

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2017

THÈSE N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 31 mars 2017 à Bordeaux

par

Anne Ducos

née le 12 juillet 1987 à Perpignan (66)

**PLACE DE L'ÉTUDE DES SOUS-POPULATIONS
MONOCYTAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX
DANS LE DIAGNOSTIC DE LA LMCC**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Pr Sylvie ROGEZ PU-PH Faculté de Pharmacie de Limoges.....Président

M. le Dr Aguirre MIMOUN PH CH de Bayonne.....Directeur

M. le Pr Vincent PRALORANP U-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

M. le Pr Arnaud PIGNEUX PU-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

Mme le Dr Fanny MENARD-DERROURE PH CH de Bayonne.....Juge

M. le Dr Laurent WEINMANN AHU Faculté de Pharmacie de Bordeaux.....Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2017

THÈSE N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE
tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 31 mars 2017 à Bordeaux

par

Anne Ducos

née le 12 juillet 1987 à Perpignan (66)

**PLACE DE L'ETUDE DES SOUS-POPULATIONS
MONOCYTAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX
DANS LE DIAGNOSTIC DE LA LMCC**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Pr Sylvie ROGEZ PU-PH Faculté de Pharmacie de Limoges.....Président

M. le Dr Aguirre MIMOUN PH CH de Bayonne.....Directeur

M. le Pr Vincent PRALORAN PU-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

M. le Pr Arnaud PIGNEUX PU-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

Mme le Dr Fanny MENARD-DERROURE PH CH de Bayonne.....Juge

M. le Dr Laurent WEINMANN AHU Faculté de Pharmacie de Bordeaux.....Juge

CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE LIMOGES

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN :

Madame Catherine FAGNERE, Maître de Conférences

ASSESEURS :

Madame le Professeur Sylvie **ROGEZ**

Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS :

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

FAGNERE Catherine

CHIMIE THERAPEUTHIQUE-CHIMIE ORGANIQUE

LIAGRE Bertrand

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

MAMBU Lengo

PHARMACOGNOSIE

ROUSSEAU Annick

BIostatistique

TROUILLAS Patrick

CHIMIE PHYSIQUE-PHYSIQUE

VIANA Marylène

PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian

HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT

PICARD Nicolas

PHARMACOLOGIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

SAINT-MARCOUX Franck

TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER :

CHAUZEIX Jasmine

HEMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine

PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

CLEDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTHIQUE

COURTIOUX Bertrand

PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE - BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin	CHIMIE-PHYSIQUE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALENIQUE
PHAM Thanh	CHIMIE ORGANIQUE-BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques
DREYFUSS Gilles
LOUDART Nicole

REMERCIEMENTS

A ma présidente de thèse,

Madame le Professeur Sylvie Rogez, Professeur des universités, à l'université de pharmacie de Limoges et Praticien hospitalier chef du service de Virologie du CHU de Limoges.

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect ainsi que ma reconnaissance.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Aguirre Mimoun, Praticien hospitalier hématologue au Centre Hospitalier de la Côte Basque.

Tu m'as fait l'honneur de me proposer ce travail, de diriger cette thèse et de la juger.

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée, ta disponibilité et ta gentillesse, le partage de tes connaissances, tes encouragements et ton encadrement précieux dans ce travail mais aussi durant ce semestre d'internat passé à tes côtés. Sois assuré de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance. Je te remercie de tout cœur.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Vincent Praloran, Professeur des universités à la faculté de médecine de Bordeaux, Praticien hospitalier au sein du service d'hématologie du CHU de Bordeaux.

Pour avoir immédiatement accepté de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de l'honneur que vous me faites. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect et de reconnaissance.

Monsieur le Professeur Arnaud Pigneux, Professeur des universités à la faculté de médecine de Bordeaux, Praticien hospitalier au sein du service d'hématologie et thérapie cellulaire du CHU de Bordeaux.

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de toute ma considération et mon respect.

Madame le Docteur Fanny Ménard-Derroure, Praticien hospitalier au sein du service d'hématologie du Centre Hospitalier de la Côte Basque.

Je te remercie pour ton soutien, tes conseils avisés, ton génie et ta pertinence à toute épreuve. Merci pour ta pédagogie, l'immensité de tes connaissances et surtout ta facilité à les transmettre. Trouve dans ce travail l'assurance de tout mon respect et de ma profonde admiration.

Monsieur le Docteur Laurent Weinmann, assistant hospitalo-universitaire à la faculté de pharmacie de Bordeaux.

Pour avoir accepté de clôturer nos années de co-internat en jugeant cette thèse et pour avoir fait route ensemble dans l'acquisition de nos connaissances, en espérant que le chemin continue encore longtemps ... Je te remercie sincèrement.

A ceux qui m'ont accompagnée lors de mon internat,

A tous les biologistes de Bayonne pour m'avoir accueillie et si vite intégrée dans votre folle équipe.

A Aguirre dit Papag et Fanny, ma maman d'hématologie et la maman chat de tous ses petits internes chats de Bayonne. Merci pour votre gentillesse, votre folie et votre humour sans borne, une expérience inoubliable !

A Yohan, mon coéquipier de choc durant ces 6 mois passés sur la côte basque, à Anne-Christine et Marie-Laure pour votre confiance et votre amitié, à David (dans notre cher petit Bayonne il est une pena...) merci pour ton humour hors norme, ta joie et ta gentillesse (mais visca catalunya !) A Rem pour tes dons informatiques sur le petit nuage et la douceur de tes compliments quotidiens ...

A toute l'équipe technique de Bayonne pour votre accueil et votre gentillesse ; mention spéciale à Anne-Sophie et David, vous avez eu la patience et la bienveillance de me former au cœur de cet ouvrage : la cytométrie. Sans oublier Christiane et ta gentillesse.

A toute l'équipe, plutôt la grande famille d'Arcachon ! Merci à toutes les filles pour votre humour et votre gentillesse.

Merci à Michèle Goursolle de me transmettre chaque jour un peu plus de votre précieux savoir, merci pour votre chaleureux accueil au sein de votre belle équipe.

Merci à Stéphanie Mimouni et Stéphanie Bez pour le partage de vos connaissances et la confiance que vous m'accordez.

A toutes ces personnes brillantes que j'ai croisées lors de mon internat et qui m'ont transmis un peu de leur savoir. A Stéphanie Dulucq, Vanessa Augis et Maggy Micheau, le beau trio de l'hématologie de Pellegrin. A Geneviève Freyburger, Marie-Cécile Ploy, Olivier Barraud, Nadia Hidri, Christian Martin, Sylvie Rogez, Sophie Alain et bien sûr Dominique Rousset. Merci pour vos connaissances, votre pédagogie et votre confiance.

A mes amis,

A mes co-internes devenus amis.

Inès et Paul, il faut dire qu'une ville comme Limoges ça rapproche ! Heureusement que les soirées dégustations et l'usine repetto ! Julien, au départ tout juste co-interne pour finalement trouver en toi un véritable ami, merci pour ces belles années et pour toutes celles à venir ! Emmanuelle, madame bij, pour cette colocation des grosses cloches et ce semestre de folie. Chloé, Benoit, Laurent, David (pili-pili for ever) l'équipe du relai H, des réunions très très privées dans le bureau d'hémostase et des après-midi transat au bord de la piscine ... A Céline et Seb, les Quilboule merci pour votre amitié et votre soutien à toute épreuve. Au grand Professeur Nicolas Lechevalier un chef comme chaque interne rêverait d'avoir !

A mes amis de toujours.

Sophie et Rodwen, les trois inséparables ! Emma, notre binôme hors norme, plus souvent à la plage ou à faire les boutiques que sur les bancs de la fac. A Polette et à ma Colma. Merci pour votre soutien en toutes circonstances, pour nos longues et belles années de folies et d'amitié sans faille. A Loriane, Charlina, Gaëlle, Sophie et Nico, Lucie, Franck et Laure.

A ma famille,

A mon frère et ma sœur, Olivier et Géraldine, merci d'avoir toujours cru en moi. Merci de votre patience, de votre soutien et de votre amitié. Je suis si fière d'être votre petite sœur... Avec tout l'amour et l'affection que je vous porte.

A David, Justine, les petits Anaé et Lubin, à mes trois cousins Philippe, Bertrand et Victor, Calie et Don parrain, à Tatie et Mamie-Nez, à mon père.

A mes parents.

A ma maman, pour ton soutien sans faille, ta compréhension et tes encouragements. Merci de nous avoir transmis le goût du travail et des sciences et de nous avoir toujours poussés à nous surpasser. Merci de m'avoir donné les moyens d'en arriver là, je te dois tout et je t'admire tant. A Philippe, pour tout ce que tu as fait pour nous...

Aux amours de ma vie : Loïc et notre fils Amaury.

TABLE DES MATIERES

CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE LIMOGES	5
REMERCIEMENTS	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS	14
LISTE DES TABLEAUX	15
PARTIE I : GENERALITES SUR LA LMMC	18
1. DEFINITION	18
2. CLASSIFICATION	18
3. EPIDEMIOLOGIE	21
4. PHYSIOLOGIE DE LA MONOCYTOSE	22
4.1. La lignée monocyttaire.....	22
4.2. Monocytopoïèse	24
4.3. Morphologie des cellules de la lignée monocyttaire.....	26
5. ONCOGENESE DE LA LMMC	28
5.1. Anomalies cytogénétiques	28
5.2. Mutations génétiques	29
6. DIAGNOSTIC ACTUEL	34
6.1. Clinique.....	34
6.2. Biologique.....	35
6.2.1. Hémogramme	35
6.2.2. Myélogramme.....	39
6.2.3. Biopsie ostéo-médullaire	42
6.2.4. Caryotype.....	43
6.2.5. Biologie moléculaire.....	43
6.2.6. Biochimie.....	44
6.3. Place de l'immunophénotypage dans la LMMC	45
6.3.1. Immunophénotypage des monocytes.....	45
6.3.2. Immunophénotypage des monocytes sanguins.....	46
6.3.3. Immunophénotypage des monocytes médullaires	48
7. SCORES PRONOSTIQUES	50
7.1. Cliniques et biologiques.....	50
7.1.1. Score CPSS.....	50
7.1.2. Score IPSS	52
7.2. Pronostic moléculaire.....	54
8. THERAPEUTIQUES	55
8.1. Prise en charge des patients LMMC	55
8.2. Traitements	57

8.2.1. Antinéoplasiques	57
8.2.2. Greffe de CSH	59
PARTIE II : MATERIEL ET METHODE	61
1. PROBLEMATIQUE	61
2. MATERIEL ET METHODE	61
2.1 Patients	61
2.1.1 Critères d'inclusion.....	61
2.1.2 Critères d'exclusion.....	63
2.2 Méthodes.....	63
2.3 Données recueillies (annexe 1)	65
Partie III : RESULTATS.....	66
1. CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES	66
2. CARACTERISTIQUES DE LA NUMERATION FORMULE SANGUINE	67
3. TYPES DE MONOCYTES DANS LES CAS LMMC ET REACTIONNEL	68
4. SYNTHÈSE DES PARAMÈTRES DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS ENTRE LA POPULATION LMMC ET LA POPULATION RECTIONNELLE	69
5. RESULTATS EN APPLIQUANT LE TAUX DE 94% DE MONOCYTES CLASSIQUES .	70
6. COURBE ROC	72
7. POPULATION TEST	73
PARTIE IV : DISCUSSION.....	74
ANNEXES.....	82
BIBLIOGRAPHIE	85
SERMENT DE GALIEN.....	92

LISTE DES ABREVIATIONS

LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
SMD : syndrome myélodysplasique
FAB : *French-American-British*
NMP : néoplasie myéloproliférative
LMC : leucémie myéloïde chronique
PV : polyglobulie de Vaquez
MFP : myélofibrose primitive
TE : thrombocytémie essentielle
MP : myéloproliférative
MD : myélodysplasique
LA : leucémie aiguë
LAM : leucémie aiguë myéloïde
HSC : cellules souches hématopoïétiques
MMP : cellule souche hématopoïétique multipotente
CMP : progéniteur myéloïde commun
GMP : progéniteur myélo-monocytaire
MDP : progéniteur de macrophages et cellules dendritiques
cMOP : progéniteur de monocytes communs
N/C : rapport nucléo-cytoplasmique
AAC : acquisition d'anomalies cytogénétiques
ADN : acide désoxyribonucléique
PNN : polynucléaires neutrophiles
IPSS : *international prognostic scoring system*
CPSS : *CMML-specific prognostic scoring system*
NGS : *Next generation sequencing*
LDH : lactate déshydrogénase
CD : cluster de différenciation
CMF : cytométrie en flux
IP : immunophénotypage
ROC : *receiver operating characteristic*
MADPS : *MD Anderson prognostic score*
Hb : hémoglobine
CSH : cellules souches hématopoïétiques
AMM : autorisation de mise sur le marché
CHCB : centre hospitalier de la côte basque
NFS : numération formule sanguine
p : p-value
MC : monocytes classiques
VPP : valeur prédictive positive
VPN : valeur prédictive négative

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Différenciation des monocytes et cellules dendritiques. Modèle murin. D'après Geissmann et al. (19).....	25
Figure 3 : Voie de développement des monocytes, leur expression, les facteurs de transcription et de croissance (13).....	26
Figure 4 : Spectre des différentes mutations génétiques retrouvées lors d'une étude menée par Patnaik et al.; fréquence de ces mutations et nombre de mutations observées chez un même patient (27).....	31
Figure 5 : Carte thermique des associations ou exclusions de mutations génétiques selon Itzykson et al. (29).....	32
Figure 6 : Schéma établi de l'ordre préférentiel de l'apparition de mutations au cours de la LMMC (30).....	33
Figure 7:Patient atteint de LMMC présentant une infiltration cutanée par des cellules leucémiques (34).....	35
Figure 8 : Sang de patient LMMC x500.....	38
Figure 9 : Sang de patient LMMC x500.....	38
Figure 10 : Sang de patient LMMC x500.....	39
Figure 11 : Moelle osseuse de patient LMMC x100.....	41
Figure 12 : Moelle osseuse de patient LMMC x500.....	41
Figure 13 : Moelle osseuse de patient LMMC x500.....	42
Figure 14 : Sous-populations monocytaires en cytométrie en flux.....	47
Figure 15 : Courbe analytique ROC de la sensibilité et spécificité du pourcentage de monocytes classiques sur un panel de patients LMMC étudié (1).....	48
Figure 16 : Abaque évaluant le groupe de risque des patients en fonction de l'âge et du score IPSS-R (54).....	53
Figure 17 : Stratégie de fenêtrage des populations leucocytaires après immunophénotypage.....	65
Figure 18 : Paramètres différentiellement exprimés entre population LMMC et réactionnelle avec correction de Bonferroni.....	70
Figure 19 : Pourcentage de monocytes classiques pour les populations LMMC et réactionnelle avec seuil à 94%.....	71
Figure 20 Courbe ROC : sensibilité / spécificité du pourcentage de monocytes classiques....	72
Figure 21: Pourcentage de monocytes non classiques d'après Pastoret et al.	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification LMMC selon OMS 2016 (4).....	20
Tableau 2 : Médianes de survie et risque d'acutisation en LA à deux ans.....	22
Tableau 3 : Aspects cytologiques : du monoblaste au monocyte mature (15).	27
Tableau 4 : Principaux gènes dont la mutation récurrente est observée dans la LMMC selon Itzykson et al (30).....	29
Tableau 5 : Numération moyenne des patients LMMC au diagnostic selon Tang et al. (8) (sang périphérique).....	37
Tableau 6 : corrélation entre anomalies cytogénétiques et mutations (31).	44
Tableau 7 Expression phénotypique des antigènes durant la maturation de la lignée monocyttaire. Les différentes protéines seront exprimées selon le stade de maturation du monocyte (10).	46
Tableau 9 : expressions phénotypiques de monocytes de patients LMMC dans la moelle osseuse.....	49
Tableau 10 : Système de score défini par les 4 variables du score CPSS selon Such et al (Blood, 2013) (43).....	51
Tableau 11 : Classification des patients en groupe de risque selon leur score CPSS ; probabilité de transformation en LA à 2 ans et médiane de survie.	51
Tableau 12 : Système de points défini par les 5 variables du score IPSS-R (54).....	53
Tableau 13 : Médiane de survie et délai médian de 25% de transformation en LAM selon le risque des patients classés selon l'IPSS-R	54
Tableau 14: Anticorps fluorescents utilisés pour l'analyse cytométrique	64
Tableau 15 : caractéristiques démographiques des populations testées	66
Tableau 16 : Test de Student avec correction de Bonferroni sur les paramètres de la NFS	67
Tableau 17 : Pourcentage de monocytes selon le mode analytique pour les trois populations	68
Tableau 18 : Test de Student sur les populations de monocytes en CMF.....	69
Tableau 19 : Sensibilité et spécificité du seuil de monocytes classiques à 94% dans notre étude	72
Tableau 20 : Sensibilité et spécificité du seuil de monocytes classiques à 90,2% calculé à partir de la courbe ROC	72
Tableau 21 : valeurs moyennes des paramètres de la NFS et de l'immunophénotypage pour la population test	73
Tableau 22 Comparaison des sensibilités et spécificités du seuil de MC de 94% entre l'étude de Selimoglu et al. et la nôtre.	75
Tableau 23 : VPN et VPP appliquées à la population test	77

INTRODUCTION

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une pathologie affectant préférentiellement le sujet âgé et dont le pronostic est sombre. Elle est liée à une anomalie clonale acquise de la cellule souche hématopoïétique médullaire et se présente sous des formes cliniques hétérogènes. Il s'agit d'une hémopathie chronique classée, à l'heure actuelle, parmi les syndromes frontières entre les syndromes myélodysplasiques et les syndromes myéloprolifératifs, réunissant les deux composantes. Cette pathologie n'a été considérée que récemment comme une entité à part entière. De fait, avant 2008, le diagnostic, les scores pronostiques clinico-biologiques et la prise en charge thérapeutique utilisés pour la LMMC étaient ceux des syndromes myélodysplasiques. Depuis 2008, date à laquelle la LMMC est reconnue comme entité distincte des syndromes myélodysplasiques, les recherches sur le diagnostic, le pronostic et le traitement de cette pathologie ont beaucoup progressé grâce, notamment, à l'établissement de scores clinico-biologiques spécifiques, aux études en génétique moléculaire et en cytométrie en flux.

Malgré ces avancées, le diagnostic de LMMC demeure, aujourd'hui encore, un diagnostic d'exclusion, donc difficile à établir. Les outils à disposition du biologiste pour aider le clinicien dans son diagnostic sont nombreux : numération, cytologie, biologie moléculaire, immunophénotypage, génétique moléculaire et cytogénétique. Cependant, aucun ne permet actuellement, à lui seul, d'établir un diagnostic de certitude. Jusqu'à présent, le diagnostic repose sur la chronicité de la monocytose. Or il s'agit d'une maladie dont l'évolution est potentiellement rapide et par conséquent l'objectivation de la chronicité constitue d'emblée un retard au diagnostic. Un outil diagnostique permettant d'établir rapidement le statut de la monocytose : réactionnelle ou maligne, permettrait d'éviter ce retard de prise en charge.

Quelques études portant sur l'immunophénotypage des leucocytes circulants, et notamment des monocytes, par cytométrie en flux ont tenté de définir une différence entre les patients atteints de LMMC et les patients dont la monocytose est réactionnelle. Une d'entre elle a particulièrement retenu notre attention car elle définissait une valeur seuil différentielle grâce à laquelle le diagnostic peut être établi : *Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia (Selimoglu et al. Blood 2015) (1).*

Cette étude proposait un seuil pour distinguer les patients atteints de LMMC de ceux ayant une monocytose réactionnelle.

La relative simplicité de la réalisation d'un immunophénotypage, son faible coût, notamment par rapport aux techniques de génétique, l'accessibilité du matériel nécessaire (sang circulant), en font un très bon candidat pour un outil diagnostique. Nous avons donc essayé d'adapter cette technique et de la tester sur des patients du Centre Hospitalier la Côte Basque. Pour cela, nous avons étudié la répartition des sous-populations monocytaires dans le sang circulant de différents groupes de patients.

- Une population témoin négatif présentant une monocytose réactionnelle, transitoire : cette population nous permettra d'établir les « valeurs normales » de répartitions des différentes sous-populations monocytaires
- Une population présentant une LMMC confirmée : population témoin positif
- Une population présentant une monocytose chronique dont le statut réactionnel ou pathologique n'a pas pu être défini : il s'agit de notre population test

Nous avons par ailleurs recueilli les données biologiques disponibles pour chaque patient, afin d'étudier chacun des paramètres différentiellement exprimés.

Dans un premier temps nous ferons quelques rappels concernant la classification de la pathologie et la physiopathologie de la monocytose. L'étude bibliographique permettra de faire l'état des lieux des connaissances concernant la leucémogénèse, les outils et les méthodes de diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique, ainsi que ses classifications pronostiques et sa prise en charge thérapeutique. Dans un second temps nous présenterons et discuterons des résultats de l'immunophénotypage en cytométrie en flux et des données biologiques de nos différentes populations de patients.

PARTIE I : GENERALITES SUR LA LMMC

1. DEFINITION

La leucémie myélomonocytaire chronique est une affection clonale acquise de la cellule souche hématopoïétique médullaire.

Il s'agit d'une pathologie hématologique rare qui concerne essentiellement le sujet âgé.

La LMMC associe deux composantes. D'une part la composante myéloproliférative : avec prolifération maligne et systématisée d'une ou plusieurs lignées sans blocage de maturation.

L'autre composante est myélodysplasique : caractérisée par une hématopoïèse inefficace, où on observe une prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale. L'apoptose de ces précurseurs anormaux aboutit à un défaut de production et à une ou plusieurs cytopénies périphériques.

2. CLASSIFICATION

Bien que la LMMC soit reconnue comme une pathologie distincte depuis plus de 40 ans, ce n'est qu'en 1978 qu'elle est intégrée comme une sous-catégorie des SMD par la classification FAB (2). Il faudra attendre 2008 pour que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) la reconnaisse comme une entité à part entière et la classe parmi les syndromes frontières : néoplasies myélodysplasiques/ myéloprolifératives (SMD/NMP) (3) ; entité qui se confirme dans la révision 2016 de la classification des néoplasies myéloïdes et leucémies aiguës de l'OMS (4).

La LMMC se définit impérativement par (4) :

- ✓ Une monocytose > 1G/L dans le sang périphérique avec un pourcentage monocytes > 10% des éléments
- ✓ Aucun critère défini par l'OMS (4) en faveur d'une leucémie myéloïde chronique (LMC), d'une polyglobulie de Vaquez (PV), d'une myélofibrose primitive (MFP) ou d'une thrombocytémie essentielle (TE)

- ✓ Absence de réarrangement PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou PCM1-JAK2 (si éosinophilie)
- ✓ Moins de 20% de blastes dans la moelle et dans le sang (blastés indifférenciés + myéloblastes + monoblastes + promonocytes)
- ✓ Dysplasie sur au moins une des lignées

Si absence de dysplasie :

- une anomalie cytogénétique ou une mutation génétique doit être retrouvée

ou

- monocytose > 1G/L dans le sang périphérique avec un pourcentage monocytaires > 10% des éléments, persistant depuis plus de 3 mois, sans autre cause de monocytose

La classification OMS 2016 (4), comme la précédente de 2008 (3), tient compte de la blastose sanguine et médullaire; ayant un but pronostic en termes de survie et d'évolution en leucémie aiguë (LA) secondaire. La LMMC est séparée en trois catégories :

➤ LMMC-0

- Sang périphérique : < 2% de blastes

et

- Moelle osseuse : < 5% de blastes

➤ LMMC-1

- Sang périphérique : 2% à 4% de blastes

et/ou

- Moelle osseuse : 5% à 9% de blastes

➤ LMMC-2

- Sang périphérique : 5% à 19% de blastes

et/ou

- Moelle osseuse : 10% à 19 % de blastes

et/ou

- Présence de corps d'Auër

A partir de 20% de blastes, la maladie sera classée en leucémie aiguë (LA).

Pour rappel, la classification OMS 2008 réunissait LMMC-0 et 1 en LMMC-1 et avait la même définition de la blastose pour la LMMC-2.

La nouvelle classification OMS 2016 distingue, de plus, une forme à dominance myéloproliférative : LMMC-MP (taux de leucocytes > 13 G/L) d'une forme myélodysplasique dominante : LMMC-MD (taux de leucocytes < 13G/L).

On dénombre ainsi 6 catégories distinctes en lieu et place des 2 précédemment définies (OMS 2008) :

Tableau 1 : Classification LMMC selon OMS 2016 (4)

Blastose \ Leucocytose	<13G/L	>13G/L
sang <2% et moelle osseuse <5%	LMMC0-MD	LMMC0-MP
sang 2% à 4% et/ ou moelle osseuse 5% à 9%	LMMC1-MD	LMMC1-MP
sang 5 à 19% et/ ou moelle osseuse 10% à 19% et/ ou corps d'Auër	LMMC2-MD	LMMC2-MP

Cette différence faisait déjà l'objet d'une séparation dans l'ancienne classification FAB 1994 (5). Force est de constater qu'une incertitude persiste dans la classification de ce syndrome frontière avec l'apparition d'une nouvelle catégorie mais aussi un retour en arrière concernant la considération de la leucocytose.

3. EPIDEMIOLOGIE

La LMMC est une pathologie concernant essentiellement le sujet âgé. Elle est exceptionnelle avant 50 ans et l'âge médian au diagnostic est d'environ 70 ans (6–8). Elle touche davantage les hommes que les femmes avec un sex ratio moyen à 2. La LMMC est le plus représenté des SMD/NMP (9,10) mais son incidence reste méconnue.

Dans une étude menée par Germing et al. sur 340 patients (11), la médiane de survie sans traitement des patients atteints de LMMC-2 est estimée à 15 mois. Les auteurs séparent les patients LMMC-1 (OMS 2008) en deux groupes selon que leur blastose médullaire est ou non supérieure à 5% des éléments, nous ramenant ainsi à la nouvelle classification OMS 2016. Les médianes de survie sont respectivement de 25 et 20 mois pour les LMMC-0 et -1. L'évolution vers la leucémie aiguë secondaire étant plus fréquente pour la LMMC-2 que pour la LMMC-1 (OMS 2008): 24% de risque contre 14% la deuxième année suivant le diagnostic (10,11).

Toutefois, ces précédentes études ne tiennent pas compte de la nouvelle distinction LMMC-MD/LMMC-MP. Dans leurs travaux, Schuler et al. (12) font le distinguo entre ces deux sous-groupes. Ils séparent également les 386 patients LMMC selon les trois catégories de la classification OMS 2016 (LMMC-0, -1, -2). Les résultats rapportent des moyennes de survie plus élevées, ainsi qu'un risque de transformation en LA à deux ans amoindri pour les patients –MD selon leurs classifications respectives -0, -1 et -2.

Tableau 2 : Médianes de survie et risque d'acutisation en LA à deux ans

Catégories		Schuler et al. (11)		Germing et al. (10)	
		Médiane de survie (mois)	Risque d'acutisation en LAM à 2 ans (%)	Médiane de survie (mois)	Risque d'acutisation en LAM à 2 ans (%)
LMMC-0	MD	48	4	25	14
	MP	17	12		
LMMC-1	MD	29	13	20	
	MP	15	21		
LMMC-2	MD	17	35	15	24
	MP	10	37		

4. PHYSIOLOGIE DE LA MONOCYTOSE

4.1. La lignée monocytaire

Les monocytes constituent une population hétérogène de phagocytes circulants qui vont donner naissance à des macrophages ou cellules dendritiques au niveau tissulaire(13).

La monocytopoïèse s'effectue dans la moelle osseuse. Le monocyte n'y séjourne en moyenne que 24 heures, puis il transite 1 à 3 jours dans le système vasculaire pour ensuite rejoindre les compartiments tissulaires vers lesquels il se destine. Cette migration trans-endothéliale se fait par diapédèse active. Sa durée de vie dans les tissus sera alors de plusieurs mois (3 mois à quelques années).

Ainsi ces cellules appartenant au système des phagocytes mononucléés prennent des dénominations différentes selon leur localisation :

- Cellules de Kupffer du foie
- Macrophages alvéolaires du poumon
- Macrophages médullaires de la moelle osseuse
- Ostéoclastes de l'os
- Cellules microgliales du cerveau etc...

Le système monocytaire remplit deux fonctions essentielles : ce sont des cellules clé de l'immunité et elles jouent un rôle de nettoyeur immunomodulateur.

➤ Rôle dans l'immunité innée et adaptative :

La lignée monocytaire représente une composante importante du système immunitaire inné constituant la première ligne de défense de l'organisme contre les risques environnementaux. Les macrophages sont doués de capacité d'adhésion, de migration mais aussi de phagocytose et de digestion de divers micro-organismes, de complexes immuns, de débris et de microparticules. Ils sont principalement actifs au niveau des interfaces avec le milieu extérieur (peau, poumons, intestins) mais également dans le système réticulo-endothélial dans la rate et le foie pour le maintien de l'homéostasie. Ces monocytes/macrophages interviennent également dans l'immunité adaptative comme cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T et participent donc à l'orchestration de la réponse immunitaire (14,15). Enfin, par le biais de leurs récepteurs ancestraux type Toll, monocytes et macrophages sont des biocapteurs très sensibles aux divers agents pathogènes. Leur activation induit une production rapide de chimiokines et cytokines. Les cytokines vont réguler localement la réaction inflammatoire, alors que les chimiokines vont recruter de nouveaux effecteurs.

Deux modèles types de monocytes ont ainsi été définis (16). Le premier modèle : M1 où les monocytes/macrophages sont à dominance pro-inflammatoires, produisant IL-12, IL-18, IL-26 et entraînant une réponse de type TH1 et TH17. Le deuxième modèle est le modèle M2 pour lesquels les macrophages, dits être « activés alternativement », vont produire l'IL-10 et le TGF-Beta : leur fonction sera davantage immunomodulatrice, de réparation tissulaire.

➤ Activité immunomodulatrice et réparation tissulaire

Ainsi, les macrophages jouent un rôle crucial dans les défenses de l'hôte contre les agents externes et un rôle tout aussi important de phagocytose non inflammatoire de cellules apoptotiques ou nécrotiques, de microparticules inertes ou débris. Pour résumer, ils défrichent les tissus endommagés suite à une blessure, une infection, une ischémie ou une régénération et participent à leur réparation ou renouvellement (17). Plusieurs tissus possèdent un taux très élevé de renouvellement cellulaire ; ce qui est inévitablement associée à la mort cellulaire ou à un certain nombre d'aberrations. Les macrophages exécutent la clairance des débris, essentielle à l'homéostasie dans les tissus. Cela concerne principalement

la peau, les muqueuses de l'intestin, les ganglions lymphatiques, le thymus, les gonades et la moelle osseuse. Ceci justifie le grand nombre de macrophages présent dans ces tissus. De plus, les macrophages aident à la régénération des tissus de soutien en fournissant des facteurs de croissance dans l'angiogenèse, l'ostéogenèse et la régénération du tissu nerveux et des muscles.

Certains auteurs poussent la réflexion au point de se demander si, dans un environnement propre, le maintien continu de l'homéostasie du corps représenterait l'activité principale des macrophages par rapport à la défense contre les infections occasionnelles (17).

4.2. Monocytopoïèse

Chez un adulte sain, les monocytes sont issus de cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle osseuse. Celle-ci se différencie en cellule souche hématopoïétique multipotente (MMP), puis en progéniteur myéloïde commun (CMP). La différenciation se poursuit en progéniteur myélo-monocytaire (GMP), puis en progéniteur de macrophages et cellules dendritiques (MDP), et enfin en progéniteur de monocytes communs (cMOP) (18).

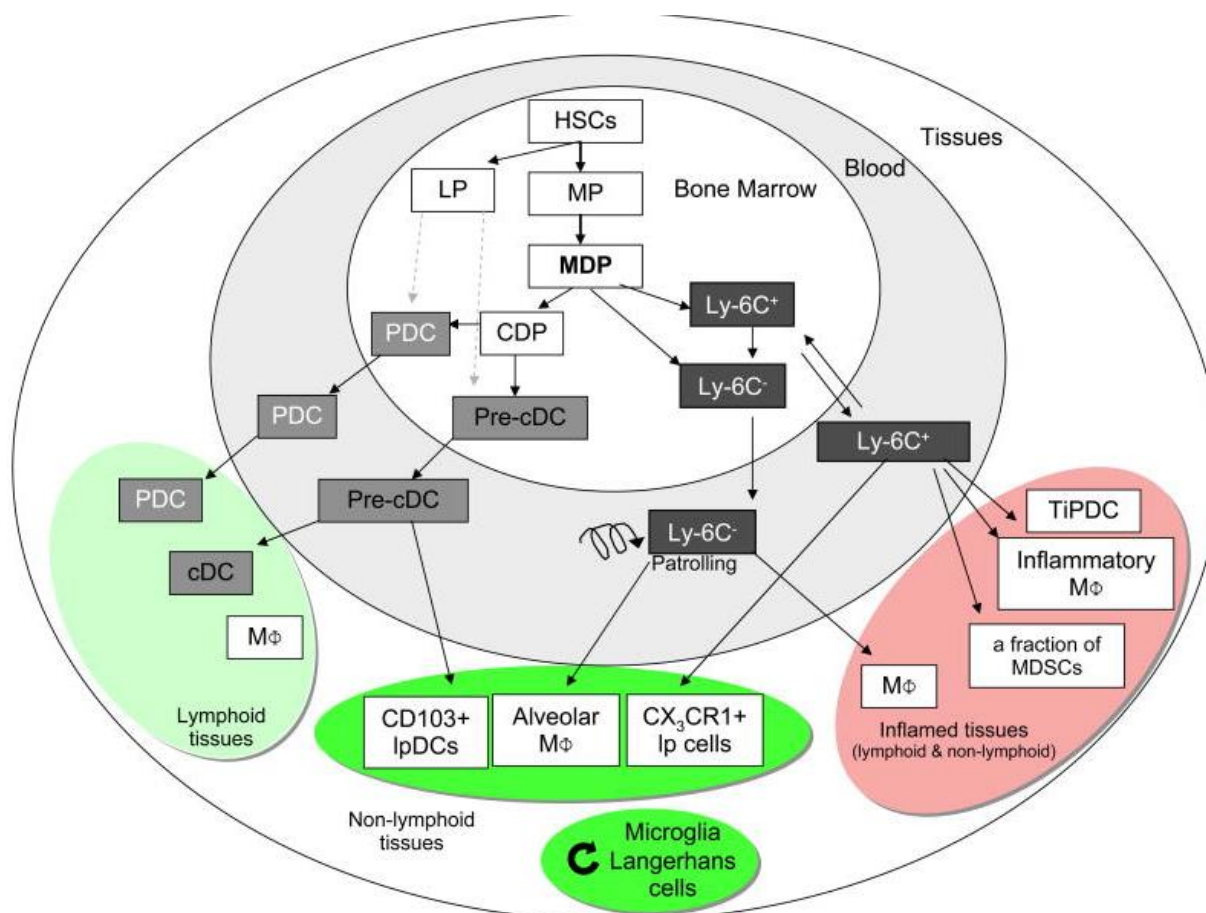


Figure 1 : Différenciation des monocytes et cellules dendritiques. Modèle murin. D'après Geissmann et al. (19)

En réponse à un état de stress inflammatoire, les cellules souches hématopoïétiques vont répondre à la stimulation de plusieurs cytokines, chimiokines, à la détection directe du pathogène via les récepteurs type Toll et autres médiateurs tels que l'INF alpha ou gamma, le TNF alpha, et vont induire une monocytose réactionnelle (18).

De récentes études visent à décrire la probable implication d'un système de réponse rapide dans la genèse de nouveaux progéniteurs, en réponse à certaines situations telles que l'inflammation : ce sont des progéniteurs myéloïdes restreints avec une activité à long terme de repeuplement, dérivant directement de la cellule souche hématopoïétique (20,21).

A l'état physiologique, la monocytopoïèse s'effectue sous l'action de divers facteurs de transcription, que sont : PU.1, IRF8, KLF4 ; et de facteurs de croissance tels que le M-CSF et IL-34 (13).

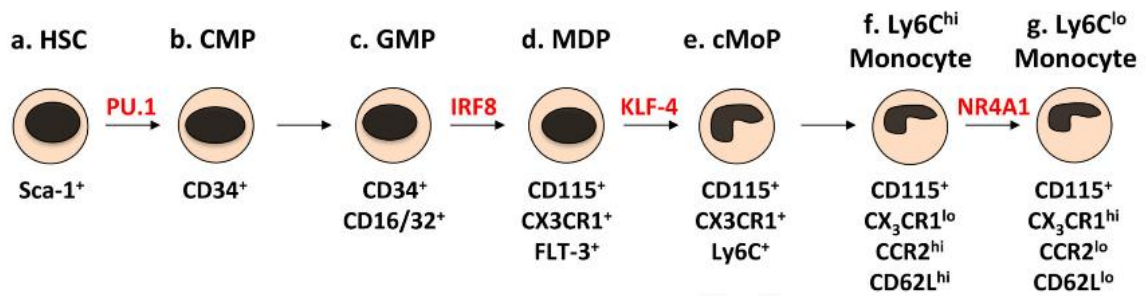


Figure 2 : Voie de développement des monocytes, leur expression, les facteurs de transcription et de croissance (13).

4.3. Morphologie des cellules de la lignée monocytaire

Les cellules de lignée monocytaire demeurent les plus difficiles à différencier en cytologie.

Selon le stade de maturation, leur morphologie varie. De même selon le statut du patient (individu sain, patient présentant une infection, un syndrome inflammatoire chronique ou une prolifération leucémique) les monocytes sanguins peuvent prendre des morphologies diverses et différents stades de maturation peuvent être observés (15).

Il est donc nécessaire de les diviser en sous-types notamment lors des proliférations monocytaires.

Chez un individu exempt de pathologie hématologique ne peuvent être observés dans le sang que les monocytes matures et immatures. Les promonocytes et monoblastes seront alors localisés exclusivement dans la moelle.

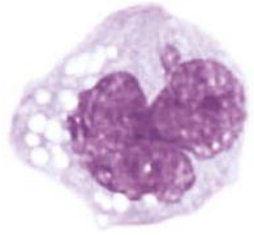
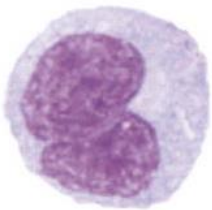
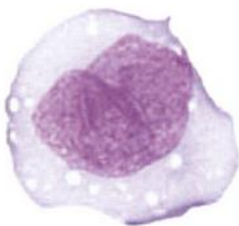
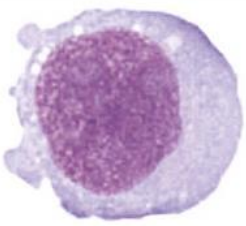
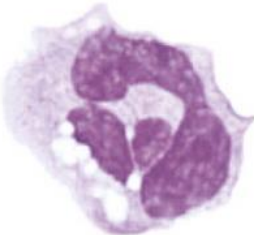
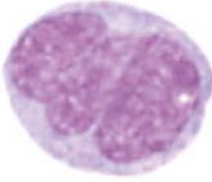
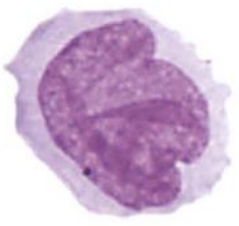
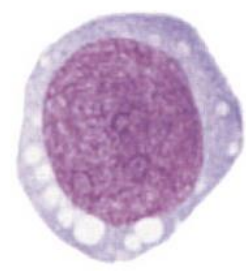
Le monoblaste est de grande taille : 20-30µm. Il présente un noyau rond, nucléolé, sa chromatine est fine. Le rapport nucléo-cytoplasmique (N/C) est plus élevé que celui du promonocyte. Son cytoplasme est basophile pouvant présenter des granulations azurophiles.

Le promonocyte est de plus grande taille : 20-30 µm. Son noyau est convoluté présentant un nucléole bien visible, sa chromatine est fine. Le rapport N/C est plus élevé que celui du monocyte. Son cytoplasme est basophile pouvant présenter des granulations azurophiles.

Le monocyte immature est sensiblement plus petit que le monocyte mature. Son noyau est convoluté, la chromatine est sensiblement moins condensée que lorsqu'il est mature. On peut occasionnellement observer des nucléoles. Son cytoplasme présente une basophilie plus marquée que précédemment, les granulations azurophiles sont moins fines.

Le monocyte mature est une cellule de grande taille 20-25µm de diamètre, à faible rapport nucléo-cytoplasmique. Son noyau est condensé, non nucléolé, très irrégulier, pouvant être serpentiforme ou réniforme. Son cytoplasme est gris-bleuté, pouvant occasionnellement présenter de fines granulations azurophiles ainsi que des vacuoles.

Tableau 3 : Aspects cytologiques : du monoblaste au monocyte mature (15).

Monocyte	Immature	Promonocyte	Monoblast
			
			

Le tableau proposé ci-dessus est issu du travail de Goasguen et al. (15) sur la morphologie de la lignée monocyttaire. Ils réunissent 5 experts auxquels ils proposent 90 cellules à identifier. Le taux de concordance se révèle être de seulement 76,6%. Or, il s'agit d'un groupe de spécialistes : la supposition est telle que la diversité morphologique de ces cellules représente une réelle difficulté pour les cytologistes. Il en est de même pour les automates de routine, qui ne possèdent pas encore les performances nécessaires pour reconnaître les différentes formes monocytaires.

5. ONCOGENESE DE LA LMMC

La physiopathologie de la LMMC reste à ce jour mal connue. On sait que la pathologie réunit une composante myélodysplasique entraînant des cytopénies périphériques : anémie et/ou thrombopénie, à une composante myéloproliférative avec prolifération granulomonocytaire entraînant une monocytose persistante additionnée ou non d'une polynucléose. Cependant les mécanismes par lesquels ces anomalies aboutissent sont encore mal connus.

5.1. Anomalies cytogénétiques

Des anomalies cytogénétiques sont détectées chez 20 à 30% des patients au moment du diagnostic initial (22,23), sans qu'aucune d'elles ne soit spécifique de la pathologie.

On retrouve principalement la trisomie 8, la perte du chromosome Y, la monosomie 7 ou des anomalies du chromosome 7, la trisomie 21 et des caryotypes complexes (24,25).

Une récente étude menée par Tang et son équipe en 2015 (8) vise à démontrer la part toute aussi importante de l'acquisition d'anomalies cytogénétiques (AAC) au cours de la LMMC. Cependant celle-ci reste largement méconnue. L'AAC semble se produire plus fréquemment chez les patients ayant un caryotype normal au diagnostic ou bien de risque faible. La progression vers une LAM (Leucémie Aiguë Myéloïde) sera alors plus souvent observée (55%) chez les patients ayant eu une AAC que chez les patients sans AAC (29%). En conclusion de cette étude, l'AAC se produirait chez environ 20 à 30% des patients LMMC au cours de la maladie, elle est significativement associée à la progression en LA et une médiane de survie plus courte. Les patients présentant une anomalie génétique au moment du diagnostic seraient donc moins susceptibles de développer une AAC et auraient un délai d'acutisation en LA plus long. Il semblerait donc que les anomalies chromosomiques présentes au moment du diagnostic ou acquises au cours de la maladie ont une implication pronostique chez les patients LMMC.

Ces résultats indiquent que les mutations se produisant probablement au début de la pathogenèse de la LMMC vont alors rester stables dans le temps, tandis que les changements dans les chromosomes sont plus dynamiques et susceptibles de contribuer à la progression de la maladie. C'est pourquoi le suivi et la surveillance des AAC devraient être systématiques chez

les patients atteints de LMMC et notamment chez les patients présentant un caryotype normal ou de faible risque au diagnostic. Une réévaluation médullaire annuelle est préconisée (26).

5.2. Mutations génétiques

De nombreuses mutations génétiques acquises ont été identifiées. Elles sont observées dans 90% des cas de LMMC, mais aucune d'entre elles n'est spécifique de la maladie (23,27–29).

Tableau 4 : Principaux gènes dont la mutation récurrente est observée dans la LMMC selon Itzykson et al (30).

<i>Gene</i>	<i>Main function(s) of the protein</i>	<i>Phenotypic correlations</i>	<i>Prognostic relevance</i>	<i>Mutated (%)</i>
<i>TET2</i>	Epigenetics (methylcytosine dioxygenase 2)	Thrombocytopenia		40–60
<i>SRSF2</i>	Pre-mRNA splicing factor	Thrombocytopenia	Poor, univariate	30–50
<i>ASXL1</i>	Epigenetics (PRC2-mediated H3K27me3)	Anemia, EMD ^a	Poor, multivariate	~40
<i>RUNX1</i>	Transcription factor	Thrombocytopenia	Poor, univariate	~15
<i>NRAS</i>	Signal transduction protein (small GTPase)	Hyperleukocytosis; EMD	Poor, univariate	~10
<i>CBL</i>	Signal transduction protein (E3 ligase)	Hyperleukocytosis; EMD	Poor, univariate	~10
<i>JAK2</i>	Signal transduction protein (tyrosine kinase)	Hyperleukocytosis		5–10
<i>KRAS</i>	Signal transduction protein (small GTPase)	Hyperleukocytosis; EMD		5–10
<i>ZRSF2</i>	Pre-mRNA splicing factor			5–10
<i>IDH2</i>	Oxido-reductase (isocitrate deshydrogenase)		Poor, univariate	5–10
<i>SF3B1</i>	Pre-mRNA splicing factor	Ring sideroblasts	Poor, univariate	5–10
<i>SETBP1</i>	Protein that binds SET, involved in DNA replication	AML transformation		5–10
<i>UTX (KDM6A)</i>	Epigenetics (H3K27 demethylase)			5–10
<i>EZH2</i>	Histone methylase (PRC2 complex)			<5
<i>FLT3</i>	Signal transduction protein (tyrosine kinase)			<5
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine 5-) methyltransferase 3 alpha			<5
<i>U2AF1</i>	Pre-mRNA splicing factor			<5
<i>NOTCH2</i> ^b	Signal transduction protein			<5
<i>NPM1</i>	Ribosome biogenesis, centrosome duplication and others	AML transformation		1
<i>IDH1</i>	Oxido-reductase (isocitrate deshydrogenase)			1
<i>Cohesin genes</i> ^c	Regulation of gene transcription			1
<i>TP53</i>	Tumor suppressor protein	AML transformation		1

^a EMD: extramedullary disease.

^b Somatic heterozygous mutations in multiple Notch pathway genes including *NCSTN*, *APH1*, *MAML1* and *NOTCH2*.

^c Cohesin complex components *STAG2*, *SMC3*, *SMC1A* and *RAD21*.

Ces mutations peuvent globalement être classées dans les catégories suivantes (31):

- mutations impliquant un régulateur épigénétique des gènes :
TET2 (~ 60 %), DNMT3A, IDH1 et IDH2 (mutations IDH < u10%)
- mutations impliquant un changement d'histone et la régulation de la chromatine :
ASXL1 (~ 40%), EZH2 (< 5 %), UTX, EED et SUZ12
- mutations impliquant la régulation de l'épissage :
SF3B1, SRSF2 (~ 50 %), ZRSR2 et U2AF1.
- mutations impliquant le complexe de cohésion :
STAG2, BCOR, SMC3, SMC1A et RAD21
- mutations impliquant des gènes de la réponse aux lésions de l'ADN :
Tp53 (~ 1 %) et PHF6
- mutations dans les facteurs de transcription et les voies de transduction du signal :
JAK2, SH2B3, RAS (~ 30 %) NRAS et KRAS, CBL (~ 10-15 %), FLT3 et NPM1.
- autres mutations :
RUNX1 (~ 15 %) et SETBP1 (~ 15 %)

Patnaik et al. étudient en 2016 (27) la fréquence des diverses mutations retrouvées dans la LMMC sur une cohorte de 175 patients. Il en ressort que les mutations impliquant les gènes TET2, SRSF2, ASXL1 et la voie RAS sont les plus fréquentes. Ils publient par là même la fréquence du nombre de mutations retrouvées chez un même patient. On constate qu'une mutation unique est assez rare et que la majorité des patients de leur cohorte en cumule plusieurs.

Mutation	# of pts w/mutation	% of total patients
ASXL1	82	47%
TET2	80	46%
SRSF2	78	45%
SETBP1	33	19%
RUNX1	25	14%
CBL	25	14%
NRAS	21	12%
U2AF1	14	8%
CEBPA	11	6%
SF3B1	10	6%
ZRSR2	9	5%
TP53	9	5%
DNMT3A	9	5%
IDH2	8	5%
PTPN11	8	5%
SH2B3	8	5%
JAK2	7	4%
NPM1	5	3%
CSF3R	3	2%
IDH1	3	2%
EZH2	2	1%
SUZ12	2	1%
KIT	2	1%
FLT3	1	1%
CALR	1	1%
MPL	0	0%
IKZF1	0	0%
TOTAL PTS = 175		

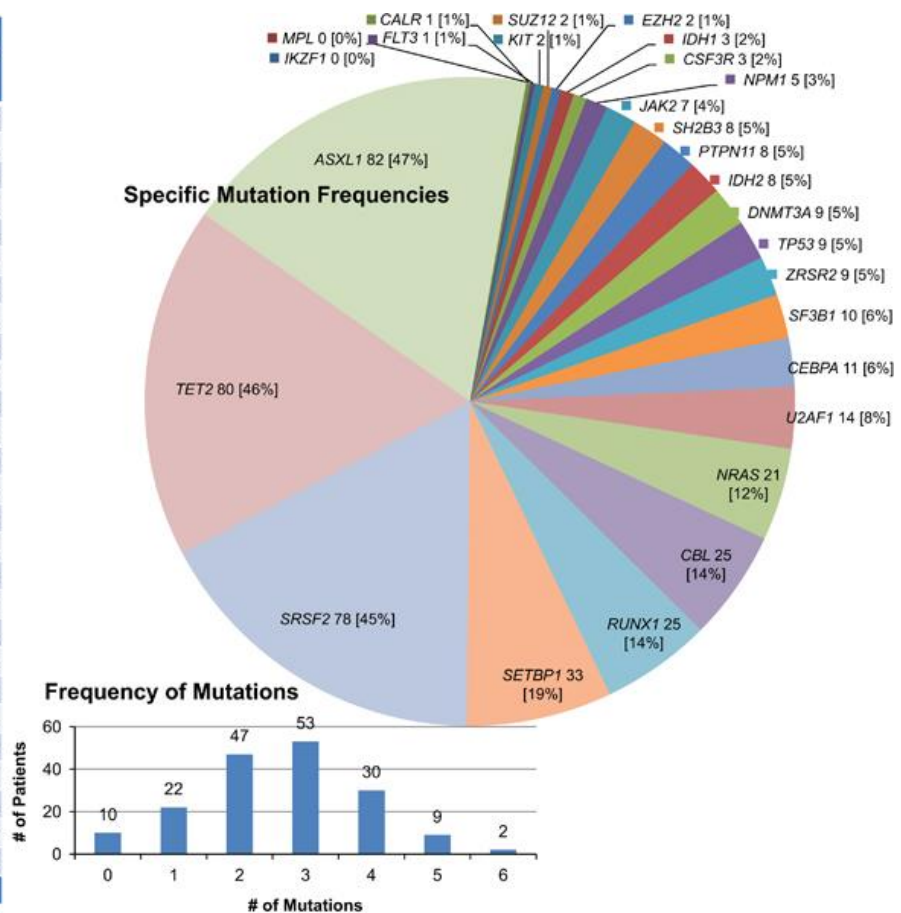


Figure 3 : Spectre des différentes mutations génétiques retrouvées lors d'une étude menée par Patnaik et al.; fréquence de ces mutations et nombre de mutations observées chez un même patient (27).

Dans la littérature, de nombreux auteurs s'accordent donc à dire que les mutations géniques décrites dans la LMMC sont très nombreuses et que certains patients en cumulent plusieurs à la fois. Itzykson et son équipe publient en 2013 une étude portant sur la fréquence des mutations retrouvées dans la LMMC (29). Ils vont plus loin : ils décrivent également la possibilité d'association de plusieurs mutations entre elles ou, a contrario, d'exclusion de deux mutations concomitantes.

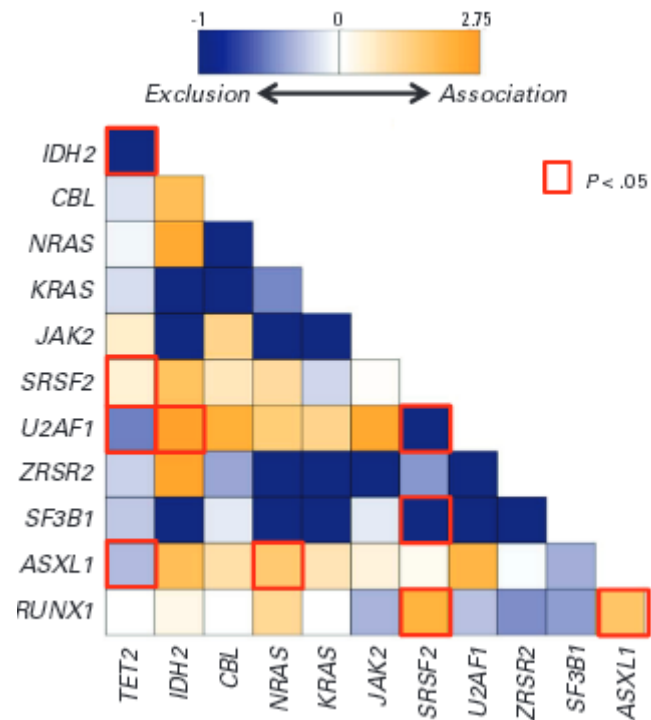


Figure 4 : Carte thermique des associations ou exclusions de mutations génétiques selon Itzykson et al. (29).

En dégradé d'orange : force de l'association ; en dégradé de bleu : force de l'exclusion, mesurées comme la différence relative entre le nombre de cas observés et le nombre de cas attendus pour chaque combinaison de gènes. Les associations ou exclusions significatives selon le test de Fisher sont encadrées en rouge.

Dans leurs travaux parus en 2013, Itzykson et Solary (30), décrivent l'existence potentielle d'un ordre préférentiel quant à l'apparition des mutations à l'origine de l'accumulation de cellules progénitrices. Ces mutations impliqueraient en premier lieu TET2 ou ASXL1 puis une composante de régulation de l'épissage et enfin une mutation dans la transduction du signal.

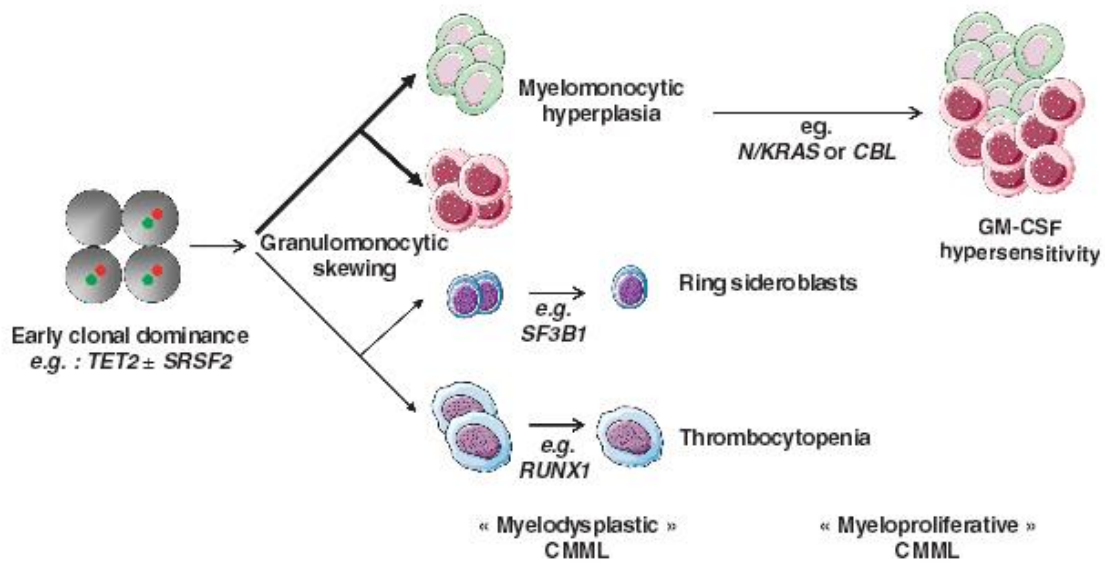


Figure 5 : Schéma établi de l'ordre préférentiel de l'apparition de mutations au cours de la LMMC (30).

Les mutations précoces de *TET2* et *SRSF2* confèrent à la cellule souche une dominance clonale qui lui procure une orientation granulomonocytaire au détriment des lignées érythrocytaires et thrombocytaires.

Les dysplasies érythrocytaires et mégacaryocytaires seront alors dues à des mutations respectives de *SF3B1* ou *RUNX1*. L'addition de mutations dans les gènes de signalisation (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*) va également promouvoir l'expansion des cellules myélomonocytaires définissant la forme myéloproliférative de la maladie.

Malgré ces nombreux travaux de recherches menés ces dernières années et les moyens mis en œuvre, la physiopathologie de la maladie demeure à ce jour mal connue. Un certain nombre d'anomalies cytogénétiques et de mutations génétiques sont décrites sans qu'aucune d'elles, à ce jour, ne puisse expliquer spécifiquement la sémiologie de la maladie.

6. DIAGNOSTIC ACTUEL

6.1. Clinique

La présentation clinique des patients LMMC est variable. Le tableau est généralement hétérogène et peu spécifique. On distingue cependant les patients ayant un phénotype myélodysplasique-like, des patients ayant plutôt un phénotype myéloprolifératif-like.

- Patients LMMC-MD : Ils présentent régulièrement les signes cliniques associés à leurs cytopénies : fatigue à l'effort en cas d'anémie, infections fréquentes en cas de neutropénie, des ecchymoses et risque hémorragique accru en cas de thrombopénie. Une dépendance aux transfusions peut survenir.
- Patients LMMC-MP : Les signes liés à l'hyperleucocytose et aux éventuelles organomégalies peuvent apparaître au premier plan : gêne abdominale due à une hépatomégalie et/ou une splénomégalie, sueurs nocturnes, cachexie avec perte de poids et fatigue (9,22,32).

La LMMC peut rarement se présenter sous forme d'atteinte cutanée initiale. L'infiltrat de la peau est inhabituel ; il est souvent considéré comme un signe de progression ou de transformation de la maladie en leucémie aiguë(33).



Figure 6: Patient atteint de LMMC présentant une infiltration cutanée par des cellules leucémiques (34)

6.2. Biologique

6.2.1. Hémogramme

L'hémogramme et l'analyse cytologique du frottis sanguin sont indispensables au diagnostic comme le précise le Groupe Français des Myélodysplasies (35).

➤ Monocytose

La monocytose est définie par un taux de monocytes circulants supérieur à 0,8 G/L (36,37). Cependant, rappelons que pour le diagnostic de LMMC, une monocytose supérieure ou égale à 1G/L, doit obligatoirement être retrouvée à l'hémogramme.

De nombreuses situations peuvent être à l'origine d'une monocytose périphérique (22):

Elle peut être transitoire :

- Certaines infections virales, fongiques, parasitaires.
- Traitements par corticoïdes ou facteurs de croissance
- Sortie d'aplasie médullaire

Ou persistante :

- Certains troubles chroniques inflammatoires
- Certaines néoplasies

Toutefois, il n'existe pas de liste officielle et exhaustive de causes réactionnelles. Et rappelons que les patients LMMC sont en grande majorité des sujets âgés, pouvant donc présenter de nombreuses comorbidités.

Par ailleurs, les moyens clinico-radio-biologiques mis en œuvre pour éliminer de manière exhaustive les causes de monocytoses réactionnelles demeurent chronophages et coûteux.

Dans la LMMC, les monocytes représentent plus de 10% du contingent leucocytaire (4,38).

Parmi les monocytes, sont à distinguer les monocytes matures et immatures des promonocytes et monoblastes qui, eux, compteront parmi les blastes.

Ainsi, blastes indifférenciés, myéloblastes, monoblastes et promonocytes constitueront la blastose sanguine. Cette dernière ne doit pas excéder 19% des éléments périphériques. En effet, à partir de 20%, le contingent blastique classe la maladie au stade leucémie aiguë. De même, selon la blastose sanguine on distingue (selon la classification OMS 2016 (4)) :

- < 2% : LMMC-0
- de 2 à 4% : LMMC-1
- de 5 à 19% : LMMC-2

➤ Leucocytose

Dans la LMMC, la leucocytose est très variable : de 1 à 100 G/L. Inférieure à 13 G/L la pathologie sera classée en LMMC-MD. Supérieure à 13 G/L, la leucocytose classera la maladie en LMMC-MP.

➤ Signes de dysplasie

On retrouve régulièrement sur le frottis sanguins, des signes de dysplasie (voir photographies : figures 8,9 et 10) sur la lignée granuleuse avec une hypogranulation ou dégranulation des PNN ainsi que des formes à noyau hyposegmenté type Pelger. On peut également retrouver quelques points de myélémie (métamyélocytes et myélocytes) présentant le plus souvent les mêmes signes de dysplasie. Les anomalies morphologiques retrouvées sur ces différentes

cellules (PNN, métamyélocytes, myélocytes, monocytes, promonocytes, monoblastes) peuvent rendre très difficile la réalisation de la formule sanguine.

Lorsque les signes de dysplasie ne sont pas observés à l'hémogramme ou au myélogramme, une anomalie cytogénétique ou mutation génétique devra être retrouvée pour affirmer le diagnostic ; et, à défaut, la persistance de la monocytose en l'absence de toute autre cause permettra d'établir le diagnostic.

➤ Autres données de l'hémogramme

Une anémie et une thrombopénie sont retrouvées de manière inconstante. L'anémie est présente dans 50 à 60% des cas avec une hémoglobine > 10g/dL dans 2/3 des cas. La thrombopénie est retrouvée dans 40% des cas avec une numération plaquettaire > 100 G/L dans 2/3 des cas. Une érythroblastémie est retrouvée dans 20% des cas (39).

En moyenne, au moment du diagnostic, on retrouve une leucocytose à 14.2 G/L (2.6 à 153 G/L), une anémie à 10.6 g/dL (5.8 à 16.3 g/dL) normo ou macrocytaire et des plaquettes à 96 G/L (6 à 820G/L) (8).

Tableau 5 : Numération moyenne des patients LMMC au diagnostic selon Tang et al. (8) (sang périphérique)

Paramètre	Moyenne au diagnostic
Hémoglobine	10,6 g/dL
Plaquettes	96 G/L
Leucocytes	14,2 G/L

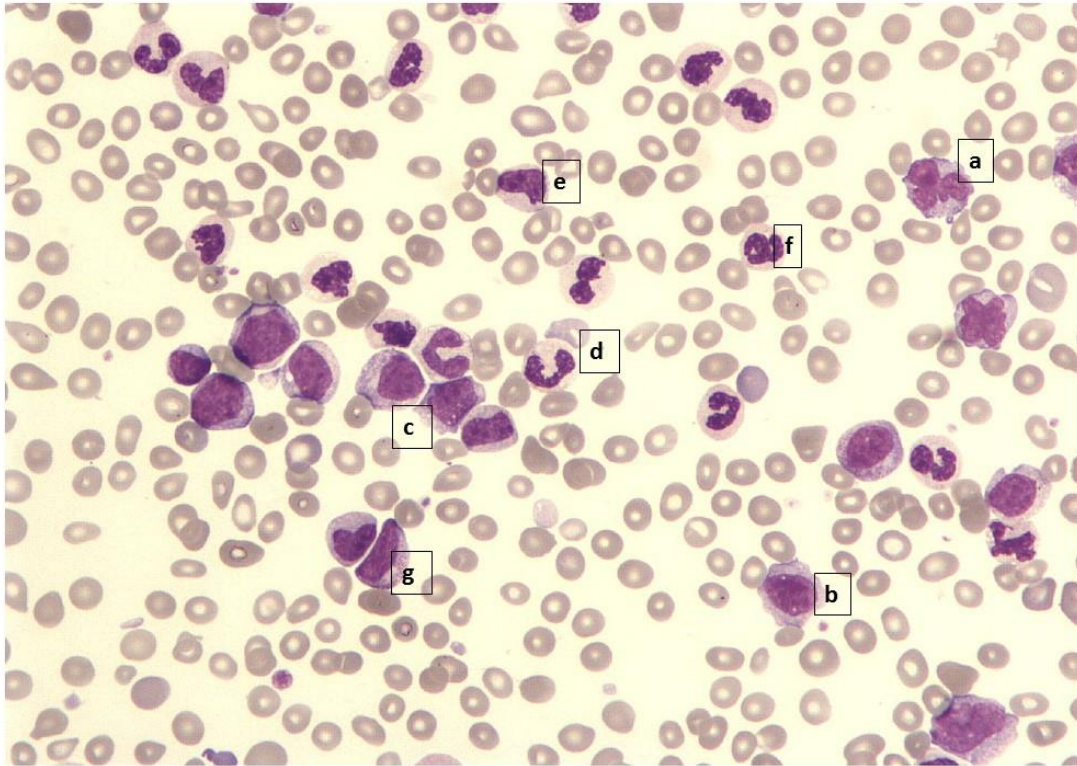


Figure 7 : Sang de patient LMMC x500

a : monocyte ; b : monocyte immature ; c : monoblaste ; d : PNN dégranulé ; e : métamyélocyte ; f : PNN avec hypercondensation chromatinienne ; g : myélocyte

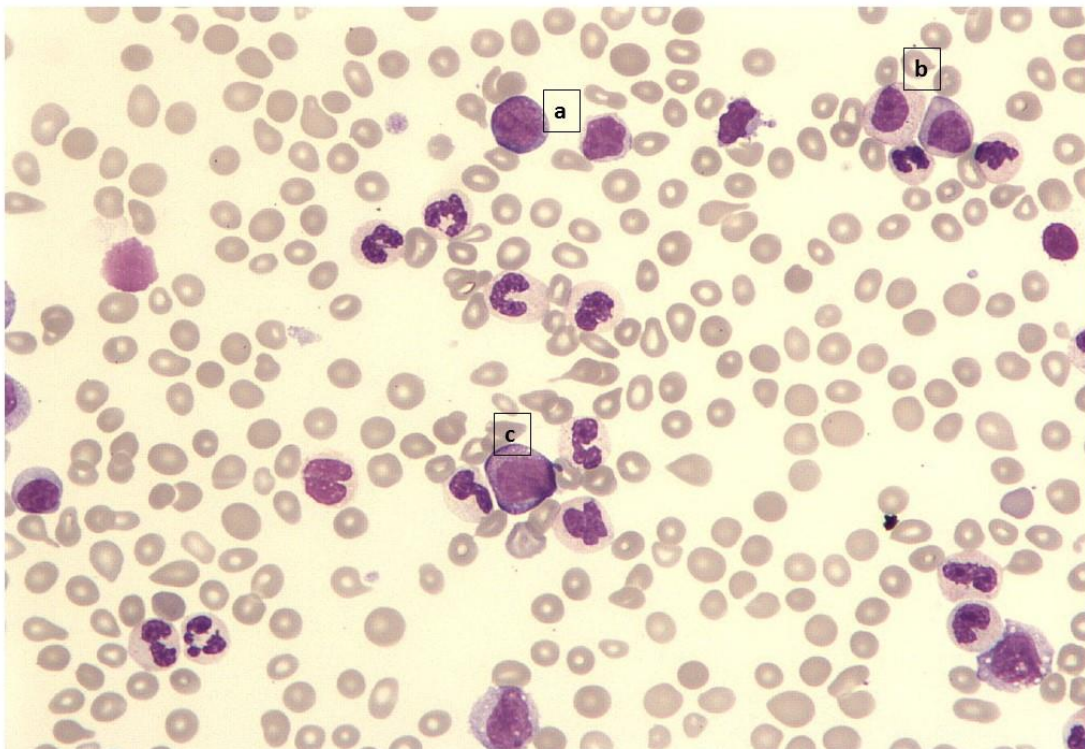


Figure 8 : Sang de patient LMMC x500

a : monoblaste ; b : PNN pseudo-Pelger ; c : promonocyte

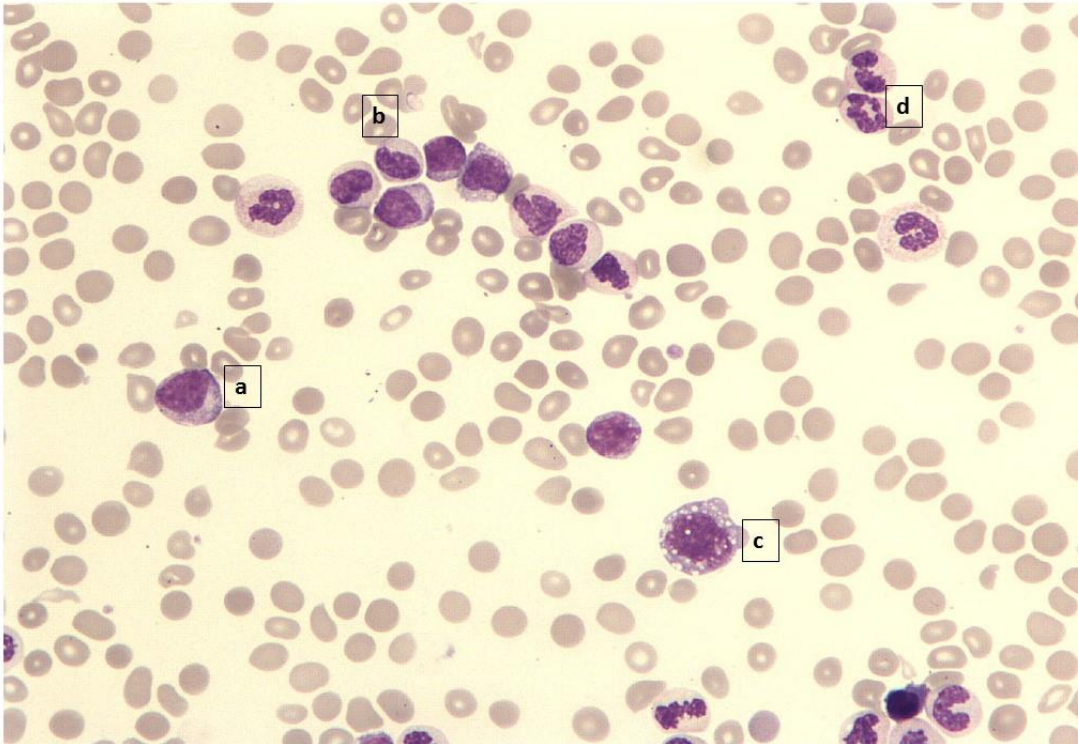


Figure 9 : Sang de patient LMMC x500

a : myélocyte présentant une dysgranulation ; b : PNN dégranulé ; c : monocyte ; d : PNN avec hypercondensation chromatinienne

6.2.2. Myélogramme

Le myélogramme devrait être réalisé de manière systématique devant la suspicion de LMMC. Il permettra de conforter le diagnostic et de classer la maladie. Il permettra également de réaliser un caryotype qui conditionnera alors le pronostic de la maladie.

On observe, le plus souvent, une moelle de densité augmentée ou normale. La lignée granuleuse est largement représentée avec une dysgranulopoïèse significative, identique à celle retrouvée en périphérie : hypogranulation ou dégranulation, noyaux présentant une hyposegmentation avec des formes pseudo-Pelger, hypercondensation chromatinienne, asynchronisme nucléo-cytoplasmique. Les lignées mégacaryocytaire et érythroblastique peuvent présenter des signes de dysplasie mais restent en général d'apparence conservée. Lorsqu'elles sont présentes, on peut alors retrouver une dysmégacaryocytopoïèse avec des noyaux hypolobés ou monolobés, ou des noyaux séparés ainsi qu'une dysérythropoïèse avec présence de mégaloblastes, caryorrhéxis et anomalies nucléaires.

Bien qu'on observe le plus souvent une hyperplasie monocytaire médullaire (plus de 5% des éléments), un contingent monocytaire limite n'est pas défini dans la moelle, contrairement au sang périphérique (10%). Au niveau médullaire, la prolifération myéloïde associée aux signes de dysgranulopoïèse rendent difficile la distinction entre monocytes et précurseurs granuleux. Afin de surmonter cette difficulté cytologique, il était jusqu'alors préconisé d'effectuer une coloration cytochimique des butyrates estérases qui colorent spécifiquement les éléments médullaires de la lignée monocytaire (38). A l'heure actuelle, on réalise un immunophénotypage des cellules de la moelle osseuse, qui permet de mieux séparer les cellules de la lignée granuleuse de celles de la lignée monocytaire (4). Enfin, la blastose médullaire, pareillement à celle du sang, comprend : blastes indifférenciés, myéloblastes, monoblastes et promonocytes. Son évaluation, mal aisée, est pourtant primordiale pour établir le stade de la LMMC.

- LMMC-0
 - Sang périphérique : < 2% de blastes
et
 - Moelle osseuse : < 5% de blastes

- LMMC-1
 - Sang périphérique : 2% à 4% de blastes
et/ou
 - Moelle osseuse : 5% à 9% de blastes

- LMMC-2
 - Sang périphérique : 5% à 19% de blastes
et/ou
 - Moelle osseuse : 10% à 19 % de blastes
et/ou
 - Présence de corps d'Auër

On rappellera qu'en présence de plus de 20% de blastes, la maladie sera classée en leucémie aiguë.



Figure 10 : Moelle osseuse de patient LMMC x100

a : mégacaryocyte monolobé

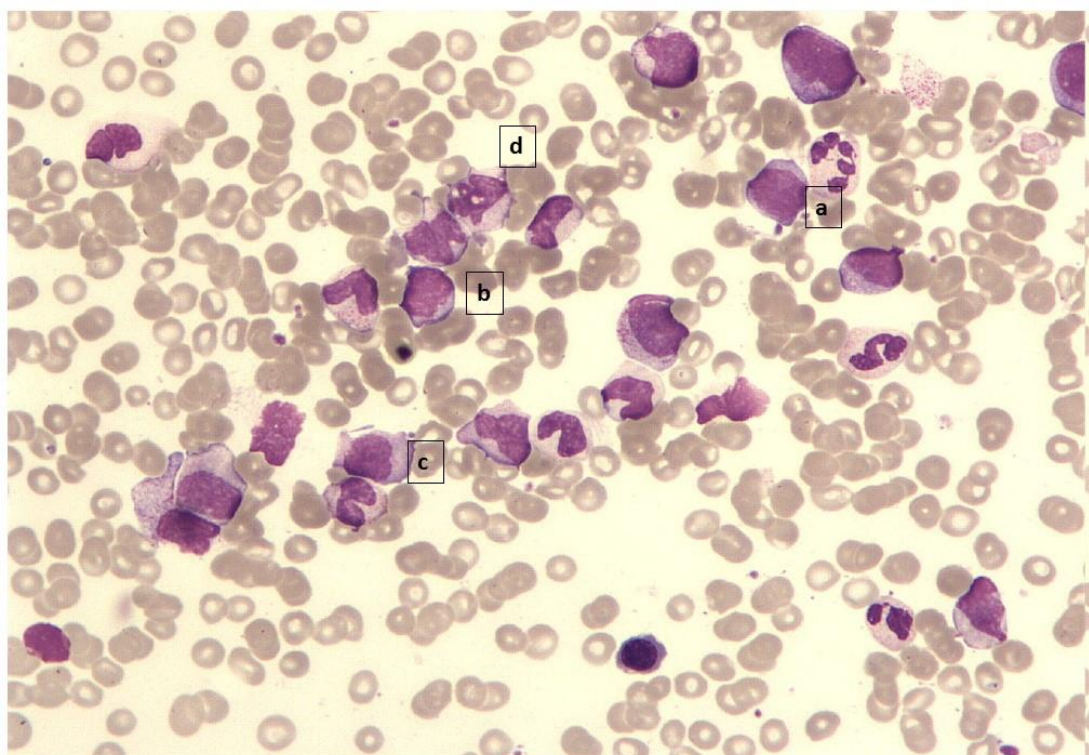


Figure 11 : Moelle osseuse de patient LMMC x500

a : blaste ; b : monoblaste ; c : promonocyte ; d : PNN dégranulé

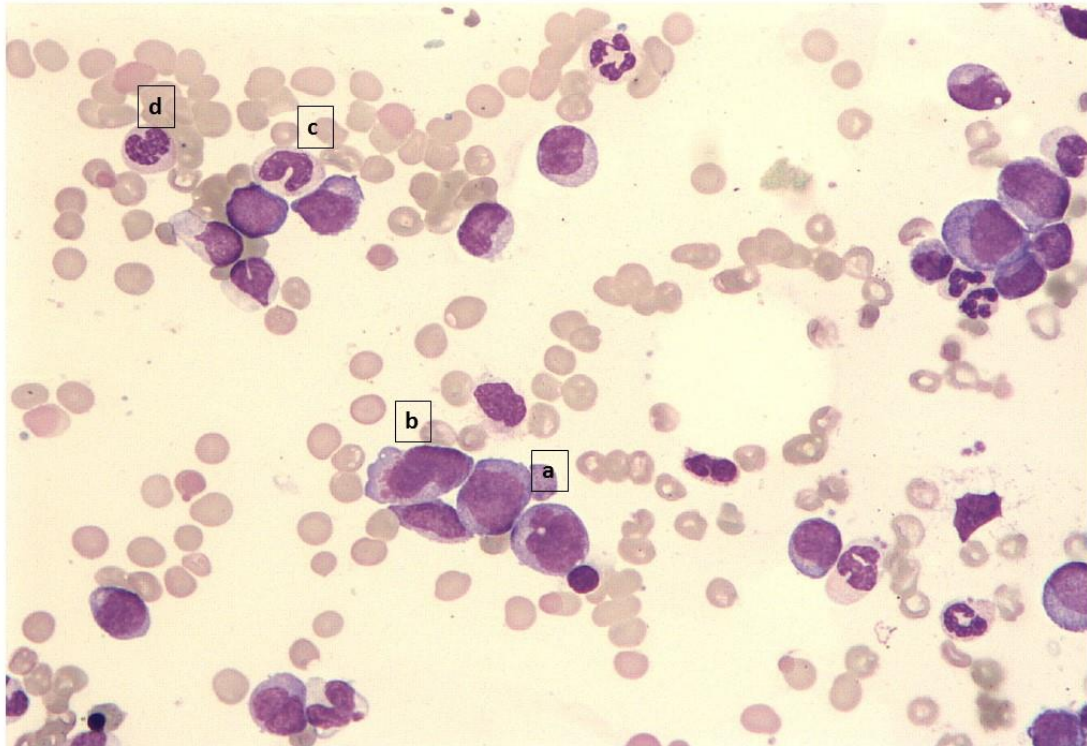


Figure 12 : Moelle osseuse de patient LMMC x500

a : monoblaste ; b : myéloblaste dystrophique ; c : métamyélocyte dégranulé ; d :PNN avec hypercondensation chromatiniene et dégranulé

6.2.3. Biopsie ostéo-médullaire

Bien plus pratiquée dans les pays anglo-saxons qu'en France, la biopsie ostéo-médullaire (BOM) n'est pas réalisée en première intention devant une suspicion de LMMC ou de SMD. Elle sera effectuée en cas de moelle pauvre ou d'aspiration difficile : lors de fibrose médullaire. On peut en effet mettre en évidence une fibrose médullaire sur BOM dans près de 30% des cas, selon les travaux d'Orazi et Germing (40) ; celle-ci peut être présente de manière locale ou plus étendue.

Dans les cas de LMMC, on observe une moelle de densité augmentée le plus souvent, présentant les signes de dysmyélopoïèse déjà décrits. Des nodules monocytiques peuvent être mis en évidence par un marquage immuno-histochimique par anticorps anti-CD123. Ils sont spécifiques de la pathologie mais présents seulement dans 20 à 40% des cas (38).

6.2.4. Caryotype

Le caryotype devrait être systématique devant toute suspicion de LMMC. Bien qu'aucune anomalie génétique ne soit spécifique de la maladie, comme mentionné précédemment, la mise en évidence d'une de ces anomalies contribue fortement au diagnostic (4). Seulement 20 à 30% des patients atteints de LMMC présentent une anomalie au caryotype au diagnostic initial (22,23).

Malgré son manque de spécificité, le caryotype joue un rôle pronostique important, puisqu'il fait partie des critères retenus pour certains scores pronostiques tels que l'IPSS ou le CPSS. Devant l'apparition de signes d'évolutivité de la maladie, il est important de refaire un myélogramme et un caryotype médullaire ; l'apparition d'anomalies surajoutées étant un marqueur d'évolution vers une leucémie aiguë (35).

6.2.5. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire est utilisée en premier lieu pour exclure certaines pathologies.

En effet, pour établir un diagnostic de LMMC, il faut remplir certains critères selon l'OMS (4): la recherche du réarrangement BCR-ABL, spécifique de la leucémie myéloïde chronique, doit être négative. Les diagnostics de MFP, PV et TE doivent, eux aussi, être écartés. Cela dit, des mutations JAK2 et CALR sont décrites dans la LMMC (27). Les réarrangements PDGFRA et B, spécifiques de néoplasies myéloïdes avec hyperéosinophilie, doivent également faire l'objet d'une recherche lorsqu'une hyperéosinophilie est détectée. Elle doit dans ce cas être négative. Quant aux mutations génétiques identifiées chez les patients atteints de LMMC, il en existe un grand nombre sans qu'aucune d'elles ne soit spécifique de la maladie. En effet, comme vu précédemment, elles sont observées dans 90% des cas de LMMC. Elles sont mises en évidence par un examen réalisé dans des laboratoires très spécialisés où les techniques de NGS (Next-Generation Sequencing) sont le plus souvent mises en œuvre. Un panel élargi de 50 gènes est utilisé : panel commun aux leucémies aiguës et SMD (35).

Leur manque de spécificité les exclut des critères diagnostiques (23,27,28). En revanche, les mutations les plus fréquemment retrouvées dans la LMMC font de plus en plus souvent l'objet d'une recherche, apportant une indication pronostique à la maladie (41).

Une étude menée sur 409 patients LMMC par Patnaik et Tefferi. (Bood, 2016 (31), cf. ci-dessous) fait le lien entre anomalie cytogénétique, mutations et scores pronostiques.

Tableau 6 : corrélation entre anomalies cytogénétiques et mutations (31).

<i>Cytogenetic abnormality</i>	<i>Frequency</i>	<i>ASXL1 mutational frequency</i>	<i>SETBP1 mutational frequency</i>	<i>SRSF2 mutational frequency</i>	<i>U2AF1 mutational frequency</i>	<i>SF3B1 mutational frequency</i>	<i>Spanish cytogenetic risk stratification</i>	<i>Mayo-French cytogenetic risk stratification</i>
+8	~23%	~24%	0%	~27%	0%	0%	High risk	Intermediate risk
-Y	~20%	~12% (SS)	~40%	~16%	0%	~9%	Low risk	Low risk
-7/7q-	~14%	~14%	~40%	~11%	40%	0%	High risk	Intermediate risk
20q-	~8%	~10%	0%	~11%	0%	0%	Intermediate risk	Intermediate risk
der(3q)	~8%	~2% (SS)	0%	~3%	20%	45% (SS)	Intermediate risk	Low risk
+21	~8%	~10%	0%	~5%	20%	0%	Intermediate risk	Intermediate risk
Complex and monosomal karyotypes (MK)	~10%	~4%	~20%	~8%	~40% (SS)	0%	Complex high risk. MK not included in stratification	High risk

Les données moléculaires participent au pronostic de la maladie et à sa prise en charge thérapeutique (41). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucun modèle pronostique intégrant cytogénétique et anomalies moléculaires. De même, aucune recommandation d'experts ne propose de panel précis à rechercher au moment du diagnostic.

6.2.6. Biochimie

Il n'existe pas de marqueurs biochimiques spécifiques des leucémies.

Le dosage des LDH peut se montrer élevé dans les LMMC (11,24). Il peut rentrer comme critère dans certains scores, notamment le score de Dusseldorf 1992 (42). Il est également abordé plus récemment, par Such et al. (Blood, 2013), dans le score CPSS (43). Il y est décrit une corrélation entre le dosage sérique des LDH et la leucocytose (classification FAB 1994 (5)) et une absence de corrélation avec la blastose sanguine et médullaire (classification OMS 2008). Dans une étude plus récente, Schuler et al. 2014 (12), montrent que les taux de LDH sont significativement différents entre les groupes LMMC-MD et LMMC-MP pour les catégories de LMMC-1 et LMMC-2 (absence de différence significative au sein du groupe LMMC-0). Cela nous ramène à la corrélation établie lors du score CPSS entre dosage sérique des LDH et leucocytose. Cependant, il n'a pas été rapporté de relation entre dosage sérique des LDH et la

médiane de survie(43). De ce fait, ce paramètre ne sera finalement pas retenu dans le score CPSS.

De même, le dosage de la $\beta 2$ microglobuline peut être augmenté.




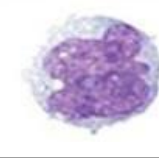

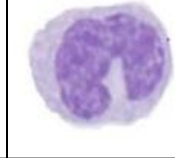
LDH et $\beta 2$ microglobuline sont toutes deux le reflet de la masse tumorale, puisque leur dosage augmente lors du phénomène de lyse cellulaire.

6.3. Place de l'immunophénotypage dans la LMMC

6.3.1. Immunophénotypage des monocytes

L'identification des cellules de la lignée monocyttaire par cytométrie en flux (CMF) est principalement basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de lignée. Cependant, seulement quelques-uns sont vraiment spécifiques de la lignée et encore moins sont spécifiques à un stade de maturation donné. Par conséquent, la caractérisation précise de la cellule nécessite des combinaisons de plusieurs marqueurs, appelés panels. Les monocytes circulants matures sont classiquement caractérisés par leur expression du CD14, généralement considéré comme un marqueur spécifique des monocytes classiques, ainsi que les CD13, CD33, CD11b, CD18, CD4, et CD64. Chacun de ces marqueurs correspond aux différentes fonctions des monocytes. D'autres marqueurs fournissent des informations sur leurs capacités d'adhérence (par exemple, des intégrines, CD54 (ICAM-1), CD49d (VLA-1 a)), l'état d'activation (par exemple CD68, CD69 et HLA-DR), l'activation des lymphocytes T (par exemple CD70, CD80, CD86), les chimiokines récepteurs CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 et régule la migration des cellules monocytaires (16).

Tableau 7 Expression phénotypique des antigènes durant la maturation de la lignée monocyttaire. Les différentes protéines seront exprimées selon le stade de maturation du monocyte (10).

Cellule souche hématopoïétique multipotente	Progéniteur myéloïde commun	Progéniteur granulomonocyttaire	Monoblaste	Promonocyte	Monocyte
	CD34+CD38- CD90+CD45RA	CD34+CD38+CD45RA +CD4-CD15-CD123+	CD34+CD4+CD33+	CD34-CD4+CD33+	CD34-CD4+CD33+
					
CD4		-	-/+	+	+
CD11b		-	-	++	+++
CD13		++	++	+ / ++	++ / +++
CD14		-	-	+ / ++	+++
CD15		-	-	++	+
CD16		-	-	-	- / +
CD33		+++	+++	+++	+++
CD34		+ / ++	+	-	-
CD36		-	-	++	+++
CD45		-	+	++	+++
CD64		++	-	++	+++
HLADR		++	++	+++	++ / +++

6.3.2. Immunophénotypage des monocytes sanguins

❖ Un rôle dans la classification

Il apparaît dans la dernière classification OMS 2016 (4) que l'immunophénotypage (IP) trouve une place officielle dans la mise en œuvre du diagnostic de LMMC au même titre que la cytogénétique ou la biologie moléculaire. En effet, la différence cytologique étant parfois difficile à réaliser entre monocytes, promonocytes et métamyélocytes dysplasiques, l'IP apporte une aide au diagnostic. D'une part, l'évaluation quantitative du contingent monocyttaire est plus précise, d'autre part, les différents marqueurs permettent une meilleure appréciation de la blastose de par l'identification plus aisée des promonocytes.

❖ Un rôle potentiel dans le diagnostic

Une récente étude menée par Selimoglu et son équipe de travail (Blood, 2015 (1)), étudie les proportions des différentes sous-populations monocytaires dans la LMMC.

Comme l'a approuvé le comité de nomenclature internationale des sociétés immunologiques, on distingue 3 sous-ensembles (14) :

- Monocytes classiques CD14+/CD16-
- Monocytes intermédiaires CD14+/CD16+
- Monocytes non classiques CD14^{low}/CD16+

A noter : le CD14 est un co-récepteur du LPS bactérien et le CD16 est un récepteur de faible affinité pour les IgG (Fcγ-III receptor).

Les monocytes dits « classiques » sont décrits comme ayant une forte capacité de phagocytose et la faculté, après activation, de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL1 et IL6). Ils expriment un haut niveau de CCR2 et un bas niveau de CX3CR1. Les monocytes dits « intermédiaires » et « non classiques » ont quant à eux des propriétés inflammatoires augmentées (forte capacité à sécréter plus de cytokines pro-inflammatoires) et produiraient aussi de l'IL 10 (qui régule la réponse inflammatoire). Ils expriment un bas niveau de CCR2 et un haut niveau de CX3CR1.

L'identification des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux utilise une stratégie de fenêtrage d'exclusion. Les sous-populations monocytaires ciblées sont étudiées cytologiquement et ne mettent en évidence que des monocytes, la population double négative CD14⁻ CD16⁻ n'étant, elle, pas constituée de monocytes.

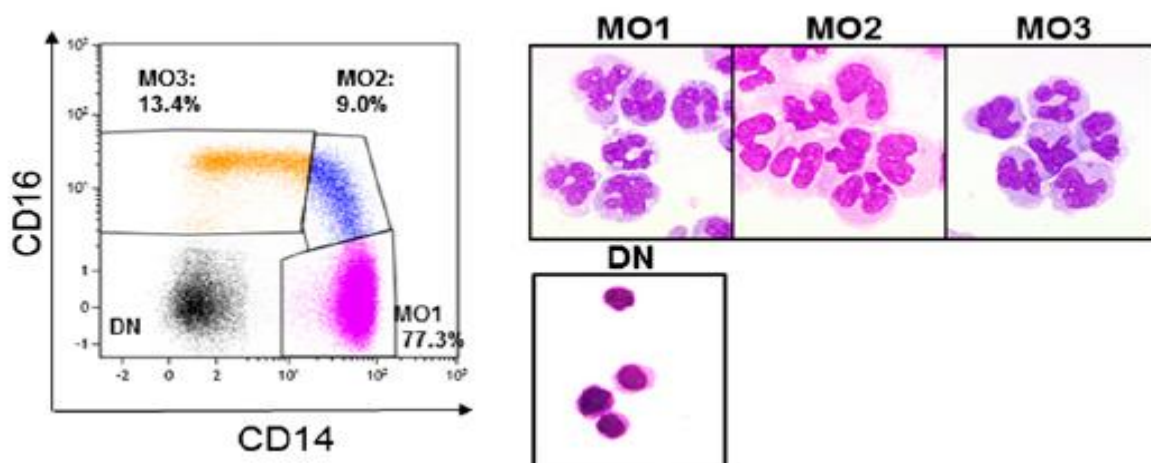


Figure 13 : Sous-populations monocytaires en cytométrie en flux

MO1 : Monocytes classiques, MO2 : Monocytes intermédiaires, MO3 : Monocytes non classiques, DN : Doubles Négatifs ; et leur aspect cytotologique

Il apparait dans leurs travaux que, dans la LMMC, la sous-population de monocytes classiques est augmentée (atteignant 96,6% dans la cohorte d'essai avec un écart-type à 1,7% et un seuil de significativité de 95%) ; et que les sous-populations de monocytes intermédiaires et non classiques sont diminuées.

Une analyse ROC sur la cohorte d'essai démontre que l'utilisation du pourcentage de monocytes classiques peut fortement aider au diagnostic de LMMC.

Dans cette étude, une valeur seuil à 94% est déterminée. Si le pourcentage se trouve au-dessus de ce seuil alors le patient pourra être classé en LMMC (Sensibilité 90,6% et spécificité 95,1% dans la cohorte d'essai).

Le diagnostic de LMMC était basé jusque-là sur une élévation de la monocytose périphérique de plus de 1G/L sur plus de trois mois (3). En ciblant les patients répondant à ce critère, le seuil utilisé de 94% retrouve une spécificité de 100% et une sensibilité de 90,4%.

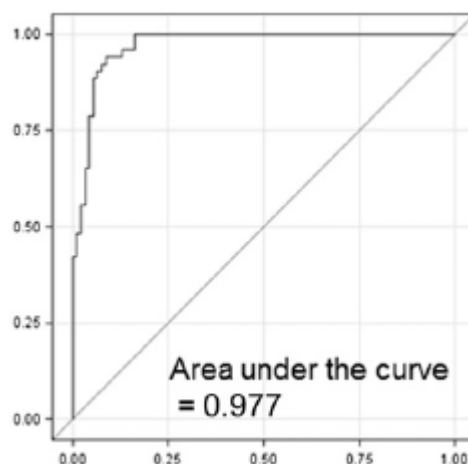


Figure 14 : Courbe analytique ROC de la sensibilité et spécificité du pourcentage de monocytes classiques sur un panel de patients LMMC étudié (1).

6.3.3. Immunophénotypage des monocytes médullaires

Comme dans le sang, l'immunophénotypage médullaire représente une aide à la cytologie notamment dans l'évaluation de la blastose et donc dans la classification de la maladie.

D'autre part, certains marqueurs peuvent être exprimés par les monocytes de manière aberrante dans la LMMC. Le CD56 est le marqueur aberrant le plus fréquemment rencontré.

Toutefois, il peut aussi être présent sur les monocytes des leucémies aiguës monocytaires (44). Le CD56 peut également être exprimé par les monocytes de régénération (45) ou lors de fortes monocytoses réactionnelles (46).

D'autres marqueurs peuvent être retrouvés de manière aberrante comme le CD2, qui lui, lorsqu'il est présent, sera davantage caractéristique de la LMMC puisqu'il ne sera pas retrouvé sur les monocytes de leucémies aiguës. De même, les monocytes de la LMMC peuvent avoir une sous-expression des CD13, CD14, CD15, CD36 ou HLA-DR. Ces aberrations ne sont pas systématiques ; de même, elles ne sont pas toujours uniques : au contraire les monocytes des patients atteints de LMMC peuvent en cumuler plusieurs (46).

Tableau 8 : expressions phénotypiques de monocytes de patients LMMC dans la moelle osseuse.

	Gorczyca et al. 2004 (47)	Xu et al. 2005 (46)	Kern et al. 2011 (44)	Shen et al. 2015 (7)
expression aberrante CD56	56	80	82	38 (>25% de monocytes)
expression aberrante CD2	34	-	21	8 (>20% de monocytes)
expression aberrante CD7	-	-	0,7	-
CD13 diminué ou non exprimé	-	15	11	-
HLA-DR diminué ou non exprimé	-	50	4	45
CD64 diminué	-	-	-	44
CD14 diminué	-	65 (>20% de monocytes)	-	29
CD15 diminué	-	5	-	-
CD36 diminué	-	5	-	-
CD45 diminué	-	-	-	66

Tous s'accordent à dire qu'aucune de ces aberrations n'est spécifique de la pathologie.

Xu et al. affirment toutefois dans leur étude (46), que l'expression de deux marqueurs aberrants couplée à la diminution d'expression d'un marqueur monocyttaire (CD14 notamment, pour plus de 20% des monocytes) chez un patient présentant une monocytose, serait caractéristique de la LMMC, avec une sensibilité de 67%.

Ainsi avant la publication de Selimoglu et al., les immunophénotypages médullaires et sanguins ne participaient pas au diagnostic de LMMC.

7. SCORES PRONOSTIQUES

7.1. Cliniques et biologiques

De nombreux modèles pronostiques ont tenté de stratifier le risque des patients atteints de LMMC. Longtemps classée parmi les SMD, la LMMC ne bénéficiait pas de son propre système de score pronostic. En effet, une vingtaine d'études sur les SMD, y intégrant la LMMC, parurent dans le courant des années 80. On y retrouve les scores de Bournemouth, de Spanish, de Lille, de Düsseldorf (42,48–50). Toutes ces études montraient des médianes de survie très variables du fait de la mauvaise classification de la pathologie, des critères de diagnostic évoluant et du manque de spécificité des études vis-à-vis de la maladie. On s'intéressera donc surtout aux scores spécifiques de la LMMC.

Une étude menée par Calvo et son équipe (51) vise à comparer 3 scores pronostiques que sont le MDAPS : MD Anderson prognostic score (52), le CPSS : CMML-specific prognostic scoring system (43) et le MAYO prognostic model (53). Le but étant en premier lieu de vérifier la concordance entre ces trois scores grâce à une cohorte de 146 patients atteints de LMMC. En second lieu, l'objectif est de tirer profit de l'utilité de chacun afin d'établir la meilleure discrimination possible entre les patients de haut et faible risques. Il en ressort une légère supériorité du CPSS quant à l'évaluation de la survie globale et du risque d'acutisation en leucémie aiguë. De plus, en regroupant les paramètres évalués dans les 3 scores, après étude multivariée, il apparaît que les meilleurs paramètres évaluateurs sont ceux qui constituent le CPSS (leucocytose, blastose, caryotype et dépendance aux transfusions).

7.1.1. Score CPSS

Such et son équipe publient en 2013 ce nouveau score pronostic : CMML-specific prognostic scoring system (43). Ce score est basé sur l'étude d'un large registre de data européennes (558 patients atteints de LMMC diagnostiquée entre 1980 et 2010).

Les quatre paramètres pris en compte sont :

- La classification selon la FAB 1994: LMMC-MD ou LMMC-MP (leucocytose inférieure ou supérieure à 13G/L)
- La classification des patients selon l'OMS 2008 : LMMC-1 ou LMMC-2 (blastose)

- Le caryotype :
 - Favorable : -Y
 - Défavorable : trisomie 8, anomalie du chromosome 7, caryotype complexe (>3 anomalies)
 - Intermédiaire : tous les autres caryotypes
- Dépendance à la transfusion en CGR : définie par une transfusion toutes les 8 semaines sur au moins 4 mois.

Tableau 9 : Système de score défini par les 4 variables du score CPSS selon Such et al (Blood, 2013) (43)

Variables pronostiques	POINTS		
	0	1	2
Classification FAB 1994	LMMC-MD	LMMC-MP	-
Classification OMS 2008	LMMC-1	LMMC-2	-
Caryotype	Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Dépendance aux transfusions de CGR	Non	Oui	-

Ce score classe les patients en 4 catégories de risque :

Tableau 10 : Classification des patients en groupe de risque selon leur score CPSS ; probabilité de transformation en LA à 2 ans et médiane de survie.

score	Groupe de risque	Probabilité de transformation en LA à 2 ans (%)	Médiane de survie (mois)
0	Faible	7	72
1	Intermédiaire-1	14	31
2-3	Intermédiaire-2	37	13
4-5	Elevé	73	5

Dans cette même étude les auteurs échantent la variable « dépendance aux transfusions » par le taux d'hémoglobine. Il n'a pas été rapporté de différence significative, cependant ceux-ci préfèrent conserver la variable « dépendance aux transfusions » du fait qu'elle tienne compte à la fois du taux d'hémoglobine, mais aussi du poids et de l'âge du patient, de ses comorbidités et des symptômes liés à l'anémie.

Dans l'étude menée par Calvo et al. sur la pertinence des scores (51) , il apparaît que le score CPSS est plus robuste lorsqu'il est associé à la valeur des plaquettes (supérieures ou inférieures à 100G/L). Il est alors appelé CPSS-P. Et la preuve en est faite avec l'expérience, puisqu'il s'agit de ce modèle-là qui est utilisé dans les études qui lui sont postérieures.

7.1.2. Score IPSS

En 2012, Greenberg et son équipe publient le score IPSS-R (54), amélioration de leur précédent score IPSS publié en 1997 (55). L'étude se base sur les données de 126 patients atteints de LMMC (parmi une cohorte de 816 patients atteints de SMD).

Le plus récent, l'IPSS-R, tient compte de 5 variables :

- Le caryotype : classé en 5 groupes pronostiques
 - Très favorable : -Y ; del(11q)
 - Favorable : normal ; del(5q) ; del(12p) ; double anomalie associée à del(5q)
 - Intermédiaire : del(7q) ; trisomie 8 ; trisomie 19 ; autres anomalies non classées parmi les précédentes ou les suivantes
 - Défavorable : monosomie 7 ; inv(3)/t(3q)/del(3q), double anomalie associée à -7/del(7q), 3 anomalies
 - Très défavorable : > 3 anomalies
- la blastose médullaire
- l'hémoglobine
- les plaquettes
- les PNN

Tableau 11 : Système de points défini par les 5 variables du score IPSS-R (54)

Variable pronostique \ Points	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Caryotype	Très favorable	-	favorable	-	Intermédiaire	défavorable	Très défavorable
Blastose médullaire (%)	≤2	-	2-5	-	5-10	>10	-
Hémoglobine (g/L)	≥10	-	8-10	<8	-	-	-
Plaquettes (G/L)	≥100	50-100	-	-	-	-	-
PNN (G/L)	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-

Afin de statuer sur le risque (très faible, faible, intermédiaire, élevé et très élevé), les auteurs proposent de se référer à un abaque qui tient compte du score précédent mais aussi de l'âge du patient, 70 ans étant l'âge médian de leur cohorte (c'est aussi l'âge médian au diagnostic).

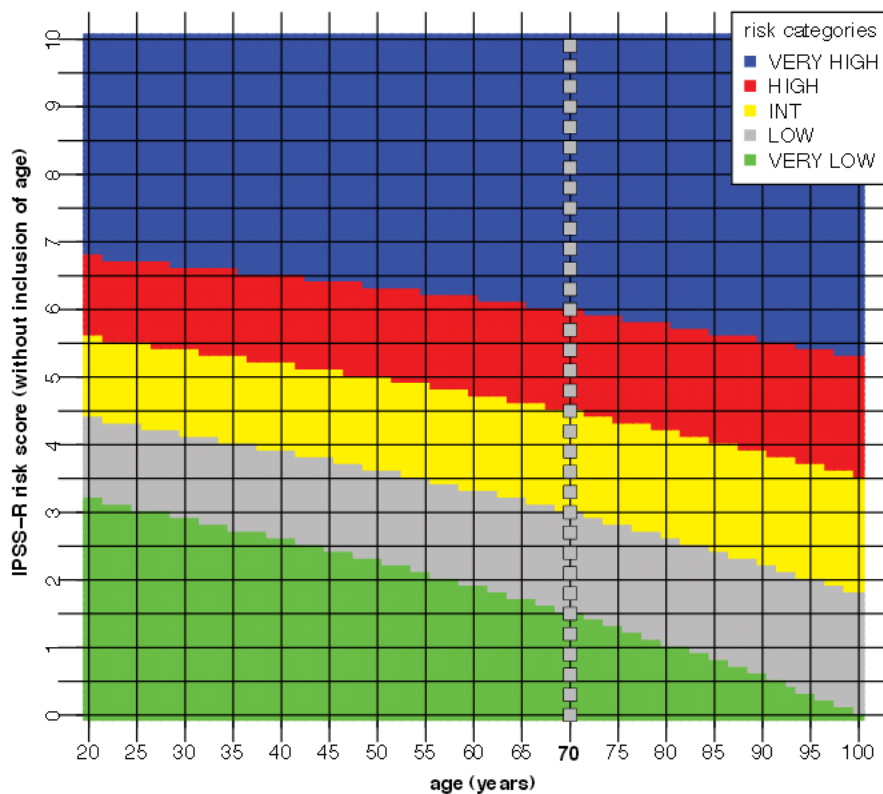


Figure 15 : Abaque évaluant le groupe de risque des patients en fonction de l'âge et du score IPSS-R (54).

Tableau 12 : Médiane de survie et délai médian de 25% de transformation en LAM selon le risque des patients classés selon l'IPSS-R

	Très faible	faible	intermédiaire	élevé	Très élevé
Médiane de survie (années)	9.3	6.3	3.4	1.2	0.6
Délai médian de 25% de transformation en LAM (années)	NR	NR	2.4	0.8	0.6

Le score IPSS est la référence en termes de classification pronostique pour les syndromes myélodysplasiques. Cependant, pour la LMMC, ce score ne tient pas compte des patients ayant une leucocytose supérieure à 12G/L, ce qui constitue sa principale limite. Il est toutefois le premier score spécifique de la LMMC à considérer le caryotype dans ses variables et reste actuellement le plus largement utilisé en pratique courante. Il s'agit du score pratiqué dans les CHU en France à ce jour pour les LMMC.

7.2. Pronostic moléculaire

Comme évoqué plus haut, Itzykson et son équipe publient en 2013 une étude (29) qui porte sur l'analyse du spectre et de la valeur pronostique des mutations portées sur 19 gènes dans une série de 312 patients atteints de LMMC. Leur analyse confirme la valeur pronostique défavorable d'une forte leucocytose, de l'anémie, de la thrombopénie, des taux de monocytes et lymphocytes élevés, de l'excès de blastes dans la moelle et de la présence de myélémie. Elle ajoute à cela la présence d'aberrations cytogénétiques. Il ressort de cette étude que la mutation ASXL1 (fréquente à plus de 40%) semblerait être de mauvais pronostic. De même les mutations de RUNX1, NRAS et CBL seraient défavorables, contrairement à TET2 (fréquente à hauteur de 58%) qui, elle, apparaît comme étant de bon pronostic. Ne seront cependant retenues dans ce score que les mutations du gène ASXL1.

Ces mutations associées à l'âge, l'hémoglobine, la leucocytose, le nombre de plaquettes, sembleraient constituer un score plus discriminant que les scores basés sur les paramètres cliniques seuls.

Cependant à l'heure actuelle, une recherche par biologie moléculaire pour étude de mutations n'est pas effectuée de manière systématique et aucune recommandation n'est clairement établie par des groupes d'experts. Mais, en effet, on pourrait imaginer un score tenant compte des paramètres précédemment décrits, du caractère MD ou MP de maladie et d'un panel de mutations à l'impact pronostique avéré.

8. THERAPEUTIQUES

Il n'existe pas à l'heure actuelle de critères factuels clairement établis par les sociétés savantes quant à la prise en charge thérapeutique des patients LMMC. Cela tient du fait que la maladie a longtemps été considérée comme un sous ensemble des SMD. Une revue de la littérature nous permet de faire le point sur les traitements et recommandations.

8.1. Prise en charge des patients LMMC

Onida et al. publient leurs recommandations (26) sur la prise en charge des patients LMMC : Un traitement doit être instauré lorsque la maladie est symptomatique ou progressive et, en particulier, lorsque l'un de ces événements se produit:

- anémie avec hémoglobine inférieure à 10g/ dL
- pourcentage de blastes dans le sang périphérique > 5%
- nombre de plaquettes \leq 50 G/ L;
- nombre de globules blancs \geq 30 G/ L;
- Myélémie \geq 10% dans le sang périphérique;
- Manifestations extramédullaires de la maladie (cutanée)
- splénomégalie symptomatique

Lorsque les patients ne sont pas candidats au traitement, un suivi régulier est instauré :

- Patients LMMC-MD :
 - NFS un mois après le diagnostic pour évaluer la stabilité hématologique,
 - puis par un examen clinique et une NFS trimestriels
- Patients LMMC-MP :

- NFS mensuelle les trois premiers mois suivant le diagnostic pour exclure une augmentation rapide du nombre de globules blancs ou des changements significatifs d'autres paramètres hématologiques,
- puis par examen clinique (splénomégalie, adénomégalie, atteinte cutanée ?) et NFS trimestriels

Pour tous les patients en abstention thérapeutique, un myélogramme pour analyse cytologique et cytogénétique doit être prélevé annuellement ou devant une évolution hématologique (augmentation du nombre de globules blancs ou de blastes) ou clinique pertinentes.

Traitements de première intention :

- Les patients atteints de LMMC-MD :
 - Blastes <10% dans la moelle : traitement de soutien par correction des cytopénies :
 - Anémie sévère (Hb ≤ 10g / dL et érythropoïétine sérique ≤ 500 mU / dL) doit être traitée par des stimulants érythropoïétiques.
 - Neutropénie fébrile : les facteurs de croissance myéloïde peuvent être envisagés
 - Blastes ≥ 10% dans la moelle ou ≥ 5% dans le sang :
 - Traitement de soutien + agent hypométhylant : azacytidine ou decitabine
 - Greffe de CSH envisagée dans le cadre d'essais cliniques
- LMMC-MP :
 - Blastes < 10% : chimiothérapie cytoreductive : hydroxyurée
 - Blastes ≥ 10% : chimiothérapie blastolytique avec polychimiothérapie suivie, si possible, par une greffe de CSH

8.2. Traitements

8.2.1. Antinéoplasiques

a) Agents hypométhylants : Vidaza® et Dacogen®

Les SMD et la LMMC sont notamment caractérisés par des mutations dans les gènes codant pour des modificateurs épigénétiques et des méthylations aberrantes de l'ADN. Des inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase sont utilisés pour traiter ces troubles. Vidaza® et Dacogen® ont reçu l'approbation pour le traitement des SMD sur la base de deux études de phase III. Ces études incluaient un petit nombre de patients LMMC (56,57). Une étude randomisée de phase III Dacogen® versus Hydréa® (58) est actuellement en vigueur dans les centres français, allemands et italiens chez les patients ayant une LMMC avancée.

Le Vidaza®, azacitidine, est un analogue de la pyrimidine. Il agit par mécanismes multiples comprenant une cytotoxicité directe à l'encontre des cellules hématopoïétiques anormales de la moelle osseuse et une hypométhylation de l'ADN. L'hypométhylation de l'ADN des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire normal, la différenciation et les voies de l'apoptose, présentant une méthylation aberrante, peut entraîner une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et une restauration de leurs fonctions (59).

Le Vidaza®, constitue actuellement une des lignes de traitement de la LMMC (56,60). En France, il a l'AMM pour le traitement de la LMMC avec 10 à 29% de blastes sans syndrome myéloprolifératif. La réponse au traitement est très variable. Une récente étude de phase II menée sur un petit nombre de patients publie ses résultats : avec une réponse globale au traitement variant de 20 à 70% et une médiane de survie de 12 à 37 mois (61). Ces résultats sont comparables à ceux de Fenaux et al, publiés dans Lancet en 2009 (62).

Le Dacogen®, décitabine, est un analogue du désoxynucléotide cytidine qui, à faibles doses, inhibe sélectivement les méthyltransférases de l'ADN. Cela entraîne une hypométhylation du promoteur du gène qui peut résulter en une réactivation des gènes suppresseurs de tumeur, une induction de la différenciation cellulaire ou une sénescence cellulaire, suivie d'une mort cellulaire programmée (63).

Le Dacogen® a l'AMM en France pour le traitement des patients âgés de plus de 65 ans atteints de LAM selon la classification OMS, nouvellement diagnostiquée, *de novo* ou secondaire, et non candidats à une chimiothérapie d'induction standard. Il est également utilisé, en France, dans des protocoles d'études de Phase III chez les patients atteints de LMMC.

Il existe une grande variabilité quant à la réponse au traitement. Des études récentes visent à prédire cette réponse, propre à chaque patient, au moment du diagnostic. Il s'agit d'analyser spécifiquement par biologie moléculaire et plus précisément par NGS, les mutations somatiques que présentent les patients ainsi que les régions d'ADN différenciellement méthylées. Meldi et al. mettent en évidence que les patients répondeurs et non-répondeurs au traitement par décitabine présentent les mêmes mutations somatiques mais que les régions d'ADN méthylées varient entre les deux cohortes. Ils mettent alors au point une classification épigénétique leur permettant ainsi de prédire la réponse au traitement au moment du diagnostic (64).

b) Chimiothérapie conventionnelle

L'Hydréa®, hydroxyurée, agit comme un cytotoxique actif sur l'ADN. Son mécanisme d'action n'est pas complètement connu. Elle inhibe la synthèse de l'ADN sans altérer la synthèse de l'ARN. Son action est rapide et s'exerce essentiellement sur la moelle osseuse. Elle inhibe d'abord la granulopoïèse puis la thrombocytopoïèse et, en dernier lieu, l'érythropoïèse. Ces effets sont rapidement réversibles après l'interruption du traitement ce qui impose dans la plupart des cas, un traitement d'entretien continu à des doses déterminées par l'évolution de l'hémogramme.

Les indications de L'Hydréa® en France sont la LMC, la PV, la TE et la splénomégalie myéloïde. Elle peut également être utilisée dans le traitement de la LMMC-MP, hors AMM, comme l'avait démontré l'étude menée par Wattel et al. dans les années 96 (65).

De nouvelles thérapeutiques sont actuellement à l'essai :

- sapacitabine : analogue de la cytidine
- clofarabine : analogue de deuxième génération de la cytidine
- ruxolitinib : inhibiteur de JAK2 (66)

Mais la faible prévalence de la LMMC ne permet pas d'obtenir des cohortes d'essai assez conséquentes pour conclure à une meilleure réponse de ces nouvelles thérapeutiques (67) à ce jour.

8.2.2. Greffe de CSH

Le seul traitement curatif de la LMMC reste à l'heure actuelle, la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Elle peut être proposée aux patients sans comorbidité, de moins de 60 ans, présentant une LMMC de haut risque, ayant reçu un traitement de première ligne (26). De fait, seul un petit nombre de patients est éligible (68–70).

Kongtim et al. rapportent un taux de rechute après greffe de CSH plus faible lorsque celle-ci a lieu après traitement par agent hypométhylant (71). Cependant, le mécanisme par lequel ce taux est réduit demeure incertain. Ils suggèrent toutefois que la greffe soit effectuée peu de temps après obtention de la rémission cytologique (par évaluation médullaire : blastose <5% des éléments).

Kekre et al. (68) font le point sur la greffe de CSH dans la LMMC. Pour ce faire, ils se basent sur la classification pronostique CPSS. Selon leur étude, si la greffe de cellules souches allogéniques reste le seul traitement curatif potentiel pour les patients atteints de LMMC, le risque accru de rechute et de mortalité sans rechute liée à la greffe demeurent des obstacles majeurs à sa réussite. Une revue de la littérature retrouve des résultats très variables et décevants : une survie globale entre 2 et 10 ans variant de 18% à 75% et une survie sans rechute variant de 18% à 67% (69).

De nouvelles stratégies visant à réduire la mortalité liée à la greffe tout en conservant l'activité anti-leucémique sont nécessaires pour cette maladie.

Pour conclure, le traitement des patients atteints de LMMC reste à ce jour une problématique entière, en partie liée au manque d'études spécifiques. En effet, la majorité des preuves thérapeutiques provient d'essais cliniques ou d'études rétrospectives menées sur des cohortes de patients présentant tout syndrome myélodysplasique confondu et dont le recrutement de patients LMMC ne représente que de faibles effectifs. Malgré l'efficacité déclarée de certaines options thérapeutiques dans les SMD, tels que les agents

hypométhylants, aucune molécule n'a démontré une survie globale prolongée dans la LMMC, hormis la greffe de cellules souches hématopoïétiques qui n'est éligible que pour un nombre très limité de patients.

Il n'existe pas à ce jour de critères objectifs formalisés pour instaurer un traitement de la LMMC et les traitements de soutien continuent de jouer un rôle majeur dans la gestion des patients atteints de LMMC.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODE

1. PROBLEMATIQUE

Le diagnostic de LMMC est un diagnostic d'exclusion et par conséquent difficile à établir, engendrant parfois un retard diagnostique. Une publication récente concernant l'immunophénotypage sanguin des monocytes dans la LMMC a retenu toute notre attention. En effet, en 2015, Selimoglu et son équipe publient leurs travaux sur la classification des monocytes dans la LMMC (1). Il en ressort, comme nous l'avons vu plus tôt, que les patients LMMC présentent un taux de monocytes classiques supérieur à 94%, alors que, lors des monocytozes réactionnelles, ce pourcentage est diminué. Cette étude est d'autant plus intéressante, que faite à partir d'un simple prélèvement sanguin, là où le diagnostic passe habituellement par un prélèvement médullaire.

Le but de ce travail est d'évaluer les performances de cette classification des monocytes, par cytométrie en flux sur le prélèvement sanguin, au Centre Hospitalier de la Côte Basque (CHCB).

2. MATERIEL ET METHODE

2.1 Patients

Les patients issus de notre étude ont été recrutés au centre hospitalier de la côte basque de mai 2015 à mai 2016. Il s'agit de patients ayant été hospitalisés dans divers services et pour lesquels nous avons reçu et effectué une numération et une formule sanguine au laboratoire.

2.1.1 Critères d'inclusion

➤ Groupe contrôle : Monocytoze transitoire

Ont été sélectionnés des patients présentant une monocytoze (> 1 G/L) réactionnelle et transitoire. Cette dernière peut être due à un syndrome inflammatoire, infectieux ou une néoplasie. Elle doit être transitoire afin que le patient soit inclus dans l'étude. Les patients sont hospitalisés dans des services divers tels que la réanimation, chirurgie orthopédique ou vasculaire. Nous avons trouvé dans leurs antécédents proches une numération sans

monocytose afin d'affirmer son caractère transitoire et nous pouvons même retrouver cette absence de monocytose dans une numération postérieure, lorsqu'il y en eût une. Ces patients ont été recrutés à chaque fois que nous avons un patient LMMC à tester afin de passer les deux voire trois échantillons en parallèle. Il convient de signaler que, autant que possible, nous avons essayé de sélectionner des patients jeunes afin de ne pas biaiser notre population témoin par d'éventuelles dysplasie ou autre maladie hématologique.

➤ Patients LMMC confirmés

La deuxième cohorte est constituée de patients présentant une monocytose chronique (> 3 mois) pour lesquels le diagnostic de LMMC a été formellement posé par le clinicien. Il s'agit soit patients déjà connus pour cette pathologie, pour lesquels une NFS a été demandée au laboratoire pour le suivi de la maladie ; soit de patients nouvellement diagnostiqués. Ces derniers ont au préalable subi plusieurs numérations-formules sanguines pour affirmer le caractère chronique de la monocytose, un myélogramme, une recherche d'anomalie au caryotype, une recherche de BCR-ABL afin que le diagnostic puisse être posé (3). Ce diagnostic a été établi par les médecins hématologues du service d'hématologie clinique du CHCB.

Une réanalyse des cas a été effectuée par les biologistes du laboratoire afin d'exclure les cas douteux.

➤ Groupe test : Monocytoses chroniques non classées LMMC (douteux)

Sont inclus les patients présentant une monocytose chronique (>3 mois) dont une cause a pu être objectivée (maladie inflammatoire chronique, néoplasie, prostatique notamment). D'autres monocytoses chroniques, sans cause retrouvée, pour lesquels les cliniciens et biologistes n'ont pas conclu au moment de l'étude, par manque de données (biologie moléculaire, chronicité de la monocytose, myélogramme) sont également classées dans cette catégorie.

Ce groupe de patients représente justement une population d'intérêt pour laquelle l'affirmation ou l'élimination du diagnostic de LMMC ne peut être objectivement réalisé. Il constituera le groupe test.

2.1.2 Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'étude les patients présentant une leucémie aiguë myéloïde : taux de blastes sanguins ou médullaires supérieur à 20%, les patients présentant une LMC ou une TE.

2.2 Méthodes

Nos analyses ont été réalisées en cytométrie en flux (CMF), sur cytomètre Navios® (Beckman Coulter®).

Chaque échantillon LMMC a été passé en parallèle d'au moins un contrôle négatif (monocytose transitoire). Le protocole, comparable à celui de Selimoglu et al. (1) est le suivant :

- Incubation de 50µL d'échantillon (sang du patient prélevé sur tube EDTA) 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité en présence de 5µL de chaque anticorps, comme recommandé par le fournisseur
- Lyse des globules rouges (Versalyse®, Beckman Coulter®) 15 minutes
- Lecture sans lavage sur cytomètre Navios® (Beckman Coulter®)

Les anticorps fluorescents utilisés sont les suivants :

Tableau 13: Anticorps fluorescents utilisés pour l'analyse cytométrique

ANTICORPS	FLUOROCHROME	CLONE	DILUTION
CD33	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	D3HL60.251	-
CD24	Phycoerythrin (PE)	ALB9	-
CD14	Phycoerythrin-Cyanin 5.5 (PC5.5)	RMO52	1/20
CD56	Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7)	N901 (NKH-1)	-
CD19	Allophycocyanin (APC)	J4.119	-
CD2	Alexa Fluor 700 (A700)	39C1.5	1/10
CD16	Pacific Blue (PB)	3G8	-
CD45	Chrome Orange (KrOr)	J33	-

Contrôles quotidiens de fluidique/ laser/ PMT :

- Flowcheck® (Beckman Coulter®)
- Flowset® (Beckman Coulter®)

Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza® (Beckman Coulter®). La stratégie employée est une stratégie d'exclusion. En effet il s'agit d'exclure une à une les populations leucocytaires afin d'obtenir une population uniquement constituée de monocytes.

Les monocytes seront ainsi fenêtrés en trois catégories : monocytes classiques, intermédiaires et non classiques. La stratégie de fenêtrage est explicitée dans le schéma qui suit.

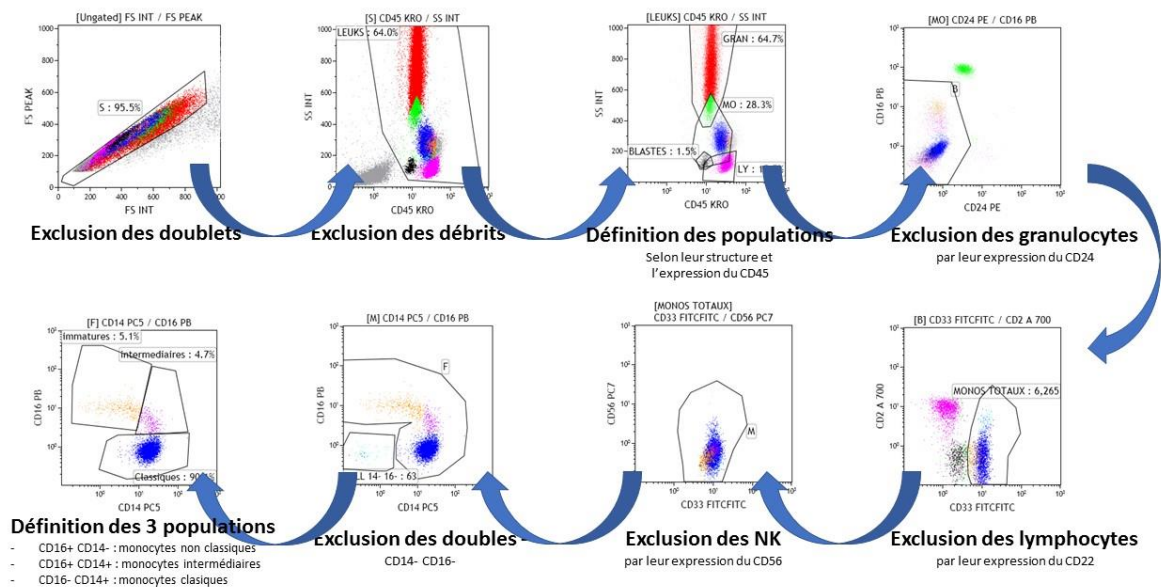


Figure 16 : Stratégie de fenêtrage des populations leucocytaires après immunophénotypage

2.3 Données recueillies (annexe 1)

Données de la numération formule sanguine :

- La numération a été réalisée sur un automate de numération Advia 2120i®, Siemens®
- La formule sanguine a soit été réalisée sur l'automate Advia 2120i® soit par décompte manuel
- Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du site internet BiostaTGV (72), qui offre une interface facilitant l'utilisation du logiciel R. Le degré de significativité retenu pour l'ensemble des analyses a été fixé à 0,05. Les analyses ont été conduites et présentées selon les recommandations STROBE (73). Les résultats des variables quantitatives sont présentés sous la forme de moyennes et écarts-types. Les distributions des variables quantitatives ont été comparées par des tests t de Student non appariés.

Partie III : RESULTATS

1. CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES

Moyennes d'âge, sexe et services sont rapportés dans le tableau ci-dessous pour les trois groupes de patients étudiés.

Tableau 14 : caractéristiques démographiques des populations testées

	LMMC	REACTIONNEL	DOUTEUX	
Effectif	13	50	20	
Moyenne âge	82,1	66,0	82,4	
Médiane âge	82	69	83	
Sex ratio (H/F)	2,2	2,3	4,5	
Services	Hématologie	62%	3%	45%
	Urgences-Réa	15%	32%	25%
	Gériatrie	0%	8%	10%
	Chirurgie	0%	26%	5%

L'âge moyen de la population LMMC est de 82,1 ans, tandis que l'âge moyen de la population témoin est plus jeune, de 66 ans. Cette différence est liée à la manière de sélectionner les patients. Les patients témoins sont en effet sélectionnés sur le critère de la monocytose réactionnelle, mais sans critère d'âge. Ils reflètent donc l'âge des patients hospitalisés au CHCB. Les patients LMMC, comme vu antérieurement, ont une moyenne d'âge au diagnostic de 70 ans. Or lors de l'étude ils sont le plus souvent en suivi de traitement, donc avec un âge plus avancé.

L'âge moyen de la population test est proche de celle du groupe LMMC : 82,4 ans.

Au sein de la population LMMC, 10 sujets sont classés en LMMC-1 et 3 en LMMC-2 (classification OMS 2008, non révisée car les patients n'ont pas tous été réévalués –par un myélogramme notamment-). Sept patients sont classés en LMMC-MP, dont les trois LMMC-2 et 6 sont classés en LMMC-MD (classification OMS 2016).

2. CARACTERISTIQUES DE LA NUMERATION FORMULE SANGUINE

La numération formule sanguine des patients atteints de LMMC est significativement différente de celle de la population témoin.

Une analyse de Student sur les paramètres classiques de la a été réalisés.

Lors de test de Student sur de très nombreux paramètres, il existe un risque important de faux positifs. Afin de s'en affranchir, nous avons complété le test de Student par une correction de Bonferroni. Dans ce cas, le seuil de significativité est abaissé à 0.001.

Tableau 15 : Test de Student avec correction de Bonferroni sur les paramètres de la NFS

Paramètres	LMMC	Réactionnel	P	Significatif après correction de Bonferroni p=0,001
Leucocytes (G/l)	24.6	16.3	0.49	Non
Hémoglobine (g)	10.6	11.8	0.0227	Non
Plaquettes (G/l)	142	337	1.29 X 10⁻⁶	Oui
Monocytes (G/L) Advia ou Formule manuelle	3,5	1,6	0,0634	Non
Monocytes % Advia ou Formule manuelle	22,6	10,6	0,00295	Non
PNN/Monocytes Advia ou Formule manuelle	4.24	8.3	0.0090	Non
Monocytes (G/l) CMF	5.0	1.9	0.073	Non
Monocytes (%) CMF	32.1	14.3	6.4 X 10⁻⁴	Oui
PNN/Monocytes CMF	2.5	6.8	2.9 X 10⁻⁶	Oui
PNN (G/l) CMF	14.9	12.2	0.74	Non
PNN (%) CMF	52.3	71.5	5.9 X 10⁻⁴	Oui

On observe 6 analytes présentant une différence significative avec une p-value < 0,05. Après correction de Bonferroni, seuls 4 paramètres de la NFS demeurent : la numération plaquettaire, les pourcentages de monocytes, de PNN et le rapport des deux (en CMF).

Concernant la numération plaquettaire, 69% des patients LMMC sont thrombopéniques (plaquettes < 150 G/L) contre 18% dans le groupe témoin.

Quant au pourcentage de monocytes évalué en cytométrie en flux, récemment inclus dans les critères diagnostic (4), seul un patient du groupe LMMC déroge à la règle (% monocyttaire à 9) : 92% des patients présentent un contingent monocyttaire supérieur à 10% des éléments. L'évaluation du contingent monocyttaire en formule manuelle ou automatisée rend un pourcentage inférieur à 10 pour deux patients supplémentaires (passant chacun de 8% à 13.5% et 16.2% en CMF).

Dans le groupe réactionnel, 64% des patients ont plus de 10% de monocytes en CMF contre 48% en cytologie sur la formule manuelle ou automatisée.

Tableau 16 : Pourcentage de monocytes selon le mode analytique pour les trois populations

	LMMC	REACTIONNEL	TEST
% monocytes Formule manuelle ou automate	22,6	10,6	22,1
% monocytes CMF	32,1	14,3	25,9

Nos résultats révèlent un pourcentage monocyttaire plus élevé, quel que soit le groupe, en CMF qu'en formule manuelle ou automate.

3. TYPES DE MONOCYTES DANS LES CAS LMMC ET REACTIONNEL

L'étude de la répartition des sous-populations de monocytes révèle une différence significative dans les pourcentages des 3 populations de monocytes (classiques, intermédiaires et non classiques). Après correction de Bonferroni, seuls les taux de monocytes classiques sont significativement différents entre les populations LMMC et réactionnelle.

Tableau 17 : Test de Student sur les populations de monocytes en CMF

Paramètres	LMMC	REACTIONNEL	p	Significativité après correction de Bonferroni p=0,001
Monocytes Classiques (%)	93.8	86.4	0.00090	Oui
Monocytes intermédiaires (%)	4.4	9.0	0.0074	Non
Monocytes non classiques (%)	1.72	4.7	0.0021	Non

4. SYNTHÈSE DES PARAMÈTRES DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS ENTRE LA POPULATION LMMC ET LA POPULATION RECTIONNELLE

Au total, parmi les 46 paramètres analysés (Annexe 2), les paramètres différenciellement exprimés entre les patients LMMC et les patients contrôles sont :

- La numération plaquettaire
- Le pourcentage de monocytes
- Le pourcentage de PNN
- Le ratio PNN/Monocytes
- Le pourcentage de monocytes classiques

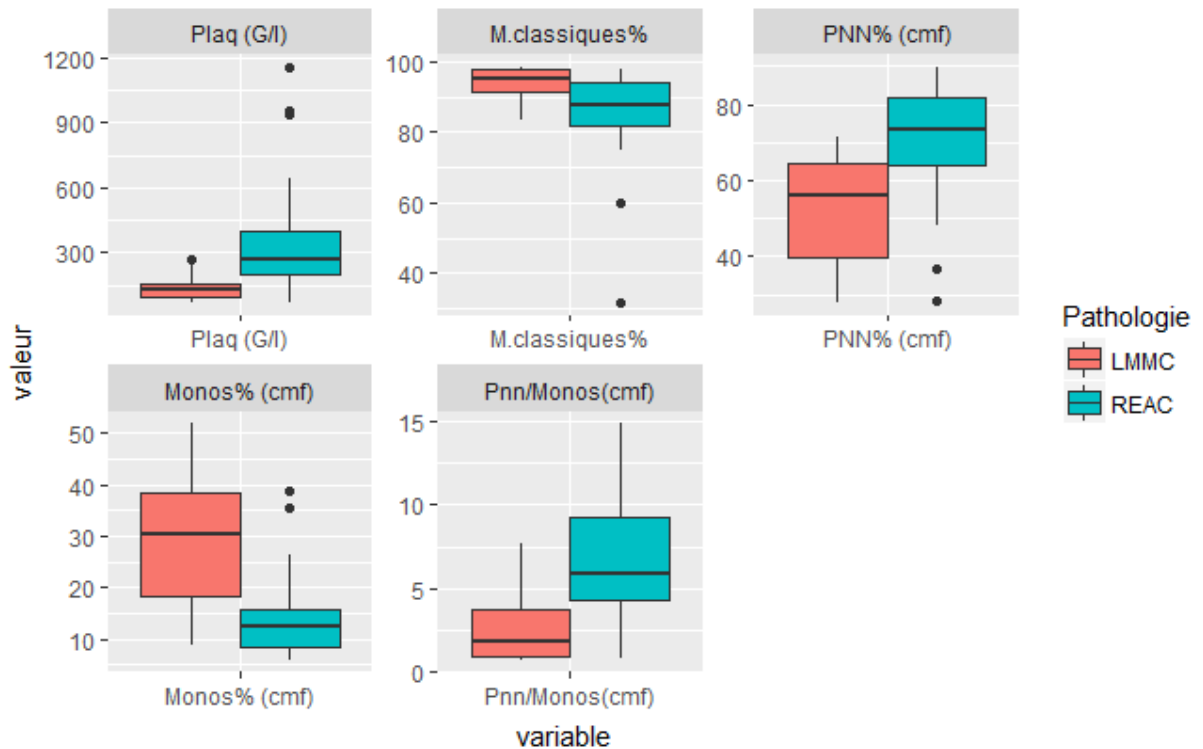


Figure 17 : Paramètres différenciellement exprimés entre population LMMC et réactionnelle avec correction de Bonferroni

Les intensités de fluorescence moyenne des CD14, CD16, CD33 et CD56 ne sont pas différenciellement exprimées dans notre étude.

5. RESULTATS EN APPLIQUANT LE TAUX DE 94% DE MONOCYTES CLASSIQUES

Comme vu précédemment, Selimoglu et al. portent leurs travaux sur le pourcentage des sous-populations monocytaires. Ils établissent une valeur seuil de monocytes classiques à 94% ; et démontrent qu'au-delà de ce pourcentage, le diagnostic de LMMC peut être établi avec une spécificité de 95,1% et une sensibilité de 90,6% (spécificité et sensibilité respectivement à 94,1% et 91,9% avec leur cohorte indépendante de validation).

En utilisant cette même valeur seuil, on observe la façon dont se répartissent les deux populations étudiées dans le graphe qui suit.

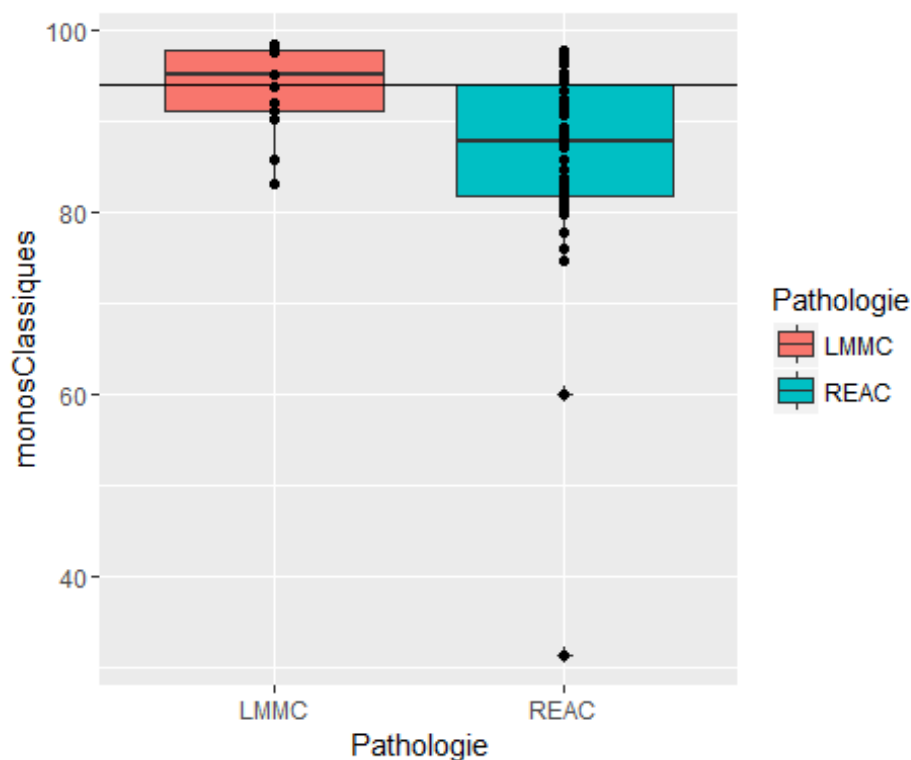


Figure 18 : Pourcentage de monocytes classiques pour les populations LMMC et réactionnelle avec seuil à 94%

On constate, parmi nos 13 patients étiquetés LMMC, que 6 d'entre eux présentent un pourcentage de monocytes classiques inférieur à 94% avec une étendue pour ceux-ci allant de 83,2% à 93,9%.

Il a été retenu dans la publication que le nombre de monocytes classiques diminuait après traitement et pouvait même constituer un marqueur de suivi et d'efficacité de celui-ci. Nous avons pris soin de recueillir cette information : patient traité ou non. Les deux molécules employées sont le Vidaza et l'Hydréa. Cinq patients au sein de notre groupe de 13 étaient traités au moment de l'étude.

Parmi les 5 patients traités, 3 d'entre eux se situent au-dessus du seuil ; un quatrième est limite avec une valeur à 93,9% et le dernier présente un pourcentage à 91,2%.

On peut calculer la sensibilité du test avec ce seuil. Elle serait alors de 54% tous patients inclus et de 50% en se basant uniquement sur les patients non traités.

Dans le groupe témoin, 13 sujets parmi les 50 obtiennent un pourcentage de monocytes classiques supérieur à 94%. On peut alors calculer une spécificité de 74% pour une valeur seuil à 94%.

Tableau 18 : Sensibilité et spécificité du seuil de monocytes classiques à 94% dans notre étude

SENSIBILITE	SPECIFICITE
54%	74%

6. COURBE ROC

On cherche alors à déterminer si nos travaux peuvent nous conduire à une meilleure valeur seuil pour le pourcentage de monocytes classiques. Pour ce faire, on réalise une courbe ROC, présentée ci-dessous.

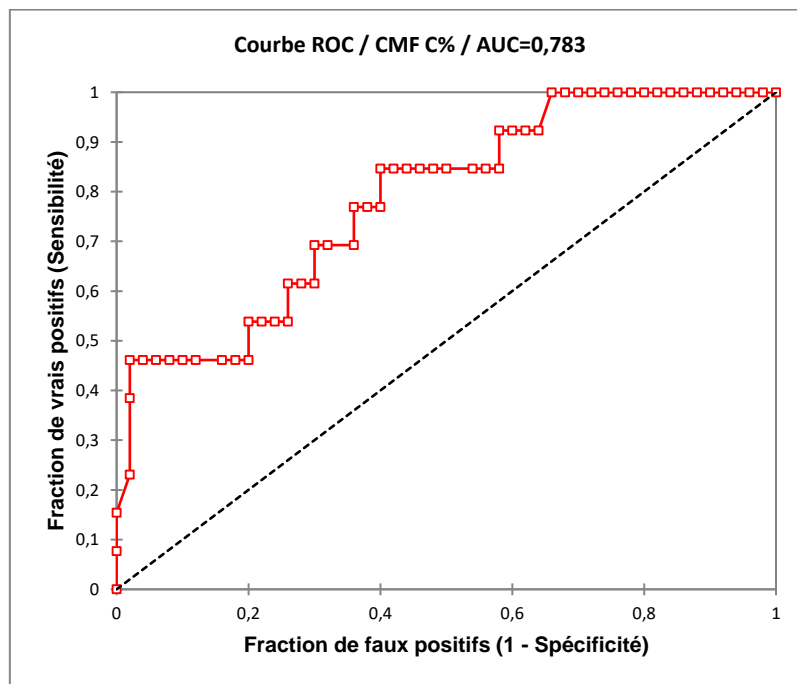


Figure 19 Courbe ROC : sensibilité / spécificité du pourcentage de monocytes classiques

La valeur optimale obtenue grâce à ce graphe est 90,2%. Pour ce seuil de pourcentage de monocytes classiques (MC), on obtient une sensibilité de 84,6% et une spécificité de 60%.

Tableau 19 : Sensibilité et spécificité du seuil de monocytes classiques à 90,2% calculé à partir de la courbe ROC

SENSIBILITE	SPECIFICITE
84,6%	60%

7. POPULATION TEST

Le troisième groupe, composé de patients présentant une monocytose chronique, représente la population d'intérêt. C'est pour cette population qu'un outil diagnostique supplémentaire serait intéressant, soit pour infirmer, soit pour étayer l'hypothèse d'une LMMC.

Tableau 20 : valeurs moyennes des paramètres de la NFS et de l'immunophénotypage pour la population test

Paramètres	Moyennes
Hémoglobine g/dL	11,9
Plaquettes G/L	185
Monocytes % CMF	24,4
Monocytes G/L CMF	2,47
PNN % CMF	50,9
PNN/Monocytes	3,63
MC % CMF	92,6

On notera que 40% des sujets sont thrombopéniques et 85% présentent une monocytose dont le pourcentage excède 10% des éléments.

En appliquant la valeur seuil précédemment retrouvée (90,2%), parmi les 20 patients de ce troisième groupe, 16 sont classés en LMMC (80% des sujets). En appliquant le seuil de 94% de Selimoglu et al. 11 sujets sont classés en LMMC (55% des patients).

PARTIE IV : DISCUSSION

Selimoglu et al. ont montré que le taux de monocytes classiques permet de différencier une monocytose bénigne d'une LMMC (1).

Nous avons exploré cette hypothèse dans le contexte du CH de Bayonne.

- **La répartition de monocytes classiques est-elle différente entre les LMMC et les monocytozes réactionnelles ?**

Nos résultats révèlent qu'effectivement le taux de monocytes classiques est significativement différent entre les patients LMMC et les patients contrôles. La différence est très significative : $p = 0.00090$.

Ces résultats sont aussi concordants avec ceux Pastoret et al. parus en 2016 dans la e-letter jointe à l'article de Selimoglu (1) sur les données d'hématoflow®, utilisant uniquement le CD16 pour différencier les monocytes classiques et non classiques.

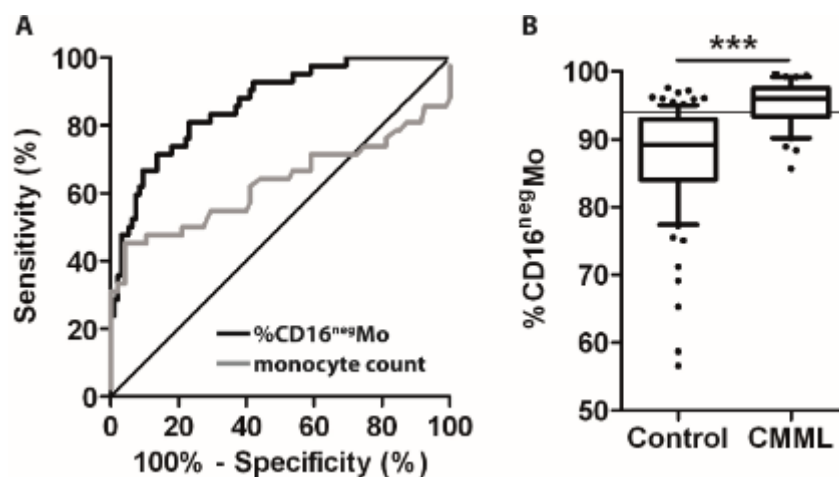


Figure 20: Pourcentage de monocytes non classiques d'après Pastoret et al.

Il est donc cohérent de tenter d'utiliser ce critère pour aider au diagnostic de la maladie, attendu que les critères actuels de LMMC en font un diagnostic d'exclusion (4).

- **Est-il possible d'affirmer le diagnostic de LMMC uniquement sur le pourcentage de monocytes classiques ?**

- **Groupe LMMC versus groupe contrôle**

Nos résultats montrent que les pourcentages de monocytes classiques se chevauchent entre les populations LMMC et réactionnelle. Ainsi dans notre étude les résultats sont très différents de ceux de Selimoglu et al..

Tableau 21 Comparaison des sensibilités et spécificités du seuil de MC de 94% entre l'étude de Selimoglu et al. et la nôtre.

Seuil de MC à 94%	SENSIBILITE	SPECIFICITE
Selimoglu et al.	90,6%	95,1%
Etude	54%	74%

Une autre utilisation possible du taux de monocytes classiques est le suivi de l'efficacité thérapeutique : d'après leurs travaux, la baisse du pourcentage de monocytes classiques en serait un bon indicateur. Malheureusement, notre série n'a pas retrouvé ce résultat, peut-être du fait du faible effectif de patients traités et de l'absence de cinétique étudiée pour un même patient avant et après mise sous traitement.

Ainsi nos résultats rejoignent ceux de Pastoret et al. (e-letter Blood 2015 (1)) (sensibilité de 70,5% et spécificité de 88,2% pour un seuil de monocytes classiques supérieur à 95%) et ceux de Tha Mya et al. (présentation ASH 2015 (74)) pour lesquels seulement 69% des patients LMMC présentent un taux de monocytes classiques supérieurs à 95% des monocytes totaux.

Nous avons utilisé la même stratégie de fenêtrage mais le mode de sélection des patients peut être différent entre nos deux études. Nos cas de LMMC étaient parfois traités, ce qui peut modifier les sous-populations monocytaires (azacytidine notamment). En revanche, le mode de recrutement de la cohorte de Semiloglu n'est pas clairement explicité : au diagnostic ? Au cours du suivi ? Naïf de tout traitement ?

Quel que soit leur mode de recrutement, il est intéressant de remarquer que les démographies de nos deux populations LMMC sont très comparables.

Concernant notre population contrôle, les patients ont été sélectionnés de manière drastique. Nous devons faire la preuve du caractère transitoire de la monocytose.

Les patients présentant une monocytose chronique et dont la cause était documentée ont été éliminés et regroupés dans la population test. En effet, bien que la monocytose soit chronique et supérieure à 10% de éléments, lorsqu'une cause possible de monocytose est diagnostiquée (comme une néoplasie, par exemple), il se peut que le diagnostic de LMMC soit écarté d'office (pour rappel sans signe de dysplasie : une anomalie cytogénétique ou au caryotype doit être retrouvée pour établir le diagnostic de LMMC, ou bien la monocytose doit être chronique et sans autre cause possible).

Peut-on être certain qu'un patient présentant une néoplasie ne cumule pas cette dernière avec une autre maladie type LMMC ? Par conséquent ces patients-là ont été exclus du groupe réactionnel et seuls des patients présentant une monocytose transitoire sont sélectionnés.

De ce fait, notre population contrôle ne peut être biaisée par des patients au diagnostic douteux et nos résultats sont le reflet des répartitions monocytaires transitoires réactionnelles.

En outre, ces « cas douteux » constituent une population d'intérêt pour laquelle le diagnostic piétine.

- **Qu'en est-il du groupe test ?**

- **Peut-on appliquer une valeur seuil ?**

Lorsque l'on étudie chacun des paramètres de ces « cas douteux » (groupe test), on n'en retrouve aucun différenciellement exprimé avec la population LMMC. En revanche, après comparaison avec la population contrôle, 4 paramètres ressortent : les plaquettes, les pourcentages de monocytes et de PNN et le rapport des deux. Cependant, bien que ce groupe test se rapproche davantage de la population LMMC, on ne retrouve pour autant pas de

différence significative sur le pourcentage de monocytes classiques avec la population contrôle.

En appliquant les résultats de Selimoglu et al. ainsi que les résultats obtenus par nos analyses au CHCB à ce groupe test, 55 à 80% des patients présentant une monocytose chronique seraient classés en LMMC. Ce qui induirait que plus d'un patient sur deux dont la monocytose est chronique aurait en fait une LMMC non diagnostiquée ? Or parmi les sujets, 20% d'entre eux ont une cause avérée de monocytose. Ces résultats laissent à penser que ces valeurs seuil ne sont ni l'une ni l'autre pertinentes pour affirmer le diagnostic de leucémie.

- Quels sont les résultats obtenus en appliquant une VPP ou une VPN ?

On cherche alors à exploiter de nos résultats (groupe LMMC vs groupe contrôle) une valeur prédictive négative (VPN) et une valeur prédictive positive (VPP).

Lorsque le pourcentage de monocytes classiques est inférieur à 83%, la VPN est de 95%.

De même, lorsque ce pourcentage est supérieur à 97.6%, la VPP est de 85.7%.

Nous étudions le comportement de notre groupe test avec ces résultats.

Tableau 22 : VPN et VPP appliquées à la population test

	Nombre de patients catégorisés « sains »	Nombre de patients catégorisés « LMMC »
<83% de monocytes classique (VPN)	2 patients	
>97,6% de monocytes classiques (VPP)		3 patients

Selon ces résultats, la VPN appliquée nous permet de catégoriser 10% des patients en NON LMMC (avec une probabilité de 95%) et la VPP : 15% des sujets en LMMC (avec une probabilité de 85.7%).

Ces résultats ne nous permettent donc pas de classer plus d'un quart de la population douteuse.

➤ **Qu'en est-il de la reproductibilité intra-individuelle du pourcentage de monocytes classiques ?**

Deux des patients LMMC ont été analysés à deux reprises à 6 mois et 15 jours d'intervalle. Nous nous apercevons que le pourcentage de monocytes classiques varie pour un même patient sans que celui-ci ne soit mis sous traitement ou ne présente une évolution de la maladie (de 98,5 à 85,8% pour le patient 1 et de 83,2 à 93,9% pour le patient 2).

La question de la reproductibilité du test se pose. Voire de la répétabilité. Les cellules se dégradent-elles dans le temps ? En effet s'agissant de cellules vivantes, on peut imaginer un délai à partir duquel la cellule entrerait en apoptose ou commencerait à internaliser certains récepteurs. A quel délai les analyses sont-elles effectuées après prélèvement ? Peut-on maîtriser les conditions pré-analytiques alors que les patients sont prélevés dans les services de soins ? Ces différences sont-elles liées au patient lui-même ou à la technique analytique ? Existe-t-il une variabilité inter-opérateurs ? L'analyse de la totalité des données a été effectuée par le même binôme mais le gating peut-il varier d'un analyte à l'autre ? Ces dernières questions sont très importantes dès lors qu'il s'agit d'une analyse quantitative. Et d'autant plus lorsque le diagnostic est défini par une simple valeur seuil sans zone grise.

Trop d'incertitudes inhérentes à cette analyse demeurent. L'immunophénotypage des sous-populations monocytaires ne nous semble pas permettre à lui seul ni d'infirmier ni de confirmer le diagnostic de LMMC. En revanche, au regard de la significativité des résultats entre monocytozes réactionnelles et LMMC, il est cohérent de penser que cette analyse représente une aide au diagnostic. Des études complémentaires sont nécessaires pour définir la place de la cytométrie en flux dans le diagnostic de la LMMC.

➤ **Peut-on utiliser d'autres critères pour affirmer la LMMC?**

En étudiant les paramètres différenciellement exprimés, nous montrons que le pourcentage de monocytes est un paramètre important. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le seuil de 10% de monocytes a été intégré à la classification OMS en 2016 pour la LMMC (4). Le pourcentage de PNN est, lui aussi, un paramètre très significatif, de même que le rapport PNN/

Monocytes. D'autres paramètres importants sont les taux d'hémoglobine et de plaquettes. Cependant, étant donné que certains patients sont traités par Vidaza® ou Hydréa® et d'autres par EPO, ces paramètres sont d'interprétation délicate sur une si faible cohorte.

➤ **Comparaison du pourcentage de monocytes en comptage manuel ou automate versus CMF :**

Un point critique est observé : la différence entre les pourcentages de monocytes retrouvés par l'automate ou le lecteur (formule manuelle) et la cytométrie en flux. Cette différence pourrait provenir du faible nombre de cellules comptées par l'opérateur (100 cellules en général) ou l'automate de routine. On retrouve dans la table de Rümke une valeur variant de 5% à 17% pour un pourcentage réel de 10% sur un compte de 100 cellules au total. Or, ici le biais est systématique avec une moyenne des différences de +3,3% (différence positive entre CMF et formule classique). En appariant les séries sur la totalité des patients de l'étude, la significativité est retrouvée avec une p-value à $9,2 \times 10^{-7}$. Ces résultats confirment le problème lié à la difficulté cytologique concernant la reconnaissance des monocytes par les automates et les lecteurs, engendrant leur sous-évaluation.

La cytométrie en flux peut ainsi apporter une aide au diagnostic et au classement de la maladie via la quantification précise des monocytes, mais aussi possiblement en associant l'étude des sous-populations monocytaires à d'autres paramètres non encore définis.

PARTIE V : CONCLUSION

L'immunophénotypage cellulaire par cytométrie en flux est une technologie en plein essor depuis une dizaine d'années. En hématologie, elle apporte une aide considérable à de nombreux diagnostics. Elle permet également de s'abstenir de certaines techniques manuelles manquant d'objectivité.

En biologie médicale, l'outil diagnostique optimal est : facile, rapide, peu coûteux et automatisé. Là où le diagnostic de LMMC est difficile, long, coûteux et subjectif, il va de soi qu'une technique par immunophénotypage leucocytaire à partir du sang périphérique paraît idéale.

L'étude menée sur la population de patients LMMC du CHCB nous a permis d'évaluer les limites du test de quantification des sous-populations monocytaires par CMF. En effet, la quantification exacte atteint ses limites dès lors que les marqueurs de la population d'intérêt s'inscrivent dans un continuum d'intensité d'expression antigénique et que la catégorisation des sous-populations est défini par cette différence d'intensité. On comprend aisément que la subjectivité de l'analyste entre en compte dans la stratégie de fenêtrage et qu'une standardisation inter-site est d'autant plus nécessaire lorsque la quantification doit être comparée à une valeur seuil, sans zone grise.

D'autre part, la variabilité intra-individuelle observée durant l'étude nous a permis de nous questionner sur l'environnement cellulaire. Le délai analytique peut-il expliquer de telles différences ? Une répétabilité réalisée sur un même prélèvement sur plusieurs heures permettrait de tester cette hypothèse. Une reproductibilité stricto-sensus n'est pas réalisable mais on pourrait imaginer une reproductibilité intra-individuelle avec une prise de sang quotidienne dans des conditions pré-analytiques et analytiques absolument identiques. Ces comparaisons permettraient de statuer sur l'incidence du pré-analytique sur la technique.

Autre hypothèse, la variabilité peut-elle être inhérente au patient lui-même ? On imagine que le statut inflammatoire du sujet LMMC peut contribuer à la modification de la répartition des sous-populations monocytaires. Devrait-on s'assurer dans ce cas que le patient ne présente aucun évènement aigu au moment de la prise de sang ? On pourrait alors prolonger l'étude

de reproductibilité dès lors que le patient présente une infection aiguë étiquetée pour évaluer en quelle mesure cela influe sur les proportions de sous-populations monocytaires.

Pour terminer, nous avons touché du doigt les difficultés cytologiques, connues et reconnues depuis longtemps déjà, quant à la reconnaissance des cellules de la lignée monocyttaire. Ces incertitudes sont levées par l'évaluation, par CMF, du contingent monocyttaire exact.

De même, l'évaluation des signes de dysplasie est requise. Alors que la subjectivité du lecteur entre en compte dans l'identification des cellules, on peut aisément imaginer qu'elle est considérable quant à l'évaluation de la dysplasie.

C'est pourquoi, les techniques d'immunophénotypage ne nous permettent pas, à l'heure actuelle, de nous affranchir d'une étude cytologique poussée par des biologistes spécialisés, mais contribuent objectivement à l'avancée du diagnostic ; et des études complémentaires sont nécessaires pour définir la place de l'immunophénotypage des sous-populations monocytaires dans le diagnostic de LMMC.

A l'heure où les études génétiques par NGS demeurent encore très coûteuses et surtout réservées à la recherche, on peut imaginer que, dans un futur plus ou moins proche, la pathologie sera décryptée par la mise en évidence de la mutation clonale, prenant la place d'analyses et d'évaluations cytologiques sans doute devenues trop subjectives.

ANNEXES

Annexe 1 : Paramètres analysés

Paramètre analysé	Unité	Technique
Globules blancs	G/L	Advia
Monocytes	G/L	Advia ou comptage manuel
Monocytes	%	Advia ou comptage manuel
PNN	G/L	Advia ou comptage manuel
Rapport PNN/Monocytes	-	Advia ou comptage manuel
Myélocytémie	%	Comptage manuel
Blastes	%	Comptage manuel
Agrégats plaquettaires	Oui / Non	
Plaquettes	G/L	Advia
Hémoglobine	g/dL	Advia
EPREX	Oui / Non	
Cytoréducteur	Vidaza / Hydréa / Néant	
Recherche de BCR-ABL	Négative/ Non faite	Biologie moléculaire
MC	G/L	CMF
MC	%	CMF
MI	G/L	CMF
MI	%	CMF
MNC	G/L	CMF
MNC	%	CMF
Nombre d'évènements	-	CMF
PNN	%	CMF
PNN	G/L	CMF
Lymphocytes	%	CMF
Lymphocytes	G/L	CMF
Monocytes totaux	%	CMF
Monocytes totaux	G/L	CMF
Rapport PNN/ Monocytes	-	CMF
Blastes	%	CMF
Blastes	G/L	CMF
Evénements 14- 16-	%	CMF
Evénements 14- 16-	G/L	CMF
MFI CD14 MT (monocytes totaux)	-	CMF
MFI CD14 MC	-	CMF
MFI CD14 MI	-	CMF
MFI CD14 MNC	-	CMF
MFI CD16 MT	-	CMF
MFI CD16 MC	-	CMF
MFI CD16 MI	-	CMF

MFI CD16 MNC	-	CMF
MFI CD33 MT	-	CMF
MFI CD33 MC	-	CMF
MFI CD33 MI	-	CMF
MFI CD33 MNC	-	CMF
MFI CD56 MT	-	CMF
MFI CD56 MC	-	CMF
MFI CD56 MI	-	CMF
MFI CD56 MNC	-	CMF
PNN/ Monocytes	-	CMF

Annexe 2 : Moyennes et p-value entre le groupe LMMC et le groupe contrôle

	Moyenne LMMC	Moyenne mono réactionnelle	p.value
GB.GL	24,63	16,30	4,89E-01
MONO.GL	3,54	1,57	6,34E-02
MONO.	22,55	10,55	2,96E-03
PNN.GL	14,56	12,34	7,36E-01
PN.Mono	4,24	8,30	9,05E-03
MYELEMIE.	5,62	1,02	1,50E-01
BLASTES.	0,23	0,04	2,84E-01
Plt.GL	141,62	336,78	1,29E-06
Hb	10,59	11,81	2,27E-02
CMF.C.	93,78	86,35	9,02E-04
CMF.C.GL	4,77	1,56	5,82E-02
CMF.IN..	4,45	9,00	7,07E-03
CMF.IN.GL	0,16	0,26	3,84E-01
CMF.NC..	1,72	4,66	2,09E-03
CMF.NC.GL	0,07	0,10	4,54E-01
CMF.LEUKS..	37999,77	35817,80	7,25E-01
CMF.GRAN.	52,33	71,47	5,93E-04
CMF.GRAN.G.L	14,89	12,25	7,36E-01
CMF.LY.	13,19	13,59	8,66E-01
CMF.LY.GL	3,15	1,87	4,61E-01
CMF.MONO.	29,63	13,30	6,40E-04
CMF.MONO.GL	5,01	1,93	7,31E-02
CMF.BLASTES.	0,88	0,51	1,48E-01
CMF.BLASTES.G L	0,22	0,09	1,88E-01
CMF.14.16...	0,38	0,17	3,11E-02
CMF.14.16.G.L	0,08	0,02	3,14E-01
CD14MFI.MT	15,71	20,24	2,30E-01
CD14MFI.C	18,22	24,40	1,72E-01

CD14MFI.IN	21,65	29,45	1,32E-01
CD14.MFINC	4,06	4,40	7,30E-01
CD16.MFI.MT	0,85	1,17	1,48E-02
CD16.MFI.C	0,78	0,88	3,81E-02
CD16.MFI.IN	4,14	5,51	1,97E-03
CD16.MFI.NC	13,10	16,72	9,49E-02
CD33.MFI.MT	9,57	8,12	1,51E-01
CD33.MFI.C	9,69	8,39	1,94E-01
CD33.MFI.IN	10,32	8,27	7,95E-02
CD33.MFI.NC	6,36	5,18	1,27E-01
CD56.MFI.MT	1,03	0,58	6,50E-02
CD56.MFI.C	1,17	0,60	6,05E-02
CD56.MFI.IN	0,87	0,68	2,99E-01
CD56.MFI.NC	0,34	0,32	8,58E-01
PNN/ Monocytes (CMF)	2,51	6,82	2,92E-06

BIBLIOGRAPHIE

1. 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*. 4 juin 2015;125(23):3618-26.
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*. août 1976;33(4):451-8.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937-51.
4. 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*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
5. 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*. août 1994;87(4):746-54.
6. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 1 juill 2008;112(1):45-52.
7. 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*. août 2015;95(2):168-76.
8. 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*. oct 2015;90(10):882-7.
9. Parikh SA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 1 nov 2013;88(11):967-74.
10. Beran M, Wen S, Shen Y, Onida F, Jelinek J, Cortes J, et al. Prognostic factors and risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia: Validation study of the M.D. Anderson Prognostic Scoring System. *Leuk Lymphoma*. 1 janv 2007;48(6):1150-60.
11. 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*. juill 2007;92(7):974-7.
12. 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*. déc 2014;38(12):1413-9.

13. Terry RL, Miller SD. Molecular control of monocyte development. *Cell Immunol.* 2014;291(0):16-21.
14. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 21 oct 2010;116(16):e74-80.
15. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Vallespi T, Brunning R, Mufti GJ, et al. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica.* 1 juill 2009;94(7):994-7.
16. Lambert C, Preijers FWMB, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 1 déc 2015;n/a-n/a.
17. Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* mars 2014;219(3):172-8.
18. Baldridge MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* févr 2011;32(2):57-65.
19. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 5 févr 2010;327(5966):656-61.
20. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, et al. Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell.* 29 août 2013;154(5):1112-26.
21. Swirski FK, Hilgendorf I, Robbins CS. From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Semin Immunopathol.* mars 2014;36(2):137-48.
22. Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *Br J Haematol.* 1 mai 2014;165(3):273-86.
23. McCullough KB, Patnaik MM. Chronic Myelomonocytic Leukemia: a Genetic and Clinical Update. *Curr Hematol Malig Rep.* sept 2015;10(3):292-302.
24. 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.* août 2014;89(8):813-8.
25. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespi T, Luño E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* mars 2011;96(3):375-83.
26. 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.* sept 2013;98(9):1344-52.
27. 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.* 15 janv 2016;6(1):e385.
28. Mughal TI, Cross NCP, Padron E, Tiu RV, Savona M, Malcovati L, et al. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis,

- diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. sept 2015;100(9):1117-30.
29. 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*. 7 janv 2013;31(19):2428-36.
 30. Itzykson R, Solary E. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. juill 2013;27(7):1441-50.
 31. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 5 févr 2016;6(2):e393.
 32. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond [Internet]. [cité 14 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com.gate2.inist.fr/science/article/pii/S0145212612003414>
 33. 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*. janv 2012;36(1):72-80.
 34. Dyachenko P, Rozenman D, Bennett M. Unusual skin and testicular lesions in a patient with CMML. *Eur J Intern Med*. juill 2006;17(4):290-1.
 35. Groupe Français des Myélodysplasies (GFM). Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) et la leucémie myélomonocytaire chronique: diagnostic, classifications, traitement [Internet]. 2015 [cité 24 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.gfmgroup.org/fichiers/ConsensusGFM2015.pdf>
 36. Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac J-P, Fossat C, et al. Étude des valeurs normales de l'hémogramme chez l'adulte : un besoin pour une meilleure interprétation et pour l'accréditation du laboratoire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 sept 2014;72(5):561-81.
 37. ANAES. Lecture critique de l'hémogramme: valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques. 1997.
 38. 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*. déc 2006;19(12):1536-45.
 39. 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*. mai 2013;5(5):1332.
 40. Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia*. 2008;22(7):1308-19.
 41. Sallman DA, Padron E. Transformation of the Clinical Management of CMML Patients Through In-Depth Molecular Characterization. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. juin 2015;15 Suppl:S50-55.
 42. Morel P, Hebbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be

- incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*. sept 1993;7(9):1315-23.
43. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Porta MGD, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 11 avr 2013;121(15):3005-15.
 44. 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*. janv 2011;52(1):92-100.
 45. Wood BL. Myeloid malignancies: myelodysplastic syndromes, myeloproliferative disorders, and acute myeloid leukemia. *Clin Lab Med*. sept 2007;27(3):551-575, vii.
 46. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol*. nov 2005;124(5):799-806.
 47. Gorczyca W. Flow cytometry immunophenotypic characteristics of monocytic population in acute monocytic leukemia (AML-M5), acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Methods Cell Biol*. 2004;75:665-77.
 48. Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ, Machin D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. *Br J Haematol*. mars 1985;59(3):425-33.
 49. Worsley A, Oscier DG, Stevens J, Darlow S, Figs A, Mufti GJ, et al. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. *Br J Haematol*. janv 1988;68(1):17-21.
 50. Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, Cañizo MC, Torrabadella M, García S, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood*. juill 1989;74(1):395-408.
 51. Calvo X, Nomdedeu M, Santacruz R, Martínez N, Costa D, Pereira A, et al. Comparison of three prognostic scoring systems in a series of 146 cases of chronic myelomonocytic leukemia (CMML): MD Anderson prognostic score (MDAPS), CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model. A detailed review of prognostic factors in CMML. *Leuk Res*. nov 2015;39(11):1146-53.
 52. 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*. 1 févr 2002;99(3):840-9.
 53. 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*. juill 2013;27(7):1504-10.
 54. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 20 sept 2012;120(12):2454-65.

55. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 15 mars 1997;89(6):2079-88.
56. 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*. 15 mai 2002;20(10):2429-40.
57. Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 15 avr 2006;106(8):1794-803.
58. Randomized Phase III Study of Decitabine +/- Hydroxyurea (HY) Versus HY in Advanced Proliferative CMML - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 7 juin 2016]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02214407>
59. VIDAZA 25 mg/ml pdre p susp inj - Vidal.fr [Internet]. [cité 7 juin 2016]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/Medicament/vidaza-90991-pharmacodynamie.htm>
60. Costa R, Abdulhaq H, Haq B, Shaddock RK, Latsko J, Zenati M, et al. Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer*. 15 juin 2011;117(12):2690-6.
61. Tantravahi SK, Szankasi P, Khorashad JS, Dao K-H, Kovacsovics T, Kelley TW, et al. A Phase II Study of the Efficacy, Safety and Determinants of Response to 5-Azacitidine (Vidaza®) in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 11 janv 2016;1-12.
62. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. mars 2009;10(3):223-32.
63. DACOGEN 50 mg pdre p sol diluer p perf - Vidal.fr [Internet]. [cité 7 juin 2016]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/Medicament/dacogen-122590-pharmacodynamie.htm>
64. Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol J-B, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1 mai 2015;125(5):1857-72.
65. Wattel E, Guerci 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*. 1 oct 1996;88(7):2480-7.
66. Geissler K, Jäger E, Barna A, Sliwa T, Knöbl P, Schwarzwinger I, et al. In vitro and in vivo effects of JAK2 inhibition in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 9 mai 2016;
67. Nazha A, Prebet T, Gore S, Zeidan AM. Chronic myelomonocytic leukemia: Are we finally solving the identity crisis? *Blood Rev*. 25 avr 2016;
68. Kekre N, Ho VT. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis and chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1 janv 2016;91(1):123-30.
69. Cheng H, Kirtani VG, Gergis U. Current status of allogeneic HST for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. avr 2012;47(4):535-41.

70. Eissa H, Gooley TA, Sorror ML, Nguyen F, Scott BL, Doney K, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: Relapse-Free Survival is Determined by Karyotype and Comorbidities. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. juin 2011;17(6):908-15.
71. Kongtim P, Popat U, Jimenez A, Gaballa S, Fakhri RE, Rondon G, et al. Treatment with Hypomethylating Agents before Allogeneic Stem Cell Transplant Improves Progression Free Survival for Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. janv 2016;22(1):47.
72. BiostaTGV - Statistiques en ligne [Internet]. [cité 6 oct 2016]. Disponible sur: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>
73. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *BMJ*. 20 oct 2007;335(7624):806-8.
74. Mya HT, Campelo MD, Herrero SV, Díaz-Alvarez A, Bustos D, Vaquero LM, et al. Peripheral Blood Analysis By Flow Cytometry for the Diagnosis of Type I Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):5248-5248.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté 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, 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 les actes criminels.

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

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

RESUME

La LMMC est une pathologie récemment reconnue comme entité unique (2008) qui reste un diagnostic d'exclusion nécessitant l'établissement de nombreux critères avant d'être posé.

De multiples études portent sur l'immunophénotypage des monocytes du sang périphérique par cytométrie en flux, dont, notamment, le travail de Selimoglu et al. (Blood, 2015). Une stratégie de fenêtrage par élimination permet aux auteurs de sélectionner les monocytes. Ils séparent la population monocyttaire en 3 sous-populations : monocytes classiques, intermédiaires et non classiques. Les auteurs établissent une valeur seuil de monocytes classiques (94%) au-delà de laquelle ils affirment le diagnostic de LMMC.

Nous cherchons à savoir si cet outil diagnostique s'applique aux patients LMMC du CHCB.

Deux groupes sont définis : patients LMMC et patients témoins présentant une monocytose transitoire. Un troisième groupe est constitué de sujets présentant une monocytose chronique dont le diagnostic de LMMC ne peut être établi ou écarté : il s'agit de la population test.

Nous utilisons la même technique analytique et la même stratégie de fenêtrage que les auteurs de l'étude de référence.

Une différence significative pour le pourcentage de monocytes classiques est retrouvée entre les groupes de patients LMMC et témoins. Cependant nos résultats en termes de sensibilité et spécificité sont très différents concernant la valeur seuil de 94%. Et nous ne pouvons appliquer de valeur seuil sur la population test. Nous relevons également une variabilité intra individuelle au sein de la population LMMC.

Du fait de ces discordances, il apparaît que des études complémentaires doivent être menées pour établir la place de cette analyse dans le diagnostic de la LMMC.

TITRE EN ANGLAIS

Place of the study of blood monocyte subsets by flow cytometry in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia

MOTS CLES

LMMC - diagnostic- immunophénotypage - cytométrie en flux- monocytes - sous-populations