilité que le patient, dont le test est positif, soit effectivement malade, et que la VPN est la probabilité que le patient, dont le test est négatif, soit effectivement non-malade. Les différents groupes étudiés ont été présentés sous forme de graphe à l'aide du logiciel GraphPad Prism® avec les seuils ainsi définis. Sur chaque graphe, les patients faux positifs et faux négatifs sont précisés.

4.3 Résultats

4.3.1 Stratégie de fenêtrage

Les doublets sont d'abord éliminés selon les pratiques usuelles du laboratoire (A, Figure 10), puis les monocytes sont ciblés sur le graphe CD45⁺/SSC comme exprimant de manière intermédiaire le CD45 (nuage orange, B). De cette population sont exclus les granulocytes et les lymphocytes B exprimant le CD24 (C), ainsi que les cellules NK exprimant le CD56 (D) et les lymphocytes T exprimant le CD2 (E). Le graphe « monocytes + lymphocytes » nous permet d'établir le contrôle interne de CD16, étant donné qu'il existe deux populations de lymphocytes (exprimant ou non le CD16), la frontière entre les deux nuages constituera le seuil d'expression du CD16 (F). De la même manière, les monocytes exprimant majoritairement le CD14, le nuage de monocytes « classiques » nous permet d'établir le seuil d'expression du CD14 (G). A partir de ces seuils, les trois sous-populations de monocytes sont identifiées, et quantifiées en pourcentage de l'ensemble des monocytes. Enfin, sur le graphe CD14⁺/CD16⁺, les populations double-négatif sont exclues (Figure 10). Cette procédure de retraitement des données brutes est répétée pour chacun des patients.

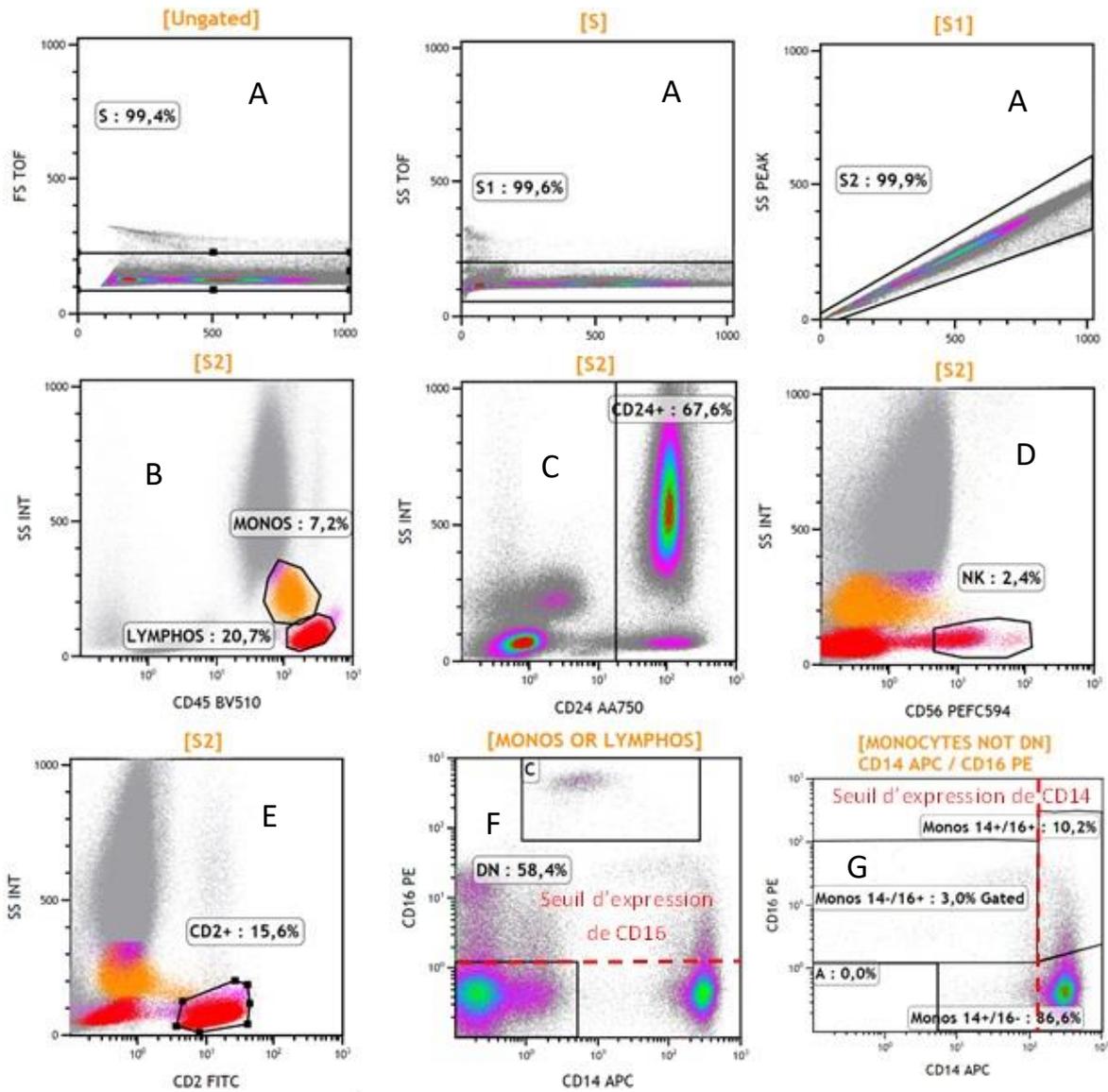


Figure 10. Stratégie de fenêtrage des sous-populations de monocytes à partir de sang total. Après avoir éliminé les doublets (A) et à partir du fenêtrage des monocytes (B), sont exclues les cellules exprimant CD24 (C), CD56 (D), CD2 (E), ainsi que les doubles négatifs 14⁻/16⁻ (F et G).

Ci-dessous un exemple de graphe chez un patient sain (non-LMMC) avec les trois sous-populations : CD14⁺/CD16⁻ (86.09%), CD14⁺/CD16⁺ (5.0%) et CD14⁻/CD16⁺ (8.64%) (Figure 11).

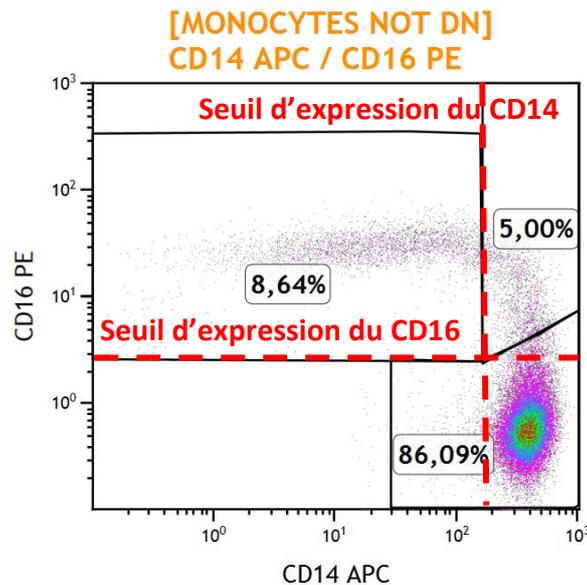


Figure 11. Graphe définissant les trois sous-populations de monocytes. L'expression de CD14 est exprimée en abscisse, celle de CD16 en ordonnée. Les seuils d'expression de CD14 et CD16 peuvent varier d'un patient à l'autre.

4.3.2 Démographie de l'étude

Concernant les cas de LMMC, nous obtenons une médiane d'âge à 76.5 ans, avec un ratio hommes/femmes à 2.4/1, ce qui est comparable à ce qui est habituellement décrit dans la littérature (respectivement 78 ans et 2.3/1 dans l'étude récente de Selimoglu-Buet et al⁵⁵). Les patients non atteints de LMMC se répartissent de manière relativement similaire entre les pathologies réactionnelles et les hémopathies non-LMMC, avec respectivement 30 cas et 25 cas. Au sein des cas de LMMC, nous observons une répartition entre les formes hyperleucocytaires (≥ 13 G/L, n=14) et non-leucocytaires (< 13 G/L, n=30) identique à ce qui est habituellement rapporté dans la littérature (environ respectivement 1/3 et 2/3 des cas).

4.3.3 Comportement des sous-populations dans la LMMC et le groupe contrôle

Plusieurs profils de graphe ont été obtenus selon les différentes situations de patients (Figure 12). Dans cet exemple, il existe pour le cas LMMC (D) une très nette prédominance de la population de monocytes classiques (98.4%) par rapport aux monocytes intermédiaires (1.0%) et non classiques (0.6%). Dans les autres cas, et notamment dans un cas syndrome

inflammatoire sévère (C), l'expression de CD16 est bien plus marquée : les taux de monocytes classiques, intermédiaires et non-classiques sont respectivement à 68.5%, 15.8% et 15.3%.

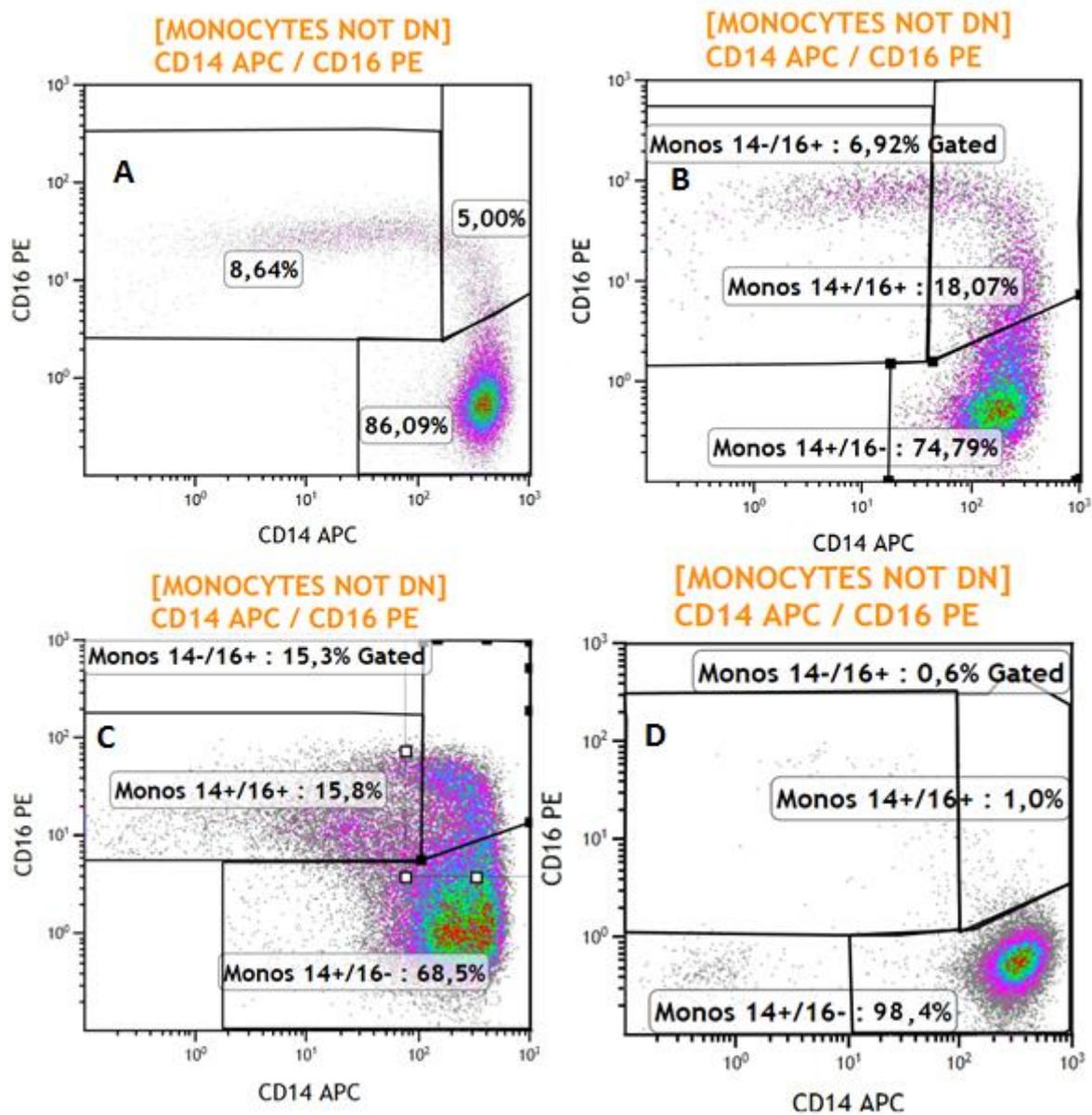


Figure 12. Exemples de graphes obtenus par cytométrie en flux. A : syndrome myéloprolifératif (SMP) ; B : syndrome myélodysplasique (SMD) ; C : état inflammatoire sévère ; D : LMMC-0

Nous avons ensuite voulu déterminer s'il était plus pertinent d'utiliser le pourcentage de ces populations par rapport au total des monocytes ou bien leur valeur absolue.

4.3.3.1 Pourcentage des sous-populations : LMMC versus non-LMMC

Les patients atteints de LMMC présentent une population de monocytes « classiques » CD14⁺/CD16⁻ supérieure à celle des patients contrôles (situations réactionnelles et autres hémopathies), soit respectivement 94.52% et 82.88%. Inversement, le pourcentage des populations de monocytes « intermédiaires » CD14⁺/CD16⁺ et « non-classiques » CD14⁻/CD16⁺ est plus faible dans la LMMC par rapport aux autres situations (respectivement 1.16% vs 3.95%, 5.68% vs 10.79%). Ces différences observées se retrouvent également lorsque l'on compare les groupes LMMC vs hémopathie d'une part, et LMMC vs réactionnel d'autre part. Si l'on tient compte de chaque sous-type de LMMC, on observe que le taux de monocytes classiques est plus faible dans la LMMC-2 par rapport aux autres sous-types (LMMC-1 et LMMC-0) avec respectivement 91.17%, 97.58% et 93.84%, et que le taux de monocytes non-classiques est plus important (respectivement 1.65%, 0,75% et 1.25%) (Tableau 6).

Tableau 6. Pourcentage moyen des sous-populations de monocytes

	%CD14⁺/CD16⁻ moyenne (écart- type)	%CD14⁺/CD16⁺ moyenne (écart-type)	%CD14⁻/CD16⁺ moyenne (écart- type)
LMMC global (n=44)	94.52 (5.20)	3.95 (3.99)	1.16 (1.18)
- Type 0 (n=24)	93.84 (5.16)	4.92 (4.26)	1.25 (1.40)
- Type 1 (n=13)	97.58 (1.79)	1.67 (1.86)	0.75 (0.45)
- Type 2 (n=7)	91,17 (7.08)	4.85 (4.64)	1.65 (1.15)
Non-LMMC (n=55)	82,88 (11.55)	10,79 (9.32)	5,68 (4.35)
- Hémopathie (n=25)	85.27 (11.04)	8.05 (7.71)	5.23 (4.42)
- Réactionnel (n=30)	80.88 (11.77)	13.07 (10.03)	6.04 (4.32)

4.3.3.2 Valeur absolue des sous-populations : LMMC versus non-LMMC

Il existe une différence significative entre les patients atteints de LMMC et le groupe contrôle lorsque la valeur absolue des sous-populations de monocytes est étudiée (Tableau 7). Cependant, les différences observées sont moins marquées avec les valeurs absolues qu'avec les pourcentages (Figure 13). Pour le reste de l'étude nous nous sommes concentrés uniquement sur le pourcentage des sous-populations.

Tableau 7. Valeur absolue moyenne des sous-populations de monocytes

	CD14⁺/CD16⁻ (G/L) moyenne (écart-type)	CD14⁺/CD16⁺ (G/L) moyenne (écart-type)	CD14⁻/CD16⁺ (G/L) moyenne (écart-type)
LMMC global (n=44)	3.32 (3.03)	0.13 (0.17)	0.033 (0.031)
- Type 0 (n=24)	2.37 (1.53)	0.14 (0.18)	0.031 (0.036)
- Type 1 (n=13)	5.32 (4.35)	0.12 (0.16)	0.035 (0.025)
- Type 2 (n=7)	2.89 (2.51)	0.14 (0.16)	0.040 (0.022)
Non-LMMC (n=55)	2.18 (3.02)	0.23 (0.22)	0.135 (0.179)
- Hémopathie (n=25)	3.11 (4.29)	0.23 (0.27)	0.166 (0.241)
- Réactionnel (n=30)	1.41 (0.63)	0.23 (0.18)	0.110 (0.101)

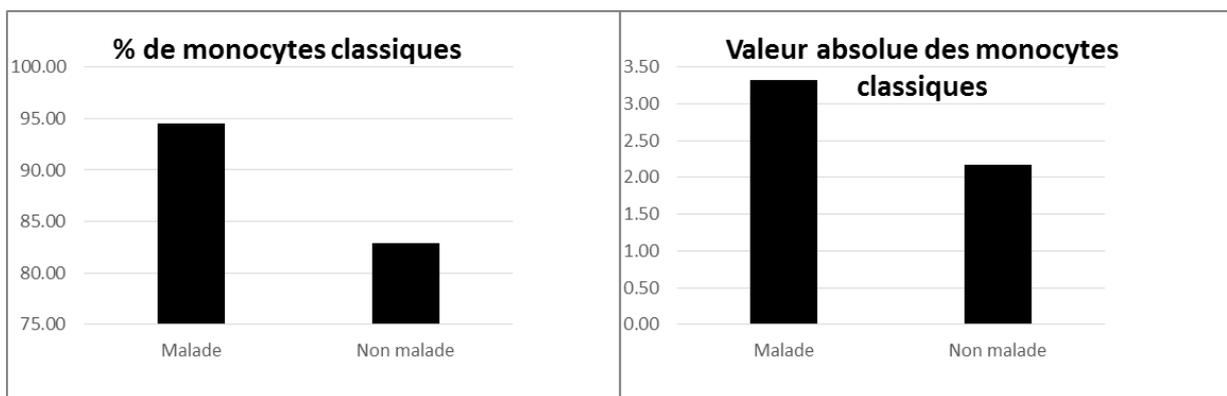


Figure 13. Différences sur les sous-populations de monocytes classiques entre les LMMC (groupe malade) et non-LMMC (groupe non-malade), en pourcentage (à gauche) et valeur absolue (à droite).

4.3.3.3 LMMC myélodysplasique versus proliférative

Nous nous sommes également intéressés aux deux versants de la LMMC, à savoir la forme myélodysplasique définie par une leucocytose inférieure à 13 G/L, et à la forme proliférative définie par une leucocytose supérieure à 13 G/L. Il semblerait que cette différence entre LMMC et non-LMMC soit retrouvée pour les formes dysplasiques (respectivement 93.62% et 84.50% pour les monocytes classiques et 1.37% et 5.44% pour les monocytes non-classiques), et soit encore plus marquée pour les formes prolifératives (au-delà de 13 G/L) avec respectivement 96.45% et 82.21% pour les monocytes classiques et 0.73% et 5.78% pour les monocytes non-classiques (Tableau 8).

Tableau 8. Pourcentage moyen des sous-populations de monocytes au niveau des formes leucocytaires ou non-leucocytaires

Leucocytose (G/L)	Moyenne (G/L)		%CD14 ⁺ /CD16 ⁻ moyenne (écart-type)	%CD14 ⁺ /CD16 ⁺ moyenne (écart-type)	%CD14 ⁻ /CD16 ⁺ moyenne (écart-type)
< 13	8.11	LMMC	93.62 (5.80)	4.47 (4.36)	1.37 (1.35)
	9.15	Non-LMMC	84.50 (8.30)	10.06 (8.38)	5.44 (3.62)
≥ 13	22.14	LMMC	96.45 (2.92)	2.82 (2.86)	0.73 (0.51)
	49.63	Non-LMMC	82.21 (12.69)	11.09 (9.77)	5.78 (4.65)

4.3.4 Définition des seuils des sous-populations

4.3.4.1 Définition d'un seuil pour l'ensemble de la cohorte

Dans un premier temps, notre objectif a été de définir un seuil de sous-population en % au-delà duquel nous pourrions classer le patient dans le groupe « malade » ou « non-malade », avec une probabilité d'erreur la plus faible possible. Les taux de faux positifs (ou FP, patients classés « malades » à tort) et de faux négatifs (ou FN, patients classés « sains » à tort) devront être le plus bas possible. Pour cela nous avons construit des courbes ROC, pour chaque sous-population, en plaçant dans le groupe « malade » la cohorte LMMC puis dans le groupe « contrôle » la cohorte non-LMMC. Le choix de la population d'intérêt ainsi que le seuil ont été défini comme ayant l'AUC la plus élevée. L'ensemble des valeurs obtenues est résumé en annexe 4.

i) *Monocytes classiques CD14⁺/CD16⁻*

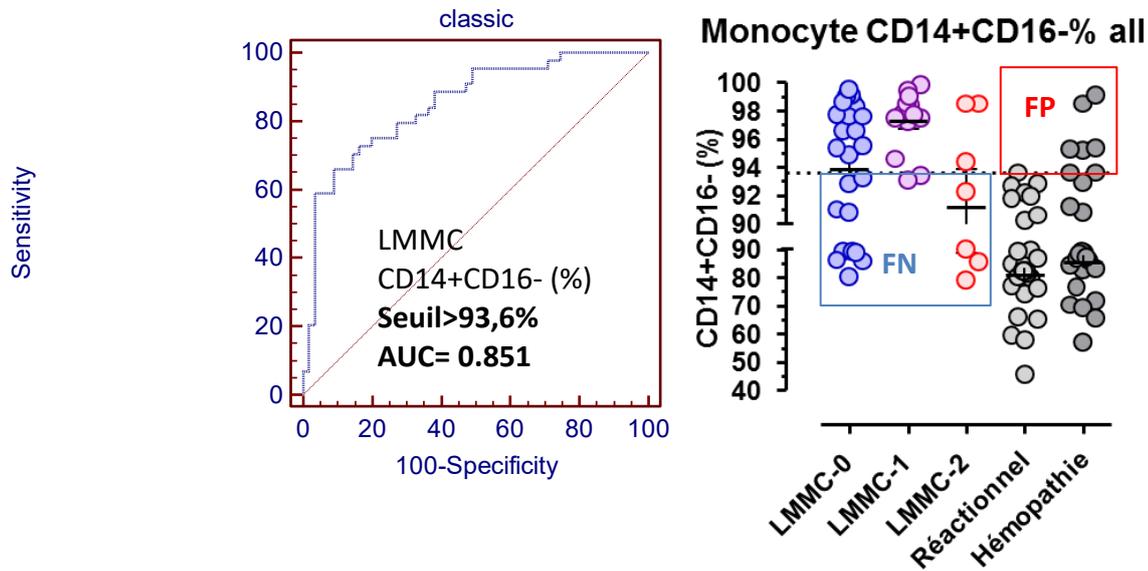


Figure 14. Courbe ROC et distribution des monocytes classiques sur la cohorte globale. A gauche, courbe ROC sur les monocytes classiques LMMC (n=44) versus contrôle (n=55) avec une AUC=0.851. A droite, la population de monocytes classiques selon les différentes catégories de patients avec le seuil ainsi défini de 93.6%. Les faux positifs (FP, en rouge) et faux négatifs (FN, en bleu) sont indiqués.

La population de monocytes classiques est intéressante car au seuil déterminé de 93.6%, nous n’observons pas de faux positifs dans les patients réactionnels (tous sont des hémopathies). En revanche, le nombre de faux négatifs est élevé (15 patients). Au total, nous obtenons une valeur prédictive négative (VPP) à 0.85 et une valeur prédictive positive (VPN) à 0.77 (Tableau 9). Par ailleurs, l’AUC est relativement faible (AUC=0.851) (Figure 14).

Tableau 9. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes classiques au seuil de 93.6%. VP : vrais positifs, FP : faux positifs, VN : vrais négatifs, FN : faux positifs.

Nombre de cas	Test + (si >93.6%)	Test -
LMMC	VP = 29	FN = 15
Contrôle	FP = 5	VN = 50
TESTS	VPP = 0.85	VPN = 0.77

ii) Monocytes intermédiaires CD14⁺/CD16⁺

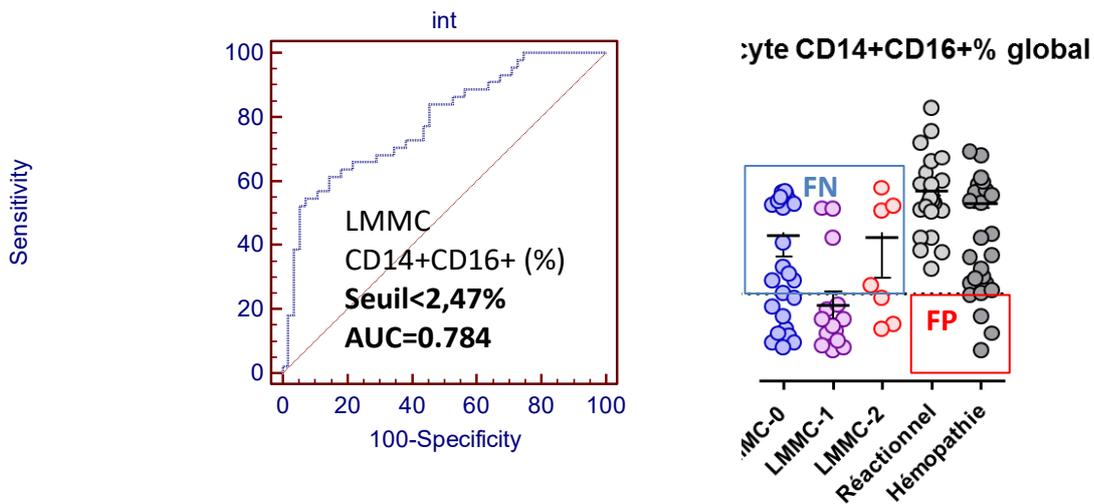


Figure 15. Courbe ROC et distribution des monocytes intermédiaires sur la cohorte globale. A gauche, courbe ROC sur les monocytes intermédiaires LMMC (n=44) versus contrôle (n=55) avec une AUC=0.784. A droite, la population de monocytes intermédiaires selon les différentes catégories de patients avec le seuil ainsi défini de 2.47%. Les faux positifs (FP, en rouge) et faux négatifs (FN, en bleu) sont indiqués.

La population de monocytes intermédiaires est peu intéressante car au seuil déterminé de 2.47%, nous observons un taux de faux négatifs qui n'est pas acceptable dans les cas LMMC (21 pour 44 cas de LMMC). Par ailleurs, l'AUC est peu élevée (0.784). Toutefois, comme pour les monocytes classiques, nous n'observons pas de faux positifs chez les patients réactionnels (Figure 15 et Tableau 10).

Tableau 10. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes intermédiaires au seuil de 2.47%.

Nombre de cas	Test + (si 2.47%)	Test -
LMMC	VP = 23	FN = 21
Contrôle	FP = 4	VN = 51
TESTS	VPP = 0.85	VPN = 0.71

iii) Monocytes non classiques CD14-/CD16+

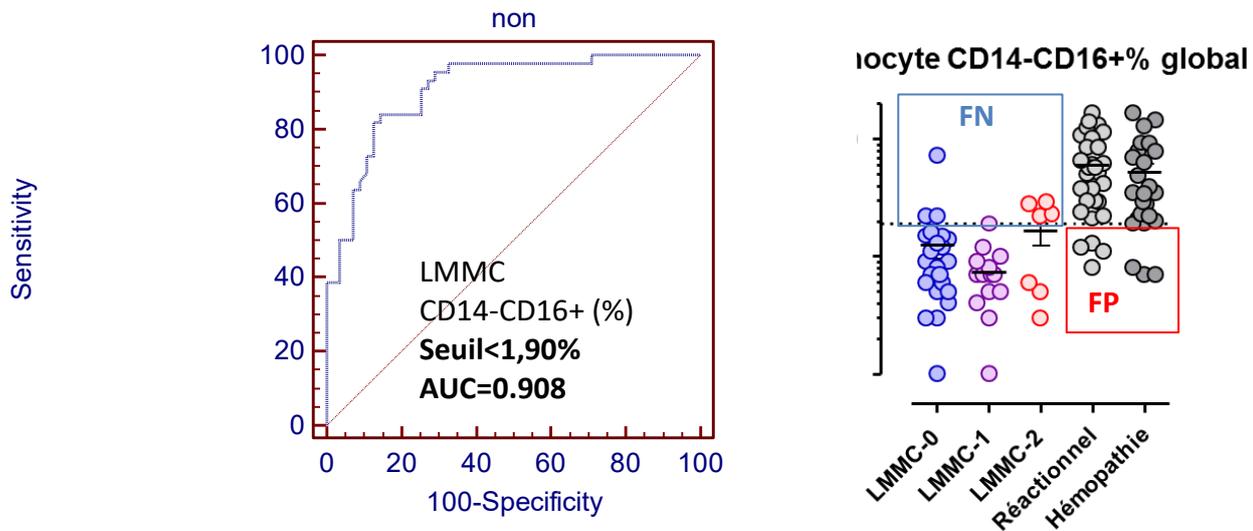


Figure 16. Courbe ROC et distribution des monocytes non-classiques sur la cohorte globale. A gauche, courbe ROC sur les monocytes non-classiques LMMC (n=44) versus contrôle (n=55) avec une AUC=0.908. A droite, la population de monocytes non-classiques selon les différentes catégories de patients avec le seuil ainsi défini de 1.90%. Les faux positifs (FP, en rouge) et faux négatifs (FN, en bleu) sont indiqués.

Concernant l'étude sur la population de monocytes non-classiques, nous observons un nombre faible de faux négatifs (FN, n=7) et de faux positifs (FP, n=7). Par ailleurs, l'AUC est tout à fait correcte à 0.908 (Figure 16). Les VPP et VPN sont satisfaisantes (respectivement 0.84 et 0.87, Tableau 11).

Tableau 11. Calcul des VPP et VPN pour la population de monocytes non-classiques au seuil de 1.90%.

Nombre de cas	Test + (si <1.90%)	Test -
LMMC	VP = 37	FN = 7
Contrôle	FP = 7	VN = 48
TESTS	VPP = 0.84	VPN = 0.87

4.3.4.2 Définition de seuils pour les deux formes de LMMC

La cohorte de patient est en réalité divisée en deux formes de pathologies distinctes par leur expression. Celle correspondant à la LMMC forme dysplasique (LMMC-SMD) définie par une leucocytose inférieure à 13G/L d'une part, et celle correspondant à la forme proliférative (LMMC-SMP) définie par une leucocytose supérieure ou égale à 13 G/L d'autre part.

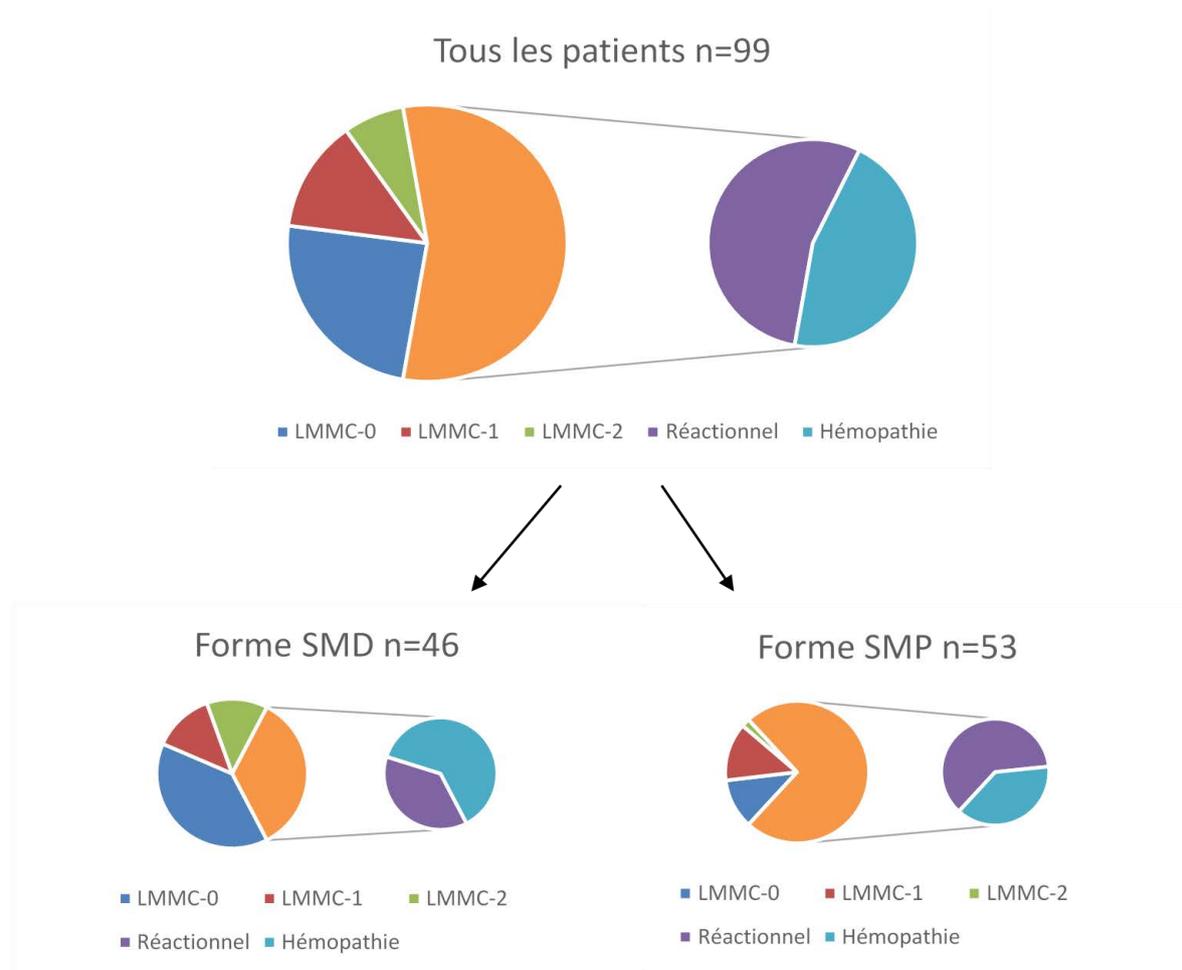


Figure 17. Répartition des cas LMMC (0, 1 et 2) et du groupe contrôle (en orange) dans les deux expressions de la maladie. Forme SMD si leucocytes < 13G/L et forme SMP si leucocytes ≥ 13 G/L.

Au total, 30 cas de LMMC sur 46 patients sont présents dans le groupe SMD soit une prévalence de 65.2%. Par ailleurs la majorité des cas non-LMMC sont des hémopathies (10 cas, pour 6 réactionnels). Concernant le groupe SMP, nous observons 14 cas de LMMC sur 53 soit une prévalence de 26.4% et la majorité des cas non-LMMC sont des situations réactionnelles (24 cas, pour 15 hémopathies) (Figure 17).

L'expression de la maladie LMMC étant différente entre les deux groupes, nous avons ensuite redéfini des seuils diagnostiques de sous-populations pour chaque groupe de patients : les formes SMD d'une part et les formes SMP d'autre part.

i) Groupe SMD

Pour les monocytes classiques, l'AUC obtenue est de 0.825 avec un seuil défini à 93.6% (identique à l'étude sur la cohorte globale). On compte sur la population malade 12 faux négatifs et un seul faux positif sur la population saine. La VPP obtenue est de 0.95 et la VPN est à 0.56.

Concernant les monocytes intermédiaires, on retrouve une AUC à 0.742 pour un seuil défini à 2.79%. Les nombres de faux positifs et de faux négatifs sont respectivement de 1 et de 16, pour une VPP=0.93 et une VPN=0.48.

Enfin, l'étude des monocytes non-classiques donne une AUC=0.921 pour un seuil à 1.64%. Les nombres de faux positifs et de faux négatifs sont respectivement de 1 et de 7, pour une VPP=0.96 et une VPN=0.68. L'ensemble des graphes sont représentés sur la Figure 18 et les résultats des VPP et VPN en Annexe 4.

ii) Groupe SMP

Au niveau des monocytes classiques, l'AUC obtenue est de 0.914 avec un seuil défini à 92.7%. On compte sur la population malade 1 faux négatif et 5 faux positifs sur la population saine. La VPP obtenue est de 0.72 et la VPN est à 0.97.

Concernant les monocytes intermédiaires, on retrouve une AUC à 0.848 pour un seuil défini à 2.33%. Les nombres de faux positifs et de faux négatifs sont respectivement de 2 et de 4, pour une VPP=0.83 et une VPN=0.90.

Enfin, l'étude des monocytes non-classiques donne une AUC=0.951 pour un seuil à 1.21%. Les nombres de faux positifs et de faux négatifs sont respectivement de 6 et de 1, pour une VPP=0.68 et une VPN=0.97. L'ensemble des graphes sont représentés sur la Figure 19 et les résultats des VPP et VPN en Annexe 4.

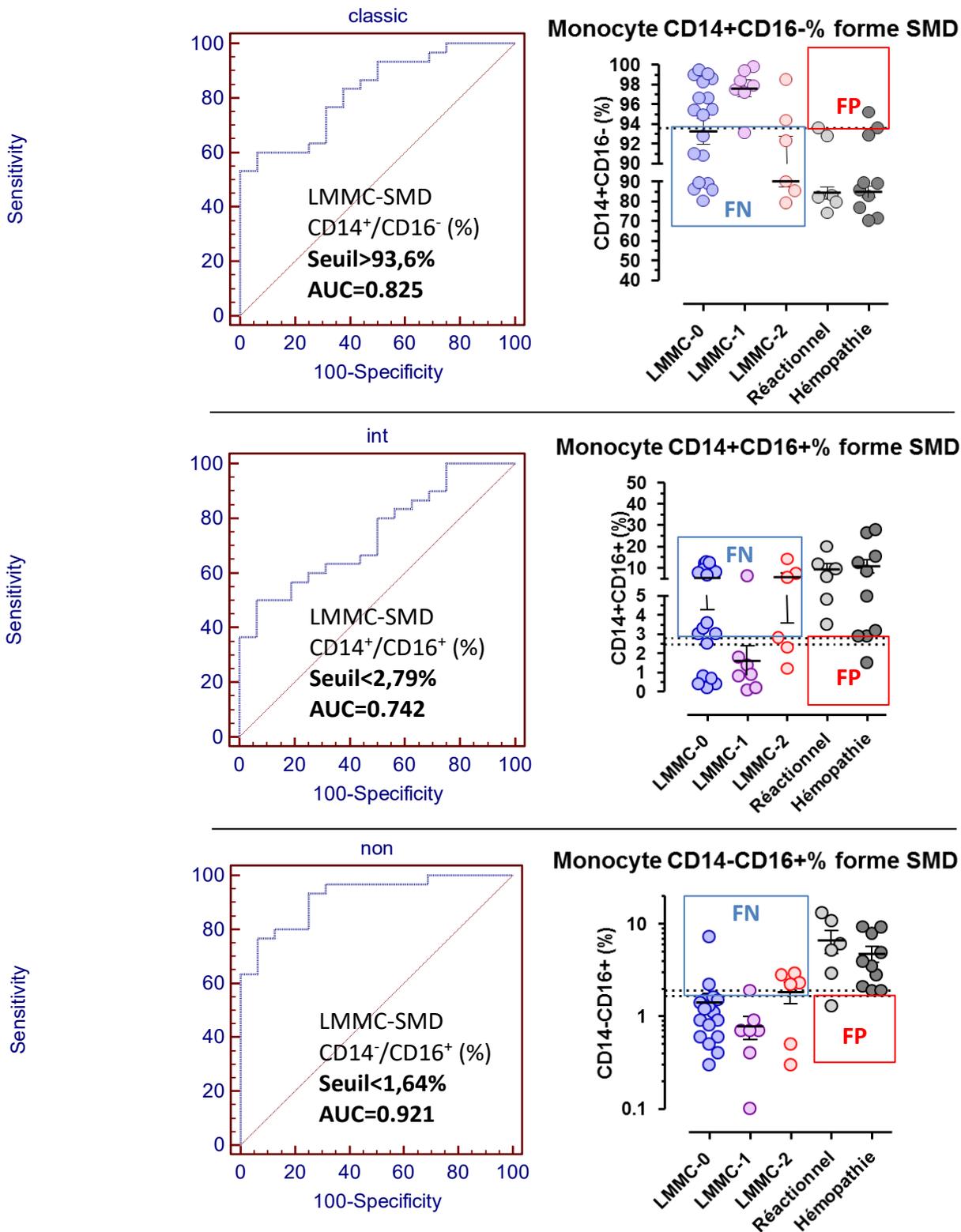


Figure 18. Courbes ROC et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte dysplasique. A gauche, les courbes ROC des trois sous-populations sont représentées pour la forme SMD. A droite, il s'agit la distribution des patients selon leur catégorisation avec les groupes faux négatifs (FN) et faux positifs (FP). A noter que le seuil défini dans l'étude de la cohorte globale est aussi représenté. La population de monocytes classiques est située en haut, les monocytes intermédiaires au milieu et les monocytes non-classiques en bas.

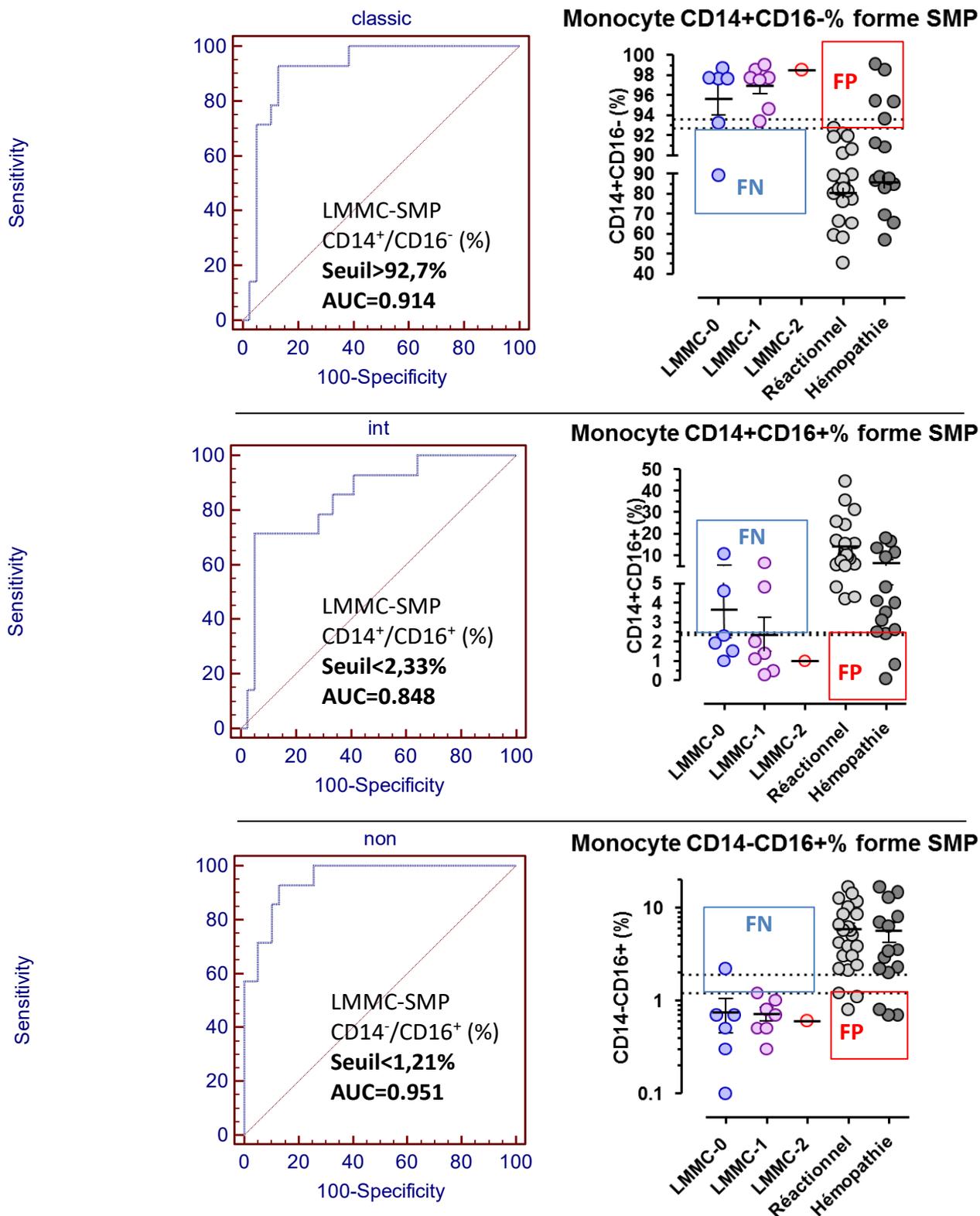


Figure 19. Courbes ROC et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte proliférative. A gauche, les courbes ROC des trois sous-populations sont représentées pour la forme SMP. A droite, il s'agit la distribution des patients selon leur catégorisation avec les groupes faux négatifs (FN) et faux positifs (FP). A noter que le seuil défini dans l'étude de la cohorte globale est aussi représenté. La population de monocytes classiques est située en haut, les monocytes intermédiaires au milieu et les monocytes non-classiques en bas.

4.3.5 Suivi de patients dans le temps

Douze patients au cours de l'étude ont bénéficié de plusieurs immunophénotypages. Parmi ces patients, 10 étaient atteints de LMMC et 2 non atteints. Certains ont eu 2 examens dans le temps, d'autres 3. Les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Caractéristiques des patients ayant eu un suivi dans le temps

	LMMC (n=10)	Non-LMMC (n=2)
Deux suivis	8	2
Trois suivis	2	0
Délai moyen entre deux suivis (jours)	222	154
LMMC 0/1/2	4/3/3	

Au cours du suivi, il apparaît que la proportion des monocytes CD14⁻/CD16⁺ reste stable dans le temps, notamment pour les cas de LMMC. Seul un patient parmi eux voit sa population augmenter de manière significative : il s'agit pour ce dernier d'une évolution d'une LMMC1 en LMMC2 (Figure 20).

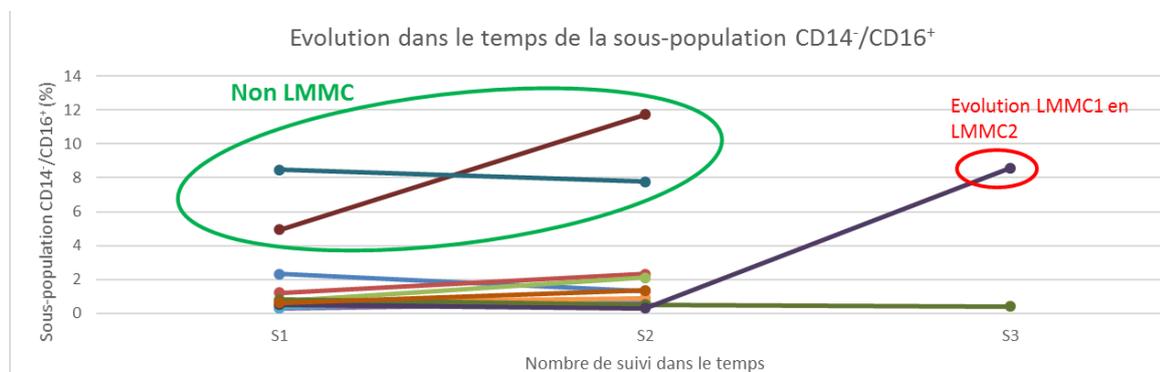


Figure 20. Evolution de la proportion de monocytes CD14-/CD16+ au cours du suivi chez douze patients.

La LMMC de ce patient a évolué avec aggravation des cytopénies et apparition d'une blastose sanguine et médullaire. Nous avons retracé l'ensemble des résultats des hémogrammes ainsi que les immunophénotypages successifs (Figure 21). Entre son deuxième et son troisième suivi, on note une variation significative de chaque sous-population : respectivement 98.34% et 72.89% pour les monocytes classiques, 0.48% et 8.16% pour les monocytes intermédiaires, et 0.55% et 7.49% pour les monocytes non-classiques.

A	15/08/2015	23/11/2016	07/02/2017
Hémoglobine (g/dL)	10.1	12.5	7.9
Plaquettes (G/L)	147	152	44
Leucocytes (G/L)	14.59	17.06	76.86
Monocytes (G/L)	3.0	4.0	3.1
Myélémie (%)	0	0	10
Blastes (%)	0	0	1.4

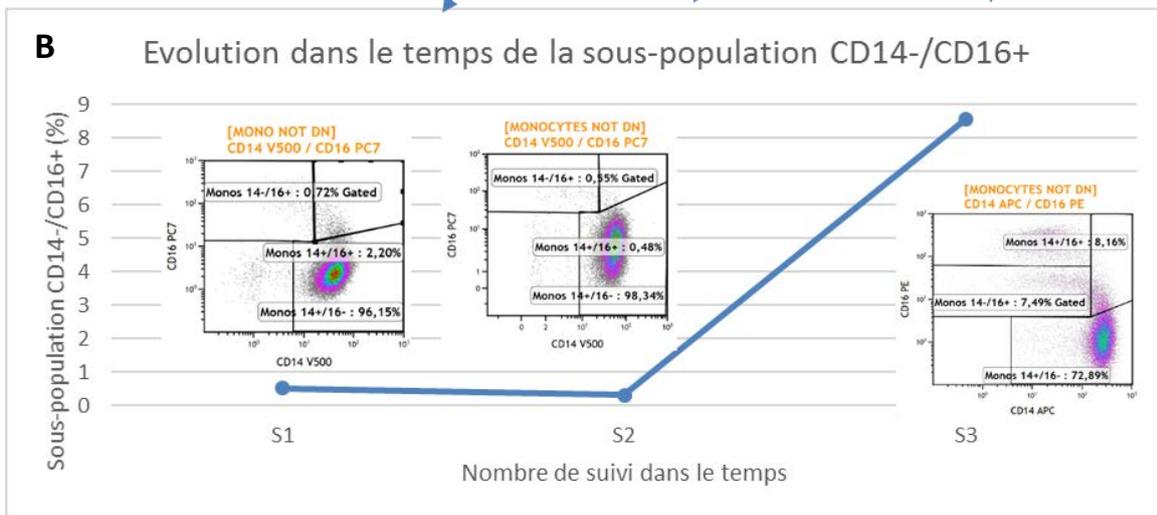


Figure 21. Evolution dans le temps de la sous-population CD14-/CD16+ avec les résultats des numérations et formules sanguines (A) et les différents graphes (B) chez le patient 11.

5 Discussion

5.1 Limites de l'étude

Il faut tout d'abord souligner que la cohorte des patients étudiés n'est pas très large avec 99 patients inclus. Cela est dû au fait que ce travail est monocentrique (uniquement sur le CHU de Toulouse) et que l'incidence de la LMMC dans la population est faible. Par conséquent, le nombre limité de cas de LMMC (notamment de cas de LMMC-2) ne permet pas d'être statistiquement très puissant.

Par ailleurs, certains patients n'ont pas eu un bilan exhaustif et, par conséquent, la caractérisation précise de leur pathologie n'a pas pu être faite. Le diagnostic, de LMMC ou non, a été fait à l'aide des arguments clinico-biologiques disponibles au moment de l'étude, et il n'est pas exclu que certains patients soient classés dans une autre catégorie ultérieurement à l'aide de nouveaux examens (chronicité de la monocytose ou disponibilité d'un myélogramme, par exemple). A ce titre, l'apport de la biologie moléculaire pourrait permettre d'apporter plus de précision. En effet, il existe une mutation clonale dans plus de 90% des LMMC, touchant principalement les gènes impliqués dans la régulation du spliceosome et des phénomènes épigénétiques⁵⁶. Le développement des nouvelles technologies comme le séquençage nouvelle génération (NGS) permettrait de venir en complément de la cytométrie en flux pour mieux préciser le caractère malin ou non des monocytoses. Toutefois, ces technologies ne peuvent être réalisées que dans des centres spécialisés.

5.2 Points forts de l'étude

La cohorte contrôle est tout à fait satisfaisante avec un ensemble varié de pathologies rencontrées. En effet, elle s'équilibre entre les hémopathies et les pathologies réactionnelles au sens large d'une part avec respectivement 25 et 30 cas, et d'autre part cette dernière catégorie comprend un large éventail de pathologies (sepsis, lupus érythémateux disséminé, drépanocytose, sclérose en plaque, maladie de Horton, cancers solides...). Par ailleurs, la cohorte LMMC est pertinente car elle présente les caractéristiques classiques des populations habituelles de patients atteints de LMMC, à savoir le ratio homme/femme de 2/1, un âge médian d'environ 70 ans et une majorité de forme dysplasique (par rapport aux formes prolifératives). La cohorte malade est donc comparable à la démographie des patients atteints de LMMC dans la population générale et ne présente pas de biais de sélection.

Soulignons également que cette étude est prospective, avec une intégration des patients au fur et à mesure de leurs venues au CHU de Toulouse, principalement à la demande des cliniciens hématologues, sans sélection de la part du laboratoire.

5.3 Intérêt dans le diagnostic de LMMC

L'immunophénotypage, réalisable sur sang périphérique, pourrait ainsi permettre d'orienter le clinicien sur l'origine bénigne ou maligne d'une monocytose chronique et sur l'intérêt de la réalisation d'un myélogramme dans un second temps. Nous montrons dans ce travail que la population de monocytes classiques est augmentée, et que parallèlement la population de monocytes non-classiques est diminuée dans la LMMC, si l'on compare aux cas non-LMMC (autres hémopathies et situations réactionnelles).

Ces variations sont moins évocatrices concernant la LMMC-2. Toutefois, dans ce cas le tableau clinique et surtout biologique, avec des cytopénies plus ou moins profondes et surtout la présence de blastes circulants (à un taux supérieur à 5%), ne fait pas douter de l'existence d'un processus hématologique malin.

L'immunophénotypage trouve essentiellement son intérêt dans les cas douteux de LMMC-0 ou de LMMC-1 sans blastes circulant, pour les différencier d'une monocytose réactionnelle. Nous montrons que l'étude des pourcentages des sous-populations est plus pertinente que l'étude du compte absolu en G/L de ces sous-populations.

5.3.1 Au sein de la cohorte globale

Par rapport à l'étude de Selimoglu-Buet, D. *et al* qui proposait un seuil de monocytes classiques supérieur à 94% comme étant en faveur d'une LMMC, nous obtenons des résultats similaires avec un seuil obtenu à 93.6%.

Les résultats montrent que la population de monocytes non-classiques CD14⁻/CD16⁺ est la plus robuste pour le diagnostic de la LMMC, avec un taux de faux positifs et faux négatifs le plus faible et l'AUC la plus forte à 0.908, par rapport aux autres sous-populations. Le seuil alors proposé est de 1.90%. Les valeurs prédictives positives et négatives sont satisfaisante (respectivement 0.84 et 0.87). Toutefois, nous avons montré que la LMMC s'exprimait dans la population de manière très différente selon la forme proliférative ou dysplasique. En effet la prévalence de la LMMC dans sa forme dysplasique est de 65.2% parmi les patients ayant une leucocytose inférieure à 13 G/L, c'est-à-dire que près de 2/3 des patients présentant une monocytose chronique seraient des LMMC. Inversement, la LMMC dans sa forme proliférative est peu représentée parmi les patients ayant une leucocytose supérieure ou égale à 13 G/L,

avec une prévalence de 26.4% : l'essentiel des patients sont en situation réactionnelle ou ont une autre hémopathie. Par ailleurs, nous observons une grande dispersion des résultats lors de l'étude de la cohorte globale avec une étendue de valeurs très large. Il apparaît donc essentiel au vu de ces résultats de définir des objectifs différents pour les deux formes d'expression de la maladie. Le choix de la population à étudier et du seuil devra tenir compte de ces paramètres.

5.3.2 Au sein de la cohorte dysplasique

Etant donné la forte prévalence de LMMC dans cette population, l'objectif est d'exclure les patients réactionnels avec le moins d'erreur possible, c'est-à-dire de limiter au maximum les faux négatifs. Le choix de la population la plus pertinente se portera sur celle ayant la VPN la plus élevée au seuil défini et semble être la population de monocytes non-classiques avec une VPN à 0.68 (Annexe 4). Au seuil alors défini de 1.64%, nous obtenons sept faux négatifs, dont quatre LMMC-2 dont nous avons dit que la question d'un processus malin dans ce contexte ne faisait aucun doute (présence d'une blastose sanguine pour trois d'entre eux). Parmi les trois autres faux négatifs, deux ont une anomalie au caryotype médullaire (délétion isolée du chromosome Y et caryotype complexe pour l'autre). Ces trois derniers patients faux négatifs ont une monocytose objectivée depuis plus de 6 ans avec un taux de monocytes représentant entre 20 et 40% des leucocytes, ce qui évoque fortement une LMMC évoluant à bas bruit et aurait amené *in fine* à la réalisation d'un médullogramme.

Le seul patient faux positif présente une néoplasie rénale, probablement à l'origine de la monocytose, et n'a pas eu d'examen complémentaires par excès.

5.3.3 Au sein de la cohorte proliférative

La prévalence de la LMMC étant faible dans ce groupe, l'objectif est cette fois-ci de diagnostiquer une LMMC avec le moins d'erreur possible, c'est-à-dire de limiter les faux positifs. Le choix de la population la plus pertinente se portera sur celle ayant la VPP la plus élevée au seuil défini et semble être la population de monocytes intermédiaires avec une VPP de 0.83, pour deux faux positifs et quatre faux négatifs (Annexe 4). Toutefois, le fenêtrage de cette population est assez difficile à standardiser dans la pratique courante, il est donc

préférable de cibler la population de monocytes classiques qui donne une VPP à 0.72 pour un seuil à 92.7%, avec un seul faux négatif et cinq faux positifs. Aucun des patients faux positifs ne se trouve en situation réactionnelle, ce qui est tout à fait intéressant car aucun de ces patients n'aurait eu d'examen complémentaire, et montre la pertinence du phénotypage pour discriminer une LMMC d'une monocytose réactionnelle dans une population où la LMMC est peu représentée. Concernant les cinq patients faux positifs, ce sont tous des hémopathies :

- Patient 1 : LAM avec présence de blastes sanguin (18%) et bâtonnets d'Auer. Ce patient avait été étiqueté comme atteint d'un SMD trois ans auparavant mais compte-tenu de la monocytose, il s'agissait vraisemblablement d'une LMMC qui aurait évolué en LAM.
- Patient 2 : LAM avec présence de blastes (10%) et de promonocytes sanguins (39%). Il s'agit d'un tableau de LAM myélomonocytaire (LAM4 selon la classification FAB)
- Patient 3 : LMC avec présence d'une translocation t(9 ;22) et du transcrit BCR-ABL. Il existe une forte monocytose (21.6 G/L) mais ne représentant que 3% des leucocytes. Le reste de la formule évoque fortement une LMC.
- Patient 4 : SMP atypique avec absence d'anomalies au caryotype. Le diagnostic a été évoqué devant une forte leucocytose (50 G/L) avec prédominance de polynucléaires neutrophiles (81.6%), la présence des mutations des gènes CSF3R et SETBP1 souvent retrouvées dans les SMP et l'absence du transcrit BCR-ABL.
- Patient 5 : SMP/SMD inclassable (selon les critères de la classification OMS). Les critères pour une LMMC ne sont pas tous présents car la monocytose, bien que chronique, représente toujours entre 2 et 4% de la formule. Par ailleurs, ce patient présente des mutations pour les gènes JAK2, PHF6, PTPN11 et TET2, ainsi qu'une splénomégalie et des signes de fibrose médullaire.

Tous ces patients ont bénéficié d'un myélogramme, des examens de cytogénétique et/ou de biologie moléculaire nécessaires pour aboutir au diagnostic. Plus particulièrement pour les trois premiers, le diagnostic est orienté dès les résultats de la formule sanguine et la LMMC écartée.

Le seul patient faux négatif présente une monocytose à 8,1 G/L soit 47.1% des leucocytes, ce qui fait fortement évoquer *in fine* une LMMC.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur la possibilité de faire évoluer ce seuil de 92.7%, de façon à améliorer la VPP. C'est ainsi qu'avec un seuil de 96%, nous obtenons, dans notre cohorte, seulement deux faux positifs et quatre faux négatifs pour une VPP=0.95 et VPN=0.72 (Figure 22). Les faux positifs dans ce cas sont les patients 1 et 5. Ce seuil de 96% de monocytes classiques semble être le meilleur compromis en termes de VPP et VPN. Soulignons que dans la cohorte proliférative, les pathologies non-LMMC sont majoritaires et il est tout à fait intéressant de pouvoir les exclure avec une forte probabilité (spécificité de 94.9% pour une sensibilité de 71.4%)

Monocyte CD14+CD16-% forme SMP

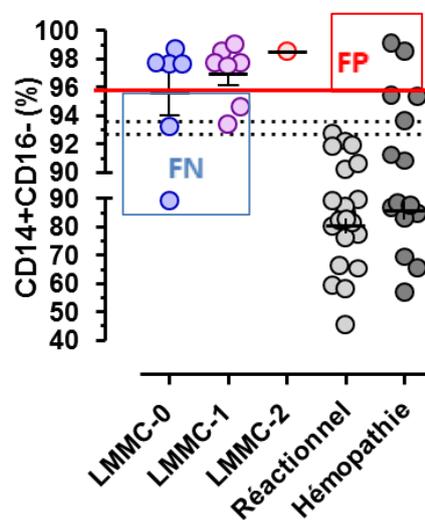


Figure 22. Distribution des patients du groupe SMP avec les faux négatifs et les faux positifs. Le nouveau seuil établi à 96% est indiqué (trait rouge).

5.4 Proposition d'un arbre décisionnel

A partir de l'ensemble des résultats, nous proposons un algorithme applicable chez les patients présentant une monocytose (Figure 23). Avec cet algorithme, nous obtenons au total 33 vrais positifs, 11 faux négatifs, 52 vrais négatifs et 3 faux positifs, sur l'ensemble de l'étude. Les VPP et VPN sont très satisfaisantes (respectivement 0.92 et 0.83). Cet arbre présente l'avantage de pouvoir être suivi à partir d'un simple prélèvement de sang périphérique, et orientera le clinicien sur l'intérêt, ou non, de réaliser un myélogramme en vue de compléter le diagnostic. Il est important de préciser que ces critères sont moins significatifs pour le diagnostic des LMMC-2, mais il existe dans ce cas un contexte clinico-biologique évocateur qui amènera *in fine* à la réalisation d'un myélogramme.

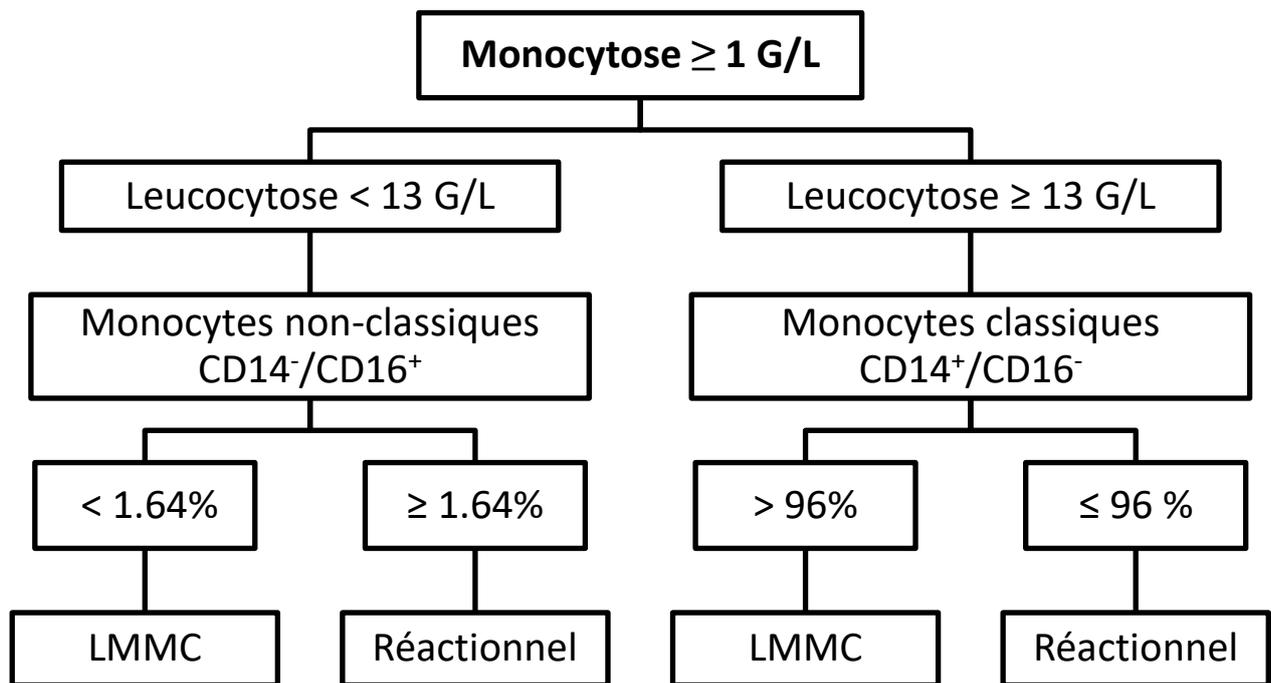


Figure 23. Algorithme d'orientation devant une monocytose chronique.

Nous avons comparé cet arbre décisionnel avec le seuil initialement établi dans la littérature de 94% de monocytes classiques. En appliquant ce seuil dans notre cohorte de patients, nous obtenons une VPP et une VPN plus faibles (respectivement 0.85 et 0.77). L'algorithme proposé, qui tient compte des deux présentations biologique et clinique de la LMMC, apparaît ainsi être un meilleur outil diagnostique. Toutefois, une cohorte plus importante sera nécessaire afin de confirmer ces résultats.

En dehors de la cytométrie en flux, nous rappelons qu'il existe d'autres outils pour le diagnostic des LMMC : (i) le myélogramme essentiellement, (ii) la cytogénétique avec l'étude du caryotype et des translocations par la technique FISH, et (iii) la biologie moléculaire. Cette dernière, avec l'avènement du NGS, permet le dépistage de très nombreuses mutations géniques, faisant évoquer un processus clonal. L'intérêt majeur de la cytométrie en flux dans ce contexte est de rationaliser les coûts pour aboutir à un diagnostic pertinent avec meilleure efficacité. En effet, à partir d'un prélèvement de sang périphérique, il est dès lors possible de discriminer une probable LMMC ou non rapidement (dans la journée) et à un coût raisonnable. Cela pourra réduire le nombre de myélogrammes réalisés, qui reste malgré tout un geste

invasif avec les risques et contraintes que cela comporte pour le patient, ainsi que le nombre de demandes de biologie moléculaire ou de cytogénétique qui sont des techniques fastidieuses, au coût non négligeable à l'heure actuelle.

Très récemment, une autre étude de Selimoglu-Buet *et al* montre qu'il existe des syndromes myélodysplasiques pour lesquels une augmentation des monocytes classiques périphériques est décrite, au-delà du seuil défini de 94%⁵⁷. Les auteurs ont observé que ces SMD sont susceptibles d'évoluer en véritable LMMC par la suite, et suggèrent de considérer ces SMD « LMMC-like » comme une entité à part entière, et que par conséquent l'immunophénotypage des monocytes pourrait être un critère positif dans le diagnostic des LMMC et SMD LMMC-like. Dans cette dernière catégorie, le taux de monocytes est significativement supérieur à celui retrouvé dans les autres SMD (0.6 vs 0.4, $p < 0.05$).

Notre étude rejoint cette hypothèse. Si l'on s'intéresse de plus près au patient 4, nous constatons que ce patient avait un immunophénotypage évocateur d'une LMMC au moment de l'étude. Bien que la monocytose était présente, elle ne représentait que 5% de la formule leucocytaire, marquée par une forte polynucléose (80 G/L de PNN). Compte-tenu de la présence de la mutation du gène *CSF3R*, le patient avait donc été diagnostiqué dès 2015 comme atteint d'une forme particulière de leucémie à polynucléaire neutrophile. 18 mois plus tard, ce patient a évolué sous la forme d'un SMD avec excès de blastes de type 2 dans une forme leucopénique (leucocytes autour de 5 G/L), avec une persistance de la monocytose. Sous traitement hypométhylant, la monocytose a disparu, rendant impossible d'objectiver la monocytose sur 3 mois. Il est fort possible que ce patient ait développé en réalité une LMMC, alors masquée par le traitement, mais nous ne pouvons l'affirmer strictement. Notre hypothèse est que l'immunophénotypage des monocytes pourrait remplacer le critère de chronicité de la monocytose. Cela est tout à fait intéressant car le diagnostic pourrait être fait sur un temps très court, au moment de la consultation.

Une autre étude américaine récente semble aller dans le même sens. Dans cette dernière, les auteurs décrivent des SMD qui présentent un taux de monocytes inférieur à 1 G/L, mais à une proportion supérieure à 10%⁵⁸. Ce groupe de SMD, appelé LMMC oligomonocytaire, comprend des patients plus jeunes que la cohorte LMMC, et 38% de ces cas ont évolué en véritable LMMC. Geyer *et al* montrent également que le taux de patients présentant au moins une mutation sur les gènes les plus courants (*TET2*, *ASXL1* et *SRSF2*) est similaire dans les

groupes, mais la fréquence des mutations est plus faible dans la forme oligomonocytaire. Cela conforte l'idée selon laquelle il existerait des états pré-LMMC, qui selon les critères OMS seraient classés en SMD. Ces SMD, qui présenteraient une monocytose sub-normale, évolueraient par la suite en véritables LMMC. La survie étant plus faible dans la LMMC par rapport aux SMD, le phénotypage des monocytes prend alors toute sa place dans la prise en charge hématologique car il permettrait un suivi plus rapproché chez ces patients susceptibles d'évoluer.

5.5 Intérêt dans le suivi de LMMC

La cytométrie en flux trouve également sa place dans le suivi de la LMMC. En effet, nous avons montré que les proportions des sous-populations de monocytes restent stables dans le temps, en l'absence d'évolution cytologique. Pour un patient chez qui nous avons observé une évolution de son hémopathie en LMMC-2, la distribution de ses sous-populations est altérée avec augmentation des monocytes non-classiques et intermédiaires. Toutefois, une cohorte plus conséquente avec un suivi sur de nombreuses années sont nécessaires pour en tirer une conclusion.

Paradoxalement, l'étude de Selimoglu-Buet *et al* montre une diminution de la population de monocytes classiques chez 7 patients traités par azacytidine, parallèlement à leur réponse cytologique (monocytose inférieure à 1 G/L), alors que la répartition reste inchangée chez les patients non-répondeurs. Il montre également une ré-ascension des monocytes classiques en cas de rechute de la LMMC⁵⁵.

Nous n'avons malheureusement pas de données sur l'immunophénotypage en lien avec les thérapeutiques car tous les patients suivis n'avaient soit aucun traitement spécifique, soit recevaient uniquement un traitement de support de type transfusions ou EPO. Notre étude ne permet pas de conclure quant à la pertinence du phénotypage monocyttaire dans le suivi de la LMMC. Il serait toutefois intéressant d'évaluer le comportement de l'évolution des sous-populations monocytaires chez des patients traités par des agents hypométhylants comme dans l'étude décrite, mais également par des chimiothérapies plus agressives de type anthracyclines, ou dans le cas de patients ayant reçu une allogreffe de CSH.

5.6 Perspectives

La LMMC étant une maladie hématologique clonale, nous pouvons raisonnablement penser que cette clonalité pourrait s'exprimer phénotypiquement par la présence de marqueurs membranaires aberrants à la surface des monocytes⁵⁹. Une étude de 2011 de Wong et al, décrit le comportement de différents marqueurs dans les trois sous-populations de monocytes chez des individus sains⁶⁰. Ils montrent dans cette étude que les monocytes classiques expriment de manière significative CD64, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CD9, CD36, CD99, IL13Ra1, alors que les monocytes non-classiques expriment préférentiellement CD123, CD294, Siglec10, P2RX1. Le seul marqueur exprimé davantage significativement par les monocytes intermédiaires est HLA-DR. Dans l'avenir, il serait intéressant d'étudier ces marqueurs et de voir comment ils se comportent dans la LMMC et dans d'autres situations réactionnelles ou malignes. Au-delà de l'aspect quantitatif des différentes sous-populations, une étude qualitative apporterait ainsi des informations supplémentaires non seulement sur la question de la clonalité du monocyte, mais également sur la quantification des monocytes clonaux et donc leur suivi dans le temps. De cette manière, nous pouvons envisager qu'un panel de marqueurs à l'origine d'un score pourrait être mis au point et, de façon comparable à ce qui existe pour les syndromes lymphoprolifératifs chroniques, permettrait d'établir un diagnostic positif de LMMC.

Dans un second temps, la cytométrie en flux pourrait apporter des informations sur le pronostic de la LMMC. Il n'existe actuellement pas de consensus international sur les critères pronostic dans la LMMC. La plupart des scores pronostic établis s'appuient sur les paramètres de l'hémogramme, les anomalies cytogénétiques, la dépendance transfusionnelle ou les mutations clonales. Dans l'optique de mettre en évidence de nouveaux marqueurs pronostics, il serait intéressant d'étudier la répartition et le comportement des sous-populations monocytaires, quantitativement et qualitativement. Les nouveaux marqueurs pourraient être inclus dans cette étude. Il pourrait être alors intéressant d'analyser l'impact sur la survie à long terme en fonction de l'expression de tel ou tel marqueur. Par exemple, nous pouvons envisager que l'existence d'un marqueur aberrant, ou l'absence d'un marqueur normalement présent, puisse avoir un impact positif ou négatif sur le pronostic. Parallèlement, il serait

intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre ces marqueurs aberrants et les anomalies cytogénétiques ou moléculaires.

Une étude parue en 2016 dans l'*American Journal of Clinical Pathology*, a déjà commencé à explorer cette voie⁶¹. Les chercheurs ont étudié un panel de marqueurs sur différentes populations cellulaires, dans une cohorte LMMC (30 cas) et une cohorte contrôle (10 cas). Ils ont comparé ces deux cohortes au niveau de l'expression de marqueurs sur les blastes (CD7, CD11b, CD13, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD117, HLA-DR), les monocytes (CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD45, CD56, CD64, HLA-DR) et les granulocytes immatures (CD56 et HLA-DR). Les seules différences significatives observées concernent les CD14 et CD15 monocytaire qui sont plus faiblement exprimés dans la LMMC par rapport à la cohorte contrôle. Ces résultats semblent paradoxaux compte-tenu du fait que dans la LMMC la population de monocytes classiques CD14⁺/CD16⁻ est augmentée, on s'attendrait alors à une augmentation de l'expression de CD14. Toutefois, les auteurs soulignent que la littérature a montré une diminution de CD14 lors de monocytozes réactionnelles et que leurs résultats manquent de spécificité. Dans cette même étude, les auteurs n'ont pas trouvé de résultats significatifs en comparant les cohortes LMMC-1 vs LMMC-2 (classification OMS 2008) hormis une expression plus forte de HLA-DR sur les granulocytes immatures dans la LMMC-2. Ils n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les LMMC myélodysplasique vs myéloproliférative, ni entre les LMMC de bas risque vs intermédiaire/haut risque (score CPSS), ni enfin entre les LMMC au diagnostic vs suivi. Les auteurs concluent qu'il existe, au sein des cas LMMC, une grande hétérogénéité au niveau des profils immunophénotypiques sur les populations cellulaires étudiées.

6 Conclusion

La LMMC est une pathologie de diagnostic difficile qui manque de critères positifs. La cytométrie en flux permet d'apporter de nouveaux éléments dans le diagnostic, notamment pour différencier cette hémopathie d'une monocytose réactionnelle. En cas de monocytose « dysplasique » (taux de leucocytes inférieurs à 13 G/L), une proportion de monocytes non-classiques inférieure à 1,64% est en faveur d'une LMMC. En cas de monocytose « proliférative » (taux de leucocytes supérieurs ou égal à 13 G/L), une proportion de monocytes classiques supérieure à 96% est en faveur d'une LMMC. Dans ces deux cas, le biologiste peut ensuite proposer au clinicien un examen médullaire afin d'approfondir le diagnostic. De cette manière, l'algorithme proposé permet un criblage des patients présentant une monocytose, dans une optique de rationaliser les examens biologiques, avec des VPP et VPN satisfaisante (respectivement 0,92 et 0,83).

7 Bibliographie

1. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
2. Park, S., Cluzeau, T., Fenaux, P. & Dreyfus, F. Syndromes myélodysplasiques et leucémies secondaires. Généralités, diagnostic et classification. *Elsevier Masson* **9**, 1–13 (2014).
3. Patnaik, M. M., Parikh, S. A., Hanson, C. A. & Tefferi, A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *Br. J. Haematol.* **165**, 273–286 (2014).
4. Cazzola, M., Malcovati, L. & Invernizzi, R. Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. *ASH Educ. Program Book* **2011**, 264–272 (2011).
5. Parikh, S. A. & others. Chronic myelomonocytic leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **87**, 610–619 (2012).
6. Itzykson, R. *et al.* Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2428–2436 (2013).
7. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **51**, 189–199 (1982).
8. Fenaux, P. & others. Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques et la leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic, classifications, traitement. *John Libbey Eurotext* **21**, 28–45 (2015).
9. Hafraoui, K., De Prijck, B. & Beguin, Y. Leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic et thérapeutique. *Rev Med Suisse* **9**, 1512–7 (2013).
10. Haute Autorité de Santé. GUIDE DU PARCOURS DE SOINS Insuffisances médullaires et autres cytopénies chroniques - Syndromes myélodysplasiques. (2015).
11. Bain, B. *Leukaemia Diagnosis Third edition.* (Wiley-Blackwell, 2008).

12. Swerdlow, S. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. **2**, (2008).
13. Bacher, U., Haferlach, T., Schnittger, S., Kreipe, H. & Kröger, N. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia: Review. *Br. J. Haematol.* **153**, 149–167 (2011).
14. Such, E. *et al.* Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **96**, 375–383 (2011).
15. Such, E. *et al.* Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**, 3005–3015 (2013).
16. Itzykson, R. *et al.* Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* **121**, 2186–2198 (2013).
17. Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N. & Solary, E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int. J. Hematol.* **105**, 711–719 (2017).
18. Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
19. Abdel-Wahab, O. *et al.* ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation Through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell* **22**, 180–193 (2012).
20. Obba, S. Caractérisation et implication de l'autophagie au cours de la différenciation macrophagique des monocytes. Application à la Leucémie Myéломonocytaire Chronique. (Université Nice Sophia Antipolis, 2015).
21. Kim, E. *et al.* SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* **27**, 617–630 (2015).

22. Kuo, M.-C. *et al.* RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* **23**, 1426–1431 (2009).
23. Park, S., Cluzeau, T., Fenaux, P. & Dreyfus, F. Syndromes myélodysplasiques et leucémies secondaires. Traitement. *Elsevier Masson* **9**, 1–10 (2014).
24. Dictionnaire Vidal. *Hoptimal* (2017).
25. Braun, T. *et al.* Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* **118**, 3824–3831 (2011).
26. LABOIS-LAVAVASSEUR, A. Implication de DOK2 dans la prolifération et la génération de cellules myéloïdes suppressives au cours de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). (Université de Rouen, 2015).
27. Savona, M. R. *et al.* An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood* **125**, 1857–1865 (2015).
28. Brown, M. & Wittwer, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* **46**, 1221–1229 (2000).
29. Betters, D. M. Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J. Adv. Pract. Oncol.* **6**, 435–440 (2015).
30. Virgo, P. F. & Gibbs, G. J. Flow cytometry in clinical pathology. *Ann. Clin. Biochem.* **49**, 17–28 (2012).
31. Iwasaki, H. & Akashi, K. Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity* **26**, 726–740 (2007).
32. Ziegler-Heitbrock, L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front. Immunol.* **6**, (2015).

33. Lauvau, G., Chorro, L., Spaulding, E. & Soudja, S. M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell. Immunol.* **291**, 32–40 (2014).
34. Akiyama, Y. *et al.* Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J. Clin. Invest.* **72**, 1093–1105 (1983).
35. Akiyama, Y. *et al.* Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **37**, 519–530 (1985).
36. Craig, F. E. & Foon, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* **111**, 3941–3967 (2008).
37. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).
38. Kawanaka, N. *et al.* CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2578–2586 (2002).
39. Mukherjee, R. *et al.* Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* **5**, 13886 (2015).
40. Burbano, C., Vasquez, G. & Rojas, M. Modulatory effects of CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes on CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes: a possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 3371–3381 (2014).
41. Koch, S., Kucharzik, T., Heidemann, J., Nusrat, A. & Luegering, A. Investigating the role of proinflammatory CD16⁺ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 332–341 (2010).
42. Amoruso, A. *et al.* Relation among anti-rheumatic drug therapy, CD14⁽⁺⁾CD16⁽⁺⁾ blood monocytes and disease activity markers (DAS28 and US7 scores) in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Pharmacol. Res.* **107**, 308–314 (2016).

43. Orii, M. *et al.* Circulating CD14⁺⁺CD16⁺ Monocyte Subsets as a Surrogate Marker of the Therapeutic Effect of Corticosteroid Therapy in Patients With Cardiac Sarcoidosis. *Circ. J.* **79**, 1585–1592 (2015).
44. Herra, C. M., Keane, C. T. & Whelan, A. Increased expression of Fc receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *J. Med. Microbiol.* **44**, 135–140 (1996).
45. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–592 (2007).
46. Zhou, J. *et al.* CD14^{hi} CD16⁺ monocytes phagocytose antibody-opsonised Plasmodium falciparum infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med.* **13**, 290 (2015).
47. Coley, J. S., Calderon, T. M., Gaskill, P. J., Eugenin, E. A. & Berman, J. W. Dopamine Increases CD14⁺CD16⁺ Monocyte Migration and Adhesion in the Context of Substance Abuse and HIV Neuropathogenesis. *PLOS ONE* **10**, e0117450 (2015).
48. Suzuki, A. *et al.* Circulating intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes are increased in patients with atrial fibrillation and reflect the functional remodelling of the left atrium. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* (2016). doi:10.1093/europace/euv422
49. Wrigley, B. J., Shantsila, E., Tapp, L. D. & Lip, G. Y. H. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes in patients with acute ischaemic heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 121–130 (2013).
50. Goonewardena, S. N. *et al.* Monocyte Subsets and Inflammatory Cytokines in Acute Decompensated Heart Failure. *J. Card. Fail.* **22**, 358–365 (2016).

51. Tang, M.-X., Zhang, Y.-H., Hu, L., Kwak-Kim, J. & Liao, A.-H. CD14⁺⁺ CD16⁺ HLA-DR⁺ Monocytes in Peripheral Blood are Quantitatively Correlated with the Severity of Pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* **1989** **74**, 116–122 (2015).
52. Saleh, M. N. *et al.* CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **85**, 2910–2917 (1995).
53. Jiang, X.-Q. *et al.* Expansion of CD14(+)CD16(+) monocytes is related to acute leukemia. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 12297–12306 (2015).
54. Feng, A.-L. *et al.* CD16⁺ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 57–65 (2011).
55. Selimoglu-Buet, D. *et al.* Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **125**, 3618–3626 (2015).
56. Greenberg, P. L. The classical nature of distinctive CMML monocytes. *Blood* **129**, 1745 (2017).
57. Selimoglu-Buet, D. *et al.* Accumulation of classical monocytes defines a subgroup of MDS that frequently evolves into CMML. *Blood* **130**, 832 (2017).
58. Geyer, J. T. *et al.* Oligomonocytic chronic myelomonocytic leukemia (chronic myelomonocytic leukemia without absolute monocytosis) displays a similar clinicopathologic and mutational profile to classical chronic myelomonocytic leukemia. *Mod. Pathol.* (2017).
59. Shen, Q. *et al.* Flow cytometry immunophenotypic findings in chronic myelomonocytic leukemia and its utility in monitoring treatment response. *Eur. J. Haematol.* **95**, 168–176 (2015).

60. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
61. Harrington, A. M. *et al.* Immunophenotypes of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Subtypes by Flow Cytometry: A Comparison of CMML-1 vs CMML-2, Myeloproliferative vs Dysplastic, De Novo vs Therapy-Related, and CMML-Specific Cytogenetic Risk Subtypes. *Am. J. Clin. Pathol.* **146**, 170–181 (2016).

8 Annexes

Annexe 1. Différents scores pronostics de LMMC proposés dans la littérature

Itzykson *et al*, 2013

	0 point	1 point	2 points	3 points
Leucocytose	< 15 G/L			> 15 G/L
Âge	< 65 ans		> 65 ans	
Plaquettes	> 100 G/L			< 100 G/L
Hémoglobine	> 10 g/dL (F) > 11 g/ dL (H)			< 10 g/dL (F) < 11 g/ dL (H)
ASXL1 muté (hors faux-sens)	NON		OUI	

Risque global	Score global	Médiane survie	Survie sans LAM
Faible	0-4	Non atteint	56 mois
Intermédiaire	5-7	38.5 mois	27 mois
Elevé	8-13	14.4 mois	9 mois

Such *et al*, 2013

	0 point	1 point	2 points
Blastose/Sous-type OMS 2008	LMMC-1	LMMC-2	
Leucocytose/Sous- type Fab	GB < 13 G/L	GB > 13 G/L	
Risque cytogénétique	Faible	Intermédiaire	Elevé
Dépendance transfusionnelle	Non	Oui	

Risque global	Score global	Médiane survie	Risque LAM à 5 ans
Faible	0	72 mois	13%
Intermédiaire 1	1	31 mois	29%
Intermédiaire 2	2-3	13 mois	60%
Elevé	4-5	5 mois	73%

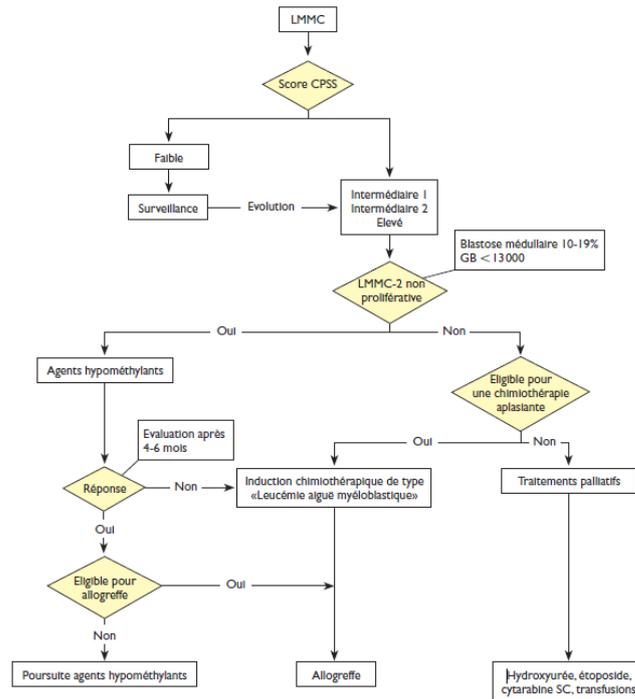
Patnaik *et al*, 2013

	0 point	1 point
Monocytose	< 10 G/L	> 10 G/L
Blastes circulants	NON	OUI
Hémoglobine	> 10 g/dL	< 10 g/dL
Plaquettes	> 100 G/L	< 100 G/L

Risque global	Score global	Médiane survie
Faible	0	32 mois
Intermédiaire	1	18 mois
Elevé	2-4	10 mois

Annexe 2. Algorithme thérapeutique proposé pour la prise en charge de la LMMC

Hafraoui *et al*, 2013



Patnaik *et al*, 2014

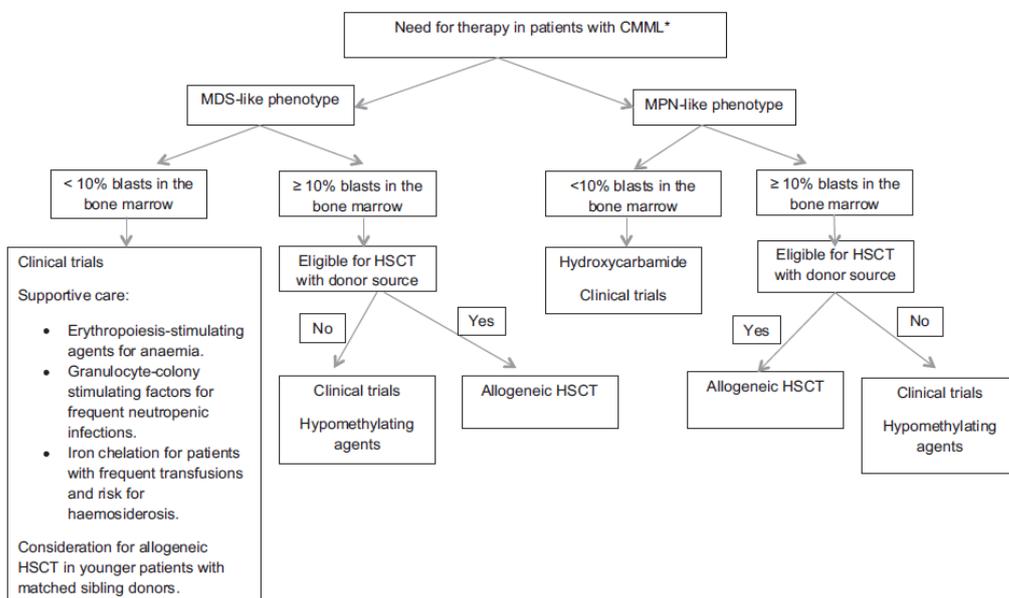


Fig 6. Management algorithm. Our management approach of newly diagnosed patients with chronic myelomonocytic leukaemia. *Need for therapy includes one or more of the following: haemoglobin < 100 g/l, platelet count < $50 \times 10^9/l$, white cell count > $20 \times 10^9/l$, symptoms of organ infiltration (such as symptomatic splenomegaly). MDS, myelodysplastic syndrome; MPN, myeloproliferative neoplasm; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation.

Annexe 3. Proposition de critères pour évaluer la réponse aux traitements dans la LMMC.

Savona *et al*, 2015

Table 2. Proposed criteria for measurement of treatment response in adult MDS/MPN

CR (presence of all of the following improvements)*
Bone marrow: $\leq 5\%$ myeloblasts (including monocytic blast equivalent in case of CMML) with normal maturation of all cell lines and return to normal cellularity*
Osteomyelofibrosis absent or equal to "mild reticulin fibrosis" (\leq grade 1 fibrosis)†
Peripheral blood‡
WBC $\leq 10 \times 10^9$ cells/L
Hgb ≥ 11 g/dL
Platelets $\geq 100 \times 10^9/L$; $\leq 450 \times 10^9/L$
Neutrophils $\geq 1.0 \times 10^9/L$
Blasts 0%
Neutrophil precursors reduced to $\leq 2\%$
Monocytes $\leq 1 \times 10^9/L$
Extramedullary disease: Complete resolution of extramedullary disease present before therapy (eg, cutaneous disease, disease-related serous effusions), including palpable hepatosplenomegaly
Provisional category of CR with resolution of symptoms:‡ CR as described above, and complete resolution of disease-related symptoms as noted by the MPN-SAF TSS
Persistent low-level dysplasia is permitted given subjectivity of assignment of dysplasia*
Complete cytogenetic remission
Resolution of previously present chromosomal abnormality (known to be associated with myelodysplastic, syndrome myeloproliferative neoplasms, or MDS/MPN), as seen on classic karyotyping with minimal of 20 metaphases or FISH§
Partial remission
Normalization of peripheral counts and hepatosplenomegaly with bone marrow blasts (and blast equivalents) reduced by 50%, but remaining $>5\%$ of cellularity except in cases of MDS/MPN with $\leq 5\%$ bone marrow blasts at baseline
Marrow response
Optimal marrow response: Presence of all marrow criteria necessary for CR without normalization of peripheral blood indices as presented above.
Partial marrow response: Bone marrow blasts (and blast equivalents) reduced by 50%, but remaining $>5\%$ of cellularity, or reduction in grading of reticulin fibrosis from baseline on at least 2 bone marrow evaluations spaced at least 2 mo apart
Clinical benefit
Requires 1 of the following in the absence of progression or CR/partial response and independent of marrow response (cord blood response must be verified at ≥ 8 wk) to be considered a clinical benefit
Erythroid response
Hgb increase by ≥ 2.0 g/dL
TI for ≥ 8 wk for patients requiring at least 4 packed red blood cell transfusions in the previous 8 wk
Only red blood cell transfusions given based on physician's judgment for a pretreatment Hgb of ≤ 8.5 g/dL will count in the red blood cell TI response evaluation
Platelet response
Transfusion independence when previously requiring platelet transfusions of at least a rate of 4 platelet transfusions in the previous 8 wk
Pretreatment $\leq 20 \times 10^9/L$: increase from $<20 \times 10^9/L$ to $>20 \times 10^9/L$ and by at least 100%
Pretreatment $>20 \times 10^9/L$ but $\leq 100 \times 10^9/L$: absolute increase of $\geq 30 \times 10^9/L$
Neutrophil response
Pretreatment $\leq 0.5 \times 10^9/L$ at least 100% increase and an absolute increase $\geq 0.5 \times 10^9/L$
Pretreatment, $>0.5 \times 10^9/L$ and $\leq 1.0 \times 10^9/L$ At least 50% increase and an absolute increase $\geq 0.5 \times 10^9/L$
Spleen response
Either a minimum 50% reduction in palpable splenomegaly of a spleen that is at least 10 cm at baseline or a spleen that is palpable at more than 5 cm at baseline becomes not palpable
Symptom response
Improvement in symptoms as noted by decrease of $\geq 50\%$ as per the MPN-SAF TSS scoring <20 were not considered eligible for measuring clinical benefit¶

Annexe 4. Valeurs prédictives positives et négatives obtenues avec les différentes populations monocytaires dans les deux formes de LMMC

	Monocytes classiques CD14 ⁺ /CD16 ⁻				Monocytes intermédiaires CD14 ⁺ /CD16 ⁺				Monocytes non- classiques CD14 ⁻ /CD16 ⁺			
Cohorte globale n=99	VP	29	VPP	0.85	VP	23	VPP	0.85	VP	37	VPP	0.84
	FP	5			FP	4			FP	7		
	VN	50	VPN	0.77	VN	51	VPN	0.71	VN	48	VPN	0.87
	FN	15			FN	21			FN	7		
Cohorte SMD n=46	VP	18	VPP	0.95	VP	14	VPP	0.93	VP	23	VPP	0.96
	FP	1			FP	1			FP	1		
	VN	15	VPN	0.56	VN	15	VPN	0.48	VN	15	VPN	0.68
	FN	12			FN	16			FN	7		
Cohorte SMP n= 53	VP	13	VPP	0.72	VP	10	VPP	0.83	VP	13	VPP	0.68
	FP	5			FP	2			FP	6		
	VN	34	VPN	0.97	VN	37	VPN	0.90	VN	33	VPN	0.97
	FN	1			FN	4			FN	1		

Title: Interest of flow cytometry for the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia

Abstract: The Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a malignant hemopathy characterized by a monocytosis > 1 G/L lasting for more than 3 months. The differential diagnosis with reactive monocytosis may be difficult. We studied, by flow cytometry, the distribution of monocytic subpopulations in 99 patients (44 CMML and 55 not-CMML). The classical CD14⁺/CD16⁻, the intermediates CD14⁺/CD16⁺, and the non-classical CD14⁻/CD16⁺ monocytes were separated by a standardized gating strategy. The myeloproliferative and myelodysplastic forms of CMML were distinguished: according to the leukocytosis, respectively ≥ 13 G/L and <13 G/L. We finally propose an algorithm that allows to orient towards a dysplastic CMML by quantifying the population of non-classical monocytes (threshold $<1.64\%$), or towards a proliferative CMML from the classical monocytes (threshold $>96\%$). This algorithm diagnosed a CMML with a positive predictive value of 0.92 and a negative predictive value of 0.83.

Keyword: CMML, flow cytometry, immunophenotype, monocyte, subpopulation

Supervisor : Docteur François VERGEZ

INTERÊT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC DE LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE

RESUME en français

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie maligne caractérisée par une monocytose > 1G/L persistante plus de 3 mois. Le diagnostic différentiel avec une monocytose réactionnelle peut s'avérer difficile. Par cytométrie en flux, nous avons étudié la répartition des sous-populations monocytaires chez 99 patients (44 LMMC et 55 non-LMMC). Les monocytes classiques CD14⁺/CD16⁻, intermédiaires CD14⁺/CD16⁺, et non-classiques CD14⁻/CD16⁺ ont été séparés par une stratégie de fenêtrage standardisée. Les formes myéloproliférative et myélodysplasique de LMMC ont été distinguées selon la leucocytose, respectivement ≥ 13 G/L et < 13 G/L. Enfin, nous proposons un algorithme qui permet d'orienter vers une LMMC dysplasique en quantifiant la population de monocytes non-classiques (seuil < 1.64%), ou vers une LMMC proliférative à partir des monocytes classiques (seuil > 96%). Cet arbre décisionnel diagnostique une LMMC avec une valeur prédictive positive à 0.92 et négative à 0.83.

=

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Biologie médicale

MOTS-CLES : LMMC, Cytométrie en flux, immunophénotype, monocyte, sous-populations

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier, Toulouse III - Faculté des Sciences Pharmaceutiques,
35 chemin des maraîchers, 31062, TOULOUSE cedex 9

Directeur de thèse : Dr VERGEZ François