



**HAL**  
open science

# Évaluation des performances analytiques de nouveaux outils : analyseur XN-10 Sysmex<sup>®</sup>, cytométrie en flux dans le diagnostic différentiel de la leucémie myélomonocytaire chronique

Jordan Dahan

## ► To cite this version:

Jordan Dahan. Évaluation des performances analytiques de nouveaux outils : analyseur XN-10 Sysmex<sup>®</sup>, cytométrie en flux dans le diagnostic différentiel de la leucémie myélomonocytaire chronique. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01879565

**HAL Id: dumas-01879565**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01879565>**

Submitted on 24 Sep 2018

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

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

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 7 septembre 2018

Par M. DAHAN Jordan  
Né le 9 décembre 1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Evaluation des performances analytiques de nouveaux outils:  
analyseur XN-10 Sysmex®, cytométrie en flux dans le diagnostic  
différentiel de la leucémie myéломocytaire chronique**

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr Françoise DIGNAT-GEORGE

Membres : Pr Régis COSTELLO

Dr Yaël BERDA-HADDAD

Dr Romaric LACROIX

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT  
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

## MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

## MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	<b>M. Cyril PUJOL</b>
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

## A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

## ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

## **CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE**

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

***L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.***

## Liste des remerciements

### Aux membres du jury :

En premier lieu, je remercie **Madame le Professeur Françoise Dignat-George**, chef de service du laboratoire d'Hématologie et de Biologie Vasculaire de l'hôpital de la Conception, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury. Ayant travaillé un an dans votre service, vous avez toujours su être disponible et me montrer la voie pour parfaire mes compétences en biologie médicale.

Je remercie **Monsieur le Professeur Régis Costello**, chef de service d'onco-hématologie adulte de l'hôpital de la Conception, d'avoir élargi mes connaissances à l'hématologie clinique. En effet, je vous remercie d'avoir accepté ma présence dans votre service lors de la visite de vos patients. Le monde de la clinique m'a permis de mieux appréhender le contact avec les patients, qualité indispensable au métier de biologiste.

Je remercie **Madame le Docteur Yaël Berda-Haddad**, praticien hospitalier au laboratoire d'Hématologie et de Biologie Vasculaire de l'hôpital de la Conception. En tant que directrice de mémoire, vous m'avez guidé dans mon travail et m'avez aidé à trouver les solutions pour avancer. Votre énergie et votre motivation communicatives m'ont permis de réaliser un travail aussi abouti.

Enfin, je remercie **Monsieur le Docteur Romaric Lacroix**, MCU-PH du laboratoire d'Hématologie et de Biologie Vasculaire de l'hôpital de la Conception, de m'avoir inculqué l'esprit scientifique que j'ai dû développer tout au long de ce travail. Merci d'avoir été co-directeur de cette thèse et d'avoir enrichi mes connaissances lors de mes stages d'interne.

### Aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire de fin d'étude :

**Maxime**, merci pour ta présence, ton soutien, ton calme légendaire, ta grande sympathie et pour toutes nos discussions qui m'ont permis de décupler mes connaissances en hématologie. J'ai vraiment adoré travailler avec toi, les lectures de myélogrammes au microscope à cinq têtes vont me manquer.

**Shirley**, merci d'avoir pris le temps de mettre en place le protocole d'immunophénotypage des monocytes, d'avoir répondu présente quand j'avais besoin d'être conseillé. Ta sympathie et ta bonne humeur sont très appréciables.

Je remercie mes co-internes, **Ségoène** la touche féminine de la team, **James** le businessman, **Robin** la zen attitude, **Hugo** le médecin généraliste qui s'est essayé à la biologie et enfin **JJ** la blonde platine. Merci à vous de m'avoir permis de travailler ma thèse et de m'avoir soutenu !

### **A ma famille :**

Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études et tout au long de ma vie. Je ne vous remercierai jamais autant pour cela.

**Maman**, ton rêve était que je sois médecin... je finis biologiste. Pour te consoler, tu peux quand même m'appeler Docteur car oui, je suis bien Docteur en biologie médicale !

**Papa**, toi qui es technicien de laboratoire depuis 1980, je pourrais maintenant être ton patron... Dommage que tu partes bientôt à la retraite !

Merci à mes sœurs qui m'ont toujours encouragé à suivre mes études :

**Sabrina**, toi la madrilène, la première de la famille à faire des grandes études, tu m'as montré l'exemple. Tu as bien tenu ton rôle d'aînée, merci encore !

**Kelly**, la débrouillarde qui enchaîne les métiers, merci de m'avoir énormément aidé et de m'avoir poussé à suivre mes études pour bien gagner ma vie.

**Debbie**, la jeune maman au caractère bien trempé, tu as réussi à élever tes 3 enfants malgré ton jeune âge, et je t'admire pour ça !

Mes neveux et nièces, **Yaron**, **David**, **Lina**, **Amaya** et **Léa** qui grandissent à une allure incroyable, je vous embrasse fort !

### **A Florence :**

Toi qui m'as soutenu durant une grande partie de mon internat, je ne te remercierai jamais assez.

### **A mes amis :**

La bande d'interne marseillais que j'ai rencontré en arrivant en novembre 2014 et avec qui j'ai tissé des liens depuis 4 ans :

**Maxime** mon collègue lyonnais avec qui je soutiens l'OL au milieu de tous ces marseillais, **Loris** le fan de microparticules avec qui les débats sont toujours constructifs, **Damien** le

retardataire avec qui les discussions sont de très haut niveau, **Thibault** le grand sportif qui dort dans son roomster, **Clémence** qui voit la vie en violet, **Pauline** la blondinette qui a peur en voiture, **Chloé** une autre blondinette à la bonne humeur communicative, **Léa** avec qui j'aimerais refaire une randonnée (ou pas...), **Alexandre** mon premier co-interne à la gentillesse inégalable, **Julien** le viticulteur chat noir des gardes, **Baptiste** le pâtissier indispensable en soirée, **Adrien** alias Bobby le réanimateur, **Maude** la généticienne fan de master, **Estelle** la reine du shopping, **Johann** le tombeur de ses dames, **Fatih** le seul stéphanois super sympa, **Jean Sélim** le capitaine de soirée, **Bassam** le grand barbu à la voix douce, **Momo** le sapé comme jamais, **Lorène** la discrète mais très attachante.

Les amis que j'ai connus tout au long de mon internat :

**Quentin** mon partenaire dans l'armée, **Antoine** le beau gosse, **Tracy** ma co-interne préférée (dingue, dingue, dingue), **Pierre-Henri** mon collègue « Mégane RS » avec qui j'ai visité la Corse un peu vite (voire trop vite), **Yuta** le spécialiste du snap banane.

La bande d'amis d'Ajaccio que j'ai hâte de revoir :

**Caroline** qui nous soigne en hélico, **Marianne** qui nous soigne en paddle, **Steven** le Corse généreux qui n'aime pas perdre aux jeux de société, **Adam** le sniper pêcheur de poissons.

# Table des matières

Liste des remerciements.....	9
Liste des abréviations.....	14
Listes des Figures et Tableaux.....	17
Préambule .....	19
<b>PARTIE I : Généralités de la Leucémie MyéloMonocytaire Chronique.</b> .....	<b>21</b>
1/ Définition .....	21
a) Evolution de la classification.....	21
b) Classification OMS 2016 des SMD/SMP .....	22
2/ Epidémiologie .....	25
3/ Physiopathologie .....	25
a) Hématopoïèse normale .....	25
b) Hématopoïèse pathologique : Focus sur la LMMC.....	28
4/ Diagnostic.....	33
a) Clinique .....	33
b) Biologique .....	34
5/ Pronostic.....	40
a) Scores IPSS et IPSS-R .....	44
b) Score CPSS et CPSS-Mol .....	46
6/ Traitement .....	49
a) Soins de support .....	50
b) Chimiothérapie.....	50
c) Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH).....	52
<b>PARTIE II : Les nouveaux outils d'aide au diagnostic de la LMMC</b> .....	<b>54</b>
1/ Le monoscore de l'automate XN-10 Sysmex®.....	54
2/ Analyse de la population monocyttaire par cytométrie en flux.....	58
<b>PARTIE III : Objectif de l'étude</b> .....	<b>64</b>
<b>PARTIE IV : Matériels et méthodes</b> .....	<b>65</b>
1/ Cohorte.....	65
2/ Méthodologie .....	66
a) Automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex®.....	66
b) Cytologie au microscope optique Leica® .....	67
c) Cytomètre de flux Navios®.....	69
3/ Recueil des données .....	73
4/ Statistiques .....	73

<b>PARTIE V : Résultats</b> .....	75
1/ Caractéristiques démographiques et biologiques .....	75
2/ Monoscore.....	79
3/ Cytométrie en flux.....	82
4/ Cytologie .....	85
5/ Synthèse des résultats.....	86
<b>PARTIE VI : Discussion</b> .....	88
1/ Monoscore.....	88
a) Avantages .....	88
b) Inconvénients.....	90
c) Optimisation du monoscore.....	91
2/ Cytométrie en flux.....	92
a) Résultats obtenus vs résultats attendus .....	92
b) Mise en défaut de la technique .....	93
c) Difficultés techniques.....	95
d) Optimisation de l'utilisation de l'immunophénotypage monocytaire .....	96
3/ Cytologie .....	97
a) Difficultés de la cytologie .....	97
b) C-score.....	98
4/ Place des 3 outils dans la pratique quotidienne.....	99
<b>PARTIE VII : Conclusion</b> .....	101
<b>Bibliographie</b> .....	103
Annexe 1 : Tableau récapitulatif du recueil des données des patients de la cohorte .....	108

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APC-AA700 : AlloPhycoCyanine-Alexa Fluor 700

APHM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes

ARN : Acide RiboNucléique

AUC : Area Under Curve (aire sous la courbe)

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

CBC-DIFF : Complete Blood Count with DIFFerential

CCR : Chemokine (C-C motif) Receptor

CD : Cluster of Differentiation

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun

CMF : CytoMétrie en Flux

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Progéniteur Myéloïde Commun

CPSS : CMML Prognostic Scoring Systems

CPSS mol : Molecular CMML Prognostic Scoring Systems

CRP : Protéine C Réactive

C-score : Score Cytologique

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

DN : Double Négatif

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

FAB : French American British

FDA : Food and Drug Administration

FSC : Forward SCatter

GB : Globule Blanc

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFHC : Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire

GFM : Groupe Français des Myélodysplasies

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GMP : Progéniteur des lignées Monocytaires et Granuleuses  
GVH : Greffon contre l'Hôte  
Hb : Hémoglobine  
HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – antigen D Related  
HU : Hydroxyurée  
IgG : Immunoglobuline de type G  
IL : Interleukine  
IPSS : International Prognosis Scoring System  
IPSS-R : Revised International Prognosis Scoring System  
KO : Krome Orange  
LA : Leucémie Aiguë  
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde  
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique  
LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique  
LMMC-MD : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique MyéloDysplasique  
LMMC-MP : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique MyéloProliférative  
LMMJ : Leucémie MyéloMonocytaire Juvénile  
Ly : Lymphocyte  
M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor  
MDAPS : MD Anderson Prognostic Score  
MEP : Progéniteur Erythroblastique et Mégacaryocytaire  
MGG : May-Grünwald Giemsa  
MO : Moelle Osseuse  
Mo : Monocyte  
MO1 : Monocytes classiques (CD14+ / CD16-)  
MO2 : Monocytes intermédiaires (CD14+ / CD16+)  
MO3 : Monocytes non classiques (CD14 dim / CD16+)  
MPP : Progéniteur MultiPotent  
NFS : Numération Formule Sanguine  
NGS : Séquençage Nouvelle Génération  
NK : Natural Killer  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
p : p-value

PB : Pacific Blue

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffer Salin

PC5 : R Phycoerythrin-Cyanine 5.1

PC7 : R Phycoerythrin-Cyanine 7

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCT : ProCalciTonine

PE : R PhycoErythrin

PNB : PolyNucléaire Basophile

PNE ou Eo : PolyNucléaire Eosinophile

PNN ou Ne : PolyNucléaire Neutrophile

Rapport N/C : Rapport NucléoCytoplasmique

ROC : Receiver Operating Characteristic

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

Se : Sensibilité

SFL : Side Fluorescence Light

SMD : Syndrome MyéloDysplasique

SMD/SMP-RS-T : Syndrome MyéloDysplasique/Syndrome MyéloProlifératif avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose

SMP : Syndrome MyéloProlifératif

Sp : Spécificité

SSC : Side SCatter

TNF : Tumor Necrosis Factor

VA : Valeur Absolue

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

## Listes des Figures et Tableaux

Figure 1 : L'hématopoïèse myéloïde (adapté de <a href="http://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/medecine-transfusionnelle/notions-d-hematologie.php">http://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/medecine-transfusionnelle/notions-d-hematologie.php</a> ) .....	27
Figure 2 : Monocytopoïèse d'après Terry RL et al. Cell Immunol, 2014.....	28
Figure 3 : Répartition des différentes mutations en fonction de leur fréquence parmi la population étudiée d'après Patnaik MM et al. Blood Cancer J, 2016.....	30
Figure 4 : Modèle adapté d'Itzykson R. et al montrant la relation entre la dominance clonale précoce et l'avantage de différenciation de la lignée granulomonocytaire.....	32
Figure 5 : Cytologie des différentes cellules monocytaires .....	35
Figure 6 : Courbes de survie globale chez les patients LMMC avec ou sans la mutation ASXL1 d'après Itzykson R, et al. J Clin Oncol, 2013 .....	39
Figure 7 : Médianes de survie des patients en sein des différents types de LMMC d'après Schuler E et al. Leuk Res, 2014 .....	40
Figure 8 : Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique Mayo d'après Patnaik MM, Itzykson R et al. ....	42
Figure 9 : Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique du Groupe Francophone des Myélodysplasies d'après Patnaik MM, Itzykson R et al. ....	43
Figure 10 : Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique Mayo moléculaire d'après Patnaik MM, Itzykson R et al.....	44
Figure 11 : Illustration du calcul de Ne-WX d'après Schillinger F et al. Scand J Clin Lab Invest, 2018.....	56
Figure 12 : Les 3 variables significativement différentes entre les 2 groupes d'après Schillinger F et al. Scand J Clin Lab Invest, 2018.....	56
Figure 13 : Fenêtre finale en « Density Plot » et cytologie des populations monocytaires d'après Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015 .....	61
Figure 14 : Répartition de la sous-population monocyttaire MO1 dans la cohorte de validation de l'étude de Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015 .....	62
Figure 15 : Schéma du principe de comptage cellulaire par la technique de l'impédance .....	66
Figure 16 : Diagramme de dispersion des leucocytes chez un patient normal .....	67
Figure 17 : Principe simplifié d'un cytomètre en flux .....	70
Figure 18 : Méthode de fenêtrage en cytométrie en flux .....	72
Figure 19 : Différence d'âge entre les deux populations.....	75
Figure 20 : Analyse du taux de plaquettes dans les deux populations .....	76
Figure 21 : Analyse du taux de monocytes en pourcentage et en valeurs absolues dans les deux populations .....	77
Figure 22 : Analyse du ratio Ne/Mo dans les deux populations .....	77
Figure 23 : Analyse de la valeur Ne-WX dans les deux populations.....	78
Figure 24: Schéma représentant les différentes alarmes analytiques en fonction de l'emplacement des cellules sur le diagramme de dispersion des leucocytes .....	78
Figure 25 : Analyse de l'alarme « Blast/ Abnormal lymph » dans les deux populations .....	79
Figure 26 : Analyse du monoscore dans les deux populations .....	79
Figure 29 : Analyse des résultats de la cytométrie en flux dans les deux populations .....	83
Figure 28 : Graphe de cytométrie en flux chez un patient faux positif en MO1 .....	84

Figure 27 : Analyse des performances du C-score.....	85
Figure 30 : Exemple de résultats faussement négatifs en cytométrie en flux chez des patients atteints de LMMC .....	96
Tableau 1 : Score IPSS .....	45
Tableau 2 : Score IPSS-R.....	46
Tableau 3 : Score CPSS .....	47
Tableau 4 : Score CPSS-mol .....	48
Tableau 5 : Ensemble des données de l'étude de Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015 .....	60
Tableau 6 : Grille d'évaluation cytologique.....	69
Tableau 7 : Anticorps fluorescents utilisés pour l'analyse en cytométrie en flux .....	71
Tableau 8 : Paramètres clinico-biologiques significativement différents entre les 2 groupes de patients .....	75
Tableau 9 : Performances analytiques du monoscore .....	80
Tableau 10 : Analyse du cas faux négatif en monoscore .....	81
Tableau 11 : Analyse des cas faux positifs en monoscore .....	81
Tableau 13 : Résultats des médianes des 3 populations monocytaires MO1, MO2 et MO3 au sein des 2 groupes de la cohorte d'étude.....	82
Tableau 14: Performances analytiques de la cytométrie en flux avec le pourcentage de MO184	
Tableau 15 : Résultats de la cytométrie en flux chez les patients faux négatifs en MO1 .....	84
Tableau 12 : Performances analytiques de la cytologie au microscope optique .....	86
Tableau 16 : Synthèse des résultats de performances analytiques des 3 outils étudiés pour le diagnostic différentiel de la LMMC. ....	86

## Préambule

La leucémie myéломonozytaire chronique (LMMC) est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique dont l'âge moyen de diagnostic est de 72 ans. Cette pathologie est rare car elle a une prévalence d'environ 4 cas pour 100000 personnes. Le pronostic est plutôt défavorable puisque la médiane de survie est d'environ 2-3 ans après le diagnostic. Les patients décèdent en général des conséquences des cytopénies, ou encore après une transformation en leucémie aiguë myéloïde. A ce jour, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la seule thérapie permettant une guérison. Ce traitement est rarement envisageable en raison de l'âge avancé des patients diagnostiqués.

La LMMC a été très longtemps classée parmi les syndromes myélodysplasiques jusqu'en 2002 où l'OMS en a fait une entité à part entière. De ce fait, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées spécifiquement à cette pathologie permettant une grande avancée sur le diagnostic, le pronostic et le traitement.

Malgré les progrès réalisés, le diagnostic reste à ce jour difficile à établir car il s'agit en général d'un diagnostic d'exclusion. Le diagnostic précoce de la LMMC reste un point clé pour une prise en charge thérapeutique optimale. Or encore aujourd'hui, il repose le plus souvent sur une persistance de la monocytose sanguine ce qui constitue un retard de la prise en charge du patient.

Des études récentes ont montré l'intérêt de nouveaux outils diagnostiques pouvant entrer en jeu dès la première numération formule sanguine (NFS). Ceux-ci pourraient permettre de faire plus précocement le diagnostic de LMMC et améliorer la prise en charge thérapeutique.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer 2 nouveaux outils diagnostiques publiés récemment dans la littérature en comparaison avec la cytologie sanguine au microscope optique chez des patients qui présentent une monocytose  $\geq 1\text{G/L}$  dans le service d'Hématologie et de Biologie Vasculaire du CHU Conception à Marseille.

Le premier est un score appelé «monoscore», paramétré sur l'automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex®. Ainsi, en présence d'une monocytose suspecte et en fonction du seuil établi par le fournisseur, un frottis sanguin est étalé. Il permettrait ainsi de rationaliser le nombre de frottis sanguin pour les numérations présentant une monocytose.

Le second outil est l'analyse de la population monocytaire par la technique de cytométrie en flux en fonction de l'expression de 2 marqueurs : le CD14 et le CD16.

Les performances analytiques de ces 2 outils ont été étudiées sur une cohorte de patients inclus de manière prospective entre février et mai 2018 et comparées à la cytologie sanguine afin de déterminer comment ces nouveaux outils pourraient se positionner dans la démarche de diagnostic différentiel de la LMMC afin de modifier la prise en charge des patients atteints de LMMC.

# **PARTIE I : Généralités de la Leucémie MyéloMonocytaire Chronique.**

## 1/ Définition

### a) Evolution de la classification

La leucémie myéломocytaire chronique (LMMC) est une pathologie rare qui concerne essentiellement les sujets âgés. Il s'agit d'une hémopathie maligne clonale acquise de la cellule souche hématopoïétique (CSH) caractérisée par un versant prolifératif et un versant dysplasique(1). Le versant prolifératif se manifeste par une prolifération maligne d'une ou plusieurs lignées hématopoïétiques (principalement la lignée monocytaire) sans blocage de maturation. Le versant dysplasique se manifeste lui par une prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de façon anormale aboutissant à une apoptose prématurée. Cette dualité lui a valu pendant longtemps d'être classé parmi les syndromes myélodysplasiques (SMD). En effet en 1976, la LMMC était déjà évoquée au sein de cette entité au côté des anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB), puis définitivement classée en 1982(2,3).

En 1994, le groupe FAB propose de différencier deux type de LMMC en fonction du taux de leucocytes (cut-off = 13 G/L) et ainsi de reclasser les LMMC hyperleucocytaires au sein des LMC(4). Deux sous entités se distinguent : LMMC myélodysplasiques (LMMC-MD) si le taux de leucocytes est inférieur à 13 G/L et LMMC myéloprolifératives (LMMC-MP) si le taux de leucocytes est supérieur à 13 G/L. Cette sous classification a été très discutée par la suite dans la littérature, notamment sur le fait que la différence entre les deux entités représenterait plutôt d'une évolution de la maladie.

Ce n'est qu'en 2002 que la LMMC est reclassée par l'OMS comme une entité à part entière, appelée syndrome myélodysplasique/syndrome myéloprolifératif (SMD/SMP)(5). La notion de LMMC hyperleucocytaire ou non n'est plus mentionnée.

Ce groupe des SMD/SMP est ainsi composé de la façon suivante :

- LMMC :
  - o LMMC-1 : Blastos inférieurs à 5% dans le sang et inférieurs à 10% dans la moelle osseuse (MO)
  - o LMMC-2 : Blastos compris entre 5 et 19% de blastos dans le sang et entre 10 et 19% dans la MO
- Leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ)
- Leucémie myéloïde chronique (LMC) atypique
- SMD/SMP avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (SMD/SMP-RS-T)
- SMD/SMP non classable

En 2008, la classification des néoplasies myéloïdes et des leucémies aiguës est révisée, on ne note pas de changement concernant la LMMC (6).

#### b) Classification OMS 2016 des SMD/SMP

En 2016, le groupe des SMD/SMP se compose de la LMMC, la LMMJ et de la LMC atypique. On ne retrouve plus les SMD/SMP non classables. Les SMD/SMP-RS-T constituent désormais une entité à part entière.

##### a. LMMC

Selon l'OMS 2016(6), la LMMC se définit par :

- Une monocytose persistante  $\geq 1$  G/L, avec un taux de monocytes représentant au moins 10 % des cellules de la formule leucocytaire (critère principal)
- Absence du chromosome Philadelphie au caryotype ou du réarrangement BCR-ABL afin d'éliminer une LMC et absence de critère évoquant tout autre SMP défini selon l'OMS.
- Absence de réarrangements PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 et absence de gène de fusion PCM1-JAK2 (doivent être spécifiquement exclus dans les cas avec éosinophilie)
- Le pourcentage de blastos dans la moelle et le sang doit être inférieur à 20% afin d'éliminer une leucémie aiguë. On comptabilisera en blastos : les myéloblastes, les

monoblastes et les promonocytes. Les monocytes anormaux sont comptés dans le contingent monocyttaire.

- Au moins l'un des critères suivants :
  - Présence de signes de dysplasie sur au moins une lignée. Si la dysplasie est absente ou minime il faut que les autres critères soient présents et qu'une anomalie cytogénétique clonale ou moléculaire soit présente dans les cellules hématopoïétiques
  - Présence d'une monocytose depuis au moins 3 mois et absence d'autre cause de monocytose (infection/inflammation/cancer)

On distingue également 3 sous types de LMMC, on les différencie uniquement par le nombre de blastes présents dans le sang et dans la moelle osseuse (MO). En effet il s'agit d'un des paramètres les plus importants dans le pronostic de la maladie de LMMC(7).

- LMMC-0 : Blastes inférieurs à 2% dans le sang et inférieurs à 5% dans la MO
- LMMC-1 : Blastes compris entre 2 et 4% dans le sang et entre 5 et 9% dans la MO
- LMMC-2 : Blastes compris entre 5 et 19% dans le sang et entre 10 et 19% dans la MO (ou présence de corps d'Auer quel que soit le pourcentage de blastes)

De plus la notion de LMMC-MD et LMMC-MP avec le cut-off à 13 G/L pour le taux de leucocytes est réapparue. En effet, suite à des études menées entre 2010 et 2014(8,9), il a été montré que la différence entre ces deux sous entités était principalement liée à la présence d'anomalies des voies de signalisation RAS/MAPK, et que par conséquent le pronostic était différent (Cf épidémiologie).

#### b. LMMJ

Cette maladie rare de l'enfant a une incidence de 1 cas pour 1 million d'habitants par an, mais représente 25 % des SMD de l'enfant de moins de 15 ans.

C'est une maladie hématopoïétique clonale agressive caractérisée par la prolifération excessive de cellules des lignées monocyttaire et granulocytaire.

Cette pathologie se définit dans un premier temps par 4 critères clinicobiologiques obligatoires(6):

- monocytose sanguine supérieure à 1 G/L
- moins de 20 % blastes dans le sang et la MO

- splénomégalie
- absence de remaniement BCR-ABL

Ensuite, il suffit d'avoir au moins un critère génétique suivant pour poser le diagnostic :

- mutation somatique de NRAS, KRAS ou de PTPN11 (les mutations germinales de PTPN11 sont exclues car évoqueraient le syndrome de Noonan)
- mutation du gène NF1 ou le diagnostic clinique de la neurofibromatose
- mutation germinale de CBL ou perte de l'hétérozygotie pour CBL

Néanmoins, si aucun des critères génétiques n'est présent, le diagnostic peut être posé si les critères suivants sont réunis :

- présence des 4 critères obligatoires et
- soit :
  - monosomie 7 ou une quelconque autre anomalie cytogénétique
  - 2 des critères suivants :
    - myélémie ou érythromyélie
    - HbF augmentée pour l'âge du patient
    - hypersensibilité *in vitro* des progéniteurs au GM-CSF
    - hyperphosphorylation de STAT5

### c. LMC atypique

Il s'agit d'une maladie rare, représentant environ 1 % des LMC portant le chromosome Philadelphie.

La LMC atypique se définit selon les critères suivants(6):

- leucocytose sanguine, avec polynucléose neutrophile et myélémie ( $\geq 10\%$  de leucocytes)
- dysgranulopoïèse (dont anomalie de condensation de la chromatine)
- polynucléaires basophiles  $< 2\%$  des leucocytes
- monocytose absente ou minime (inférieure à 1 G/L et inférieure à 10 % des leucocytes)
- moelle osseuse hypercellulaire avec hyperplasie granulocytaire et dysgranulopoïèse, avec ou sans dysplasie des autres lignées
- moins de 20 % de blastes dans le sang et dans la MO

- absence de critères évoquant une LMC avec gène de fusion BCR-ABL, une Myélofibrose, une Polyglobulie de Vaquez ou une Thrombocytémie Essentielle
- absence de réarrangement PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, ou PCM1-JAK2

## 2/ Epidémiologie

L'âge médian du diagnostic de la LMMC varie de 71 à 74 ans selon les études, avec une prépondérance masculine (1,5-3: 1). L'incidence exacte de la LMMC reste encore inconnue, elle est estimée à environ 4 cas pour 100 000 personnes par an(10). Elle est probablement sous-estimée du fait des difficultés diagnostics et de l'impact thérapeutique encore limité.

La leucémie myéломocyttaire chronique est l'entité la plus fréquente dans ce groupe de SMD/SMP(11). Lorsque le diagnostic est fait chez des patients inférieurs à 65 ans, le pronostic semble meilleur(12).

Environ 10 % des cas de LMMC seraient secondaires à de la chimiothérapie cytotoxique, et selon une étude rétrospective de *Subari et al*, les temps de survie médian globaux sont plus courts que les LMMC de novo(13). Dans une autre étude de 2014, on montre que 6 % des LMMC seraient secondaires à des syndromes myélodysplasiques(14).

La littérature décrivant l'exposition environnementale et le risque de LMMC est limitée. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse que les facteurs de risque connus pour les SMD ou les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) tels que les rayonnements ionisants, la chimiothérapie cytotoxique, le benzène ou d'autres hydrocarbures, les produits chimiques agricoles et la fumée de tabac pourraient s'avérer être des facteurs de risque pour la LMMC. Cependant, les preuves sont actuellement non concluantes. Il n'y a pas de LMMC familiale rapportée, mais plusieurs syndromes congénitaux sont associés à la leucémie myéломocyttaire juvénile (LMMJ) comme le syndrome de Noonan.

## 3/ Physiopathologie

- a) Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse peut se définir comme étant l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ceci implique la présence d'un micro environnement spécifique permettant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches de l'hématopoïèse, l'intervention de molécules extracellulaires (facteurs de croissance), intracytoplasmiques (récepteurs et voies de transduction du signal), et intranucléaires (facteurs de transcription et gènes spécifiques).

Elle connaît deux phases au cours du développement :

Une phase primitive qui débute à J21 de la vie embryonnaire. Des îlots sanguins se forment à partir du mésoderme du sac vitellin. Les cellules centrales se différencient en cellules érythroblastiques (nucléées) et les cellules périphériques forment les premières cellules endothéliales (vaisseaux).

Une phase définitive qui débute à J28, lors de l'apparition des premières cellules souches hématopoïétiques dans l'aorte dorsale de la région Aorte-Gonades-Mesonephros, qui iront ensuite coloniser le foie puis la rate.

Vers 4 mois de grossesse, la moelle osseuse commence à être colonisée par les CSH et sera le site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et pour toute la vie (présentes dans tous les os jusqu'à 4 ans, puis uniquement les os courts et plats : sternum, côtes, bassin, crâne, vertèbres).

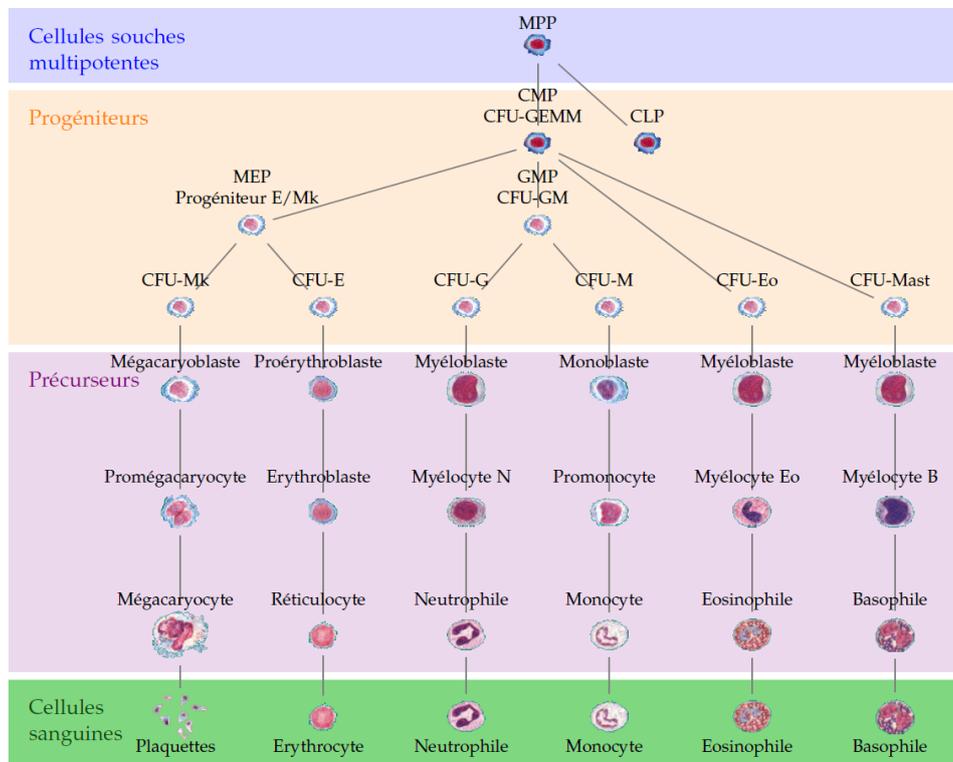
Le système hématopoïétique est organisé de façon pyramidale. Au sommet de la pyramide se situent les CSH localisées dans les niches de la moelle osseuse. Elles ont la particularité d'être multipotentes, donc capable de donner naissance à toutes les cellules de l'hématopoïèse. Elles sont en très faible nombre, et pour la plupart quiescentes (donc protégées contre les agressions de type radio ou chimiothérapie par exemple). Elles ont aussi bien la capacité de s'auto-renouveler, ou de donner une cellule fille équivalente, ou encore, de se différencier en progéniteur (lignée myéloïde ou lymphoïde).

Le progéniteur a une grande capacité de prolifération et de différenciation mais a perdu la capacité d'auto-renouvellement. À partir de ce progéniteur, chaque étape de la différenciation s'accompagne de la génération de progéniteurs de plus en plus engagés dans la différenciation en lignée spécifique. La CSH multipotente va donner un progéniteur commun lymphoïde (CLP) qui à son tour va donner toutes les lignées lymphoïdes, ou un progéniteur commun myéloïde (CMP). Le CMP donne un progéniteur commun aux lignées mégacaryocytaire et

érythroblastique (MEP) et un progéniteur commun aux lignées granuleuse et monocyttaire (GMP).

Une fois que le progéniteur s'est suffisamment différencié, il aboutira à un précurseur spécifique d'une lignée cellulaire. Les précurseurs de l'hématopoïèse représentent le compartiment de maturation de la moelle osseuse. Dans chaque lignée on observe une amplification du nombre de cellules (3 à 5 divisions cellulaires), avec des critères morphologiques propres à chaque stade de maturation, observable au microscope.

Les cellules les plus matures présentes dans la moelle osseuse vont pouvoir sortir pour aller dans le sang et effectuer leurs fonctions. Les cellules de la lignée myéloïde présentes dans le sang sont les plaquettes, les érythrocytes, les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles et enfin les monocytes. Les plaquettes ont un rôle dans l'hémostase et la coagulation, les érythrocytes transportent l'oxygène via l'hémoglobine, les polynucléaires neutrophiles ont un rôle dans les infections, les monocytes ont un rôle dans l'immunité innée ou acquise ainsi que dans l'inflammation [Figure 1].



**FIGURE 1 :** L'hématopoïèse myéloïde (adapté de <http://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/medecine-transfusionnelle/notions-d-hematologie.php>)

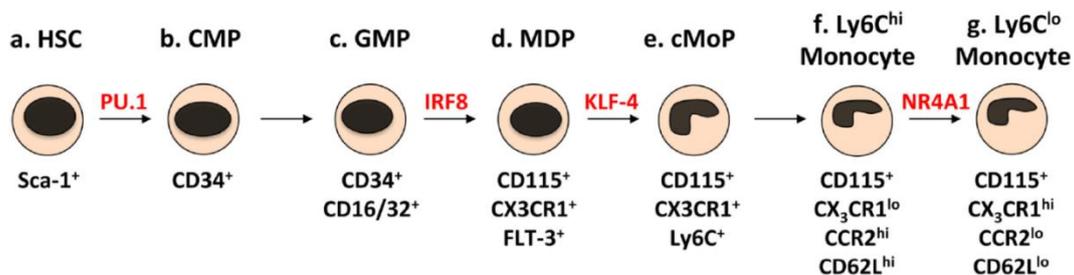
Le monocyte réside environ 24 heures dans la MO, puis migre dans le sang périphérique où il est présent 1 à 3 jours, avant de migrer par diapédèse active au travers des parois vasculaires pour se localiser dans les divers tissus de l'organisme. Il se transforme alors en histiocyte, ayant une activité macrophagique et immunitaire. Il n'existe pas de réserve médullaire.

Leur rôle dans l'immunité innée se matérialise principalement par la phagocytose. Le chimiotactisme permet leur attraction vers un territoire précis. L'adhésion aux éléments à éliminer se fait par l'intermédiaire du complément et des récepteurs Fc des immunoglobulines ou encore des Toll-like récepteurs. L'ingestion de l'élément va aboutir à la dégradation et à l'épuration de celui-ci.

Cette dégradation peut également aboutir à la formation d'un peptide antigénique qui sera à la base de la réponse immunitaire. Couplé au CMH de classe II sur la membrane externe de l'histiocyte, ce peptide antigénique pourra être présenté aux lymphocytes T et B au niveau des organes lymphoïdes : les histiocytes sont des cellules présentatrices d'antigènes.

#### b) Hématopoïèse pathologique : Focus sur la LMMC

Des facteurs de transcription (PU.1, IRF8, KLF4) associés à des facteurs de croissance (M-CSF et IL-34) vont permettre la différenciation et la maturation des CSH vers la lignée monocyttaire [Figure 2].



**FIGURE 2** : Monocytopoïèse d'après Terry RL et al. *Cell Immunol*, 2014

On rappelle que la LMMC se traduit par une composante myéloproliférative entraînant une monocytose persistante avec ou sans polynucléose neutrophile, ainsi qu'une composante myélodysplasique qui se traduit par des cytopénies périphériques (anémie, thrombopénie, neutropénie).

Cette maladie est issue de la transformation d'un progéniteur myéloïde très immature CD34+, CD38-, CD90+ conduisant à l'accumulation de monocytes. Il a également été retrouvé des

cellules granuleuses immatures qui ont la faculté d'avoir des propriétés immunosuppressives. Elles bloquent la différenciation des monocytes en sécrétant des alpha-défensines qui interagissent avec le récepteur purinergique P2Y6 à la surface des cellules. Elles inhibent aussi l'activation lymphocytaire T. Le clone leucémique génère donc des cellules myéloïdes suppressives analogues à celles identifiées dans le sang des patients atteints de tumeurs solides.

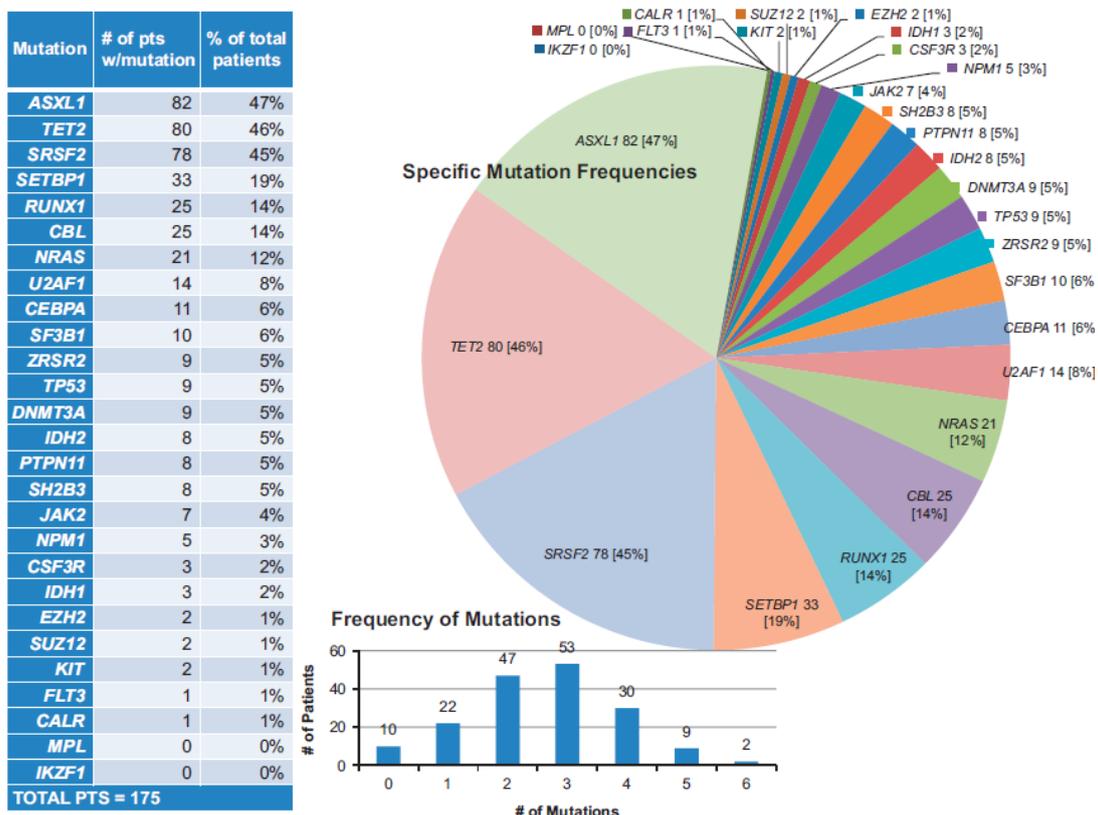
Il a été montré que seules les cellules myéloïdes portaient les mutations somatiques. Cela suggère que la cellule pathologique d'origine soit un progéniteur déjà engagé dans une lignée cellulaire. Ces mutations permettraient à celle-ci de retrouver des propriétés d'auto-renouvellement ou encore d'induire un désavantage compétitif lors de la différenciation lymphoïde.

La LMMC se caractérise fréquemment par une hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF qui dépend de la voie STAT5. Cette caractéristique semble associée à la présence d'altérations génétiques affectant des gènes de signalisation, en particulier ceux de la voie RAS (NRAS, KRAS, CBL et NF1)(15). L'hyperactivation de la voie STAT provoquerait également une surexpression de Mcl-1 et de Bcl-XL, protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2(16). Ceci serait une cause du défaut d'apoptose des monocytes. En ce qui concerne le biais de différenciation vers la lignée granulomonocytaire, des mutations semblent contribuer à ce déséquilibre [Figure 3].

Ces anomalies génétiques récurrentes peuvent être regroupées en trois catégories selon leur fréquence (15):

- Anomalie fréquentes (chez plus de 30 % des patients):
  - **TET2**, un gène affectant la méthylation de l'ADN et qui est muté chez 50-60 % des patients.
  - **ASXL1**, un gène qui régule les modifications de la chromatine en agissant sur les histones, qui est muté chez 40-50 % patients.
  - **SRSF2**, un gène de l'épissage des pré-ARN messagers, qui est muté chez 35 % des patients (plus fréquent chez le sujet âgé avec anémie modérée et caryotype normal).
- Anomalies de fréquences intermédiaires (chez 10 à 30 % des patients) :
  - **RUNX1**, un gène appartenant à la famille des facteurs de transcription, indispensable à l'hématopoïèse.
  - **KRAS/NRAS**, souvent associées aux LMMC prolifératives

- **SETBP1**, gène codant pour une protéine impliquée dans la réplication de l'ADN
  - **DNMT3A**, un gène codant pour une enzyme jouant un rôle spécifique dans la différenciation des CSH.
  - **CBL**, un proto-oncogène ayant un rôle dans la dégradation du protéasome.
  - **U2AF1**, un gène jouant un rôle dans l'épissage de l'ARN constitutif.
  - **SF3B1** : mutation associée aux cas de LMMC avec sidéroblastes en couronnes.
- Anomalies rares (chez moins de 10 % des patients) : EZH2, IDH2, ASXL2, TET3, NPM1, ZRSR2, LUC7L2, JAK2, FLT3, CSF3R, RIP1, SH2B3, DOCK2, ETNK1, PHF6, BCOR et HUWE1.



**FIGURE 3** : Répartition des différentes mutations en fonction de leur fréquence parmi la population étudiée d'après Patnaik MM et al. *Blood Cancer J*, 2016

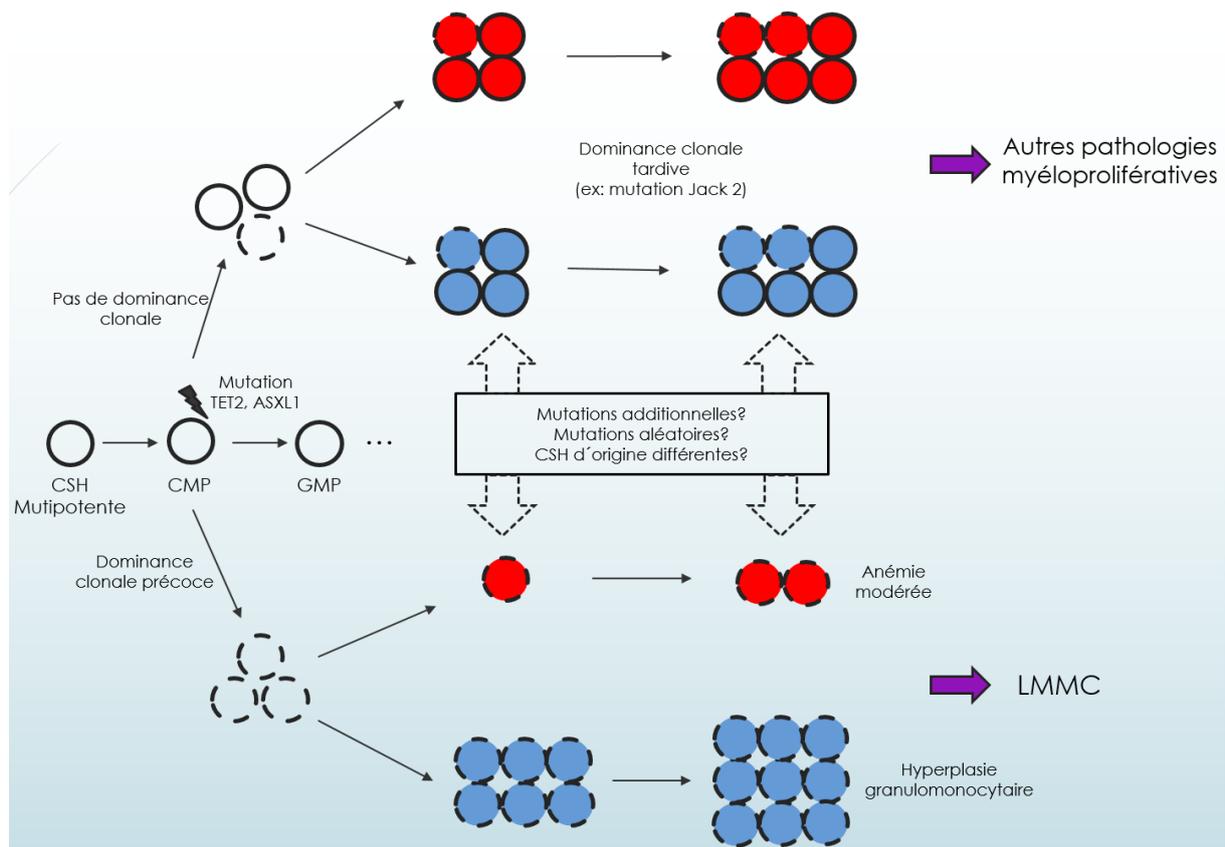
Aucune de ces altérations somatiques récurrentes identifiées dans les régions codantes de l'ADN des cellules du clone leucémique n'est spécifique de la LMMC, suggérant que la maladie est la conséquence de combinaisons particulières, chacune pouvant générer des

nuances phénotypiques(17). Par exemple, les LMMC dans lesquelles il existe une mutation de RUNX1 sont souvent thrombopéniques. Ou encore chez environ 30% des patients lorsqu'il existe des mutations impliquant les gènes N/KRAS, cela provoque la plupart du temps une myéloprolifération plus importante faisant entrer les patients dans la catégorie LMMC-MP qui est de moins bon pronostic(8,9).

Des études ont montrées que la plupart des patients accumulaient plusieurs mutations. Il a été retrouvé au moins 2 mutations chez 80 % des patients atteints de LMMC(18).

L'analyse à l'échelle unicellulaire a permis également de montrer qu'il y avait un ordre d'apparition et d'accumulation des anomalies du génome dans les progéniteurs de la LMMC, ce qui permettrait la distinction entre la LMMC et les autres syndromes myéloprolifératifs ayant les mêmes mutations génétiques. L'analyse séquentielle des séquences codantes du génome dans les monocytes de ces patients montre l'accumulation linéaire de nouvelles mutations dans le clone pendant la différenciation myéloïde. Le plus souvent, la première mutation affecte un gène codant pour un régulateur épigénétique (TET2 ou ASXL1 notamment) puis survient la mutation d'un gène de l'épissage (SRSF2 notamment) suivie d'une mutation d'un gène de signalisation. Mais toutes les autres combinaisons semblent possibles. Ces mutations sont observées dans la plupart des cellules hématopoïétiques les plus immatures, on parle de dominance clonale précoce. Tout ceci orienterait la différenciation myéloïde vers la lignée granulomonocytaire, au détriment des lignées érythrocytaires et thrombocytaire (11,15,17).

Dans l'étude d'Itzykson R. et al de 2013, des cellules plus matures (progéniteurs granulomonocytaires, puis monocytes) ont été analysées et il a été retrouvé beaucoup moins d'hétérogénéité. Ainsi toutes les mutations sont présentes dans toutes les cellules, suggérant que les cellules les plus mutées prennent l'avantage sur les cellules moins mutées au cours de la différenciation. En effet chez 75% des patients ayant deux mutations somatiques, la première mutation est présente dans plus de 85% des CSH, MPP, CMP et GMP alors que la deuxième mutation est plus fréquente dans les GMP que dans les CSH et MPP. Cela suggère que ces événements secondaires donnent un avantage au clone pendant la différenciation myéloïde. Un modèle montrant la relation entre d'une part la mutation précoce associée à une dominance clonale, et d'autre part la LMMC a été proposé [Figure 4] :



En fonction de leur stade d'expansion (précoce dans la LMMC, plus tard dans les autres néoplasies myéloïdes chroniques), les mutations TET2 provoqueront ou non une monocytose. Les cellules, dont TET2 est muté, sont représentées par des lignes discontinues. Le potentiel de différenciation granulomonocytaire est représenté en bleu, le potentiel érythroïde en rouge.

**FIGURE 4 :** Modèle adapté d'*Itzykson R. et al* montrant la relation entre la dominance clonale précoce et l'avantage de différenciation de la lignée granulomonocytaire.

Des modèles murins sont donc utilisés pour explorer les conséquences fonctionnelles de toutes ces anomalies retrouvées chez les patients atteints de LMMC.

Une étude montre qu'une mutation de type délétion TET2 induit un phénotype de LMMC chez une fraction de souris lorsqu'elles vieillissent. Ce n'est pas le cas de la délétion ASXL1 ou de la mutation P95 du gène SRSF2 car elles génèreraient un phénotype de SMD sans composante myéloproliférative. On remarque également qu'une délétion du gène Tif1 génère un modèle murin évoquant une LMMC. Chez l'Homme, le promoteur de ce gène est hyperméthylé chez plus de 35% des patients, ce qui souligne l'importance de la composante épigénétique dans cette maladie. Il existe toujours une hyperméthylation globale de l'ADN dans les cellules du clone leucémique, d'où l'importance du rôle de TET2 dans l'oxydation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine conduisant à la déméthylation (15).

Au final, de nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre la physiopathologie de la LMMC mais à ce jour, seules des hypothèses sont élaborées et encore aucune certitude. De nombreuses anomalies cytogénétiques ont été mises en évidence mais aucune d'entre elles n'est spécifique de la maladie.

#### 4/ Diagnostic

##### a) Clinique

Le diagnostic de la LMMC se fait le plus souvent de manière fortuite car la maladie peut être asymptomatique, ou alors induire des signes cliniques très peu spécifiques. La symptomatologie reflète le plus souvent le caractère dysplasique et/ou prolifératif de la maladie.

Chez les patients LMMC-MD, la clinique sera principalement le reflet des cytopénies périphériques :

- Présence de fatigue, étourdissements ou essoufflements en cas d'anémie
- Infections à répétitions en cas de neutropénie
- Epistaxis, ecchymoses, hématomes, saignements des gencives en cas de thrombopénie

Chez les patients LMMC-MP, la clinique sera le reflet de l'hypermétabolisme en général : présence de signes généraux comme de la fièvre, des sueurs nocturnes, un amaigrissement, des douleurs osseuses ou encore une cachexie. On peut observer une splénomégalie ou plus rarement une hépatomégalie.

Il est possible d'observer des signes cliniques extra-hématopoiétiques, mais cela reste relativement rare. Notamment des lésions infiltratives cutanées peuvent être observées, des localisations neurologiques ou digestives ont également été rapportées.

La progression de la LMMC en leucémie aigüe est également possible, les infiltrats cutanés peuvent parfois en être le signe(19).

## b) Biologique

### a. Hémogramme

C'est un des examens biologiques les plus importants, notamment parce que c'est à partir de cet examen et de l'analyse du frottis sanguin que l'on va émettre l'hypothèse d'une LMMC. Cette première étape permettra d'orienter le clinicien à savoir poursuivre ou non les investigations biologiques. Selon l'OMS 2016, un des critères principaux du diagnostic de la LMMC est fondé sur l'hémogramme : il s'agit d'une monocytose persistante  $\geq 1$  G/L, avec un taux de monocytes représentant au moins 10 % des cellules de la formule leucocytaire.

Pour rappel, c'est une pathologie rare qui touche principalement le sujet âgé, il est donc nécessaire de faire le diagnostic différentiel avec d'autres causes de monocytoses plus fréquentes.

Il s'agit donc éliminer les causes réactionnelles ou transitoires : infections bactériennes (tuberculose, brucellose, syphilis, fièvre typhoïde, ...), parasitaires (leishmaniose, paludisme, trypanosomiase, ...), virales, grands états inflammatoires, phases de régénérations (après une aplasie chimio induite par exemple), traitements médicamenteux (corticoïdes), hémodialyse. Il n'est pas toujours facile de faire ce diagnostic différentiel, sachant qu'il s'agit d'une population de personnes âgées qui présentent plusieurs comorbidités associées le plus souvent.

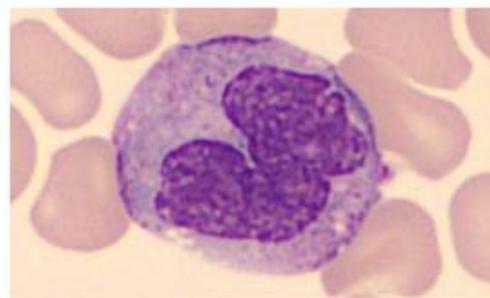
Les anomalies morphologiques des monocytes sont inconstantes. On peut observer dans certains cas une série monocytaire associant monocytes et promonocytes, avec parfois même quelques monoblastes [Figure 5], ce qui oriente fortement le diagnostic.

**Monocyte mature :**

Grande taille, 20-40  $\mu\text{m}$  de diamètre, rapport N/C = 0,5 à 0,6

Noyau arrondi ou ovalaire, souvent réniforme ou serpentiforme, la chromatine est peu dense, non mottée.

Cytoplasme étendu gris bleuté (dit en « ciel d'orage ») parfois vacuolé, avec de fines granulations rosées.

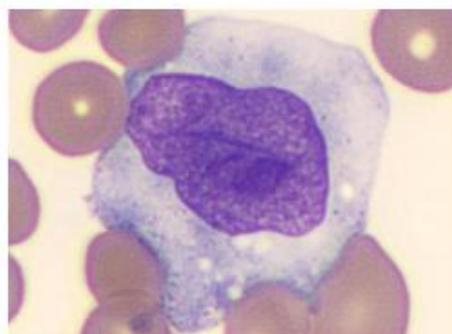


**Promonocyte :** monocyte immature entre le monocyte et le monoblaste

Grande taille, 20-30  $\mu\text{m}$  de diamètre, rapport N/C = 0,6 à 0,8

Noyau de forme irrégulière, convoluté avec aspect de replis, 1 à 2 nucléoles, chromatine fine

Cytoplasme plus basophile parfois vacuolé, quelques granulations

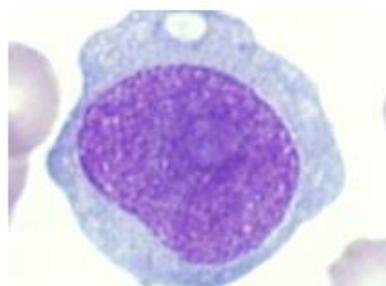


**Monoblaste :**

Grande taille, 20-30  $\mu\text{m}$  de diamètre, rapport N/C = 0,6 à 0,8

Noyau arrondi ou ovalaire, chromatine fine, avec souvent un volumineux nucléole unique

Cytoplasme basophile, rares granulations



**FIGURE 5 :** Cytologie des différentes cellules monocytaires

Les promonocytes et les monoblastes sont comptés en blastes sur le frottis sanguins, et ne doivent pas excéder 19% des cellules périphériques dans le cadre d'une LMMC. En cas de blastes supérieurs à 20%, il s'agira d'une leucémie aigüe (LA).

Il est important de rechercher sur le frottis sanguin un éventuel contingent de blastes et des signes de dysplasie. Les dysmorphies érythrocytaires sont minimales et variables, les signes de dysgranulopoïèse sont quant à eux plus présents mais souvent moins marqués dans les formes hyperleucocytaires. Il s'agit principalement de PNN hypogranulés voire complètement dégranulés, de PNN hypolobés voire de type pseudo Pelger-Huet, de PNN avec anomalie de condensation de la chromatine. Une myélémie (parfois dégranulée également) peut être présente.

L'anémie est fréquente, souvent normo ou macrocytaire et la thrombopénie existe dans 50% des cas(20).

Ainsi dès les premiers résultats de l'hémogramme, on peut classer les LMMC en fonction de la leucocytose : soit LMMC-MD (si GB < 13 G/L) soit LMMC-MP (si GB > 13 G/L).

#### b. Myélogramme

Il s'agit d'une ponction de moelle osseuse qui se fait généralement au niveau du sternum, ou encore au niveau de la crête iliaque postérieure. Des étalements du suc médullaire seront réalisés puis colorés au May Grünwald Giemsa (MGG). En parallèle, une seringue de moelle sera dédiée à une analyse cytogénétique et à de la biologie moléculaire.

Le frottis médullaire va permettre d'évaluer quantitativement et qualitativement les trois lignées cellulaires : thrombocytes, leucocytes, érythrocytes.

Actuellement, l'analyse médullaire est essentielle pour établir le diagnostic de LMMC.

La richesse médullaire est évaluée au faible grossissement (objectif x10), elle est augmentée dans 75 % des cas(7). Puis on observe dans 80 % des cas de nombreux mégacaryocytes et dysmorphiques pour la plupart. La dystrophie des mégacaryocytes est illustrée par des tailles hétérogènes, la présence de micromégacaryocytes, des images de noyaux séparés (« sac de billes ») ou encore de noyaux hypolobés voire monolobés.

A l'objectif x50, la dysmyélopoïèse est évaluée lignée par lignée, sur au moins 200 éléments. Concernant la lignée granuleuse, les anomalies cytologiques seront identiques à celles déjà observées dans le sang mais seront en général plus franches dans la moelle.

La dysérythropoïèse (moins fréquente) peut être illustrée par des anomalies cytoplasmiques ou nucléaires des érythroblastes. Les anomalies cytoplasmiques sont représentées par des images de lacunes dans le cytoplasme ou encore de ponctuations basophiles. Les anomalies nucléaires sont représentées par des images de caryorrhexie, d'érythroblastes binucléés ou multinucléés et des signes de mégaloblastose.

L'association d'une monocytose (nombre de monocytes supérieur à 3 %) et de signes de dysplasie permet de conclure à une cytologie en faveur d'une LMMC.

Un compte précis du pourcentage de blastes est fait en général sur au moins 500 éléments nucléaires (en incluant les blastes indifférenciés, les myéloblastes, les monoblastes et les promonocytes) afin de classer la LMMC en type 0, 1 ou 2.

Une coloration de Perls est systématiquement faite au moment du diagnostic afin de mettre en évidence une LMMC avec sidéroblastes en couronne. Les sidéroblastes sont des érythroblastes dont les mitochondries contiennent des granules de fer apparaissant sous la forme de granulations vertes. On parle de sidéroblastes « en couronne » quand les

granulations sont disposées sur au moins un tiers du noyau. La LMMC avec sidéroblastes en couronne est évoquée lorsque le nombre de sidéroblastes en couronne est supérieur ou égal à 15 % des érythroblastes.

La lecture d'un frottis médullaire au microscope optique par le biologiste est pertinente lorsque le prélèvement est fait correctement. En effet un prélèvement hémodilué, des frottis mal étalés (épaisseur importante, cellules altérées, ...) ou encore une moelle fibrotique peuvent rendre l'analyse cytologique difficile ne permettant pas au biologiste de faire un diagnostic formel.

La reconnaissance des signes de dysplasie, la présence ou non d'une série monocytaire, le décompte précis de blastes peuvent être parfois difficiles et demandent un œil averti avec une grande expérience de la part du cytologiste. La plupart de ces anomalies cytologiques notamment celles de la lignée granuleuse peuvent se retrouver dans des états réactionnels. Il est donc important de lire plusieurs frottis différents, de faire plusieurs comptes sur chacun d'entre eux, et si possible d'effectuer la lecture par plusieurs biologistes(21). Des grilles élaborées par le Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) permettent une meilleure harmonisation des pratiques en cytologie pour les signes de dysmyélopôïèse(22).

### c. Biopsie-ostéomédullaire (BOM)

La ponction biopsique se fait généralement au niveau de la crête iliaque postérieure et rapporte un petit fragment cylindrique (= carotte) de moelle osseuse. Elle n'est pas obligatoire pour le diagnostic de LMMC ou de SMD car en général le myélogramme est suffisant. Elle peut être pratiquée en cas de myélofibrose associée car dans ce cas la moelle est difficile à aspirer et le myélogramme est pauvre. On peut parfois voir sur la BOM une petite fibrose réticulinique chez certains patients.

On retrouve en général les mêmes caractéristiques que dans le myélogramme, à savoir une richesse cellulaire augmentée, des signes de dysplasie et une monocytose. On peut faire également des marquages immunohistochimiques, notamment avec l'anticorps anti-CD123 qui mettrait en évidence des nodules composés de cellules dentritiques plasmocytoïdes que l'on retrouverait principalement dans la LMMC et que très rarement dans d'autres syndromes myéloprolifératifs (23).

Malgré tout, l'identification précise de la composante monocytaire étant difficile sur la BOM, celle-ci n'est pas utilisée dans les algorithmes diagnostiques et pronostiques.

Pour le diagnostic de LMMC, ce type de prélèvement est peu suivie en France mais reste très consensuel dans les autres pays.

#### d. Caryotype

Comme précisé précédemment, aucune altération somatique dans les régions codantes de l'ADN des cellules du clone leucémique n'est spécifique de la LMMC(17). Par contre le caryotype reste un examen important pour le diagnostic différentiel et le pronostic de la maladie.

Au caryotype, des anomalies cytogénétiques sont détectées chez environ 20 à 40% des patients atteints de LMMC au moment du diagnostic (24). De plus il nous permet de répondre à un des critères de classification de l'OMS, à savoir l'absence du chromosome Philadelphie.

Il est surtout important pour le pronostic car en fonction des anomalies trouvées, la médiane de survie ne sera pas la même. Les patients atteints de LMMC avec un caryotype anormal ont une survie globale plus faible par rapport aux patients qui ont un caryotype normal(25). En effet la médiane de survie chez les patients ayant un caryotype normal est de 33 mois. Or chez les patients ayant une, deux ou trois anomalies caryotypiques, les médianes de survie sont respectivement de 23, 16 et 15 mois(25).

Le caryotype est inclus dans de nombreux scores pronostiques que l'on détaillera ci-après.

De plus il est également important de renouveler l'analyse au cours de la maladie pour détecter d'éventuelles acquisitions d'anomalies cytogénétiques, qui surviennent chez environ 20-30% des patients, et qui sont significativement associées à la progression en leucémie aigüe myéloïde et à une médiane de survie plus courte.

Ainsi les anomalies caryotypiques, présentes au moment du diagnostic ou acquises au cours de la maladie, ont un impact pronostique chez les patients atteints de LMMC(24).

Les anomalies les plus à risque sont la trisomie 8, la délétion 7/7q ou encore la présence d'au moins 3 anomalies. Les moins à risque sont la perte isolée du chromosome Y et le caryotype normal(26).

#### e. Biologie moléculaire

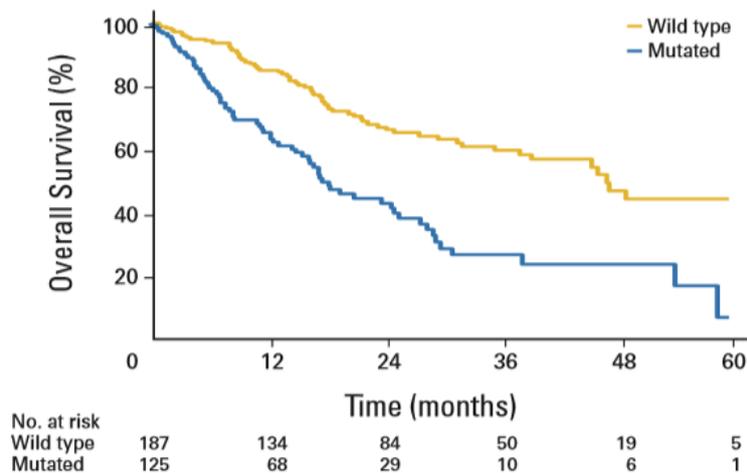
Les analyses de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence dans environ 90% des LMMC la présence d'une ou plusieurs mutations au sein de divers gènes impliqués dans

l'oncogénèse hématopoïétique. On rappelle que les mutations les plus fréquemment retrouvées sont TET2, ASXL1 et SRSF2, comme nous l'avons précisé auparavant(15).

De même que pour le caryotype, aucune anomalie moléculaire n'est spécifique de la maladie mais l'analyse moléculaire reste indispensable pour le diagnostic différentiel et le pronostic de la maladie.

En effet selon les critères de classification de l'OMS 2016, deux des cinq critères font intervenir cet examen. On ne doit pas mettre en évidence la présence de gène de fusion BCR-ABL, ni de réarrangements PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou de gène de fusion PCM1-JAK2. Dans la pratique courante, la biologie moléculaire est principalement utilisée pour le diagnostic différentiel avec d'autres hémopathies myéloïdes. Par exemple il est important de chercher un réarrangement génique impliquant PDGFRB, qui exclut la maladie du groupe des SMP/SMD et indique une probable sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib. L'éosinophilie accompagne généralement ces réarrangements. Il est également important de rechercher le gène de fusion BCR-ABL pour exclure une LMC.

Selon des études récentes, il serait intéressant d'intégrer certaines mutations dans les scores pronostiques. En effet la mutation du gène ASXL1 par exemple serait plutôt de mauvais pronostic (11) [Figure 6].



**FIGURE 6 :** Courbes de survie globale chez les patients LMMC avec ou sans la mutation ASXL1 d'après *Itzykson R, et al. J Clin Oncol, 2013*

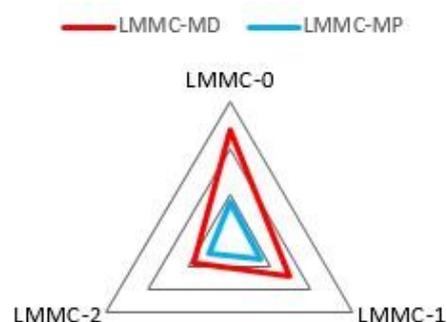
## 5/ Pronostic

Le pronostic général des patients atteints de LMMC est plutôt sombre car la survie varie de quelques mois à plusieurs années et la médiane se situe entre deux et trois ans(27). Le décès est le plus souvent la conséquence de complications infectieuses ou hémorragiques, notamment lorsque la maladie se transforme en leucémie aiguë. Compte tenu de l'âge avancé de ces patients, les comorbidités jouent un rôle important dans l'espérance de vie.

L'étude de Schuler et al. publiée en 2014 a démontré l'intérêt de la nouvelle classification OMS 2016, notamment en prouvant l'intérêt pronostique des 2 paramètres cités, le nombre de blastes dans le sang et dans la MO ainsi que le taux de leucocytes. Ils ont classé 386 patients ayant une LMMC dans 6 groupes différents en fonction des variables suivantes : LMMC-0 ou LMMC-1 ou LMMC-2 et LMMC-MD ou LMMC-MP(27) [Figure 7].

		LMMC-MD	LMMC-MP	Médiane
mois de survie	LMMC-0	48	17	31
	LMMC-1	29	15	19
	LMMC-2	17	10	13

*Les médianes de survie sont significativement différentes entre les groupes LMMC-MD et LMMC-MP. Elles sont également significativement différentes entre les groupes LMMC-0, LMMC-1 et LMMC-2.*



**FIGURE 7 :** Médianes de survie des patients en sein des différents types de LMMC d'après Schuler E et al. *Leuk Res*, 2014

La transformation à 2 ans en leucémie aiguë est significativement différente entre les groupes LMMC-0, LMMC-1 et LMMC-2, par contre elle ne l'est pas entre les groupes LMMC-MD et LMMC-MP(27). Ainsi le décompte de blastes dans la moelle osseuse reste un facteur pronostique important pour l'évolution en leucémie aiguë.

Selon des études parues en 2013, les analyses de biologie moléculaire ont permis d'identifier diverses mutations géniques conférant un pronostic défavorable (ASLX1, EZH2) ou favorable (TET2) aux LMMC. Ces données sont toutefois d'interprétations délicates, voire divergentes, et ne font pas encore l'objet d'un consensus suffisant. En outre, ce type d'analyses n'est pas encore d'usage courant au sein des laboratoires(11,18,28).

Tous les modèles pronostiques actuels utilisent les résultats clinico-biologiques, dont les plus récents intègrent également l'analyse cytogénétique. Les premiers modèles ont été conçus principalement pour les SMD, puisque la LMMC était initialement classée dans cette entité. Ainsi, la classification par défaut de la pathologie associée au manque de spécificité de ces scores, expliquent la grande variabilité des médianes de survie. Parmi les anciens scores, on retrouve le score de Bournemouth en 1985 avec sa version modifiée en 1988, le score de Spanish en 1989, le score de Düsseldorf en 1992 et le score de Lille en 1993.

Le score MDAPS (MD Anderson Prognostic Score) est le premier score à être basé sur une étude de patients exclusivement LMMC (29). En effet cette étude de 2002 a regroupé 213 patients diagnostiqués LMMC de 1966 à 1999. Le score pronostique proposé prend en compte quatre variables qui donneront un point chacune :

- hémoglobine inférieure à 120 g/L
- lymphocytes supérieurs à 2.5 G/L
- présence de myélémie
- présence d'au moins 10% de blastes dans la moelle osseuse.

Ce score compris entre 0 et 4 permet de créer des catégories de risque :

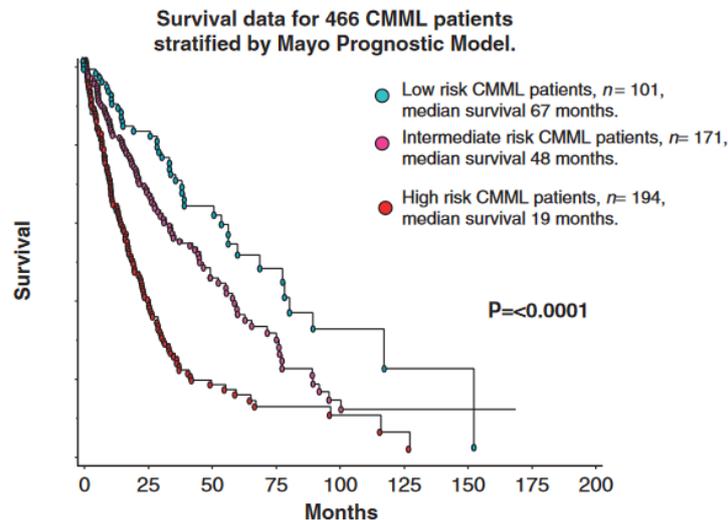
faible (score 0 ou 1), intermédiaire I (score 2), intermédiaire II (score 3), élevé (score 4).

Les médianes de survie pour ces différents groupes sont respectivement de 24, 15, 8 et 5 mois.

Les inconvénients majeurs de ce score sont d'une part qu'il est basé sur une étude où le diagnostic de LMMC est fait selon la classification FAB de 1985, et d'autre part, que les patients ayant plus de 5% de blastes dans le sang ont été exclus de l'étude.

Puis des scores plus récents sont apparus en 2013 comme celui du modèle pronostique Mayo établi sur une étude de 226 patients LMMC de la Mayo Clinic (28). Plusieurs facteurs de risque pour la survie comme l'anémie, la thrombopénie, l'hyperleucocytose, la polynucléose neutrophile, la monocytose, la présence de myélémie, ont été identifiés. Mais dans l'analyse multivariée, quatre variables sont restées significatives (une monocytose supérieure à 1 G/L,

une hémoglobine inférieure à 100 g/L, des plaquettes inférieures à 100 G/L et la présence de cellules myéloïdes immatures). Un score pronostique est donc fait à partir de celles-ci permettant de classer les patients en trois catégories de risque : élevé, intermédiaire et faible. La médiane de survie est respectivement de 10 mois, 18.5 mois et 32 mois [Figure 8].



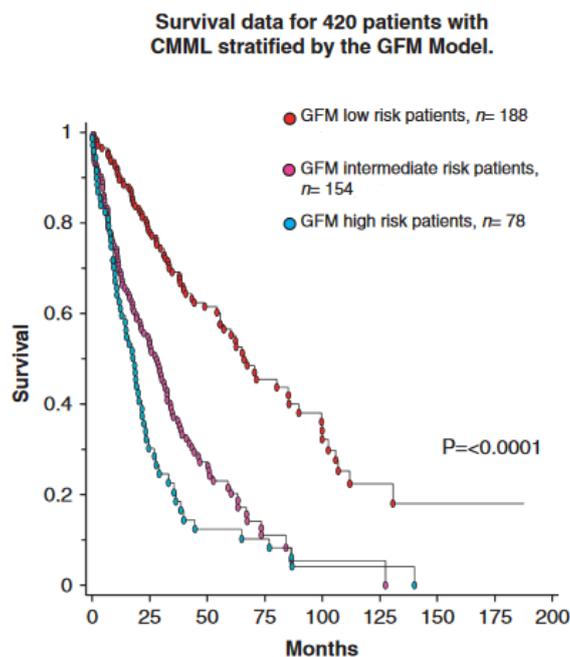
**FIGURE 8 :** Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique Mayo d'après Patnaik MM, Itzykson R et al.

En 2013, le Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM) est le premier à proposer un score pronostique incluant de la biologie moléculaire(11). Sur une étude de 312 patients LMMC, un score pronostique est proposé en prenant en compte cinq variables, dont le statut ASXL1, permettant de définir trois groupes de risque différents : faible (0 à 4 points), intermédiaire (5 à 7 points) et élevé (8 à 11 points).

Les variables sont :

- Age > 65 ans → 2 points
- Leucocytes > 15 G/L → 3 points
- Hémoglobine (Hb) < 110 g/L (homme) ou Hb < 100 g/L (femme) → 2 points
- Plaquettes < 100 G/L → 2 points
- Mutation ASXL1 → 2 points

La médiane de survie dans le groupe à risque faible est de 65 mois, celle dans le groupe à risque intermédiaire est de 38.8 mois, et celle dans le groupe à risque élevé de 14.4 mois [Figure 9].



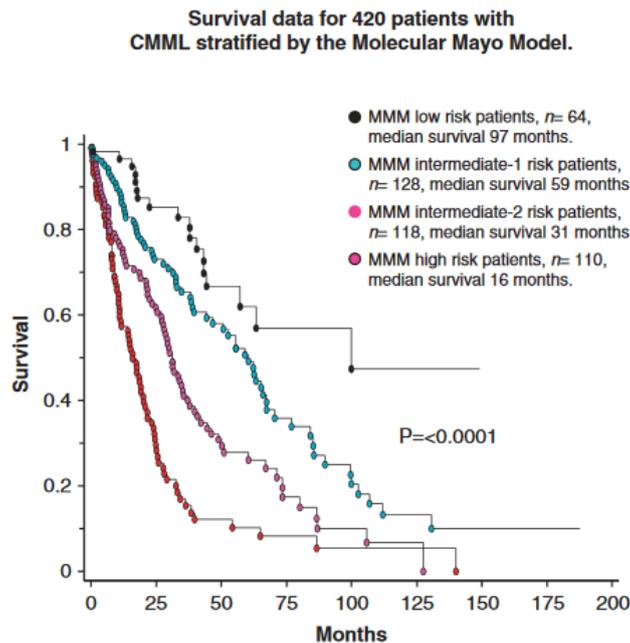
**FIGURE 9 :** Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique du Groupe Francophone des Myélodysplasies d'après *Patnaik MM, Itzykson R et al.*

Les deux équipes de ces deux derniers scores ont mis en commun leurs données afin de publier en 2014 un score commun, le Modèle Mayo Moléculaire.

Les variables permettant d'établir ce score sont les suivantes :

- Monocytes  $> 1$  G/L  $\rightarrow$  2 points
- Présence de myélémie  $\rightarrow$  2 points
- Hémoglobine  $< 100$  g/L (quel que soit le sexe)  $\rightarrow$  2 points
- Plaquettes  $< 100$  G/L  $\rightarrow$  1.5 points
- ASXL1 muté  $\rightarrow$  1.5 points

Les groupes de risque sont définis de la façon suivante : faible (0 point), intermédiaire-1 ( $\leq 2$  points), intermédiaire-2 (2.5 à 4.5 points) et élevé ( $\geq 5$  points) (30). Les médianes de survie sont respectivement de 97, 59, 31 et 16 mois [Figure 10].



**FIGURE 10 :** Courbes de survie des patients LMMC selon le modèle pronostique Mayo moléculaire d'après *Patnaik MM, Itzykson R et al.*

Bien que ces scores soient plutôt fiables de par la qualité des cohortes étudiées, ils ne sont finalement que très rarement utilisés par les cliniciens. En effet certains d'entre eux utilisent des méthodes de biologie moléculaire qui ont un coût non négligeable.

Actuellement, les scores pronostiques habituellement utilisés sont les scores :

- IPSS (International Prognosis Scoring System) avec la variante IPSS-R
- CPSS (CMML Prognostic Scoring Systems)

a) Scores IPSS et IPSS-R

En 1997, Greenberg et son équipe propose le score IPSS qui prend en compte trois variables :

- Le nombre de blastes dans la MO
- Le caryotype :
  - Favorable : caryotype normal, délétion Y isolée, délétion 5q isolée, délétion 20q isolée
  - Défavorable : Anomalie du chromosome 7, caryotype complexe (au moins 3 anomalies)
  - Intermédiaire : autres anomalies

- Le nombre de cytopénies
  - Hémoglobine < 100 g/L
  - Polynucléaires neutrophiles < 1.8 G/L
  - Plaquettes < 100 G/L

Ce score va permettre de séparer quatre groupes de risque pronostic : faible, intermédiaire I, intermédiaire II, élevé(31). Il est très utilisé dans le pronostic des SMD en général, mais il a ses limites dans la LMMC car dans cette étude les patients dont les leucocytes étaient supérieurs à 12 G/L ont été exclus.

Risque pronostique	Faible	Intermédiaire I		Intermédiaire II	Elevé
Score pronostique	0	0,5	1	1,5	2
Blastose médullaire (%)	< 5	5 à 10	-	11 à 20	21 à 30
Caryotype	Favorable	Intermédiaire	Défavorable		
Cytopénies	0 ou 1	2 ou 3			
Médiane de survie (année)	5,7	3,5		1,2	0,4
Médiane d'évolution en LAM (année)	9,4	3,3		1,1	0,2

**TABLEAU 1 : Score IPSS**

En 2012, le score IPSS a été amélioré par la même équipe, il s'agit du score IPSS-R. Les variables sont pratiquement les mêmes, mais elles ont été affinées et sont au nombre de cinq désormais(32) :

- Le nombre de blastes dans la moelle osseuse (3 seuils : 2, 5 et 10 %)
- Le caryotype :
  - Très favorable : délétion Y isolée, délétion 11q isolée
  - Favorable : caryotype normal, délétion 12p isolée, délétion 20q isolée, deux anomalies incluant la délétion 5q
  - Intermédiaire : trisomie 8, trisomie 19, délétion 7q isolée, inversion 17q
  - Défavorable : monosomie 7 plus ou moins associée à une délétion 7q, inv(3)/t(3q)/del(3q), 3 anomalies
  - Très défavorable : plus de 3 anomalies

- Hémoglobine (2 seuils : 80 et 100 g/L)
- Plaquettes (2 seuils : 50 et 100 G/L)
- Polynucléaires neutrophiles (seuil à 0.8 G/L)

Dans ce nouveau score IPSS-R, les patients sont répartis dans cinq groupes de risques pronostiques différents : très faible, faible, intermédiaire, élevé, très élevé. De même que pour le score IPSS, les patients dont les leucocytes étaient supérieurs à 12 G/L ont été exclus.

Score pronostique	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Blastose médullaire (%)	≤ 2		2 < n < 5		5 ≤ n ≤ 10	> 10	
Caryotype	Très favorable		Favorable		Intermédiaire	Défavorable	Très défavorable
Hémoglobine (g/L)	≥ 100		80 ≤ n < 100	< 80			
Plaquettes (G/L)	≥ 100	50 ≤ n < 100	< 50				
PNN (G/L)	≥ 0,8	< 0,8					

Risque pronostique	Très faible	Faible	Intermédiaire	Elevé	Très élevé
Score	≤ 1,5	1,5 < S ≤ 3	3 < S ≤ 4,5	4,5 < S ≤ 6	> 6
Médiane de survie (année)	8,8	5,3	3,0	1,6	0,8
Médiane d'évolution en LAM (année)	Non renseignée	10,8	3,2	1,4	0,73

**TABLEAU 2 : Score IPSS-R**

Ce score a été mis au point à partir d'une population ayant un SMD, et parmi eux certains patients avaient une LMMC. En raison de l'exclusion des patients ayant plus de 12 G/L de leucocytes dans la cohorte d'étude, les patients atteints de LMMC-MP n'étaient pas représentés. Ainsi sa validité dans le cadre de la LMMC a toujours été assez limitée.

#### b) Score CPSS et CPSS-Mol

Le score CPSS, qui est spécifique de la LMMC, a été créé à partir d'une étude rétrospective de 2013 par Such et son équipe(26). Ce score est basé sur une cohorte d'étude espagnole de

558 patients diagnostiqués entre 1980 et 2010. La cohorte de validation était composée de 274 patients d'origine allemande et italienne. Ce score prend en compte quatre variables :

- Le type de LMMC selon la classification OMS de 2002 : LMMC-1 et LMMC-2 en fonction du pourcentage de blastes
- Le type de LMMC selon la classification FAB de 1994 : LMMC-MD et LMMC-MP en fonction du taux de leucocytes
- Le caryotype :
  - o Favorable : normal, délétion Y isolée
  - o Défavorable : trisomie 8, anomalie du chromosome 7, complexe ( $\geq 3$  anomalies)
  - o Intermédiaire : autres anomalies
- La dépendance aux transfusions de culots globulaires (défini par une transfusion toutes les 8 semaines sur une période de 4 mois).

Ce score va permettre de définir quatre groupes de risque pronostic différent : faible, intermédiaire I, intermédiaire II, élevé.

Score pronostique	0	1	2
LMMC selon la classification OMS de 2002	LMMC-1	LMMC-2	-
LMMC selon la classification FAB de 1994	LMMC-MD Leucocytes < 13 G/L	LMMC-MP Leucocytes $\geq$ 13 G/L	-
Caryotype	Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Dépendance aux transfusions	Non	Oui	

Risque pronostique	Faible	Intermédiaire-1	Intermédiaire-2	Élevé
Score	0	1	2 ou 3	4 ou 5
Médiane de survie (mois)	61	31	15	9
Evolution en LAM à 2 ans (%)	8	25	49	100

**TABLEAU 3** : Score CPSS

La dépendance aux transfusions est préférée au taux d'hémoglobine car elle prend en compte en plus du taux d'hémoglobine, l'âge, le poids, les comorbidités et les symptômes liés à

l'anémie. L'inconvénient majeur de ce score est qu'il prend en compte d'anciennes classifications : la classification FAB de 1994 et la classification OMS de 2002.

En 2016, l'équipe d'Elena améliore ce score sur une cohorte de validation de 260 patients atteints de LMMC (33). Deux variables restent inchangées, la LMMC selon la classification FAB et la dépendance aux transfusions. La troisième variable est le nombre de blastes dans la moelle osseuse, en se basant sur la nouvelle classification OMS 2016. La quatrième variable associe le caryotype à la biologie moléculaire avec la recherche de la mutation de 4 gènes : ASXL1, NRAS, RUNX1, SETBP1.

L'association du caryotype et de la biologie moléculaire va permettre de quantifier un risque génétique. Ce risque génétique est ensuite inclus dans le score final appelé CPSS-Mol.

A partir de ce score (S), il a été défini quatre groupes de risque différent : faible (S = 0), intermédiaire-1 (S = 1), intermédiaire-2 ( $2 \leq S \leq 3$ ) et élevé (S  $\geq 4$ ) [Tableau 4].

Les médianes de survie et le pourcentage de patients évoluant en LA sont significativement différents entre chaque groupe [Tableau 4].

Score (risque génétique)	Caryotype	ASXL1	NRAS	RUNX1	SETBP1
0	Favorable	non muté	non muté	non muté	non muté
1	Intermédiaire	muté	muté	-	muté
2	Défavorable	-	-	muté	-

Risque génétique	Favorable	Intermédiaire 1	Intermédiaire 2	Défavorable
Score	0	1	2	$\geq 3$

Score pronostique CPSS-mol	0	1	2	3
LMMC selon la classification OMS de 2016	LMMC-0 Blastes dans MO < 5 %	LMMC-1 ou LMMC-2 Blastes dans MO $\geq 5$ %	-	-
LMMC selon la classification FAB de 1994	LMMC-MD Leucocytes < 13 G/L	LMMC-MP Leucocytes $\geq 13$ G/L	-	-
Risque génétique	Favorable	Intermédiaire 1	Intermédiaire 2	Défavorable
Dépendance aux transfusions	Non	Oui	-	-

Risque pronostique	Faible	Intermédiaire-1	Intermédiaire-2	Elevé
Médiane de survie (mois)	NC	68	30	17
Evolution en LA à 48 mois (%)	0	8	24	52

**TABLEAU 4** : Score CPSS-mol

En routine, le score utilisé est le plus souvent le CPSS, bien que le CPSS-Mol soit plus approprié, mais demande l'utilisation de technologies coûteuses, notamment le séquençage à haut débit de l'ADN par NGS.

Au final, depuis que l'OMS en 2002 a reclassé cette maladie au sein des SMD/SMP, plusieurs modèles pronostiques visant à fournir des outils cliniquement utiles pour la prise de décision individuelle ont été développés au fil du temps, conduisant à une amélioration progressive de l'évaluation des risques au diagnostic. Néanmoins, aucun de ces systèmes de score pour la LMMC n'a été validé jusqu'à présent de façon universelle(34).

## 6/ Traitement

Malgré la réalisation d'essais thérapeutiques qui sont dédiés à la LMMC, indépendamment des SMD, il n'y a toujours pas de traitement consensuel de cette pathologie.

Le traitement n'est pas systématique devant une LMMC, notamment chez les personnes âgées, l'abstention est habituelle dans les formes peu prolifératives ou encore peu symptomatiques. Aujourd'hui, il n'a pas été déterminé de moment optimal pour démarrer une thérapie. Les patients sont traditionnellement mis sous traitement quand ils commencent à avoir des signes cliniques ou biologiques montrant des complications de leur maladie : présence ou accentuation des cytopénies, présence de fièvre ou d'infections, avoir une dépendance transfusionnelle ou encore une augmentation du pourcentage du blastes. Si les patients sont en abstention thérapeutique, ils devront nécessairement être surveillés. Selon une étude récente, il serait recommandé chez les LMMC-MD de faire une numération formule un mois après le diagnostic puis tous les trois mois avec un examen clinique afin d'évaluer la stabilité hématologique. Pour les patients diagnostiqués LMMC-MP, un suivi de la numération formule est recommandé mensuellement les trois premiers mois après le diagnostic, pour voir l'évolution des leucocytes notamment, puis tous les trois mois avec toujours un examen clinique (taille de la rate, recherche de lymphoadénomégalies, etc). Une réévaluation hématologique et cytogénétique est recommandée en cas d'évolution significative entre deux bilans ou d'évolution clinique(35).

Lorsqu'un traitement est décidé lors d'une Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP), il est toujours adapté au patient, en fonction de l'âge et de ses comorbidités. Ainsi on identifie plusieurs lignes de traitement : les soins de support, les thérapies ciblées incluant les

chimiothérapies cytotoxiques, les agents hypométhylants et l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

#### a) Soins de support

Les soins de support visent principalement à réduire les symptômes et aident à améliorer la vie du patient. Des facteurs de croissance ou des supports transfusionnels sont prescrits en cas d'anémie ou de thrombopénie. En cas de neutropénie, du G-CSF et/ou une antibiothérapie préventive sont prescrits. Suite aux transfusions itératives, les patients doivent parfois être mis sous chélateurs de fer. Les vaccinations doivent être à jour, en particulier contre le pneumocoque, et le vaccin antigrippal annuel est recommandé.

#### b) Chimiothérapie

Le choix de thérapeutique dépend principalement de la vitesse et du degré de myéloprolifération. On utilise :

- soit un traitement cytoréducteur (Hydroxyurée = Hydrea®), généralement préférée pour les patients présentant des symptômes dus à une myéloprolifération intense
- soit un traitement hypométhylant (Azacitidine = Vidaza®, Décitabine = Dacogen®) pour les patients ayant des cytopénies profondes ou les non répondeurs au traitement cytoréducteur.

##### a. Traitement cytoréducteur

L'hydroxyurée (HU) a longtemps été le traitement de choix dans les formes prolifératives (LMMC-MP) car il s'agit d'un agent myélosuppressif, pouvant être utile en cas de splénomégalie importante ou pour contrôler les cellules myélomonocytaires prolifératives. En effet une étude randomisée de 1996 avait montré que l'hydroxyurée était plus efficace et moins toxique que l'étoposide par voie orale : après un suivi médian de 11 mois, 60% des patients sous hydroxyurée ont répondu contre 36% sous étoposide (36). Les patients ne tolérant pas l'HU peuvent bénéficier d'autres anti-métabolites oraux, tels que la 6-thiopurine,

bien que moins de données soient disponibles. On peut envisager l'utilisation de chimiothérapies d'induction de la leucémie aiguë myéloïde chez des patients en bonne condition présentant une intense myéloprolifération qui est réfractaire à l'HU. Le rôle des thérapies intensives de cytoréduction n'est pas très clair, car la plupart des patients ne retrouveront pas une hématopoïèse normale.

La dose habituelle d'HU est de 500 mg deux fois par jour ou de 1000 mg une fois par jour par voie orale (36). Les doses sont ensuite ajustées en fonction de l'équilibre entre l'effet désiré sur le nombre de polynucléaires neutrophiles, qui doit être maintenu au-dessus de 0.5 à 1 G/L, et les effets indésirables tels que l'anémie sévère et la thrombocytopénie. L'action est plutôt rapide (3-5 jours après la première prise) et de courte durée. Par conséquent, les ajustements posologiques ne doivent pas être effectués plus d'une fois par semaine afin d'éviter de grandes fluctuations du nombre de plaquettes. Les effets secondaires sont généralement minimes, on peut voir des ulcères buccaux, une hyperpigmentation, des éruptions cutanées, des modifications des ongles (37). De façon plus rare, de la fièvre ou une altération de la fonction hépatique. Des numérations formules et des bilans hépatiques doivent être effectués fréquemment dans les trois mois suivant le début du traitement.

#### b. Traitement hypométhylant

Les patients atteints de LMMC ont été inclus dans des études, notamment en 2002 et 2006, qui ont étudié l'utilisation de la 5-azacitidine (azacitidine) et de la 5-aza-déoxycytidine (décitabine) dans les SMD (38,39). Aujourd'hui, ces deux molécules ont l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) dans le traitement de la LMMC.

Elles exercent leurs effets antinéoplasiques par des mécanismes multiples comprenant une cytotoxicité directe à l'encontre des cellules hématopoïétiques malignes et une hypométhylation de l'ADN par inactivation des ADN méthyltransférases. Cette fonction entraînerait une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et une restauration de leurs fonctions. On peut facilement comprendre leur efficacité en connaissant en partie la physiopathologie de la LMMC, notamment avec le rôle de TET2 par exemple. En effet il joue un rôle dans l'oxydation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine conduisant à la déméthylation. Cette déméthylation permet *in fine* d'avoir une activité inhibitrice sur la croissance et la division des cellules. La protéine TET2 agit comme un suppresseur de tumeur.

Ces molécules ont un effet thérapeutique, attesté par une hématopoïèse plus équilibrée, chez 30 à 40% des patients (15).

En France, l'azacitidine à la dose de 75 mg/m<sup>2</sup>/j par cycles de 7 jours mensuels, a reçu l'AMM dans les LMMC non prolifératives et non éligibles à l'allogreffe avec une blastose médullaire supérieure à 10% (LMMC-2 selon l'OMS 2016). La décitabine quant à elle est encore utilisée dans des protocoles d'études chez des patients atteints de LMMC. Un essai de phase II de la décitabine chez 39 patients atteints de LMMC ayant un pronostic médiocre (par exemple un score IPSS intermédiaire-2 ou élevé) a rapporté un taux de réponse global de 38% et un taux de survie global à deux ans de 48% (40). De plus il a été montré qu'elle semble active dans les formes prolifératives car elle serait plus myélosuppressive que l'azacitidine (40). Une étude de phase III est en cours pour déterminer si la décitabine prolongerait la survie sans progression dans ces formes, par rapport à la cytoréduction de l'hydroxyurée. Il n'existe pas encore d'AMM.

#### c) Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)

Chez les sujets les plus « jeunes » dont l'état de santé est conservé, on pourra proposer le seul traitement offrant un espoir de guérison, la greffe de cellules souches hématopoïétiques qui se fait le plus souvent après un conditionnement d'intensité réduite. Malheureusement, les comorbidités, l'âge avancé au moment du diagnostic et l'absence d'un donneur sont des obstacles sérieux à la candidature à l'allogreffe. Le risque de rechute après l'allogreffe reste néanmoins élevé, avoisinant 25-30 % (15). On peut voir apparaître plusieurs complications, comme le rejet du greffon, la maladie du greffon contre hôte (GVH) aiguë ou chronique, une rechute de la maladie post-allogreffe, une insuffisance d'organe ou encore la mortalité non due à une rechute. C'est pour cela que la décision finale sur l'admissibilité à la transplantation doit être fondée sur une évaluation des risques et des avantages, ainsi que sur les besoins et les souhaits du patient.

Voici quelques exemples d'études évaluant le bénéfice de l'allogreffe dans les LMMC :

Une étude a été menée à Seattle chez 21 patients atteints de LMMC qui ont été allogreffés. L'âge médian était de 47 ans avec des extrêmes de 1 à 63 ans. Il a été montré que la survie sans maladie à trois ans était observée chez 39% des patients (41). Il a été suggéré également que la survie des patients était améliorée lorsque la durée de la maladie était courte avant la

greffe. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude monocentrique incluant 18 patients avec une survie globale de 31% à trois ans (42).

Egalement, les résultats chez 50 adultes allogreffés dont l'âge médian était de 44 ans (extrêmes de 19 à 61 ans) indiquent une mortalité liée au traitement de 52%, avec une survie à 5 ans sans maladie de 18% (43).

Dans une étude récente et plus complète issue du registre de la société française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire, une survie globale à 3 ans de l'ordre de 32% a été retrouvée. Parmi les 73 patients allogreffés de cette étude, 35% ont rechuté, et on dénombre 36% de mortalité non due à une rechute. Il a été montré que dans ce groupe de patients, la présence d'une splénomégalie avant la greffe était de mauvais pronostic, mais qu'assez étonnamment, la survie globale n'était pas influencée par la cytogénétique ou encore la réduction du nombre de blastes dans la MO avant la greffe, donc que l'intérêt de la rémission complète avant la greffe était minime (44).

De nombreuses questions demeurent quant à la prise en charge thérapeutique idéale des patients atteints de LMMC. Bien que les taux de réponse globale à l'azacitidine et à la décitabine soient élevés, on ne sait pas vraiment juger cliniquement une réponse thérapeutique incomplète.

Lors d'une réunion de consensus international, il a été proposé des critères de réponses adaptés à la maladie, qu'il faut désormais valider prospectivement(45).

## **PARTIE II : Les nouveaux outils d'aide au diagnostic de la LMMC**

Comme nous l'avons déjà vu, le diagnostic de LMMC est fortement orienté par les résultats de l'hémogramme, notamment devant une monocytose persistante. Cependant, il existe de nombreuses causes de monocytose réactionnelle. En milieu hospitalier, de nombreux frottis sanguins correspondant aux monocytoses réactionnelles sont encore réalisés et sont le plus souvent sans intérêt diagnostique. Afin d'améliorer le diagnostic différentiel de la LMMC, des nouveaux outils ont été proposés.

### **1/ Le monoscore de l'automate XN-10 Sysmex®**

L'hémogramme est un des examens biologiques les plus importants, notamment parce que c'est celui-ci que l'on fait en premier lors d'un bilan à visée diagnostique. Un taux de monocytes  $\geq 10\%$  et une monocytose  $\geq 1\text{G/L}$  peuvent faire suspecter une LMMC. L'intérêt de la revue du frottis sanguin au microscope est de rechercher des anomalies qualitatives et/ou quantitatives associées comme des signes de dysgranulopoïèse, des monocytes anormaux et/ou une blastose circulante. Ainsi le biologiste pourra orienter le clinicien soit vers une LMMC, soit vers une monocytose réactionnelle.

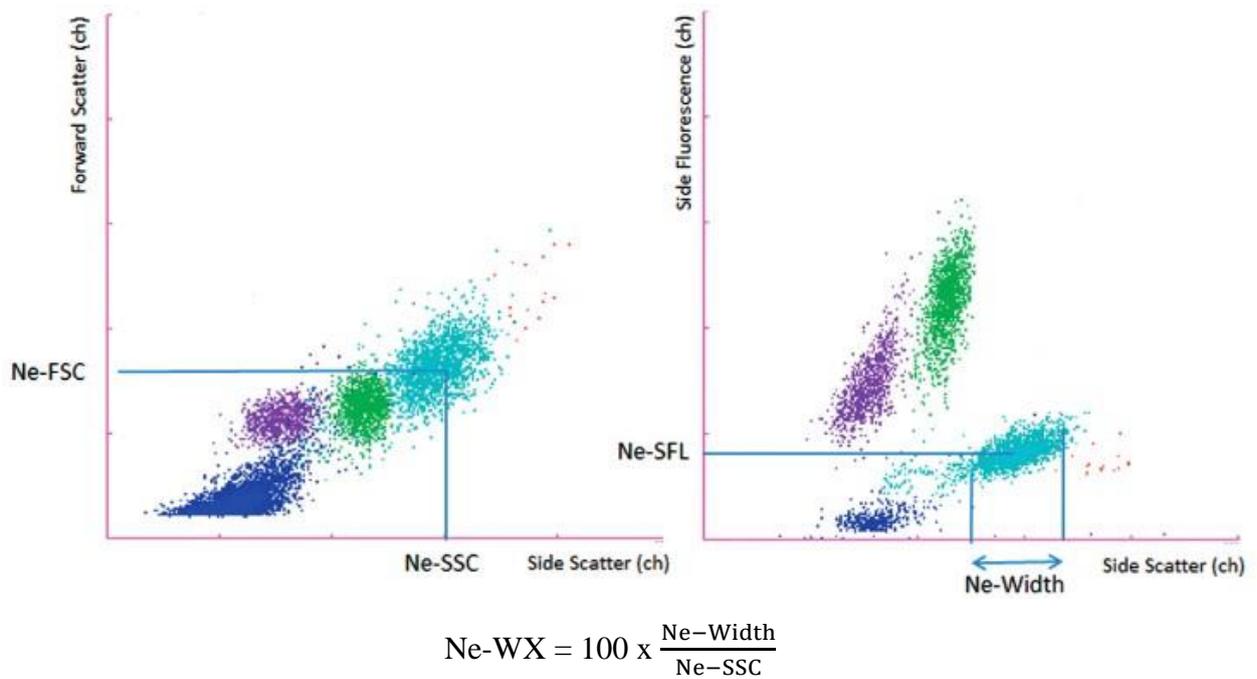
Dans la pratique courante, les monocytoses  $\geq 1\text{G/L}$  sont très fréquentes dans un laboratoire de biologie médicale privée ou hospitalier, dont les causes sont pour la plupart réactionnelles. Cette revue de lame devant toute monocytose inconnue engendre un très grand nombre de frottis sanguins pouvant générer un risque de sous diagnostiquer des LMMC.

Ainsi le groupe de travail du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) a fixé à 1,5 G/L le seuil de monocytes pour la revue du frottis sanguin au microscope (46). Ce seuil semble être un compromis satisfaisant en terme de sensibilité et spécificité. Or de véritables LMMC dont les monocytes seraient inférieurs au seuil de 1,5 G/L mais supérieurs à 1 G/L ne seraient pas revues au microscope. Ainsi, une étude multicentrique a été menée entre juillet 2013 et juillet 2014 en combinant des données de plusieurs centres hospitaliers français

utilisant comme analyseur d'hématologie le XN-10 Sysmex® (Sysmex Corporation, Kobe, Japon) (47). Afin d'être plus discriminant en routine, ils ont émis l'hypothèse qu'une combinaison de paramètres pourrait aider à exclure le diagnostic de LMMC et ainsi réduire le nombre de frottis sanguins examinés en cas de monocytose réactionnelle. L'objectif de cette étude était de développer et de tester un système de score basé sur les paramètres les plus pertinents permettant de distinguer les patients avec une LMMC probable des patients présentant une monocytose réactionnelle et d'optimiser l'examen microscopique des frottis sanguins devant une monocytose.

Pour cela, l'étude a été faite sur une cohorte d'apprentissage de 61 adultes atteints de LMMC (diagnostic établi selon les critères OMS 2016) non traités, répartis dans 11 centres en France et en Belgique, et de 635 patients adultes ayant une monocytose réactionnelle analysés au laboratoire de Besançon. Une numération formule complète (CBC-DIFF) a été réalisée pour chaque patient. Dans le canal DIFF, les analyseurs XN fournissent une formule leucocytaire comprenant les PNN (Ne), PNE, PNB, lymphocytes (Ly), monocytes (Mo) et les granuleux immatures par cytométrie en flux (CMF) après marquage spécifique de l'ARN par un fluorochrome. Ainsi, chacune des cellules sera identifiée par sa structure (axe X correspondant au SSC), sa fluorescence (axe Y correspondant au SFL) et sa taille (axe Z correspondant au FSC).

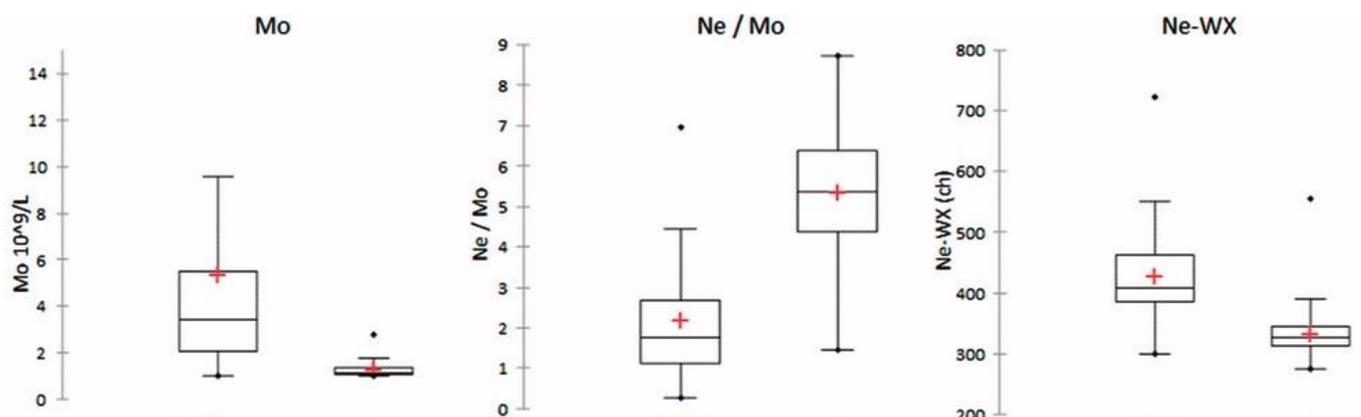
L'analyseur a donc permis de voir pour chaque patient la position médiane sur les 3 axes des Ne (Ne-X, Ne-Y, Ne-Z) appelée Ne-SSC, des Ly (Ly-X, Ly-Y, Ly-Z) appelée Ly-SSC et des Mo (Mo-X, Mo-Y, Mo-Z) appelée Mo-SSC, ainsi que leur dispersion (Ne-WX, Ne-WY, Ne-WZ / Ly-WX, Ly-WY, Ly-WZ / Mo-WX, Mo-WY, Mo-Z). La dispersion est le résultat d'un rapport entre la largeur du nuage cellulaire appelée Width et la valeur de la position médiane de celui-ci [Figure 11].



**FIGURE 11** : Illustration du calcul de Ne-WX d'après Schillinger F et al. Scand J Clin Lab Invest, 2018

Trois variables ont retenu l'attention car elles étaient significativement différentes entre les deux groupes : **Monocytose, Ratio Ne/Mo, Ne-WX**(47) [Figure 12].

	LMMC	Réactionnelle
Taux de Monocytes (G/L)	3,46	1,16
Ratio Ne/Mo	1,75	5,38
Ne-WX	409	326



**FIGURE 12** : Les 3 variables significativement différentes entre les 2 groupes d'après Schillinger F et al. Scand J Clin Lab Invest, 2018

Un score appelé « mono-dysplasie » a pu être mis en place suite à cette étude. Ce score fait intervenir ces trois variables précédemment citées au sein d'une équation permettant une quantification de 0 à 1 selon la formule mathématique suivante :

$$\frac{1}{1 + e^{-(-11.623 + 0.026 \times \text{NeWX} - 1.385 \times \frac{\text{Ne}}{\text{Mo}} + 2.714 \times \text{Mo})}}$$

L'analyse ROC a permis d'établir un seuil de **0,160** au-delà duquel un examen du frottis sanguin devra être réalisé. On trouve alors une sensibilité de **96,7%** (2 faux négatifs parmi 61 patients LMMC) et une spécificité de **97,8%** (14 faux positifs parmi 635 monocytoses réactionnelles).

Ce seuil a ensuite été testé sur une cohorte de validation contenant 1809 échantillons dont 26 LMMC. La sensibilité et spécificité étaient respectivement de **92,3** et **93,6%** (47).

Ainsi, il a été proposé à la fin de cette étude une nouvelle stratégie concernant l'examen du frottis sanguin chez des patients ayant une monocytose, chez les utilisateurs de la gamme XN de Sysmex.

- Si monocytes  $\geq 1$  G/L et  $\geq 10\%$  des cellules de la formule leucocytaire et score « mono-dysplasie »  $> 0,160 \rightarrow$  l'examen microscopique doit être fait afin de rechercher des signes de dysplasie sur toutes les lignées et de réaliser une analyse cytologique des monocytes
- Si monocytes  $\geq 1$  G/L et  $\geq 10\%$  des cellules de la formule leucocytaire, et score « mono-dysplasie »  $\leq 0,160 \rightarrow$  monocytose probablement d'origine réactionnelle, et en l'absence de toute autre alarme quantitative et/ou qualitative, l'examen microscopique n'est pas nécessaire.

En respectant les recommandations du GFHC (étalement du frottis en cas de monocytose  $\geq 1.5$  G/L), dans la cohorte d'apprentissage, 90 monocytoses réactionnelles sur 635 patients (14,1%) étaient supérieures à 1,5 G/L, générant donc un frottis sanguin, contre seulement 14 (2,2%) en utilisant le score « mono-dysplasie ». Et inversement, 10 patients LMMC sur 61 au total (16,4%) présentaient une monocytose inférieure à 1,5 G/L, dont seulement deux avaient eu un frottis sanguin pour l'alarme « Blast / Abnormal lymph ».

Au total, au moins 8 patients LMMC n'auraient pas bénéficié d'une analyse microscopique contre seulement 2 avec le monoscore.

L'intérêt de ce score serait de permettre de réduire le nombre d'échantillons à étaler pour vérification de la monocytose sur frottis sanguin, et donc de permettre une économie sur le temps technicien et biologiste. Ce score « monocytose et dysplasie » aide le biologiste à être plus pertinent dans sa démarche diagnostique et lui permettra d'assurer une prestation de conseil plus adaptée à la situation. Le biologiste pourra alors recommander des examens complémentaires (myélogramme, la biologie moléculaire, caryotype) souvent plus coûteux uniquement chez ces patients à forte suspicion de LMMC (47) pour établir un diagnostic de certitude. A ce jour, il s'agit de la seule étude publiée évaluant la performance du monoscore dans le diagnostic différentiel de la LMMC. Ceci nécessiterait d'autres évaluations afin de vérifier la pertinence de cet outil.

D'autres outils sont développés dans ces approches diagnostiques comme par exemple, la cytométrie en flux adaptée à la population monocytaire.

## 2/ Analyse de la population monocytaire par cytométrie en flux

Cette technique permet d'étudier la population monocytaire chez les patients atteints de LMMC avec une monocytose persistante.

Les marqueurs associés à la lignée monocytaire sont les CD14 (le plus spécifique), CD13, CD33, CD11b, CD18, CD4, et CD64. Ces marqueurs membranaires sont en fait des récepteurs de nature protéique mis en évidence en immunofluorescence par cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques. On peut également trouver d'autres marqueurs corrélés à une activité particulière, comme :

- les récepteurs aux chimiokines (CCR1, CCR2, ...) qui jouent un rôle dans la migration des monocytes dans les tissus
- les intégrines (CD54, CD36 par exemple) qui jouent un rôle dans l'adhérence
- les marqueurs d'activation cellulaire comme le HLA-DR, le CD68 et le CD69.

La caractérisation des monocytes sanguins peut paraître à première vue difficile en raison de l'hétérogénéité des marqueurs présents à leur surface, et de l'hétérogénéité de leur expression en fonction du stade de maturation de la cellule et de sa fonctionnalité physiologique.

De plus, il a été décrit dans la littérature que les monocytes chez les patients LMMC pouvaient exprimer certains marqueurs de façon aberrante, comme le CD56 qui est le plus connu car le plus fréquent(45). Pour autant cette augmentation de l'expression du CD56 n'est

pas spécifique de la LMMC, car elle a également été observée chez des personnes saines, ou encore lors de phase de régénération après une cure de chimiothérapie(49).

Dans une étude américaine de 2014 menée sur 118 patients LMMC, des altérations immunophénotypiques sur les monocytes ont été observées chez 96% d'entre eux(49). Celles-ci n'étaient pas spécifiques car également détectées de façon aléatoire chez 37% des 26 patients témoins. Par contre elles étaient plus fréquentes et plus profondes chez les patients LMMC. Ces aberrations incluaient une expression diminuée du CD45 et de HLA-DR, une expression altérée des CD64 et CD14 (soit nettement augmentée ou diminuée), et une expression aberrante du CD56 et du CD2. Ces altérations étaient détectées de manière similaire chez les patients LMMC-MD et LMMC-MP(49).

D'autres études auparavant ont également montré l'expression de marqueurs aberrants, comme ceux présentés précédemment, mais au final aucune de ces aberrations n'est spécifique de la maladie(49,50). Ceci explique que l'immunophénotypage des populations monocytaires ne soit pas encore intégré au diagnostic de LMMC.

Cependant, une équipe française a montré en 2015 que cet outil permettrait de raccourcir le temps de diagnostic de la maladie (monocytose persistante pendant 3 mois selon l'OMS 2016) en étudiant la répartition de trois sous-populations monocytaires, définies par deux marqueurs :

- Le **CD14** qui est une protéine facilitant la liaison aux lipopolysaccharides bactériens des germes gram négatif
- Le **CD16** qui est un récepteur pour le fragment Fc des IgG

On distingue alors 3 catégories de monocytes :

- Les monocytes **classiques** : CD14+ / CD16-
- Les monocytes **intermédiaires** : CD14+ / CD16+
- Les monocytes **non classiques** : CD14 dim / CD16+

Les monocytes classiques sont les plus représentés, ils ont une forte activité de phagocytose. Les autres monocytes ont principalement un rôle dans l'inflammation en sécrétant les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) et aussi anti-inflammatoires (Il-10).

La cohorte d'étude (N = 175) intègre 53 patients LMMC (selon la classification de l'OMS 2008), 39 donneurs sains d'âge similaire, 26 jeunes donneurs sains, 33 patients avec une monocytose réactionnelle et 24 patients ayant une hémopathie autre que la LMMC (12 SMP, 7 SMD, 1 LMMJ et 4 pathologies lymphoïdes). La cohorte de validation (N = 307) quant à elle comprend 86 patients LMMC, 68 donneurs sains d'âge similaire, 74 patients avec une

monocytose réactionnelle et 79 patients atteints d'une autre hémopathie (non-LMMC) [Tableau 5].

		Cohorte d'étude				Cohorte de validation			
		LMMC (n=53)	Donneurs sains (n=39)	Non-LMMC (n=24)	Réactionnelle (n=33)	LMMC (n=86)	Donneurs sains (n=68)	Non-LMMC (n=79)	Réactionnelle (n=74)
Age médian (année) ± extrêmes		78 (53-91)	79 (62-94)	74 (2-94)	63,5 (36-87)	77 (46-97)	79,5 (50-92)	73 (0,5-92)	65 (37-91)
Sexe	Homme n(%)	37 (70)	13 (33)	13 (54)	20 (61)	59 (69)	16 (24)	43 (55)	40 (54)
	Femme n(%)	16 (30)	26 (67)	11 (46)	13 (39)	27 (31)	52 (76)	36 (45)	34 (46)
Médiane GB (G/L) ± extrêmes		9,25 (3,7 - 84,7)	6,8 (4,9-16,4)	7,4 (2,3-79,9)	11,8 (4,7-33,4)	9,3 (3,2-122,3)	6,6 (4,6-9,9)	5,7 (0,89-112,3)	10,2 (4,2-658)
Médiane Hb (g/dL) ± extrêmes		12,1 (7,5-14,9)	12,8 (11,1-16,7)	13,2 (8-26,8)	10,6 (8-14,3)	11,7 (6,1-16,9)	13 (11,6-15,9)	10,6 (5-18,2)	10,7 (7,9-19)
Médiane Plaquettes (G/L) ± extrêmes		86,5 (13-457)	229 (156-406)	207,5 (37-1045)	298,5 (57-1143)	132,5 (13-529)	244 (129-443)	151 (17-869)	259 (7-1037)
Médiane Monocytose (G/L) ± extrêmes		2,51 (1-28,8)	0,62 (0,31-0,96)	0,72 (0,2-2)	1,3 (1,1-7)	1,85 1-60)	0,6 (0,4-0,6)	0,63 (0,11-21,98)	1,4 (1-5,9)
LMMC-1 / LMMC-2		48/5				63/11			
Risque cytogénétique faible / intermédiaire / élevé		41/5/1				45/5/6			

Donneurs sains: donneurs sains d'âge similaire que le groupe LMMC ; Non-LMMC: patients avec hémopathie autre que LMMC ; Réactionnelle: Patients avec monocytose réactionnelle.  
 Les caractéristiques des jeunes donneurs sains (n=26) ne sont pas connues.  
 Patients LMMC étudiés avant tout traitement.

**TABLEAU 5 :** Ensemble des données de l'étude de *Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015*

L'analyse en cytométrie en flux a été réalisée pour chaque patient à partir du sang total et de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Afin d'identifier des sous-ensembles de monocytes, le protocole de cytométrie en flux inclut :

- 5 anticorps pour les PBMC : CD45, CD24, CD56, CD14, CD16
- 6 anticorps pour le sang total : CD45, CD2, CD24, CD56, CD14, CD16

Une étape de lyse sans lavage est ajoutée lors du traitement du sang total. L'analyse s'effectue dans la fenêtre des monocytes (CD14 / CD16) sur au moins 60 000 monocytes classiques à partir des PBMC et 50 000 à partir des sangs totaux.

Une stratégie d'exclusion des différentes sous-populations a été utilisée afin de sélectionner spécifiquement les monocytes :

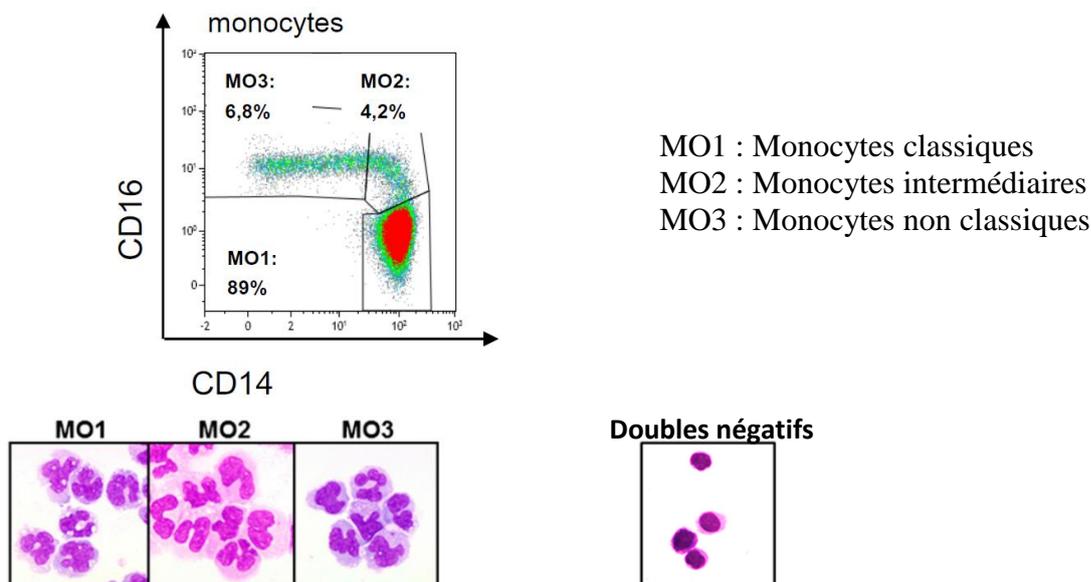
- Une élimination des doublets se fait en tout premier lieu en fonction de la taille et de la structure des cellules. Ces évènements sont présents lorsque des cellules passent en même devant le laser.
- Ensuite, une sélection est faite de façon très élargie des cellules de structure intermédiaire grâce au CD45, récepteur présent sur toutes les cellules nucléées, et au SSC (Side Scatter) : ces cellules correspondent aux monocytes

- Les cellules exprimant le CD24 à leur surface sont sélectionnées grâce à l'anticorps anti-CD24 et au SSC : cette population correspond aux lymphocytes B
- Grâce au CD16 et au SSC, on peut éliminer la population exprimant fortement ce récepteur : cette population correspond aux cellules granuleuses
- De la même manière, on élimine la population exprimant le CD56 à sa surface : il s'agit des lymphocytes NK
- Enfin, on élimine la population exprimant le CD2 à sa surface : il s'agit des lymphocytes T
- Une fenêtre est ensuite créée avec en abscisse l'expression du CD14 et en ordonnée l'expression du CD16. On sélectionne la population n'exprimant aucun de ces récepteurs à sa surface pouvant correspondre à des lymphocytes résiduels non éliminés auparavant.

Toutes ces étapes ont permis d'éliminer une à une les différentes populations cellulaires dans le but de sélectionner la population d'intérêt : les Monocytes.

Cette fenêtre finale est représentée ci-après [Figure 13], en « **Density Plot** » afin de mieux séparer les trois populations qui nous intéressent dénommées MO1, MO2 et MO3.

Ces trois sous-populations ont été étudiées cytologiquement après les avoir récupérées par tri cellulaire et les étalements ont été colorés au MGG.



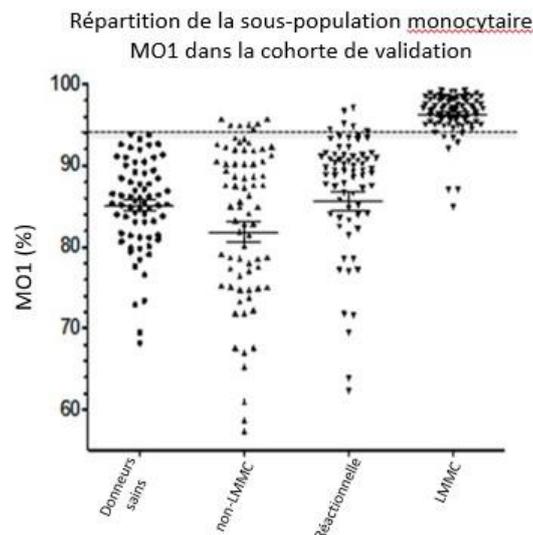
**FIGURE 13 :** Fenêtre finale en « Density Plot » et cytologie des populations monocytaires d'après *Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015*

Dans la cohorte d'étude, parmi le groupe des 53 patients LMMC, le pourcentage de MO1 est en moyenne de **96,6**+/-1,7%. Dans les groupes « non-LMMC » et « réactionnelle », les moyennes des populations MO1 sont respectivement de 84,4+/-10,6% et 79,1+/-10,5%. La proportion de MO1 est significativement plus élevée chez les patients LMMC que dans les autres groupes étudiés ( $p < 0.0001$ ). La différence n'est pas significative entre les autres groupes de la cohorte d'étude [Figure 14].

Une valeur supérieure à **94,0%** de MO1 montre une spécificité de **95,1%** et une sensibilité de **90,6%** pour le diagnostic de LMMC. Cette valeur a été validée dans un second temps dans une cohorte de validation. Parmi le groupe des 86 patients LMMC, le pourcentage de MO1 est en moyenne de 96,4+/-2,5%. Dans les groupes « non-LMMC », « réactionnelle » et « donneurs sains » les moyennes des populations MO1 sont respectivement de 81,9+/-11,5%, 85,8+/-9,9% et 85,1+/-5,6%. En prenant en compte seulement les patients ayant une monocytose > 1 G/L avec le cut-off de MO1 placé à 94% en cytométrie, on obtient les résultats suivants :

- une spécificité de 100% et une sensibilité de 90,4% dans la cohorte d'étude
- une spécificité de 94,5% et une sensibilité de 91,7% dans la cohorte de validation.

**Ces données indiquent que le pourcentage de MO1 avec un seuil de 94% pourrait être utilisé afin d'améliorer le diagnostic de LMMC parmi les patients ayant une monocytose  $\geq 1$  G/L(48).**



**FIGURE 14 :** Répartition de la sous-population monocytaire MO1 dans la cohorte de validation de l'étude de *Selimoglu-Buet D et al. Blood, 2015*

Il a été observé que le pourcentage de MO1 chez les patients LMMC était indépendant du nombre absolu de monocytes circulants, d'éventuelles mutations de gènes, du statut prolifératif ou dysplasique de la maladie selon la classification FAB et du sous-type de la maladie (LMMC-1, LMMC-2) selon les critères de la classification l'OMS. La répartition caractéristique des sous-ensembles de monocytes dans le sang périphérique des patients atteints de LMMC montre une augmentation de MO1 et une diminution de MO3 par rapport aux donneurs sains. A l'inverse, les patients avec une monocytose réactionnelle montrent une augmentation significative des sous populations MO2 et MO3.

Chez 18 patients LMMC, une augmentation de la sous population MO1 dans la moelle osseuse a été observée. Ce résultat est comparable à celui observé dans le sang périphérique. Ainsi la diminution de la fraction MO3 dans le sang n'est pas liée à leur rétention dans la moelle osseuse(48).

Lors du suivi des patients LMMC, il a été remarqué que le pourcentage de MO1 restait supérieur à 94% chez 21 patients non traités sur une période de 26 mois. Chez les patients traités par 5-azacytidine, il a été observé une normalisation des sous-populations monocytaires chez 7 patients répondeurs, avec une disparition de la monocytose, alors que la répartition des monocytes est restée inchangée chez les patients non répondeurs. Ainsi, l'immunophénotypage semble également être intéressant dans le suivi de la maladie afin d'évaluer la réponse thérapeutique des agents hypométhylants(48).

## **PARTIE III : Objectif de l'étude**

Le diagnostic de LMMC reste à ce jour difficile à établir car il s'agit en général d'un diagnostic d'exclusion. Le diagnostic précoce de la LMMC reste un point clé pour une prise en charge thérapeutique optimale.

Des études récentes ont montré l'intérêt de nouveaux outils diagnostiques pouvant entrer en jeu dès la première numération formule sanguine (NFS). Ceux-ci pourraient permettre de faire plus précocement le diagnostic de LMMC et améliorer la prise en charge thérapeutique.

Notre étude a été réalisée entre février et mai 2018 dans le service d'Hématologie et de Biologie Vasculaire du Pr. F. Dignat-George en collaboration avec le service d'onco-hématologie et de thérapie cellulaire adulte du Pr. R. Costello à l'hôpital de la Conception, à Marseille.

**Le but de ce travail est de comparer les performances de 3 outils dans le diagnostic différentiel de la LMMC :**

- **le « monoscore » calculé par l'automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex® lors de la NFS**
- **la caractérisation des sous populations monocytaires par cytométrie de flux**
- **la cytologie sanguine au microscope optique.**

## **PARTIE IV : Matériels et méthodes**

### 1/ Cohorte

Dans le cadre de cette étude, 48 patients ont été inclus présentant les critères suivants :

- l'âge supérieur à 18 ans
- la présence d'une monocytose sanguine  $\geq 1$  G/L et représentant au moins 10% des leucocytes.

Le recrutement des patients s'est fait sur une période de 4 mois, entre février et mai 2018.

Il s'agit d'une étude cas-témoin dans laquelle pour tout patient présentant un diagnostic ou une forte suspicion de LMMC, 3 à 5 patients présentant les critères d'inclusions de l'étude ont été inclus le même jour. La confirmation du diagnostic de LMMC a pu être faite avant ou après l'inclusion selon les critères OMS 2016.

A partir du recueil de l'ensemble des données cliniques, biologiques et thérapeutiques, les patients ont été ensuite répartis en deux groupes distincts :

- Groupe 1 : 11 Patients « LMMC » = Cas

Les patients constituant ce groupe sont des patients pour lesquels le diagnostic de LMMC a été formellement posé par le service clinique selon l'OMS à l'aide notamment de la NFS (monocytose chronique), du myélogramme, du caryotype ou encore de la biologie moléculaire. Il s'agit soit de patients nouvellement diagnostiqués, soit de patients déjà connus dans le service d'onco-hématologie pour une LMMC. Un traitement par Vidaza est en cours pour 2 patients et un traitement par corticoïde pour un patient. Les 8 autres n'ont soit pas de traitement, soit seulement des traitements de support (transfusions par exemple).

- Groupe 2 : 37 Patients « réactionnels » = Témoins

Ce groupe de patients a été recruté au quotidien sur les simples résultats de l'hémogramme en présence d'une monocytose  $\geq 1$ G/L et représentant plus de 10% de la formule leucocytaire.

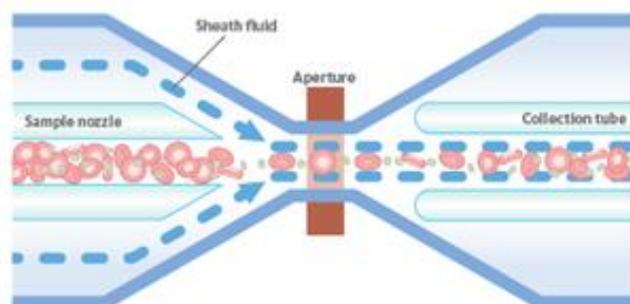
Seuls les patients qui présentaient une monocytose *de novo* avec syndrome inflammatoire avéré et/ou sous antibiothérapie ont été conservés dans ce groupe. De plus, le critère de disparition de la monocytose a été également recherché dans les bilans de suivi afin de confirmer la notion de monocytose réactionnelle chez ces patients.

## 2/ Méthodologie

Un prélèvement sanguin a été réalisé au diagnostic ou lors du suivi des patients. Un tube d'acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) de 4 ml de sang est recueilli. Il est ensuite acheminé dans les plus brefs délais au laboratoire d'Hématologie et de Biologie Vasculaire de la Conception.

### a) Automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex®

Le prélèvement est analysé sur l'automate XN-10 Sysmex®. Cet analyseur utilise différentes technologies pour effectuer la numération formule sanguine (NFS). Les globules rouges et les plaquettes sont mesurés simultanément au niveau d'un orifice de comptage par la technique de l'impédance combinée à la focalisation hydrodynamique [Figure 15].



**FIGURE 15** : Schéma du principe de comptage cellulaire par la technique de l'impédance

Un réactif sans cyanure est utilisé pour mesurer l'hémoglobine par photométrie.

Cet automate utilise également la fluoro-cytométrie comme principale méthode de détection pour la formule leucocytaire, la numération des réticulocytes et des érythroblastes.

Dans un premier temps, l'échantillon de sang est marqué à l'aide d'un fluorochrome qui se lie spécifiquement aux acides nucléiques. Puis il est ensuite transporté dans la chambre de mesure. L'échantillon est illuminé par le faisceau d'un laser semi-conducteur, capable de séparer des cellules au moyen de trois signaux différents :

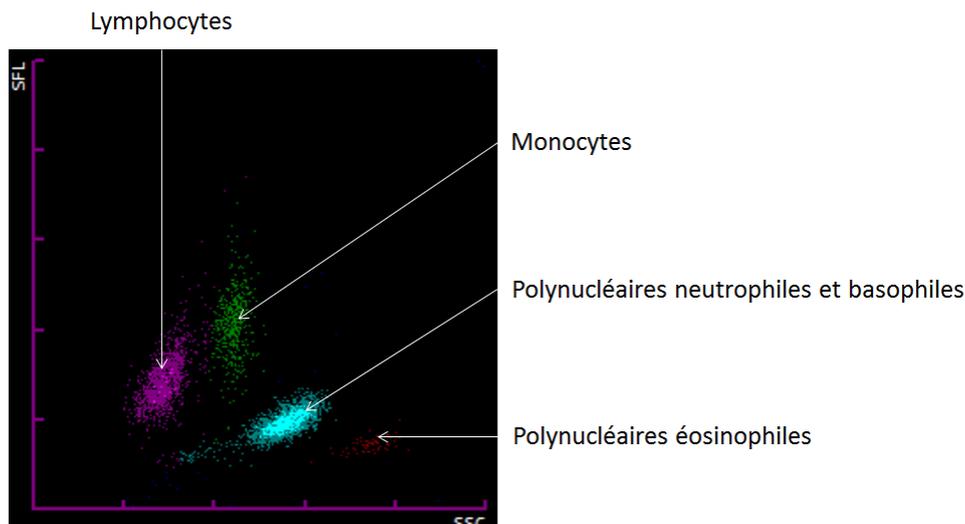
- Diffusion frontale de la lumière (FSC : « forward scatter »)
- Diffusion latérale de la lumière (SSC : « side scatter »)
- Fluorescence latérale de la lumière (SFL : « side fluorescence light »)

L'intensité de la diffusion frontale indique le volume de la cellule, la diffusion latérale fournit des informations sur le contenu de la cellule, telles que la taille du noyau ou les granulations.

La fluorescence latérale indique la quantité d'ADN et d'ARN que contient la cellule.

Les cellules ayant des propriétés physiques et chimiques similaires forment une population similaire sur un graphique appelé diagramme de dispersion (scattergram).

Ce diagramme vous est présenté dans la figure ci-après [Figure 16] :



**FIGURE 16** : Diagramme de dispersion des leucocytes chez un patient normal

#### b) Cytologie au microscope optique Leica®

Un frottis sanguin manuel est fait de façon systématique et coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) à l'aide du colorateur automatique (SP-10 XN Sysmex®) dans un délai de moins de

2h. Les frottis sanguins sont ensuite analysés au microscope par un seul et même opérateur afin d'améliorer la reproductibilité selon une grille pré établie détaillée ci-après [Tableau 6].

Plusieurs items sont analysés et renseignés dans le tableau :

- L'aspect des monocytes : normal, anormal ou de type promonocytaire
- La présence ou non de blastes et leur décompte
- La présence ou non d'une myélémie et son décompte
- La présence ou non de signes de dysgranulopoïèse principalement observés dans les PNN: dégranulation, anomalie de condensation de la chromatine, présence de spicules, anomalies de la segmentation nucléaire
- La présence de lymphocytes d'aspect réactionnel : lymphocytes hyperbasophiles
- La présence ou non de signes de dysplasie sur les plaquettes : anisocytose plaquettaire (plaquettes de grande taille ou plaquettes géantes), ou dystrophie plaquettaire (plaquettes dégranulées)

L'analyse de ces critères cytologiques a été codifiée de la façon suivante.

Pour chaque item cytologique analysé, un nombre de points a été attribué :

- soit en fonction de la présence ou non de l'item étudié
- soit en fonction de l'intensité de l'anomalie présente pour l'item étudié.

Ces points ont été additionnés, donnant ainsi un score : le C-score.

Selon la classification OMS 2016, des signes de dysgranulopoïèse inférieurs à 10% ne sont pas jugés comme significatifs.

De même, l'anisocytose plaquettaire a été notifiée uniquement en cas d'anisocytose plaquettaire marquée soit  $\geq 50\%$ .

La méthode d'attribution des points est résumée dans le tableau suivant :

Items	Critères	Points
<b>Monocytes</b>	Aspect normal	0
	Aspect anormal	1
	Promonocytes : rajeunissement de la chromatine	2
<b>Blastes</b>	Absence	0
	Présence	1
<b>PNN dégranulés</b>	0%	0
	1 - 9 %	1
	10 - 19 %	2
	20 - 49 %	3
	≥ 50 %	4
<b>PNN avec troubles de condensation de la chromatine</b>	0%	0
	1 - 9 %	1
	10 - 19 %	2
	20 - 49 %	3
	≥ 50 %	4
<b>PNN avec des spicules</b>	0%	0
	1 - 9 %	1
	10 - 19 %	2
	20 - 49 %	3
	≥ 50 %	4
<b>PNN hyposegmentés</b>	0%	0
	1 - 9 %	1
	10 - 19 %	2
	20 - 49 %	3
	≥ 50 %	4
<b>Plaquettes</b>	Aspect normal	0
	Anisocytose plaquettaire	1
	Aspect anormal : dystrophie plaquettaire	2

**TABLEAU 6** : Grille d'évaluation cytologique

c) Cytomètre de flux Navios®

Les prélèvements sont analysés le jour même ou le lendemain (conservation du tube à température ambiante) sur l'automate de cytométrie en flux Navios® de la société Beckman Coulter®.

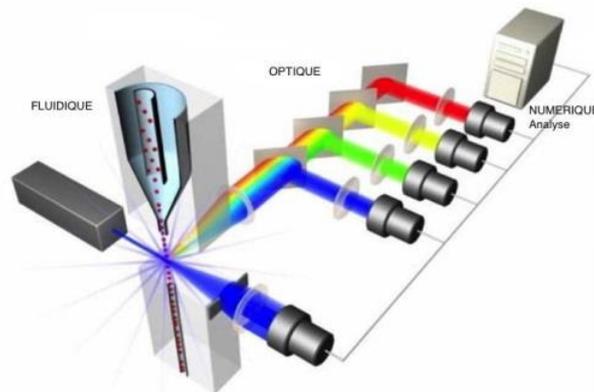
Le cytomètre en flux est un instrument qui possède trois systèmes : le système fluidique qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au niveau de la cellule d'analyse, le système optique comprenant les lasers comme source de lumière, et les filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs, et enfin le système électronique qui va convertir la lumière en signaux électroniques analysables par l'ordinateur [Figure 17].

Cependant, le « coeur » du système est représenté par la cellule d'analyse. En effet, c'est là que les cellules traversent le ou les lasers et que le système optique collecte la lumière diffractée et la fluorescence émise par la cellule. Le passage des cellules les unes derrière les autres, réalisé par le principe de centrage hydrodynamique est primordial pour une analyse précise des signaux optiques.

Au final, les paramètres cellulaires analysés sont essentiellement relatifs :

- Aux propriétés optiques intrinsèques des cellules qui correspondent aux phénomènes de diffraction lumineuse liés aux dimensions de la cellule et à sa structure interne. La taille relative (FSC) et la granularité relative (SSC) des cellules sont ainsi mesurées. Cela permet d'identifier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes
- Aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques d'antigènes ou de fonctions cellulaires. En général, des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes sont nécessaires pour ces mesures optiques. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, d'où une émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée.

Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.



**FIGURE 17 :** Principe simplifié d'un cytomètre en flux

Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza®. Concernant la méthode de fenêtrage, la méthode de manipulation et les anticorps fluorescents à utiliser, le protocole est inspiré de la publication de *Selimoglu-Buet D et al.*

Les différents anticorps utilisés sont : CD45, CD24, CD2, CD56, CD14, CD16

ANTICORPS			FLUOROCHROMES		
Spécificité	Isotype	Clone	Nom	$\lambda$ excitation (nm)	$\lambda$ émission (nm)
CD45	IgG1 $\kappa$	J33	Krome Orange	405	528
CD24	IgG1	ALB9	R Phycoerythrin (PE)	488	575
CD16	IgG1	3G8	Pacific Blue	405	455
CD56	IgG1	N901 (NKH-1)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	488	770
CD2	IgG2a	39C1.5	Allophycocyanine-Alexa Fluor 700	633/638	720
CD14	IgG2a	RMO52	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1(PC5)	488	670

**TABLEAU 7 :** Anticorps fluorescents utilisés pour l'analyse en cytométrie en flux

- On prélève une prise d'essai de 100 $\mu$ L de sang total et on ajoute 5 $\mu$ L de chaque anticorps
- Après avoir légèrement homogénéisé, on place le tube à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 minutes
- On ajoute ensuite 2mL de solution de lyse des globules rouges
- Après agitation de quelques secondes, on replace le tube à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10 minutes
- On réalise une centrifugation à 194 G pendant 4 minutes, puis on élimine le surnageant
- On rajoute 400 $\mu$ L de PBS BSA-azide pour une bonne conservation des cellules
- Lecture sur le cytomètre de flux

La stratégie d'analyse a été la suivante [Figure 18]:

- Après avoir éliminé les doublets, une sélection est faite de façon très élargie des cellules de structure intermédiaire grâce au CD45 et au SSC (Side Scatter)
- Les lymphocytes T, NK, B et les cellules granuleuses sont éliminés respectivement grâce aux anticorps anti CD2, CD56, CD24, CD16
- Enfin les cellules CD14-/ CD16- (double négatif) qui serait des lymphocytes résiduels sont éliminées.

Une fenêtre finale est obtenue contenant exclusivement des monocytes, représentée en « **Density Plot** » afin de mieux séparer les trois populations d'intérêt : monocytes classiques (MO1), intermédiaires (MO2), non classiques (MO3). Cette fenêtre est encadrée en Figure 18. A noter que séparation des populations MO2 et MO3 est relativement arbitraire. Dans le cadre de cette étude, elle a été fixé par un même opérateur afin d'avoir une bonne reproductibilité.

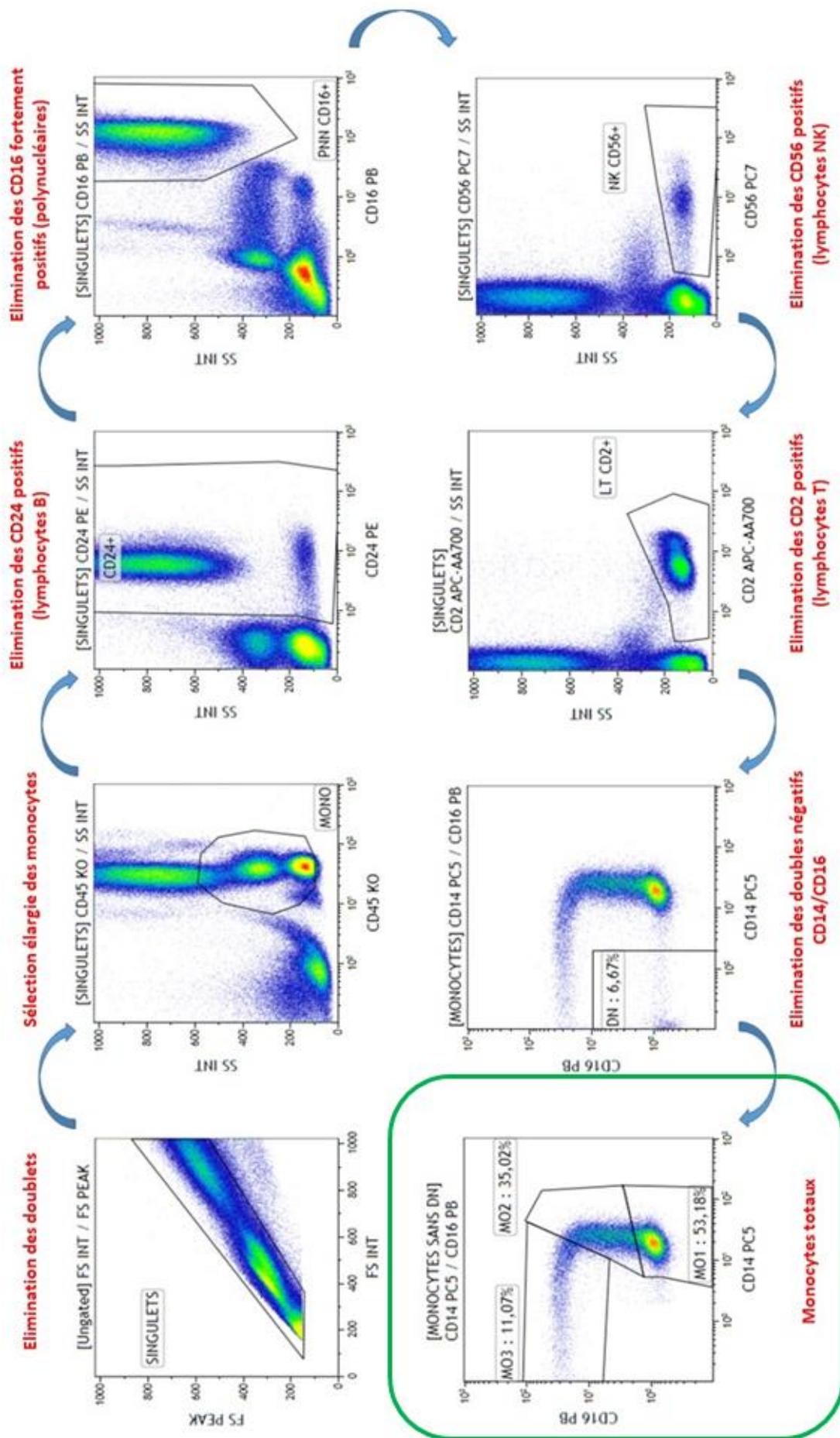


FIGURE 18 : Méthode de fenêtrage en cytométrie en flux

### 3/ Recueil des données

Les données biologiques et cliniques suivantes ont été collectées pour chaque patient:

- L'âge et le sexe
- Les données hématologiques: hémoglobine, plaquettes, leucocytes, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, myélocytose, blastes, rapport Ne/Mo, Ne-WX
- Le monoscore
- L'analyse qualitative du frottis sanguin selon les items cités ci-dessus (C-score)
- Les résultats de la CMF : pourcentages de MO1, MO2 et MO3
- La CRP

Un tableau récapitulatif du recueil de ces données est illustré en Annexe 1.

D'autres données biologiques et cliniques ont été collectées pour chaque patient permettant leur répartition au sein des groupes de notre cohorte :

- Les NFS antérieures et/ou postérieures si disponibles
- Les résultats du caryotype et de la biologie moléculaire (si réalisées)
- Les résultats du myélogramme : en cas de monocytose persistante chez les patients nécessitant une exploration en service d'onco-hématologie.
- Autres données biologiques : ProCalciTonine (PCT), fibrinogène, cultures bactériennes, sérologies et PCR virales.
- Les données cliniques (motif d'hospitalisation, symptômes, ...)
- La notion d'instauration d'un traitement.

### 4/ Statistiques

Une analyse statistique a été faite pour chaque donnée recueillie en Annexe 1. Les résultats de ces données sont présentés sous forme de médiane et écart-type. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US).

Nous avons comparé les différentes variables entre les deux groupes de notre cohorte grâce à un test de comparaison de deux moyennes expérimentales, échantillons indépendants. Les

valeurs sont significativement différentes lorsque la *p-value* est inférieure à 0,05 selon la loi de Student. Lorsque les données recueillies montraient une différence significative entre les 2 groupes (*p-value* < 0,05), une courbe ROC a été faite. Elle permet de mesurer la performance d'un test à une valeur seuil donnée. La courbe ROC correspond à la représentation graphique du couple (1-spécificité ; sensibilité) pour les différentes valeurs seuil. A partir de cette courbe, un indice synthétique est calculé : l'aire sous la courbe (AUC) qui correspond à la probabilité pour qu'un évènement positif soit classé comme positif par le test sur l'étendue des valeurs seuil possibles. On considère que le modèle est bon lorsque l'AUC est supérieure à 0,7 et excellent lorsqu'elle est supérieure à 0,9. Pour un modèle idéal, l'AUC est égale à 1.

## PARTIE V : Résultats

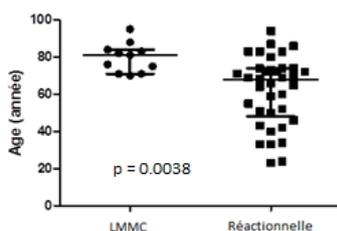
### 1/ Caractéristiques démographiques et biologiques

La cohorte est constituée de 48 patients (31H, 17F) adultes dont l'âge médian est de 71 ans. Les paramètres clinico-biologiques significativement différents entre les 2 populations sont représentés dans le tableau suivant :

	Patients LMMC (N=11)		Patients réactionnels (N=37)		P-value
	Médiane	[25 <sup>ème</sup> ; 75 <sup>ème</sup> percentile]	Médiane	[25 <sup>ème</sup> ; 75 <sup>ème</sup> percentile]	
Age (année)	81	[71 ; 84]	68	[48 ; 74]	0,0038
Hb (g/L)	91	[81 ; 112]	115	[99 ; 134]	0,007
Plaquettes (G/L)	77	[35 ; 136]	260	[212 ; 323]	<0,0001
Monocytes (%)	27,4	[20,7 ; 37,7]	12,9	[11,5 ; 15,3]	<0,0001
Monocytes (G/L)	2,1	[1,5 ; 4,9]	1,3	[1,2 ; 1,6]	0,0005
Ne / Mo	1,6	[1,3 ; 3,1]	5	[3,3 ; 6,4]	<0,0001
Ne-WX	387	[360 ; 469]	312	[298 ; 326]	<0,0001
Blasts/Abn Lymph	75	[55 ; 82]	40	[30 ; 60]	0,0014

**TABLEAU 8** : Paramètres clinico-biologiques significativement différents entre les 2 groupes de patients

\* L'âge médian des patients « LMMC » est de 81 ans alors que celui des patients ayant une monocytose réactionnelle, que l'on appellera « patients réactionnels », est de 68 ans. Comme observé sur la figure 19, l'âge de la population réactionnelle est très hétérogène par rapport à celui de la population « LMMC ».



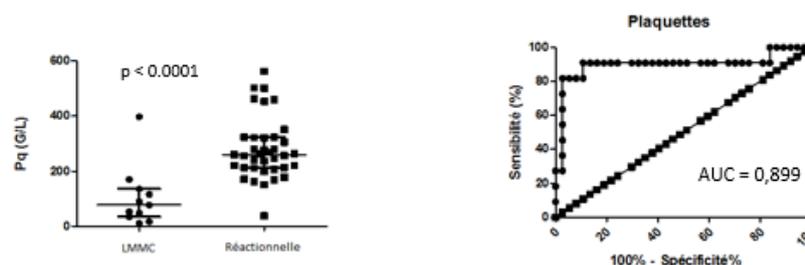
**FIGURE 19** : Différence d'âge entre les deux populations

\* Au sein du groupe de patients LMMC, 10/11 patients ont une anémie. Ceci est expliqué d'une part par la maladie en elle-même mais également pour certains patients (2 d'entre eux) par l'instauration de traitement comme le Vidaza® qui majore le syndrome anémique. Probablement que leur taux d'hémoglobine serait plus bas encore si la plupart d'entre eux ne recevaient pas des traitements de support (transfusions régulières ou facteurs de croissance). A l'inverse, au sein du groupe de patients réactionnels, 23/37 patients sont anémiés. Parmi ces patients, on retrouve des situations post-chirurgicale ou obstétricale, des greffés rénaux ou encore des patients présentant une hémoglobinopathie. Ceci explique le nombre important de patients anémiés au sein de ce groupe réactionnel à des taux qui ne nécessitent pas de support transfusionnel.

\* Au sein du groupe de patients LMMC, 9/11 patients présentent une thrombopénie. A noter que les 2 seuls patients avec un taux de plaquettes normal présentaient un syndrome inflammatoire concomitant.

A l'inverse, au sein du groupe de patients réactionnels, un seul présente une thrombopénie. L'origine de cette thrombopénie est expliquée par la mise en évidence d'un syndrome d'activation macrophagique au myélogramme dans un contexte de septicémie à *Staphylococcus aureus*.

La présence d'une monocytose associée à une thrombopénie est donc dans notre cohorte un élément fortement discriminant en faveur d'une LMMC. [Figure 20]. En effet, on obtient une excellente spécificité (Sp = 97,3%) lorsque les patients ont une thrombopénie inférieure à 140 G/L.

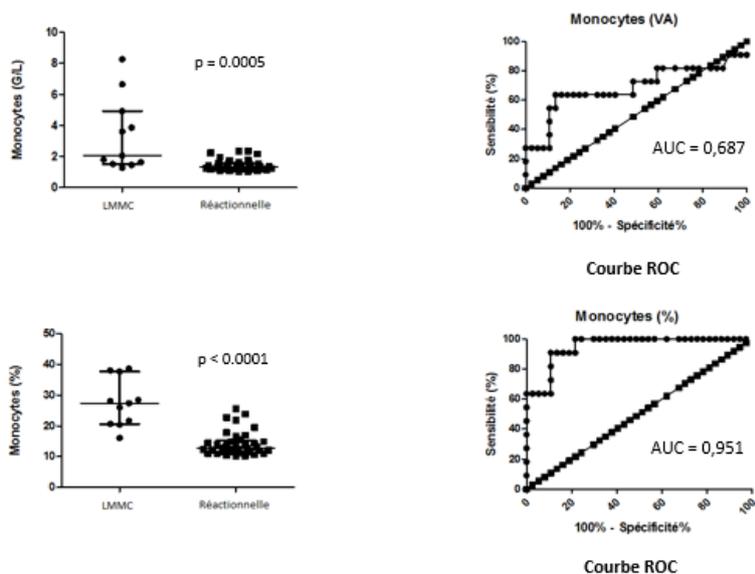


**FIGURE 20** : Analyse du taux de plaquettes dans les deux populations

\* Comme le montre le tableau 8, le pourcentage et la valeur absolue de la monocytose sont également significativement différents entre les 2 groupes de patients. De manière intéressante, les courbes ROC montrent une aire sous la courbe du taux de monocytes en pourcentage plus élevée qu'en valeur absolue ( $AUC_{\%}=0,951$  vs  $AUC_{VA}=0,687$ ) [Figure 21].

Ce résultat montre que dans l'étude, le pourcentage de monocytes est plus discriminant que la valeur absolue pour le diagnostic différentiel de la LMMC.

Selon les courbes, on remarque que lorsque la monocytose est supérieure à 26% des leucocytes ou supérieure à 2,5 G/L, la spécificité est de 100% en faveur du diagnostic de LMMC dans notre cohorte.

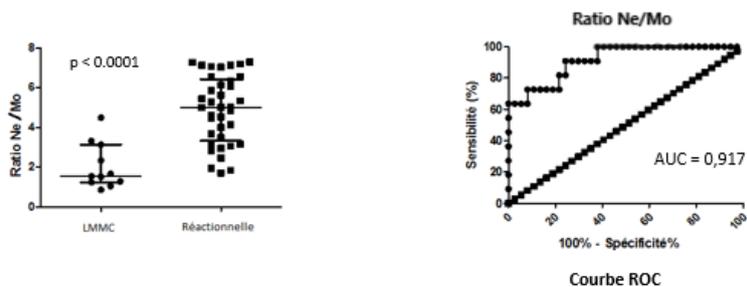


**FIGURE 21** : Analyse du taux de monocytes en pourcentage et en valeurs absolues dans les deux populations

\* Le ratio Ne/Mo correspond au rapport entre le taux de PNN et le taux de monocytes en valeur absolue. Les médianes de ce ratio chez les patients LMMC et chez les patients réactionnels sont respectivement de 1,6 [1,3 ; 3,1] et 5,0 [3,3 ; 6,4].

Comme pour les autres paramètres pré-cités, une courbe ROC a été réalisée [Figure 22] et une spécificité de 100% a été retrouvée lorsque le seuil est placé à 1,7.

Ainsi, un ratio Ne/Mo inférieur à 1,7 serait très en faveur d'une LMMC. En revanche la sensibilité est seulement de 63,6%.

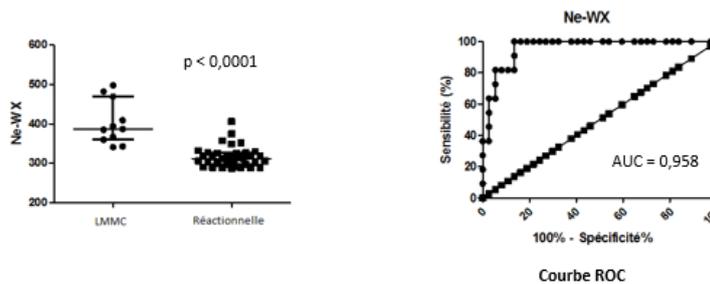


**FIGURE 22** : Analyse du ratio Ne/Mo dans les deux populations

\* La médiane de Ne-WX chez les patients LMMC est significativement plus élevée que chez les patients réactionnels. Par conséquent, la granularité des PNN chez les patients atteints de LMMC est plus hétérogène, ce qui peut représenter un signe de dysgranulopoïèse.

Comme le montre la courbe ROC [Figure 23], ce paramètre présente l'AUC la plus élevée de tous les paramètres étudiés de l'hémogramme (AUC = 0,958).

Ainsi, ce paramètre est le plus discriminant de l'hémogramme pour différencier une monocytose réactionnelle et pathologique. Ce paramètre est constitutif du monoscore.



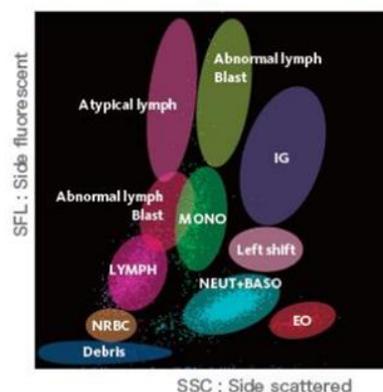
**FIGURE 23 :** Analyse de la valeur Ne-WX dans les deux populations

\* Le paramètre « Blast/Abnormal lymph » est significativement supérieur chez les patients LMMC comparé aux monocytoses réactionnelles. Ce paramètre est mesuré par l'automate XN-10 Sysmex® en fonction du nombre de cellules présentes dans certaines zones du diagramme de dispersion des leucocytes [Figure 24]. Deux zones sont analysées:

- Une zone située entre le nuage des lymphocytes et le nuage des monocytes.
- Une zone située au-dessus du nuage des monocytes

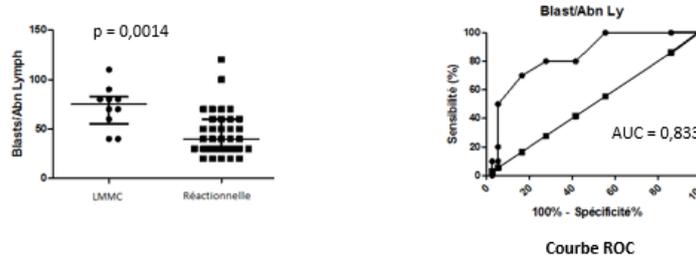
Ces cellules peuvent correspondre par exemple à des monocytes anormaux avec un rajeunissement de la chromatine, ou encore à des blasts significativement plus présents chez les patients LMMC que dans la population contrôle.

Diagramme de dispersion des leucocytes



**FIGURE 24:** Schéma représentant les différentes alarmes analytiques en fonction de l'emplacement des cellules sur le diagramme de dispersion des leucocytes

L'AUC de la courbe ROC est de 0,833 montrant une bonne spécificité (94,4%) avec un seuil à 80 (unité arbitraire) pour ce paramètre [Figure 25].

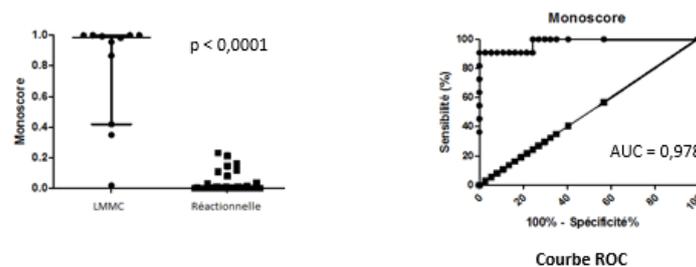


**FIGURE 25 :** Analyse de l'alarme « Blast/ Abnormal lymph » dans les deux populations

Au final, en comparaison avec les patients présentant une monocytose réactionnelle, les patients atteints de LMMC de notre cohorte sont plus anémiés, plus thrombopéniques, présentent une monocytose plus importante (VA et %), un ratio Ne/Mo assez faible, et déclenchent plus souvent l'alarme « Blast/ Abnormal lymph ». Ces résultats sont bien en adéquation avec la littérature. On en conclut que notre cohorte d'étude est, malgré un effectif faible, représentative pour pouvoir comparer les performances analytiques des nouveaux outils de diagnostic différentiel de la LMMC: le monoscore, la cytologie et la CMF.

## 2/ Monoscore

Les médianes du monoscore chez les patients LMMC et chez les patients réactionnels sont respectivement de 0,984 [0,42 ; 1] et 0,001 [0 ; 0,021]. Ce paramètre est très significativement différent entre les 2 groupes car la *p-value* est inférieure à 0,0001 [Figure 26]. L'AUC de la courbe ROC est à 0,978.



**FIGURE 26 :** Analyse du monoscore dans les deux populations

\* Les performances analytiques du monoscore ont été calculées dans un premier temps avec le seuil décisionnel de 0,160 (issu de la littérature).

Parmi les 35 patients ayant un monoscore négatif, 34 présentent une monocytose réactionnelle et un seul une LMMC. Ainsi la Valeur Prédictive Négative (VPN) du monoscore dans notre cohorte est de 97,1%.

Parmi les 13 patients ayant un monoscore positif, 10 présentent une LMMC et 3 une monocytose réactionnelle. Ainsi la Valeur Prédictive Positive (VPP) du monoscore dans notre cohorte est de 76,9%.

Parmi les 11 patients LMMC, le monoscore est positif pour 10 patients, ce qui donne une sensibilité de 90,9%.

Parmi les 37 patients réactionnels, le monoscore est négatif pour 34 patients, ce qui donne une spécificité de 91,9% [Tableau 9].

	Monoscore		Total
	≥ 0,160	< 0,160	
LMMC (+)	10	1	11
LMMC (-)	3	34	37
Total	13	35	48

**TABLEAU 9** : Performances analytiques du monoscore

Au total, le monoscore a permis de classer correctement 44/48 patients, soit 91,7%.

Analyses des faux positifs et faux négatifs avec le seuil de la littérature :

- Concernant le seul patient faussement négatif pour le monoscore. Il s'agit d'un patient connu pour une LMMC depuis avril 2014, qui est greffé rénal et traité uniquement par corticothérapie.

La formule sanguine de ce patient rendue par l'automate a été contrôlée au microscope et a été modifiée. Ainsi, en prenant en compte le nouveau taux de monocytes et le nouveau rapport Ne/Mo, le monoscore a été recalculé à 0,077 (initialement égal à 0,020) ce qui reste malgré tout inférieur au seuil de positivité de 0,160.

Si on s'intéresse plus en détail aux différents paramètres qui définissent le monoscore, à savoir le taux de monocytes (G/L), le ratio Ne/Mo et la valeur Ne-WX. On s'aperçoit comme cela est représenté dans le tableau 10 que ce patient a des valeurs de Ne/Mo et Ne-WX qui sont en dehors des intervalles de confiance établis pour les 2 groupes définis à partir des résultats du monoscore (monoscore négatif (N=35) et monoscore positif (N=13)). On remarque également que le taux de monocytes est même inférieur à la borne inférieure du groupe « monoscore négatif ». On peut donc affirmer que, pour ce patient, c'est le taux de monocytes qui impacte le plus la valeur du monoscore.

	Groupe de patients avec un monoscore négatif (N=35)			Patient	Groupe de patients avec un monoscore positif (N=13)		
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de confiance (95%)		Moyenne	Ecart-type	Intervalle de confiance (95%)
Taux de Monocytes (G/L)	1,409	0,3382	1,29 - 1,53	<b>1,28</b>	3,161	2,228	1,81 - 4,51
Ne/Mo	5,089	1,577	4,54 - 5,63	<b>3,33</b>	1,995	1,038	1,36 - 2,63
Ne-WX	313,9	23,98	305,6 - 322,1	<b>343</b>	394,7	56,66	360,5 - 428,9

**TABLEAU 10** : Analyse du cas faux négatif en monoscore

- Concernant les 3 patients faussement positifs en monoscore [Tableau 11].

- Pour le patient 1 (monoscore = 0,161), le taux de monocytes est compris dans l'intervalle de confiance du groupe de patients avec le monoscore positif, contrairement aux deux autres paramètres. Le poids de la positivité du monoscore est principalement dû au taux de monocytes très élevé. Ce patient présentait une fièvre à 38,4°C et une CRP à 84,6 g/L. Devant ce tableau inflammatoire, une infection aiguë est supposée, faisant augmenter le taux de monocytes assez rapidement. Cette monocytose a été recontrôlée sur un bilan biologique ultérieurement : la formule sanguine s'est normalisée.

- Pour le patient 2 (monoscore = 0,212), le ratio Ne/Mo et la valeur de Ne-WX sont dans l'intervalle de confiance du groupe de patients ayant un monoscore positif, contrairement au taux de monocytes. Le poids de la positivité du monoscore repose donc sur ces 2 paramètres. Ce patient est traité par chimiothérapie pour un carcinome épidermoïde.

- Pour le patient 3 (monoscore = 0,232), la valeur du ratio Ne/Mo est incluse dans l'intervalle de confiance du groupe de patients ayant un monoscore positif, contrairement aux 2 autres paramètres. Le monoscore est probablement positif à cause de ce ratio Ne/Mo trop faible. Dans le cadre d'un traitement par chimiothérapie, il a reçu des injections de G-CSF (Zarzio®) qui sont des facteurs de croissance des leucocytes.

Il est également important de remarquer que pour ce patient, devant la présence d'une myélémie non connue représentant 7,2% des leucocytes, la formule leucocytaire a été contrôlée au microscope. En raison de l'absence de myélémie constatée sur le frottis sanguin, la formule manuelle a été rendue. De ce fait, la population des PNN est majorée ce qui modifie ainsi le calcul du monoscore. Une fois recalculé avec le bon taux de PNN et de monocytes, le monoscore se négative à 0,070.

	Groupe de patients avec un monoscore négatif (N=35)			Groupe de patients avec un monoscore positif (N=13)			Moyenne	Ecart-type	Intervalle de confiance (95%)
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de confiance (95%)	Patient 1	Patient 2	Patient 3			
Taux de Monocytes (G/L)	1,409	0,3382	1,29 - 1,53	<b>2,36</b>	<b>1,38</b>	<b>1,52</b>	3,161	2,228	1,81 - 4,51
Ne/Mo	5,089	1,577	4,54 - 5,63	<b>3,17</b>	<b>1,71</b>	<b>1,84</b>	1,995	1,038	1,36 - 2,63
Ne-WX	313,9	23,98	305,6 - 322,1	<b>307</b>	<b>375</b>	<b>357</b>	394,7	56,66	360,5 - 428,9

**TABLEAU 11** : Analyse des cas faux positifs en monoscore

\* Dans un deuxième temps, un nouveau seuil calculé à partir des résultats de notre cohorte a été déterminé. Un seuil à 0,292 permet d'obtenir une spécificité du monoscore à 100 % tout en gardant la même sensibilité à 90,9 % permettant de classer ainsi correctement 47/48 patients.

En revanche si l'on veut augmenter la sensibilité à 100%, il faudrait un seuil de positivité à 0,018. La spécificité serait abaissée à 75,7%.

Avec un seuil à 0,018, un frottis sanguin aurait été fait pour 20/48 patients, soit 41,6%. Parmi ces patients, seulement 11 sont des patients LMMC (55%).

### 3/ Cytométrie en flux

L'analyse phénotypique des monocytes permet de différencier 3 sous-populations (MO1, MO2 et MO3).

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous [Tableau 13]:

	Groupe LMMC (n=11)		Groupe réactionnel (n=37)		p-value
	Médiane	[25 <sup>ème</sup> ; 75 <sup>ème</sup> percentile]	Médiane	[25 <sup>ème</sup> ; 75 <sup>ème</sup> percentile]	
MO1 (%)	84,1	[79,9 ; 97,3]	75,4	[69,1 ; 82,6]	0,003
MO2 (%)	12,5	[2,1 ; 16,7]	14,8	[9,4 ; 22,4]	0,0714
MO3 (%)	0,4	[0,4 ; 1,3]	6,7	[3,4 ; 11,1]	< 0,0001

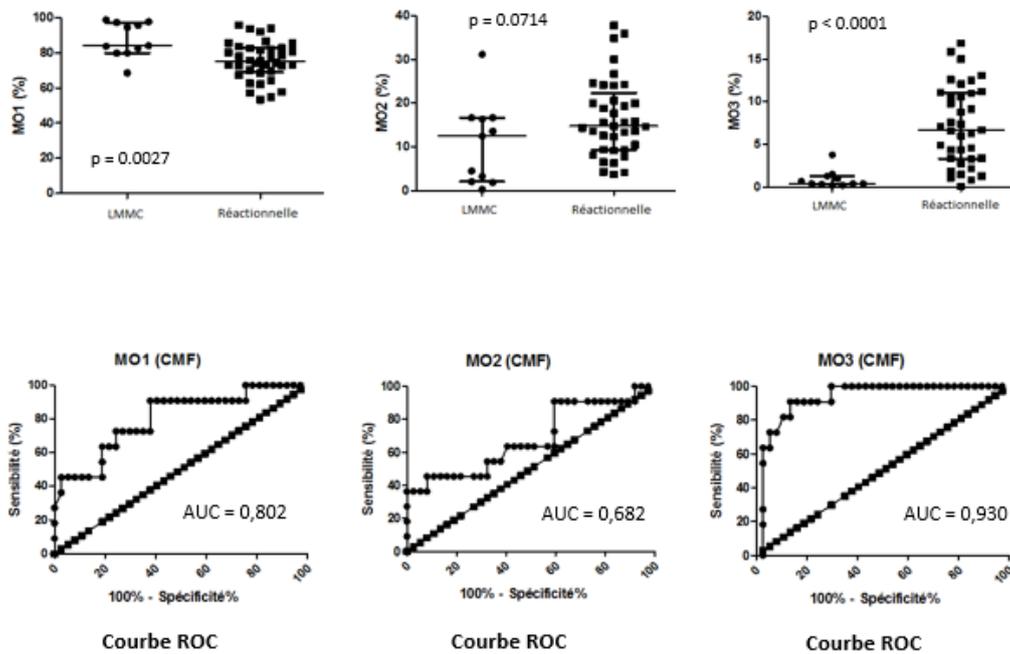
**TABLEAU 12 :** Résultats des médianes des 3 populations monocytaires MO1, MO2 et MO3 au sein des 2 groupes de la cohorte d'étude

- La population MO1 (CD14+/CD16-) est significativement plus élevée dans la population LMMC comparée à la population réactionnelle. A noter cependant que le pourcentage médian de MO1 dans le groupe des LMMC (84,1%) est moins élevé que le pourcentage obtenu par *Selimoglu-Buet D et al.*

- On ne note pas de différence significative entre les 2 groupes concernant les MO2 (CD14+/CD16+)

- Le pourcentage de MO3 (CD14dim/CD16+) est significativement plus élevé chez les patients réactionnels comparés aux patients LMMC. Comme observé sur la figure 29, le

pourcentage de MO3 est très faible dans le groupe des LMMC (0,4 [0,4 ; 1,3]) alors qu'il est très hétérogène dans le groupe des patients réactionnels (6,7 [3,4 ; 11,1]).



**FIGURE 27** : Analyse des résultats de la cytométrie en flux dans les deux populations

En terme de performances analytiques :

Au seuil décisionnel de 94% de MO1 (issu de la littérature) appliqué à notre cohorte, on observe que :

- 42/48 patients ont un pourcentage de MO1 inférieur à 94% (25 hommes et 17 femmes)
- 6/48 patients ont un pourcentage de MO1 supérieur à 94% (6 hommes).

Parmi les 42 patients ayant un pourcentage inférieur à 94%, 36 sont classés dans le groupe des patients réactionnels et 6 dans le groupe des patients LMMC. La détection des monocytes de type MO1 par CMF a donc une VPN de 85,7%.

Parmi les 6 patients ayant un pourcentage de MO1 supérieur à 94%, 5 sont classés dans le groupe des patients LMMC et un seul dans le groupe des patients réactionnels. La VPP est donc de 83,3%.

Parmi les 11 patients LMMC, le test est positif pour 5 patients, ce qui donne une sensibilité de 45,5%.

Parmi les 37 patients réactionnels, le test est négatif pour 36 patients, ce qui donne une spécificité de 97,3% [Tableau 14].

Au final, ce paramètre a permis une bonne orientation diagnostique pour 41/48 patients, soit dans 85,4% des cas.

	MO1		Total
	≥ 94 %	< 94 %	
LMMC (+)	5	6	11
LMMC (-)	1	36	37
Total	6	42	48

**TABLEAU 13:** Performances analytiques de la cytométrie en flux avec le pourcentage de MO1

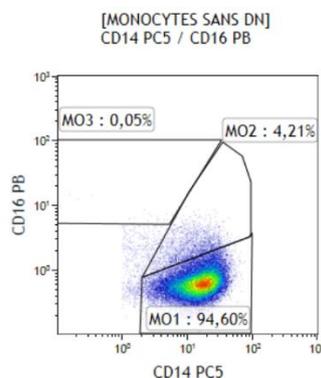
Analyse des faux positifs et faux négatifs avec le seuil de la littérature :

- Cas faux négatifs : 6 patients faux négatifs dont la moyenne du pourcentage de MO1 (78,8%) est très éloignée de la valeur attendue pour ce type de patients (≥ 94%). Les résultats de CMF pour ces patients sont répertoriés dans le tableau 15 ci-dessous :

		MO1 (%)	MO2 (%)	MO3 (%)
Patient 1	LMMC-0 (connue)	84,1	13,6	0,7
Patient 2	LMMC-0 (diagnostic)	68,6	31,2	0,2
Patient 3	LMMC-0 (diagnostic)	82,6	16,7	0,35
Patient 4	LMMC-0 (diagnostic)	79,9	16,7	1,5
Patient 5	LMMC (connue hors APHM)	79,9	16,4	3,8
Patient 6	LMMC-0 (diagnostic)	83,8	12,5	1,3

**TABLEAU 14 :** Résultats de la cytométrie en flux chez les patients faux négatifs en MO1

- Cas faux positifs : Le patient faussement positif a un taux de MO1 limite de 94,6% [Figure 28]. Il s'agit d'un patient de 24 ans drépanocytaire homozygote et splénectomisé.



**FIGURE 28 :** Graphe de cytométrie en flux chez un patient faux positif en MO1

Ainsi au seuil de 94%, la population MO1 présente une bonne spécificité mais un défaut majeur de sensibilité.

De manière intéressante, les AUC obtenues par l'analyse des courbes ROC montrent une meilleure performance de MO3 comparé à MO1 ( $AUC_{MO3}=0,930$  contre  $AUC_{MO1}=0,802$ ). Ainsi, au seuil de 4%, on obtient une parfaite spécificité en faveur d'une monocytose réactionnelle. Le pourcentage de MO3 pourrait donc être également intéressant en complément du pourcentage de MO1 dans le diagnostic différentiel de la LMMC.

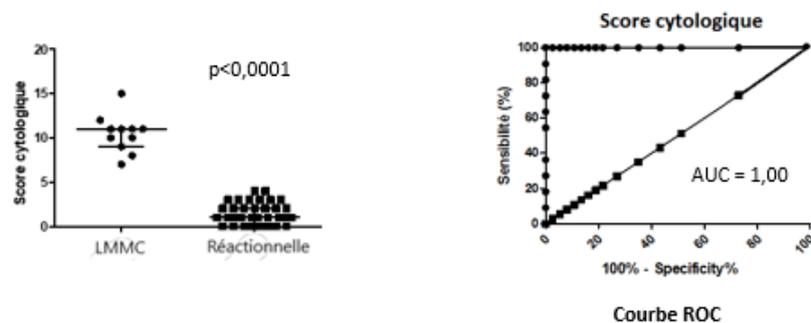
#### 4/ Cytologie

Plusieurs items cytologiques sont analysés et renseignés pour chaque patient. Afin d'améliorer la reproductibilité, une grille détaillée de lecture a été établie au préalable (Cf Tableau 6 Partie III-3/b).

#### Performances analytiques du C-score :

Le C-score est très significativement supérieur pour les patients LMMC comparé aux patients réactionnels : 11 [9 ; 11] vs 1 [0 ; 2],  $p<0,0001$ .

Comme le montre la courbe de ROC, à partir de notre cohorte, l'AUC est de 1,00 et un seuil à 7 permet d'obtenir une sensibilité et une spécificité de 100%, ainsi qu'une VPP et VPN de 100% [Figure 27].



**FIGURE 29 :** Analyse des performances du C-score

Ainsi, un score cytotogique supérieur ou égal à 7 serait en faveur d'une LMMC.

Parmi les items montrant le plus d'impact dans la positivité du C-score, on trouve l'aspect des monocytes, les PNN dégranulés et les PNN avec troubles de condensation de la chromatine. Ce score permet de classer parfaitement tous les patients de la cohorte [Tableau 12].

	Cytologie		Total
	Monocytose réactionnelle	LMMC	
LMMC (+)	0	11	11
LMMC (-)	37	0	37
Total	37	11	48

**TABLEAU 15** : Performances analytiques de la cytologie au microscope optique

La cytologie sur frottis sanguin est la méthode la plus ancienne pour orienter le clinicien vers le diagnostic d'une LMMC. Ce résultat montre donc l'importance de la lecture microscopique pour le diagnostic différentiel de la LMMC.

## 5/ Synthèse des résultats

Les résultats des performances analytiques des 3 outils de diagnostic différentiel de la LMMC sont résumés dans le tableau 16 ci-dessous :

		Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Monoscore		0,16	90,9	91,9
		0,292	90,9	100
		0,018	100	75,7
C-score		7	100	100
Cytométrie en flux	MO1	94%	45,5	97,3
	MO3	4%	100	70,3

**TABLEAU 16** : Synthèse des résultats de performances analytiques des 3 outils étudiés pour le diagnostic différentiel de la LMMC.

Au vu de ces résultats, la cytologie sur frottis sanguin reste le meilleur outil pour établir le diagnostic de la LMMC. La cytométrie en flux, avec le pourcentage de MO1, serait le moins bon outil de diagnostic en raison de sa faible sensibilité. Le monoscore se placerait entre les deux avec sa bonne sensibilité et spécificité. La place potentielle de chacun de ces outils dans la démarche diagnostique de la LMMC est discutée dans la dernière partie de ce travail.

## **PARTIE VI : Discussion**

Les résultats de notre étude ont montré que la cytologie sur frottis sanguin restait le meilleur outil dans le diagnostic différentiel de la LMMC. La mise en place dans cette étude d'un score cytologique (C-score) a permis de faciliter l'orientation diagnostique et donc d'obtenir une fiabilité de 100%. L'analyse des populations monocytaires par cytométrie en flux est présentée comme étant innovante et performante dans la littérature(48). Or dans notre étude il s'agit de l'outil diagnostique le moins performant en raison de sa faible sensibilité. Le monoscore ou score « mono-dysplasie » qui a été décrit récemment comme un outil innovant de screening(47), montre de bonnes performances analytiques dans notre étude, lui ouvrant des perspectives d'utilisation intéressantes dans la pratique quotidienne.

### **1/ Monoscore**

#### **a) Avantages**

Le monoscore est un paramètre obtenu en première intention lors de l'analyse d'un échantillon sanguin par l'automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex®. Il s'agit d'un calcul mathématique élaboré à partir de paramètres rendus par défaut par l'automate (taux de monocytes en valeur absolue, ratio Ne/Mo, Ne-WX) en présence d'une monocytose  $\geq 1$  G/L. L'obtention de ce monoscore ne nécessite pas de temps supplémentaire par rapport au rendu d'une simple NFS et ne consomme pas plus de réactifs. Il s'agit d'un outil d'expertise analytique dont les performances obtenues en terme de sensibilité et de spécificité sont satisfaisantes au regard de la littérature(47). Les résultats de notre étude confirment les bonnes performances de cet outil. En effet, il a permis chez 44/48 patients, soit dans 91,7% des cas, de contribuer à une bonne optimisation de la gestion des monocytoses dans la pratique quotidienne.

Par rapport aux critères de définition de la LMMC(6), un frottis sanguin devrait être étalé pour tous les patients inclus dans notre cohorte.

En 2014, le GFHC publie des recommandations où il préconise un frottis sanguin pour toute monocytose supérieure à 1,5 G/L(46).

D'après les résultats de notre étude, 21/48 patients avaient une monocytose  $\geq 1,5$  G/L, soit 43,8% des patients dont seulement 10 sont des patients LMMC (47,6%). On remarque qu'un patient LMMC n'aurait probablement pas été diagnostiqué en raison d'une monocytose inférieure à 1,5 G/L.

Concernant l'impact du monoscore par rapport au taux de revue de lame, dans notre travail, seulement 13/48 patients ont un monoscore positif, soit 27,1% de la cohorte. Ainsi, l'utilisation du monoscore permettrait de diminuer de 72,9 % le nombre de frottis par rapport aux recommandations OMS.

De plus, si on se réfère aux recommandations du GFHC, sur les 21 patients avec monocytose  $\geq 1,5$  G/L de notre cohorte, 11 patients ont un monoscore positif et 10 ont un monoscore négatif, ce qui générerait une réduction de 47,6% du nombre de frottis sanguin.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par l'équipe de *Schillinger F et al.*, parmi 90 monocytoses réactionnelles supérieures à 1,5 G/L, seulement 14 avaient un score « mono-dysplasie » positif. Dans leur cas, 84% des frottis peuvent être évités(47).

Cet outil a donc des avantages considérables en raison de son rendement. En effet il ne coûte rien et engendre un bénéfice dans la structure d'un laboratoire. La diminution du nombre de frottis sanguins peut avoir plusieurs conséquences :

- Diminution de l'utilisation de matériel et de réactifs : économie sur le stock de lames en verre et sur la consommation de colorant May-Grünwald Giemsa (MGG)
- Diminution du temps technicien : celui-ci peut être amené à réaliser le frottis sanguin et à le colorer manuellement notamment dans les structures où il n'y a pas d'étaleur colorateur automatisé ou en cas de panne du colorateur automatique
- Diminution du temps biologiste : celui-ci est amené à lire beaucoup moins de frottis sanguins au microscope optique
- Optimisation du temps biologiste et de son efficacité : en raison de la diminution du nombre de frottis sanguin, seuls les frottis nécessaires seront à lire au microscope optique. Le biologiste aura donc plus de temps pour lire ces frottis sanguins et pourra être plus efficace pour faire le diagnostic différentiel d'une LMMC.

Il aura plus de temps pour mieux analyser l'ensemble des données biologiques et/ou cliniques d'un patient difficile.

- Gain de temps pour une toute autre activité du laboratoire : le gain de temps technicien et de temps biologiste peut leur permettre d'effectuer d'autres missions dans la structure du laboratoire (mise au point de nouvelles techniques analytiques, participation à l'accréditation d'une analyse, mise en place de nouvelles procédures qualité, amélioration du système informatique, améliorer les relations avec le service clinique,...)

#### b) Inconvénients

Malgré de bonnes performances analytiques dans le diagnostic différentiel de la LMMC, il existe des patients faux positifs et faux négatifs en monoscore.

Un seul patient faux négatif pour lequel le taux de monocytes est bas, impactant directement la valeur du monoscore. Ce patient est connu pour une LMMC depuis avril 2014. Il est greffé rénal et traité par corticothérapie. Une étude récente montre que la prise de médicaments immunosuppresseurs peut diminuer le taux de monocytes et inhiber partiellement leurs voies d'activation après une transplantation rénale(51). Ainsi ce contexte clinique et thérapeutique peut être à l'origine de cette diminution du taux de monocytes et de la non positivité du monoscore. Finalement, chez ce patient malgré la négativité du monoscore, un frottis sanguin a été réalisé suite au déclenchement de l'alarme « Blast/Abnormal lymph ». Ceci a permis une analyse cytologique de ce frottis malgré l'absence d'un monoscore positif.

Dans notre travail, 3 patients faussement positifs en monoscore ont été retrouvés, il s'agit de patients sous chimiothérapie ou encore sous facteur de croissance.

En effet, les chimiothérapies entraînent souvent un effet toxique sur les éléments cellulaires notamment en provoquant en plus d'une diminution du nombre de PNN des troubles qualitatifs ce qui par conséquence pourra impacter le monoscore avec une diminution du ratio Ne/Mo et une augmentation de la valeur Ne-WX. Quand un patient est sous facteurs de croissance, les automates peuvent avoir du mal à bien cerner la population granuleuse ce qui pourra engendrer un monoscore faussement positif, qui sera alors corrigé après modification de la répartition des éléments de la formule leucocytaire après lecture microscopique.

Ainsi, d'après les résultats de notre étude, il semblerait que le monoscore puisse être mis en échec devant des patients sous corticothérapie au long court, sous chimiothérapie ou encore sous facteur de croissance. Ceci est en adéquation avec la littérature car des cas de faux positifs en monoscore ont été retrouvés chez des patients en sepsis sévères, ou encore atteints de tous types de leucémies ou de lymphomes(47). Dans ces situations, le biologiste doit s'interroger sur la véracité du monoscore quand il analysera le frottis sanguin. Les informations cliniques et thérapeutiques sont toujours très importantes dans l'interprétation des résultats et un partenariat clinicien-biologiste doit s'instaurer dans les cas complexes.

### c) Optimisation du monoscore

Les résultats de notre étude montrent que le monoscore est perfectible et peut être optimisé. Une équipe française a également étudié le monoscore de l'automate XN-10 Sysmex® lors d'un travail de thèse(52). Le seuil de positivité utilisé dans ce travail était de 0,07. Les performances montraient une excellente sensibilité ( $Se = 100\%$ ) mais une moins bonne spécificité ( $Sp = 21\%$ ). Ils ont donc cherché à optimiser le seuil décisionnel et ont montré que pour un monoscore supérieur à 0,410, la sensibilité est de 100% et la spécificité de 78,3%(52).

Dans notre cohorte, nous avons également cherché à modifier le seuil décisionnel.

Un seuil à 0,292 permettrait d'augmenter la spécificité du monoscore à 100 % tout en gardant la même sensibilité à 90,9 %. Cette proposition est à pondérer car il s'agit d'une cohorte avec de petits effectifs. Il faudrait augmenter le nombre de patient afin de proposer un nouveau seuil robuste. Cette augmentation du seuil peut être intéressante si l'on veut un outil très spécifique. Or ce score a été conçu pour diminuer le nombre de frottis sanguins en cas de monocytose et d'augmenter la pertinence de la lecture au microscope(47). Ainsi un test très spécifique engendre un risque de valider une formule sanguine présentant une monocytose en faveur d'une LMMC sans alarme automate et donc sans réalisation d'un frottis sanguin.

Il serait donc plus judicieux d'avoir un outil très sensible, quitte à avoir encore quelques frottis sanguins avec une cytologie en faveur d'une monocytose réactionnelle. En effet cet outil serait amené à être utilisé comme un outil de dépistage en raison d'un rendu de résultat immédiat lors de la NFS. Un test de dépistage utilisé en routine doit être le plus sensible

possible. L'augmentation de la spécificité se fait grâce à d'autres tests ou d'autres techniques venant après le test de dépistage.

Nos résultats montrent qu'un seuil à 0,018 permettrait d'augmenter la sensibilité du monoscore à 100%, tout en gardant une bonne spécificité de 75,7%. Cependant, dans le travail de thèse cité ci-dessus, la spécificité est très inférieure à celle de notre étude avec un seuil pourtant plus élevé (seuil à 0,07). Ainsi nos résultats sont à pondérer en raison du faible effectif de notre cohorte.

Une autre façon d'améliorer le monoscore serait de modifier sa formule mathématique.

En effet, nos résultats ont permis de vérifier que les 3 paramètres déjà présents dans la formule du monoscore sont bien pertinents. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de *Schillinger F et al.*(47). Mais selon les résultats de notre travail, d'autres paramètres de l'hémogramme montrent des résultats intéressants pouvant être exploités dans le diagnostic différentiel de la LMMC :

- Le taux de monocytes en pourcentage (AUC = 0,951)
- Le taux de plaquettes (AUC = 0,899)
- L'alarme « Blast/Abnormal lymph » (AUC = 0,833)

Le monoscore, tel qu'il est défini actuellement, ne permet pas de s'affranchir de la cytologie et reste un outil complémentaire à l'analyse cytologique. L'expertise du biologiste reste toujours indispensable pour le diagnostic différentiel de la LMMC.

## 2/ Cytométrie en flux

### a) Résultats obtenus vs résultats attendus

Notre étude s'est référée à ce qui a été réalisé par l'équipe française de *Selimoglu-Buet D et al.* rapporté dans une publication de juin 2015(48).

Nous avons suivi le même protocole, avec un système de fenêtrage et un mode opératoire similaire. Nous avons également utilisé un automate similaire, à savoir un cytomètre Navios®

de la société Beckman Coulter®. Les anticorps fluorescents utilisés sont les mêmes (mêmes isotypes et mêmes clones). Seule la nature du fluorochrome couplé à certains anticorps varie. Notre étude montre des résultats différents surtout en terme de sensibilité avec seulement 45,5% par rapport à 91,7% publiée dans la cohorte de validation tout en ayant une spécificité comparable pour la population MO1 au seuil de 94%.

Dans leur étude, ils précisent que les patients LMMC ne sont pas traités par chimiothérapie. Or, dans notre cohorte de patients LMMC, 2 patients sont traités par Vidaza et 1 patient par corticoïdes. Cependant l'impact du traitement peut être exclu par le fait que ces 3 patients présentent une population MO1 supérieure à 94%.

Une thèse d'exercice soutenue en mars 2017 a pour sujet la place de l'étude des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux dans le diagnostic de la LMMC(53). La cohorte d'étude était composée d'un groupe de 13 patients LMMC, un groupe de 50 patients réactionnels et un groupe de 20 patients douteux. Les résultats obtenus sont également très différents de la publication initiale. En effet la sensibilité est de 54% et la spécificité de 74% pour la population de MO1 au seuil de 94%. Ces résultats se rapprochent plus de ceux retrouvés dans notre étude.

Le protocole est en tout point identique à celui de notre étude (manipulations, fenêtrage, anticorps, fournisseur d'automate).

#### b) Mise en défaut de la technique

Nos résultats ont mis en évidence un seul patient faussement positif ( $MO1 \geq 94\%$ ). Il s'agit d'un patient de 24 ans drépanocytaire homozygote et splénectomisé. On note sur sa formule sanguine en plus d'une monocytose à 1,95 G/L, une lymphocytose à 4,23 G/L, une hyperéosinophilie à 1,15 G/L et une basocytose à 0,25 G/L.

Chez les patients splénectomisés, on retrouve généralement une hyperleucocytose chronique avec une monocytose importante et une lymphocytose(54). Une étude récente a montré que la splénectomie était associée notamment à une distribution altérée des macrophages de l'artère coronaire. Ces résultats suggèrent que la rate peut moduler le recrutement des macrophages(55).

Ce patient est le seul de notre cohorte à être splénectomisé. Notre hypothèse pour expliquer l'augmentation de monocytes classiques dans le sang du patient repose sur l'absence de rate qui serait un probable régulateur de la population leucocytaire. Aucune étude dans la

littérature n'a été faite à ce jour concernant les sous-populations monocytaires chez les patients splénectomisés.

On note que le monoscore s'avère négatif à 0,120 pour ce patient. De plus il s'agit d'un patient jeune chez qui l'on ne suspecte pas une LMMC en première intention.

Lors d'une étude menée sur la cytométrie en flux chez les patients LMMC dans le cadre d'une thèse d'exercice, il a été montré que la corticothérapie au long court pouvait augmenter le pourcentage de MO1 et diminuer les pourcentages de MO2 et MO3 chez certains patients(52). La prise de corticoïdes doit donc être signalée par le clinicien lorsqu'une analyse par cytométrie en flux est envisagée. Ils préconisent de rendre un résultat sous réserve chez les patients positifs en cytométrie en flux et traités par corticothérapie.

Nos résultats ont mis en évidence 6 patients faussement négatifs ( $MO1 < 94\%$ ). Aucun de ces patients n'est traité par agent cytoréducteur ou hypométhylant. On observe chez 4 de ces patients un tableau clinico-biologique inflammatoire. Ils ont une CRP élevée, certains ont une infection bactérienne, un patient a une maladie de Horton, un autre a un prurit sévère chronique. L'inflammation et le contexte réactionnel associé peuvent expliquer l'augmentation des monocytes MO2 et/ou MO3. Ceci aurait pour conséquence une diminution relative du pourcentage de MO1 et donc ne permettrait pas d'établir le diagnostic de LMMC. En effet, il a déjà été montré dans la littérature que les monocytes exprimant le CD16 augmentaient dans ce type de contexte(56). De plus, devant la forte prévalence de pathologies inflammatoires et auto-immunes dans la LMMC qui selon une étude récente serait d'environ 30%(57), un nombre non négligeable de patients faux négatifs en cytométrie en flux est possible. Ces patients avec une inflammation chronique ont été diagnostiqués grâce à la persistance de la monocytose et l'aspect de la moelle osseuse avec des signes de dysmégacaryopoïèse et dysgranulopoïèse.

Les 2 autres patients ont une CRP négative.

On observe une augmentation polyclonale des immunoglobulines pour un des deux patients laissant supposer une infection sous-jacente pouvant expliquer l'augmentation de monocytes réactionnels MO2 à 12,5%.

Concernant le deuxième patient, récemment diagnostiqué, aucune explication n'a été trouvée pour expliquer l'augmentation du pourcentage de MO2 à 16,7%.

Au final, la cytométrie en flux peut être mise en défaut dans certaines situations. D'après nos résultats et la littérature, l'inflammation et le contexte réactionnel associé peuvent masquer un

diagnostic de LMMC. Dans ces cas-là, la cytométrie en flux n'est pas capable de faire le diagnostic différentiel de la LMMC. Il est donc préférable de faire cette analyse en dehors de tout épisode aigu. Un résultat peut également être erroné en cas de splénectomie ou en cas de traitement par corticoïdes au long court. On note donc l'importance des renseignements cliniques pour la bonne interprétation des résultats de cytométrie en flux.

### c) Difficultés techniques

Plusieurs difficultés sont présentes au niveau pré-analytique. Selon les recommandations de la publication de *Selimoglu-Buet D et al.*, il est nécessaire d'acquérir un nombre suffisant d'évènements (50000 MO1 au minimum). En cas d'hyperleucocytose avec de la myélémie, une dilution s'impose afin d'obtenir un taux de 10 G/L environ de leucocytes. Le panel d'anticorps fluorescents nécessaire pour exclure les différentes populations est très coûteux. L'exclusion des NK et de la myélémie est très importante car ces cellules ont le CD16 à leur surface, tout comme les monocytes intermédiaires et non classiques.

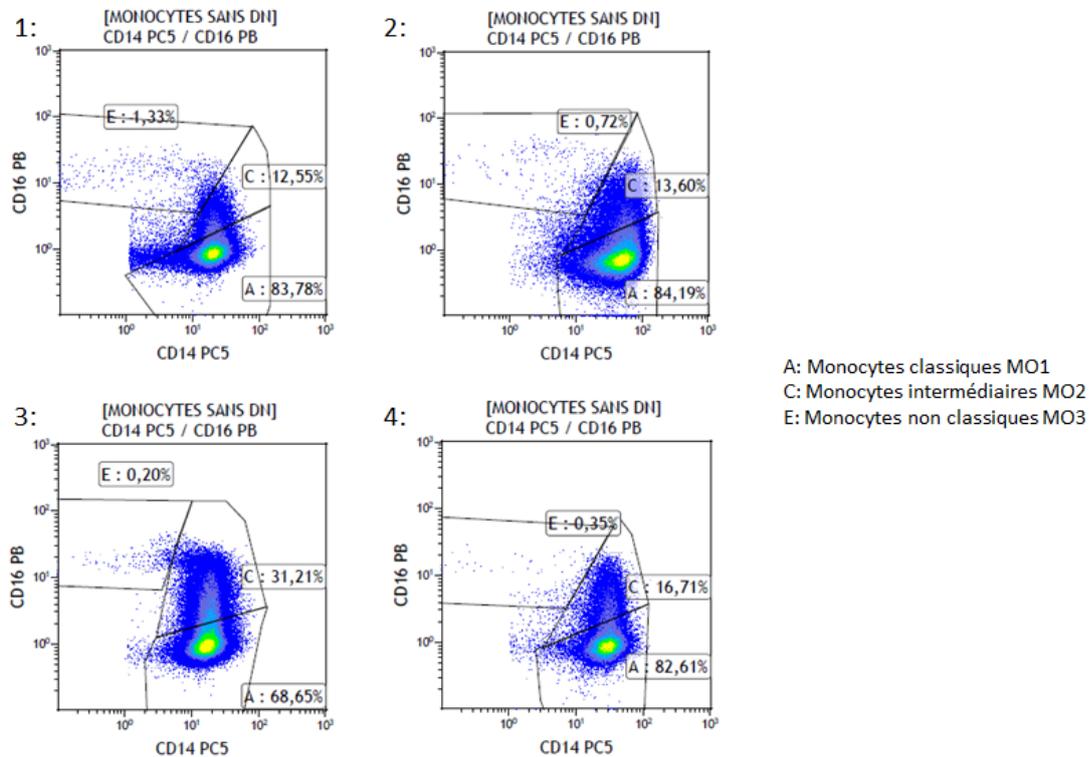
Cette technique demande un temps technicien très conséquent. En effet, l'analyse d'un échantillon peut durer 1h à 1h30 entre la prise en charge de l'échantillon par le laboratoire et le rendu de résultat par l'automate. Le monoscore en comparaison est obtenu immédiatement, au moment du résultat de l'hémogramme.

Au niveau post-analytique, le fenêtrage sur le logiciel Kaluza® peut entraîner chez certains patients quelques difficultés.

La publication nous recommande de travailler en « density plot » afin de faciliter la distinction des 3 populations(48). Or chez certains patients, la distinction MO1/MO2 était difficile de par la présence d'un continuum d'évènement sur l'axe CD16. Cela peut engendrer une différence significative des pourcentages des 3 populations monocytaires et donc par conséquent une erreur d'interprétation de résultat.

Un travail de thèse a été fait sur la méthode fenêtrage concernant les MO1, MO2 et MO3(52). Ils en ont conclu que la meilleure méthode était celle utilisée dans la publication de *Selimoglu-Buet D et al.*, en « density plot ». Cependant, bien que cette méthode semble donner de meilleurs résultats, il reste des situations où la distinction des 3 populations est incertaine entraînant un manque de reproductibilité(52).

On peut voir dans la figure 30 ci-dessous les difficultés rencontrés dans la distinction des populations MO1, MO2 et MO3 chez certains patients de notre étude atteint de LMMC.



**FIGURE 30** : Exemple de résultats faussement négatifs en cytométrie en flux chez des patients atteints de LMMC

#### d) Optimisation de l'utilisation de l'immunophénotypage monocyttaire

Nous avons vu dans nos résultats que les pourcentages de MO1 et de MO3 pouvaient être intéressants à utiliser dans le diagnostic différentiel de la LMMC. La population MO3 n'a pas été utilisée dans la littérature pour émettre des conclusions dans le diagnostic différentiel de la LMMC. En effet les résultats rapportés des pourcentages de MO1 semblaient plus intéressants à étudier et à discuter dans les études que les pourcentages de MO3(48,53). Dans notre cohorte, nous avons observé une sensibilité de 100% pour un seuil de 4%. Ce paramètre peut donc avoir un intérêt lorsqu'il est positif ( $\geq 4\%$ ), car il permettrait d'orienter le clinicien vers une monocytose réactionnelle.

Ainsi en combinant les paramètres MO1 et MO3, 3 profils différents de patients peut être définis :

- Profil 1 : Si  $MO1 \geq 94\%$  → En faveur d'une LMMC (spécificité = 97,4%)
- Profil 2 : Si  $MO3 \geq 4\%$  → En faveur d'une monocytose réactionnelle (spécificité = 100%)
- Profil 3 : Si  $MO1 < 94\%$  et  $MO3 < 4\%$  → Douteux

Appliquée à notre cohorte, cette stratégie permettrait d'apporter une réponse diagnostique pour 32/48 patients, soit 67 %.

Au vu des résultats obtenus et des difficultés techniques constatées, la question de l'intérêt de la cytométrie en flux dans le diagnostic différentiel de la LMMC peut être discutée. La détection des sous populations monocytaires par cytométrie en flux est une technique coûteuse et qui demande de l'expertise technique. Elle a une bonne spécificité mais une mauvaise sensibilité. Elle pourrait donc être utilisée en troisième intention en cas de résultats discordants entre le monoscore et l'analyse cytologique. Elle ne pourra pas toujours être discriminante mais elle sera intéressante à tester notamment dans le suivi des patients de LMMC. En effet, ce test est indépendant du taux de monocytes et pourrait permettre dans certains cas de caractériser la population monocytaire persistante en post traitement.

### 3/ Cytologie

Dans notre étude, la cytologie a permis de donner une bonne orientation diagnostique pour les 48 patients de la cohorte, que ce soit vers une monocytose réactionnelle ou pathologique. Il s'agit d'un résultat intéressant pour une technique qui est souvent considérée comme archaïque.

#### a) Difficultés de la cytologie

La LMMC est une pathologie rare qui touche principalement le sujet âgé dont les comorbidités sont parfois nombreuses. Il est donc parfois difficile de faire le diagnostic différentiel avec d'autres causes de monocytoses plus fréquentes.

Les résultats obtenus dans notre étude sont très performants, mais en réalité, l'interprétation d'un frottis sanguin peut être très difficile.

Tout d'abord, la cytologie est très dépendante de la qualité du frottis sanguin, de la qualité de la coloration au MGG et de la qualité du microscope optique. La qualité d'un frottis sanguin est également très dépendante de la personne qui le prépare, d'où l'intérêt d'avoir un étaleur-colorateur automatisé lorsque les moyens du laboratoire le permettent. Le protocole de coloration au MGG peut légèrement varier d'un laboratoire à un autre, rendant parfois la lecture cytologique difficile, notamment au niveau de la condensation de la chromatine et de la granularité des cellules. On rappelle que ces paramètres cytologiques sont très importants dans l'orientation vers un diagnostic de LMMC. La qualité du microscope optique varie également d'un laboratoire à un autre. Il doit être suffisamment puissant et suffisamment net afin de pouvoir apprécier les détails de la chromatine des cellules et leur granularité.

Au final, ces difficultés d'ordres techniques sont d'une importance capitale pour analyser un frottis sanguin dans de bonnes conditions et ainsi aider le biologiste à être plus performant dans le diagnostic différentiel de LMMC, et pour toute autre pathologie sanguine.

La cytologie est une discipline qui demande de l'expérience afin d'avoir un œil averti, ce qui rend cet examen opérateur dépendant. En effet un biologiste expert en cytologie sanguine et en lecture de myélogramme sera plus à même de faire un diagnostic différentiel de LMMC qu'un biologiste non spécialisé en hématologie par exemple. D'autant plus qu'il s'agit d'une pathologie maligne dont l'analyse qualitative est prépondérante et où le contexte clinique est important. En effet les monocytoses les plus fréquentes sont causées par un syndrome inflammatoire et/ou infectieux. Ces états peuvent parfois mimer des images de dysplasie pouvant faire douter de l'orientation diagnostique de cette monocytose.

Ainsi, la capacité d'un biologiste, expert ou non en cytologie, à pouvoir orienter un clinicien vers un diagnostic de LMMC peut être hétérogène.

#### b) C-score

Au vu des difficultés rencontrées lors de la lecture de frottis sanguin au microscope optique, une grille a été établie avec une évaluation quantitative des différentes anomalies cytologiques des lignées granuleuse, mégacaryocytaire et monocytaire permettant d'établir un score : le C-score (Cf Partie III 3/b).

Ce score a l'avantage d'associer à chaque signe cytologique une notion quantitative. Par conséquent l'analyse qui est initialement qualitative se simplifie car il suffit de compter la proportion de l'anomalie en question sur 100 cellules.

Les résultats de notre étude indiquent qu'un score cytologique supérieur ou égal à 7 orienterait la conclusion vers une cytologie en faveur d'une LMMC si on appliquait cette grille aux patients tout-venant de l'hôpital. Ainsi ce score cytologique établi dans ce travail est fiable à 100%.

Ce score permettrait de formaliser la lecture au microscope et d'être plus objectif dans l'analyse cytologique. Ces résultats encouragent à valider au sein d'une plus grande cohorte les performances de ce C-score.

#### 4/ Place des 3 outils dans la pratique quotidienne

Le monoscore est un paramètre de première intention calculé instantanément par l'automate d'hématologie cellulaire XN-10 Sysmex® lors d'une NFS. Il s'agit d'un outil d'expertise analytique dont les performances obtenues en terme de sensibilité et de spécificité sont satisfaisantes au regard des études déjà publiées et de notre travail. Il a donc toute sa place dans une utilisation en routine dans un laboratoire de biologie médicale pour optimiser le nombre de frottis sanguin à réaliser en présence d'une monocytose. Dans tous les cas, l'utilisation de ce monoscore ne permet pas de s'affranchir d'une analyse cytologique pour orienter vers une monocytose réactionnelle ou pathologique. L'établissement d'une grille avec une évaluation quantitative des différentes anomalies cytologiques des lignées granuleuse, mégacaryocytaire et monocytaire a permis d'être reproductible et de s'interroger sur chaque item de manière isolée. Ainsi ce score cytologique (C-score) établi dans ce travail est fiable à 100%.

Ce résultat est pondéré par l'effectif réduit de patients LMMC dans notre cohorte. A cela s'ajoute, la difficulté d'être reproductible lors de la lecture au microscope. En effet, nous savons que l'expertise cytologique de l'opérateur est importante dans ce domaine.

On peut proposer plusieurs conduites à tenir en présence d'une monocytose  $\geq 1$  G/L :

- **Si monoscore < 0,160** : pas de frottis sanguin (en faveur d'une monocytose réactionnelle). On rappelle que ce seuil serait à améliorer par une étude plus importante afin d'obtenir une sensibilité de 100%.

- **Si monoscore  $\geq$  0,160 ET C-score  $\geq$  7** : Une conclusion cytologique orientant le clinicien vers une monocytose pathologique avec suspicion de LMMC.

La cytométrie en flux ne semble pas avoir d'intérêt dans ce cas-là, en fonction des résultats de notre étude. Le clinicien sera alors en mesure de décider de la poursuite des investigations complémentaires (myélogramme, caryotype, biologie moléculaire) en fonction de l'âge, du contexte clinique du patient.

- **Si monoscore  $\geq$  0,160 ET C-score < 7** : situations de discordance

La cytométrie en flux peut avoir un intérêt, surtout en cas de forte suspicion clinique de LMMC, ou encore en cas de monocytose persistante non expliquée par exemple.

- Si la cytométrie en flux montre un profil 1 ou un profil 2, on peut proposer une réponse au clinicien : monocytose pathologique de type LMMC ou monocytose d'aspect réactionnel en fonction du profil obtenu
- Si la cytométrie en flux montre un profil 3 (douteux), on ne peut pas proposer de réponse pertinente au clinicien. On encourage donc à reconstrôler la monocytose à 3 mois.

Cette démarche pourrait permettre d'orienter le clinicien vers une monocytose réactionnelle ou pathologique dès la première NFS. Dans les cas de discordance monoscore / cytologie associée à un profil 3 en cytométrie en flux, une analyse plus approfondie des données clinico-biologiques doit être faite. En effet cette démarche est indispensable pour comprendre la discordance des résultats des différents outils analytiques. Si aucune cause n'a été mise en évidence, la NFS et la cytologie seront à contrôler à distance, en dehors de tout épisode aigu. La persistance de la monocytose sera donc un argument important pour proposer au clinicien des explorations supplémentaires (myélogramme, biologie moléculaire, caryotype).

## **PARTIE VII : Conclusion**

La leucémie myéломonozytaire chronique (LMMC) est une pathologie maligne touchant le sujet âgé. Le critère principal périphérique est la monocytose persistante  $\geq 1$  G/L, avec un taux de monocytes représentant au moins 10 % des cellules de la formule leucocytaire (OMS 2016) associé à une exploration médullaire. Or il s'agit d'une population présentant souvent plusieurs comorbidités avec polymédication, notamment des syndromes inflammatoires fréquents ou au long court, des infections bactériennes à répétitions, etc. Tous ces contextes cliniques sont des causes possibles à la présence d'une monocytose sanguine, et même parfois à de la dégranulation des PNN pouvant mimer des signes de dysgranulopoïèse sur le frottis sanguin. Ainsi le diagnostic de LMMC n'est pas toujours évident à porter. Après avoir éliminé toutes les autres causes de monocytoses, c'est sur le caractère persistant de la monocytose à 3 mois que des explorations médullaires seront réalisées ou en cas de cytopénie profonde comme une thrombopénie. Par conséquent cela engendre :

- un retard de diagnostic augmentant le risque d'évolution de la pathologie en leucémie aigüe.
- un retard de prise en charge thérapeutique optimale du patient.

Ce constat a permis l'émergence de nouveaux travaux de recherche, et notamment dans le diagnostic de cette pathologie. Des études récentes ont montré l'intérêt de nouveaux outils diagnostiques pouvant entrer en jeu dès la première numération formule sanguine (NFS) : Le score « mono-dysplasie » ou monoscore proposé par Sysmex et la cytométrie en flux.

Ce travail a permis d'étudier les performances analytiques du monoscore dans une cohorte de patients du CHU Conception. Les performances retrouvées sont tout à fait satisfaisante en terme de sensibilité et de spécificité et correspondent bien aux données déjà publiées sur cet outil. Ce calcul intégré dans le rendu de la formule leucocytaire permet de tirer des avantages considérables dans le rendement d'un laboratoire d'analyse médicale en réduisant le taux de revue de frottis sanguin inutile. Il existe néanmoins des faux positifs et des faux négatifs. Ce qui ne permet pas de s'affranchir d'une lecture du frottis sanguin par un cytologiste expérimenté. L'analyse cytologique des différents éléments sanguins, des résultats de l'hémogramme et des données clinico-biologiques permettent de porter un regard critique sur le résultat de ce nouveau test. D'autant plus que cette étude nous a permis de mettre en place un score cytologique (C-score) permettant de formaliser la lecture au microscope et de

faciliter la prise de décision du biologiste quant à l'orientation diagnostique qu'il souhaite donner au clinicien.

La cytométrie en flux, technique innovante, ne semble pas intéressante pour une utilisation en routine en raison de ses performances insuffisantes en terme de sensibilité et des difficultés techniques et économiques constatées. Son intérêt réside dans le fait que la fraction  $MO1 \geq 94\%$  soit indépendante de la monocytose, ce qui n'est pas le cas pour le monoscore comme nous l'avons déjà vu. En revanche, une utilisation ciblée sur certains patients de manière ponctuelle est envisageable en raison d'une excellente spécificité.

C'est pourquoi nous proposons une utilisation de cette technique en cas de discordance entre le monoscore et le C-score. Si tel est le cas, afin de pouvoir interpréter les résultats de cytométrie en flux, il sera nécessaire de joindre à la demande d'analyse des renseignements cliniques, notamment la présence d'une pathologie inflammatoire pouvant influencer la répartition des monocytes.

Ainsi, grâce à ces nouveaux outils analytiques, le biologiste sera plus à même de donner une orientation diagnostique en faveur d'une LMMC ou non dès la première NFS. Le clinicien pourra donc assurer une meilleure prise en charge de son patient en élaborant une stratégie d'examens complémentaires spécialisés et une stratégie thérapeutique adéquate.

## Bibliographie

1. Netgen. Leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic et thérapeutique. Revue Médicale Suisse. 2013.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976 Aug;33(4):451–8.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1982 Jun;51(2):189–99.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H, et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. Br J Haematol. 1994 Aug;87(4):746–54.
5. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2292–302.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391–405.
7. Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. Haematologica. 2007 Jul;92(7):974–7.
8. Cervera N, Itzykson R, Coppin E, Prebet T, Murati A, Legall S, et al. Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. Am J Hematol. 2014 Jun;89(6):604–9.
9. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2010 Apr 15;16(8):2246–56.
10. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2016 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol. 2016 Jun;91(6):631–42.
11. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. J Clin Oncol. 2013 Jul 1;31(19):2428–36.
12. Patnaik MM, Wassie EA, Padron E, Onida F, Itzykson R, Lasho TL, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. Blood Cancer J. 2015 Jan 2;5:e270.

13. Subari S, Patnaik M, Alfakara D, Gangat N, Elliott M, Hogan W, et al. Patients With Therapy-Related CMML Have Shorter Median Overall Survival Than Those With De Novo CMML: Mayo Clinic Long-Term Follow-Up Experience. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Sep;15(9):546–9.
14. Padron E, Yoder S, Kunigal S, Mesa T, Teer JK, Al Ali N, et al. ETV6 and signaling gene mutations are associated with secondary transformation of myelodysplastic syndromes to chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jun 5;123(23):3675–7.
15. Fenaux P, Adès L, Dreyfus F. *Les syndromes myélodysplasiques*. John Libbey Eurotext. 2016.
16. Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, Smolewski P. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2010 Mar 1;46(4):800–10.
17. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2186–98.
18. Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2016 Jan 15;6:e385.
19. Mathew RA, Bennett JM, Liu JJ, Komrokji RS, Lancet JE, Naghashpour M, et al. Cutaneous manifestations in CMML: Indication of disease acceleration or transformation to AML and review of the literature. *Leuk Res*. 2012 Jan;36(1):72–80.
20. Wu H, Bian S, Chu J, Zhong X, Sun H, Zhang B, et al. Characteristics of the four subtypes of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Exp Ther Med*. 2013 May;5(5):1332–8.
21. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Vallespi T, Brunning R, Mufti GJ, et al. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*. 2009 Jul;94(7):994–7.
22. Fenaux P, Ades L, Fontenay M, Raynaud S. *Consensus Français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) et la leucémie myélomonocytaire chronique: diagnostic, classifications, traitement*. 2015.
23. Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, Czader M, Allen SL, An C, et al. Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Dec;19(12):1536–45.
24. Tang G, Fu B, Hu S, Lu X, Tang Z, Li S, et al. Prognostic impact of acquisition of cytogenetic abnormalities during the course of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2015 Oct;90(10):882–7.
25. Tang G, Zhang L, Fu B, Hu J, Lu X, Hu S, et al. Cytogenetic Risk Stratification of 417 Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia from a Single Institution. *Am J Hematol*. 2014 Aug;89(8):813–8.

26. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):3005–15.
27. Schuler E, Schroeder M, Neukirchen J, Strupp C, Xicoy B, Kündgen A, et al. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leuk Res*. 2014 Dec;38(12):1413–9.
28. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia*. 2013 Jul;27(7):1504–10.
29. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):840–9.
30. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia*. 2014 Nov;28(11):2206–12.
31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079–88.
32. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2454–65.
33. Elena C, Gallì A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2016 08;128(10):1408–17.
34. Onida F. Models of Prognostication in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017 Dec;12(6):513–21.
35. Onida F, Barosi G, Leone G, Malcovati L, Morra E, Santini V, et al. Management recommendations for chronic myelomonocytic leukemia: consensus statements from the SIE, SIES, GITMO groups. *Haematologica*. 2013 Sep;98(9):1344–52.
36. Wattel E, Guerçi A, Hecquet B, Economopoulos T, Copplesstone A, Mahé B, et al. A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Français des Myélodysplasies and European CMML Group. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2480–7.
37. Antonioli E, Guglielmelli P, Pieri L, Finazzi M, Rumi E, Martinelli V, et al. Hydroxyurea-related toxicity in 3,411 patients with Ph<sup>-</sup>-negative MPN. *Am J Hematol*. 2012 May;87(5):552–4.
38. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 May 15;20(10):2429–40.

39. Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1794–803.
40. Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3824–31.
41. Zang DY, Deeg HJ, Gooley T, Anderson JE, Anasetti C, Sanders J, et al. Treatment of chronic myelomonocytic leukaemia by allogeneic marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):217–22.
42. Krishnamurthy P, Lim ZY, Nagi W, Kenyon M, Mijovic A, Ireland R, et al. Allogeneic haematopoietic SCT for chronic myelomonocytic leukaemia: a single-centre experience. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct;45(10):1502–7.
43. Kröger N, Zabelina T, Guardiola P, Runde V, Sierra J, Van Biezen A, et al. Allogeneic stem cell transplantation of adult chronic myelomonocytic leukaemia. A report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*. 2002 Jul;118(1):67–73.
44. Park S, Labopin M, Yakoub-Agha I, Delaunay J, Dhedin N, Deconinck E, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Eur J Haematol*. 2013 May;90(5):355–64.
45. Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu RV, Mughal TI, Orazi A, et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood*. 2015 Mar 19;125(12):1857–65.
46. Geneviève F, Galois AC, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O, Trimoreau F, Fenneteau O, et al. Smear microscopy revision: propositions by the GFHC. *Feuill Biol*. 2014;9.
47. Schillinger F, Sourdeau E, Boubaya M, Baseggio L, Clauser S, Cornet E, et al. A new approach for diagnosing chronic myelomonocytic leukemia using structural parameters of Sysmex XNTM analyzers in routine laboratory practice. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018 Jan 8;0(0):1–6.
48. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3618–26.
49. Shen Q, Ouyang J, Tang G, Jabbour EJ, Garcia-Manero G, Routbort M, et al. Flow cytometry immunophenotypic findings in chronic myelomonocytic leukemia and its utility in monitoring treatment response. *Eur J Haematol*. 2015 Aug;95(2):168–76.
50. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Acute monoblastic/monocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia share common immunophenotypic features but differ in the extent of aberrantly expressed antigens and amount of granulocytic cells. *Leuk Lymphoma*. 2011 Jan;52(1):92–100.

51. Kannegieter NM, Hesselink DA, Dieterich M, de Graav GN, Kraaijeveld R, Rowshani AT, et al. Pharmacodynamic Monitoring of Tacrolimus-Based Immunosuppression in CD14+ Monocytes After Kidney Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2017;39(5):463–71.
52. Aubert H. Diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique par technique de cytométrie en flux au Centre Hospitalier Universitaire de Caen. Université de Caen Normandie; 2017.
53. Ducos A. La place de l'étude des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux dans le diagnostic de la LMMC. Université de Limoges; 2017.
54. Demeter J, Mihalik R, Benczúr M, Lehoczky D, Pálóczi K. Peripheral blood leukocyte subpopulations a long time after posttraumatic splenectomy. *Haematologia (Budap).* 1991;24(3):139–44.
55. Li Y, Stone JR. The impact of splenectomy on human coronary artery atherosclerosis and vascular macrophage distribution. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2016 Dec;25(6):453–60.
56. Zahid MF, Barraco D, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Gangat N, et al. Spectrum of autoimmune diseases and systemic inflammatory syndromes in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(6):1488–93.
57. Patnaik MM, Timm MM, Vallapureddy R, Lasho TL, Ketterling RP, Gangat N, et al. Flow cytometry based monocyte subset analysis accurately distinguishes chronic myelomonocytic leukemia from myeloproliferative neoplasms with associated monocytosis. *Blood Cancer J.* 2017 Jul;7(7):e584.

# Annexe 1 : Tableau récapitulatif du recueil des données des patients de la cohorte

Groupes	Age (année)	Sexe	Hb (g/L)	Plaquettes (G/L)	GB (G/L)	Ne		Ly		Mo		Myélobémie (G/L)	Blaste (G/L)	Ne-WX	Monscore	MO1 (%)	MO2 (%)	MO3 (%)	C-score	Orientation cytologique	CRP (g/L)	Traitement		
						(%)	(G/L)	(%)	(G/L)	(%)	(G/L)													
Patients "LMMC" (N = 11)	81	H	73	35	24,2	73,0	17,7	5,0	1,2	17,0	4,1	3,0	0,7	3,14	409	98,9	0,3	0,4	11	LMMC		Vidaza		
	71	H	86	17	10,0	48,4	4,8	12,5	1,3	36,7	3,9		<1%	1,25	385	1,000	3,3	0,4	11	LMMC		Vidaza		
	76	H	88	53	6,2	72,0	4,4	3,0	0,2	23,0	1,5			3,33	343	0,020	1,9	0,2	10	LMMC		concoïdes		
	83	H	91	397	51,4	75,0	38,5	5,0	2,6	16,0	8,2	4,0	2,1	4,50	367	1,000	84,1	13,6	0,7	9	LMMC			
	75	H	81	90	6,4	48,0	3,0	21,6	1,4	28,5	1,8			1,68	489	0,957	82,6	16,7	0,35	11	LMMC			
	84	H	81	77	5,8	40,3	2,4	33,2	1,9	26,0	1,5			1,55	360	0,420	79,9	16,7	1,5	10	LMMC			
	95	H	89	136	4,3	33,1	1,4	25,2	1,1	38,0	1,6			0,87	482	0,984	94,5	4,5	1	8	LMMC			
	70	H	120	11	7,3	41,0	3,0	28,0	2,1	28,0	2,1	2,0	0,1	1,53	387	0,867	97,7	2,1	0,4	12	LMMC		Vidaza	
	71	F	112	170	17,6	39,7	7,0	12,1	2,1	37,7	6,6	9,8	1,7		1,05	498	1,000	68,6	31,2	0,2	11	LMMC		
	82	F	91	48	5,3	35,4	1,9	36,8	2,0	27,4	1,5			1,39	341	0,350	79,9	16,4	3,8	7	LMMC			
	88	F	131	116	16,7	50,9	8,5	22,3	3,7	21,7	3,6	4,3	0,7	<1%	2,35	394	0,994	83,8	12,5	1,3	15	LMMC		
68	H	123	279	11,2	75,9	8,5	10,5	1,2	12,9	1,4			5,88	287	0,000	80,7	12,3	4,4	0	Réactionnel		83,9		
64	H	115	207	9,5	71,4	6,8	10,6	1,0	13,1	1,2			5,45	318	0,001	82,5	7,8	9,2	4	Réactionnel		167,1		
65	H	115	322	10,9	72,8	8,0	9,7	1,1	11,1	1,2	2,7	0,3	6,56	328	0,000	78	9,4	12,1	2	Réactionnel		30,9		
33	H	138	247	12,1	61,9	7,5	17,8	2,2	19,5	2,4			3,17	307	0,161	68,5	15,6	15,9	2	Réactionnel		84,6		
52	H	169	502	17,6	69,3	12,2	17,3	3,0	12,3	2,2			5,83	312	0,008	85,6	10,5	3,4	2	Réactionnel		3,9		
51	H	91	200	6,1	36,8	2,4	30,1	1,8	22,7	1,4			1,71	375	0,212	74	19,9	9,8	1	Réactionnel		1,3		
55	H	125	151	6,0	55,0	3,3	21,0	1,3	21,0	1,3			1,84	357	0,232	86,6	8,2	4,9	2	Réactionnel				
24	H	92	460	13,1	42,0	5,5	32,4	4,2	14,9	1,9			2,82	320	0,120	95,7	6,5	0,1	1	Réactionnel		1,7		
69	H	134	268	8,4	48,2	4,1	26,9	2,3	15,6	1,3			3,09	352	0,038	85,6	4,3	8,8	1	Réactionnel				
70	H	106	562	14,2	66,2	9,4	16,4	2,3	16,5	2,3			4,01	325	0,081	53,4	34,9	11,2	1	Réactionnel		29,2		
46	H	83	501	16,6	64,9	10,8	19,7	3,3	13,4	2,2			4,84	406	0,146	92,1	6,3	0,8	1	Réactionnel				
72	H	70	279	14,2	81,8	11,6	4,3	0,6	11,6	1,6			7,05	306	0,000	62,2	26,7	10,7	0	Réactionnel		70,8		
40	H	154	241	7,0	64,9	4,6	19,8	1,4	14,5	1,0			4,48	289	0,001	80,2	17,7	1,8	4	Réactionnel				
42	H	103	38	6,3	53,6	3,4	22,4	1,4	21,8	1,4			2,46	298	0,028	75,4	20	4,6	3	Réactionnel		129,2		
66	H	100	463	8,6	58,3	5,0	21,8	1,9	14,0	1,2	3,5	0,3	4,16	289	0,001	75,7	12,6	11,1	0	Réactionnel		22,7		
74	H	139	211	10,9	81,0	8,8	5,7	0,6	12,8	1,4			6,33	327	0,000	72,5	24,2	2,8	3	Réactionnel		210,6		
50	H	144	213	10,9	74,4	8,1	11,6	1,3	12,1	1,3			6,15	314	0,000	93,6	4,2	1,9	1	Réactionnel		83,6		
73	H	101	324	9,9	60,9	6,0	22,4	2,2	12,1	1,2			5,03	312	0,001	83,5	9,4	6,6	1	Réactionnel		7,3		
43	H	134	263	16,1	77,8	12,5	10,4	1,7	11,0	1,8			7,07	318	0,000	64,4	24,1	1,1	3	Réactionnel		225,7		
34	H	143	171	11,7	77,7	9,1	10,6	1,2	10,9	1,3			7,13	291	0,000	57,8	37,8	4,4	0	Réactionnel		10,9		
69	H	117	162	8,2	73,2	6,0	11,8	1,0	13,7	1,1			5,34	288	0,000	77,7	14,7	7,4	1	Réactionnel		32,5		
60	H	139	178	11,9	74,2	8,8	12,5	1,5	10,3	1,2			7,20	290	0,000	81,7	15,6	3,3	0	Réactionnel		190,9		
71	H	84	453	15,2	83,3	12,7	4,9	0,7	11,4	1,7			7,31	311	0,000	74,3	19,4	6,3	1	Réactionnel		93,3		
83	F	98	213	6,8	62,6	4,3	18,6	1,3	17,9	1,2			3,50	330	0,010	78,5	13,4	7,1	0	Réactionnel		34,3		
75	F	97	263	14,2	75,7	10,8	13,4	1,9	10,6	1,5			7,14	332	0,000	72,6	24,6	1,3	0	Réactionnel		15		
74	F	119	324	11,2	71,3	8,0	14,0	1,6	14,1	1,6			5,06	288	0,001	54,9	30,1	1,5	0	Réactionnel		234,5		
23	F	123	235	10,4	48,6	5,1	36,7	3,8	10,5	1,1			4,63	298	0,001	93,9	3,7	2,2	3	Réactionnel				
86	F	101	168	11,5	74,4	8,5	15,2	1,7	10,2	1,2			7,29	302	0,000	81,6	14,8	3,4	0	Réactionnel		15,8		
72	F	81	221	8,5	62,3	5,3	20,6	1,7	12,4	1,0			5,02	306	0,000	82,7	9,2	7,6	0	Réactionnel				
72	F	106	220	12,6	73,2	9,2	13,1	1,6	12,0	1,5			6,10	307	0,000	57,3	36	6,7	2	Réactionnel		63,3		
83	F	120	305	4,9	46,4	2,3	27,8	1,4	23,8	1,2			1,95	349	0,108	67,4	20	12,6	2	Réactionnel		2,7		
59	F	114	321	9,6	45,3	4,4	38,9	3,7	12,3	1,2			3,68	299	0,003	70,2	18,9	10,6	2	Réactionnel		4,4		
80	F	99	278	9,2	75,3	6,9	10,8	1,0	11,5	1,1			6,55	316	0,000	73	13,6	13,1	1	Réactionnel		14,3		
83	F	99	351	9,3	78,7	7,3	5,8	0,5	14,9	1,4			5,28	288	0,000	73,3	20,6	6	3	Réactionnel		77,9		
94	F	123	260	6,5	52,3	3,4	25,5	1,6	17,0	1,1			3,08	326	0,011	73,1	14,4	12,5	1	Réactionnel		26,7		
87	F	127	257	9,2	42,6	3,9	37,4	3,4	14,4	1,3			2,96	304	0,014	69,6	13,7	16,9	1	Réactionnel		2,9		
34	F	137	237	13,3	50,9	6,8	34,7	4,6	11,2	1,5			4,54	317	0,003	62,6	24,3	1,1	3	Réactionnel		6,5		

H = Homme / F = Femme / Ne = Neutrophiles / Ly = Lymphocytes / Mo = Monocytes / Cscore = Score cytologique / CRP = Protéine C réactive

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*