



UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2014

THÈSE N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

**RELATION ENTRE L'ANALYSE CYTOLOGIQUE ET L'ANALYSE
CYTOMÉTRIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES SYNDROMES
MYÉLODYSPLASIQUES**

Présenté et soutenu publiquement

Par M^{lle} Céline MORVAN
Née le 19 Janvier 1986, à La Tronche (38)

Le lundi 2 Juin 2014 à Limoges

Conformément aux dispositions de l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'État de docteur en pharmacie, tient lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Directeur de thèse

Madame le Docteur Estelle GUERIN

Membres du Jury

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ	Président
Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD	Juge
Madame le Docteur Estelle GUERIN	Juge
Monsieur le Docteur Franck TRIMOREAU	Juge
Madame le Docteur Marie-Pierre GOURIN	Juge

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

**RELATION ENTRE L'ANALYSE CYTOLOGIQUE ET L'ANALYSE
CYTOMÉTRIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES SYNDROMES
MYÉLODYSPLASIQUES****Présenté et soutenu publiquement**

Par M^{lle} Céline MORVAN
Née le 19 Janvier 1986, à La Tronche (38)

Le lundi 2 Juin 2014 à Limoges

Conformément aux dispositions de l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'État de docteur en pharmacie, tient lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**Directeur de thèse****Madame le Docteur Estelle GUERIN****Membres du Jury**

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ	Président
Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD	Juge
Madame le Docteur Estelle GUERIN	Juge
Monsieur le Docteur Franck TRIMOREAU	Juge
Madame le Docteur Marie-Pierre GOURIN	Juge

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS :

BATTU Serge CHIMIE ANALYTIQUE

BENEYTOUT Jean-Louis BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

BROSSARD Claude PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

DELAGE Christiane CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DESMOULIERE Alexis PHYSIOLOGIE

DUROUX Jean-Luc BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

MAMBU Lengo PHARMACOGNOSIE

ROUSSEAU Annick BIOSTATISTIQUE

VIANA Marylène PHARMACOTECHNIE 3

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

LACHÂTRE Gérard TOXICOLOGIE

MOESCH Christian HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)

PICARD Nicolas PHARMACOLOGIE

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 THERAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise PHARMACOLOGIE

FAGNERE Catherine CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

FROISSARD Didier BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

JAMBUT Anne-Catherine CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

LABROUSSE Pascal BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

LEGER David BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

LIAGRE Bertrand BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 4

MARION-THORE Sandrine CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

MARRE-FOURNIER Françoise BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

MILLOT Marion PHARMACOGNOSIE

MOREAU Jeanne MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE

PASCAUD Patricia PHARMACIE GALENIQUE

POUGET Christelle CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

SIMON Alain CHIMIE GENERALE ET MINERALE

TROUILLAS Patrick BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

VIGNOLES Philippe BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR de LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël ANGLAIS

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

MAMMARI Nour (1/10/13 au 31/08/14) MICROBIOLOGIE

VEDRENNE Nicolas (1/11/13 au 31/08/14) CHIMIE ANALYTIQUE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury :

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse et l'intérêt que vous avez témoigné pour ce travail en acceptant de le juger. Soyez assurée de mon profond respect et de ma haute considération.

Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD

Pour l'honneur que vous me faites d'avoir jugé ce travail. Merci pour tous les précieux conseils que vous m'avez prodigués ainsi que la grande aide apportée pour la réalisation de ce projet. Soyez assuré de ma grande reconnaissance.

Madame le Docteur Estelle GUERIN

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse très intéressant, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton dynamisme pour l'encadrement de ce travail. Je te remercie également pour tout ce que j'ai appris à tes côtés lors de mes deux semestres passés au laboratoire d'hématologie en tant qu'interne.

Monsieur le Docteur Franck TRIMOREAU

Pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour votre participation et l'aide apportée à ce projet. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Madame le Docteur Marie-Pierre GOURIN

Pour votre ouverture d'esprit et l'intérêt que vous portez aux activités du laboratoire d'hématologie. C'est un grand honneur pour moi que de vous compter dans ce jury, je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie l'ensemble des biologistes, techniciens, ainsi que tout le personnel des services de Biochimie, Hématologie et de Bactériologie-Virologie de Limoges, des laboratoires d'Immunologie et de Parasitologie de Toulouse pour leur participation active à ma formation professionnelle.

Je tiens également à remercier :

Mes parents, merci pour votre indéfectible soutien tout au long de ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir su me motiver dans les moments difficiles.

Loulou, merci pour tes précieux conseils et le sacrifice de quelques week-ends qui ont permis à cette thèse d'aboutir. Merci pour ton soutien, ta patience et ton optimisme.

Merci à Cécile, David et Victor, pour votre amitié infaillible depuis toutes ces années malgré la distance.

Merci au 7Club Seven : Amandine, Annabelle, Christelle, Claire, Fanny, Julie et leurs pièces rapportées, merci pour tous ces moments formidables passés et à venir.

Merci à tous ceux que j'ai pu croiser au cours de mon internat à Limoges et Toulouse : Fanny, Jennifer, Aurélie, Nicolas, Isabelle, Caroline, Marc, David, Jérôme, Ludo, Romain, Laurie, Raphaëlle, Adam, Batiste, Camille, Thomas, Christophe, Jessica et plus particulièrement à Coralie, Thomas, Ana, Jasmine et Laure.

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	12
2	GÉNÉRALITÉS	14
2.1	Les syndromes myélodysplasiques.....	14
2.1.1	Définitions	14
2.1.2	Épidémiologie.....	14
2.1.3	Étiologie.....	15
2.1.4	Signes cliniques et circonstances de découverte.....	16
2.1.5	Diagnostic biologique et cytologique	16
2.1.7	Diagnostic cytochimique	22
2.1.8	Diagnostic cytogénétique.....	22
2.1.9	Autres examens biologiques	24
2.1.10	Diagnostic différentiel	25
2.1.11	Oncogenèse et biologie moléculaire.....	27
2.1.12	Classification des SMD.....	36
2.1.13	Pronostic.....	40
2.1.14	Traitement et prise en charge	44
2.2	La cytométrie en flux	48
2.2.1	Définitions	48
2.2.2	Principes de la CMF	48
2.2.3	Applications de la CMF dans les hémopathies.....	53
2.2.4	Place de la CMF dans les SMD.....	55
3	OBJECTIFS	62
4	MATÉRIEL ET MÉTHODES	63
4.1	Constitution des cohortes	63
4.2	Analyse par CMF	64
4.2.1	Protocoles de traitement des échantillons de moelle osseuse	64
4.2.2	Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata	65
4.2.3	Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata étendu.....	72
4.3	Analyse cytologique des frottis de moelle osseuse.....	73
4.3.1	Grille de lecture et score cytologique	73
4.3.2	Lecture des lames de moelle osseuse.....	73
4.4	Analyse des résultats	74

5	RÉSULTATS.....	75
5.1	Données initiales	75
5.1.1	Recueil des données clinico-biologiques.....	75
5.1.2	Les patients.....	76
5.2	Cytométrie en flux	82
5.2.1	Score d'Ogata	82
5.2.2	Cohorte n°1 et score d'Ogata étendu	88
5.3	Cytologie : cohorte n°2	92
5.3.1	Sensibilité et spécificité du score cytologique	92
5.3.2	Distribution du score cytologique selon les cinq groupes	93
5.4	Relation entre le score d'Ogata et le score cytologique dans la cohorte n°2	94
5.4.1	Cohorte n°2 tous groupes confondus :	94
5.4.2	Groupe contrôle non SMD	95
5.4.3	Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans les groupes des SMD	96
6	DISCUSSION	101
7	CONCLUSION.....	108
8	ANNEXES.....	110
9	BIBLIOGRAPHIE	120
10	TABLE DES MATIÈRES	126
11	TABLES DES FIGURES	130
12	TABLE DES TABLEAUX.....	131

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Anémie Aplasique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALIP : Localisation Anormale de Précurseurs Immatures

AR : Anémie Réfractaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARS : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne

ARS-T : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose

AREB I : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos de type 1

AREB II : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos de type 2

ASXL1 : *Additional Sex-Comb Like 1*

ATG : *Anti-Thymocyte Globulin*

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

CBL : *Casitas B-lineage Lymphoma*

CD : *Cluster of Differentiation*

CDR : *Common Deleted Region*

CGH : *Comparative Genomic Hybridization*

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMF : CytoMétrie en Flux

CRDM : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée

CRDU : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Unilignée

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

DNMT3 : *Mammalian de novo DNA methyltransferase 3*

ELN : *European LeukemiaNet*

EPO : Érythropoïétine

EZH2 : *Enhancer of Zeste Homolog 2*

FAB : Franco-Americano Britannique

FCS : *Flow Cytometry Standard*

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*

FLT3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*

FS : *Forward Scatter*

G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*

GFM : Groupe Français des Myélodysplasies

HAS : Haute Autorité de Santé

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

ICD-O : *International Classification of Diseases for Oncology*

ICUS : *Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance*

IDH : Isocitrate DésHydrogénase

IDUS : *Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance*

IL : *Inter-Leukine*

IPSS : *International Prognosis Scoring System*

IPSS-r : *revised International Prognosis Scoring System*

ISCN : *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

LA : Leucémie Aiguë

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LMD : *List Mode Data*

LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique

MGG : May-Grünwald Giemsa

MRD : *Minimal Residual Disease*

NCI : *National Cancer Institute*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : *Phosphate buffered saline*

PMT : *PhotoMultiplier Tube*

PNN : PolyNucléaire Neutrophile

PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique

RAS : *Rat Sarcoma*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

RTK : Récepteurs à activité Tyrosine Kinase

SEER : *Surveillance, Epidemiology, and End Results*

SFH : Société Française d'Hématologie

SF3B1 : *Splicing Factor 3b, subunit 1*

SIL : Système d'Informatique de Laboratoire

SMD : Syndrome MyéloDysplasique
SMD-I : Syndrome MyéloDysplasique Inclassable
SMP : Syndrome MyéloProlifératif
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
SRSF2 : *Serine/arginine-Rich Splicing Factor 2*
SS : *Side Scatter*
TET2 : *Ten Eleven Translocation 2*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TPO : Thrombopoïétine
U2AF1 : *U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 1*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPN : Valeur Prédictive Négative
VPP : Valeur Prédictive Positive
WPSS : *WHO classification based Prognosis Scoring System*

1 INTRODUCTION

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies clonales myéloïdes acquises. Ces pathologies sont caractérisées par une hématopoïèse inefficace responsable de cytopénies périphériques et par une transformation fréquente en leucémie aiguë myéloïde (LAM).

Le diagnostic de SMD est basé sur une combinaison d'éléments cliniques et biologiques. La mise en évidence d'anomalies morphologiques sur les lignées érythroïde, granuleuse et mégacaryocytaire par l'examen cytologique du frottis de moelle osseuse, a longtemps été considérée comme le *gold standard* dans le diagnostic des SMD. Celui-ci est facilité lorsque les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sont présents : excès de blastes médullaires, dysmyélopoïèse marquée et anomalies cytogénétiques. La présence de sidéroblastes en couronne est également une aide pour le diagnostic de certains SMD. En l'absence de ces marqueurs, le diagnostic biologique ou le diagnostic différentiel avec des causes secondaires de dysmyélopoïèse peuvent cependant se révéler plus difficiles. Dans de tels contextes clinico-biologiques, il existe un réel besoin de critères supplémentaires pour le diagnostic de SMD. C'est en ce sens que l'analyse par la cytométrie en flux (CMF) des cellules de la moelle osseuse s'impose de plus en plus comme un outil important pour le diagnostic biologique des SMD.

En effet, cette méthode d'analyse multiparamétrique, développée pour l'étude des constituants à la surface des cellules, permet la caractérisation individuelle, qualitative et quantitative des cellules en suspension dans un liquide. Son application permet de détecter les aberrations de l'expression de certains marqueurs des cellules myéloïdes au niveau de la moelle osseuse des patients atteints de SMD. Différents groupes de travail ont conçu plusieurs systèmes de notation pour le diagnostic des SMD. L'*European LeukemiaNet* (ELN) a récemment validé un score en CMF s'appliquant au diagnostic des SMD, le score d'Ogata.

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'apport de la CMF pour le diagnostic biologique des SMD et son intérêt par rapport à la cytologie (méthode de référence). Ce manuscrit présentera tout d'abord les généralités sur les SMD et l'état de l'art actuel : définitions, physiopathologie, méthodes de diagnostic clinico-biologiques et prises en charge thérapeutiques. Il introduira également les notions fondamentales de la CMF. Puis nous détaillerons les résultats de l'analyse du score de CMF d'Ogata déjà reconnu, ainsi que l'étude d'un deuxième score

composé d'un panel plus étendu. Ce mémoire mettra enfin en évidence la relation entre la CMF et la cytologie ainsi que leur complémentarité pour le diagnostic des SMD.

2 GÉNÉRALITÉS

2.1 Les syndromes myélodysplasiques

2.1.1 Définitions

Les SMD sont des pathologies formant un groupe hétérogène d'hémopathies clonales myéloïdes acquises caractérisées par :

- une différenciation et une maturation défectueuses des cellules souches hématopoïétiques (CSH), se traduisant par une hématopoïèse inefficace responsable de cytopénies sanguines, et par la présence d'une ou plusieurs dysplasies des principales lignées cellulaires myéloïdes.
- une augmentation de l'apoptose des précurseurs des cellules sanguines contribuant également aux cytopénies périphériques.
- l'expansion anormale d'un clone, ce qui augmente le risque d'une transformation en LAM (1,2).

Les SMD constituent le plus fréquent des états pré-leucémiques chez l'adulte (3).

2.1.2 Épidémiologie

Les SMD prédominent chez les sujets âgés avec une médiane d'âge au diagnostic de 70 ans. L'incidence est de 3 à 5 cas pour 100 000 habitants par an, elle augmente ensuite avec l'âge, chez les sujets âgés de plus de 70 ans elle est supérieure à 20 cas pour 100 000 habitants par an.

Il existe une prédominance masculine de ces pathologies (2).

Les SMD ont longtemps été considérés comme des pathologies non malignes jusqu'à l'adoption de l'ICD-O, *International Classification of Diseases for Oncology* en 2000 par l'OMS (4). En effet, les SMD étaient classés auparavant dans la catégorie 1 du code de classification de l'ICD-O (hémopathies d'évolution incertaine bénignes ou malignes), ils ont ensuite été reclassés en catégorie 3 (hémopathies malignes) (5).

A partir de 2001 les SMD ont été répertoriés dans des registres comme le SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) mené par le *National Cancer Institut* (NCI) américain.

Les résultats de ce programme montrent que les taux d'incidence standardisés à l'âge étaient respectivement de 3,6 cas en 2001, 3,8 en 2002 et de 4,1 à 4,6 cas pour 100 000 habitants de 2003 à 2008. Ces résultats suggèrent un recensement incomplet des SMD les premières années avec une amélioration et une stabilisation du recueil dans le temps (5).

2.1.3 Étiologie

L'étiologie des SMD reste inconnue dans la grande majorité des cas, avec seulement 10% des cas étiquetés (6).

L'OMS définit les SMD primaires ou *de novo* comme étant des pathologies survenant en l'absence d'exposition à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie anticancéreuses.

Il existe de nombreux facteurs de risques impliqués dans la prédisposition des SMD primaires. Ils sont principalement professionnels et environnementaux avec le tabagisme, l'exposition aux produits chimiques et aux solvants utilisés dans l'agriculture, l'exposition aux dérivés du benzène. On peut également citer la présence d'antécédents familiaux d'hémopathies (7).

Les SMD survenant chez des patients ayant des antécédents de chimiothérapie et/ou de radiothérapie anticancéreuses sont définis comme secondaires. Ils représentent 10% à 20% des cas de SMD. Les principaux agents cytotoxiques impliqués sont les agents alkylants (chlorambucil, melphalan, nitroso-urées, *etc*), les inhibiteurs de la topoisomérase II (étoposide, doxorubicine, daunorubicine, *etc*), les antimétabolites et les analogues des purines. Les radiations ionisantes peuvent également être responsables de SMD secondaires (6).

Un risque accru de survenue d'un SMD est également associé à certaines pathologies congénitales comme l'anémie de Fanconi, la dyskératose congénitale, les syndromes de Diamond-Blackfan et Shwachmann-Diamond (2).

2.1.4 Signes cliniques et circonstances de découverte

Un bilan diagnostique pour SMD doit être réalisé devant une symptomatologie évocatrice de cytopénies (anémie, neutropénie, thrombopénie). Ces manifestations cliniques ne sont pas spécifiques et varient avec le type et la profondeur de la ou des cytopénies. Ce sont les signes cliniques associés à l'anémie qui sont révélateurs d'un SMD dans 90% des cas : asthénie, pâleur, tachycardie. Dans les 10% restants, ce sont les signes hémorragiques (purpura cutanéomuqueux) en rapport avec la thrombopénie ou un problème infectieux lié à la neutropénie qui font pratiquer l'exploration biologique approfondie.

L'examen clinique et l'interrogatoire doivent évaluer le retentissement des cytopénies, leur ancienneté, l'exposition à des facteurs favorisants (chimiothérapie, radiothérapie, tabagisme, exposition au benzène, etc) ainsi que rechercher des signes de pathologie dysimmunitaire (arthropathie, vascularite, polychondrite, etc) fréquemment retrouvés dans les SMD (3,8).

2.1.5 Diagnostic biologique et cytologique

L'exploration biologique à la recherche de SMD doit être envisagée chez des patients présentant des cytopénies périphériques inexplicables (9).

2.1.5.1 Hémogramme et formule sanguine

La réalisation de l'hémogramme va permettre de révéler la présence d'une ou plusieurs cytopénies et l'analyse cytologique du frottis sanguin au microscope peut mettre en évidence des signes de dysplasie cellulaire.

Les cytopénies chroniques, définies par une durée supérieure à 6 mois, sont systématiquement retrouvées dans les SMD (10). Les seuils critiques de ces cytopénies retenus par la classification OMS 2008 sont ceux recommandés par l'IPSS (*International Prognosis Scoring System*) en 1997.

L'anémie est la cytopénie la plus couramment observée, elle survient chez 80% à 85% des patients (8). Elle est généralement normochrome, normo ou macrocytaire et arégénérative. Le seuil critique retenu est une hémoglobininémie inférieure à 10 g/dl (2).

Une neutropénie isolée ou associée à l'anémie est retrouvée dans 40% des cas, le seuil critique retenu en faveur d'un SMD est une valeur des polynucléaires neutrophiles (PNN) circulants inférieure à 1,8 G/L (2).

Une thrombopénie isolée ou associée aux autres cytopénies est observée dans 30% à 40% des cas. Le seuil critique retenu en faveur d'un SMD est une valeur de plaquettes inférieure à 100 G/L (2).

Une pancytopénie est retrouvée dans 50% des cas (11). Le nombre de cytopénies constitue clairement un critère de mauvais pronostic d'après l'IPSS (12).

Une hyperleucocytose est généralement retrouvée dans les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) avec un compte de monocytes supérieur à 1 G/L.

Certains SMD à caryotypes particuliers ou certaines anémies sidéroblastiques peuvent être accompagnés d'une thrombocytose.

L'examen du frottis sanguin peut parfois orienter vers le diagnostic de SMD. On peut y observer des anomalies morphologiques des trois lignées cellulaires témoignant de la dysmyélopoïèse :

- des hématies à type de macrocytes, des hématies à ponctuations basophiles et la présence d'érythroblastes circulants. Outre la macrocytose, les anomalies des érythrocytes ne sont pas très spécifiques (10),
- une dégranulation des PNN (très spécifique), une hyposegmentation nucléaire (aspect de type Pseudo-Pelger-Huët), ou une hypersegmentation des PNN,
- la présence de micromégacaryocytes.

La présence de quelques blastes circulants est possible, certains peuvent comporter des corps d'Auer (6). Ceux-ci doivent être décomptés et leur pourcentage doit être déterminé sur au moins 200 leucocytes selon les recommandations de l'OMS (2).

2.1.5.2 Myélogramme

L'examen du frottis de moelle osseuse est essentiel pour confirmer le diagnostic définitif de SMD. Il est également important pour évaluer le pronostic et choisir la prise en charge thérapeutique optimale pour chaque patient (2).

Le myélogramme est une aide au diagnostic différentiel d'autres causes de cytopénies. Il fournit des informations sur la cellularité de la moelle osseuse, la présence de blastes et d'anomalies morphologiques des différentes lignées myéloïdes. Pour le diagnostic de SMD, les deux paramètres importants sont le décompte de blastes et l'existence d'anomalies morphologiques qualifiant la dysmyéloïèse (10).

La moelle osseuse des SMD est classiquement hyper- ou normocellulaire, mais peut être hypoplasique chez une minorité de patients (environ 10%) (13).

Les SMD sont caractérisés par des anomalies morphologiques touchant une ou plusieurs lignées myéloïdes mises en évidence sur le myélogramme. On parle de dysmégacaryopoïèse pour la lignée des mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes), de dysérythropoïèse pour la lignée des érythroblastes (précurseurs des érythrocytes) et de dysgranulopoïèse pour la lignée granuleuse (précurseurs des PNN). L'existence d'une spécificité variable des anomalies morphologiques des différentes lignées myéloïdes est un point important à prendre en compte dans le diagnostic des SMD (10). La dysmégacaryopoïèse, notamment la présence de micromégacaryocytes ainsi que la dysgranulopoïèse avec la présence de cellules hyposegmentées ou agranulaires possèdent une valeur diagnostique importante. En revanche, la dysérythropoïèse est peu spécifique et a une valeur diagnostique faible (10). L'étude morphologique des cellules doit être réalisée sur au moins 30 mégacaryocytes et 100 érythroblastes et granulocytes dans la mesure du possible selon Malcovati (13). L'OMS considère comme significatif un nombre de cellules dysplasiques supérieur ou égal à 10% dans chaque lignée des précurseurs érythroïdes, granulocytaires et mégacaryocytaires (2).

La classification des SMD est principalement basée sur le type de dysplasie et sur le pourcentage de blastes médullaires. Il peut être augmenté dans les SMD mais doit rester strictement inférieur à 20%, taux correspondant au seuil établi pour le diagnostic de LAM.

Pour déterminer le pourcentage de blastes, il est recommandé de compter au moins 500 cellules sur un frottis de moelle osseuse (2).

Au total, l'étude cytologique du frottis médullaire s'attachera à évaluer le plus précisément possible :

- le nombre de lignées atteintes,
- la proportion d'éléments atteints dans une lignée,
- le type d'anomalies morphologiques,
- l'intensité de ces anomalies,
- et le décompte de blastes (10).

Pour évaluer la dysmyélopoïèse, la quantification de la dysplasie de chacune des lignées selon une grille a été proposée dans les années 1990 par G.Flandrin puis adaptée par le Groupe Français des Myélodysplasies (GFM). Le GFM recommande d'évaluer les dysplasies sur au moins 30 mégacaryocytes, 200 leucocytes et 200 érythroblastes.

Les anomalies morphologiques sont appréciées de 0 à 2 :

- absence d'anomalie : 0,
- dysplasie >10% : 1,
- dysplasie >50% : 2.

Cette grille de quantification est détaillée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Grille de quantification de la dysplasie proposée par le GFM.

Lignée mégacaryocytaire	Absente/Présente		
Dysmégacaryopoïèse			
Micromégacaryocytes	0	1	2
Mégacaryocytes bi-tri ou multinucléés (noyaux séparés)	0	1	2
Mégacaryocytes hypolobés (type 5q- et autres)	0	1	2
Anomalies cytoplasmiques (tous types : vacuoles, coloration...)	0	1	2
Dysmégacaryopoïèse >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)	0	1	2
Lignée érythroblastique	Absente/Présente		
Dysérythro-poïèse			
Anomalies nucléaires (irrégularités, multinucléarité, gigantisme)	0	1	2
Anomalie cytoplasmiques (défaut d'hémoglobinsation)	0	1	2
Macroérythroblastés-mégaloblastés	0	1	2
Sidéroblastés en couronne >15%	0	1	2
Dysérythro-poïèse >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)	0	1	2
Lignée granuleuse	Absente/Présente		
Dysgranulopoïèse/anomalies nucléaires			
Défaut de segmentation (tous types : pseudo-Pelger Huët, bissac, ou autre hyposegmentation)	0	1	2
Condensation anormale de la chromatine	0	1	2
Autres anomalies nucléaires (tous autres types dont binucléarité...)	0	1	2
Dysgranulopoïèse/anomalies cytoplasmiques			
Hypogranularité-agranulaire (grains faiblement ou non visibles)	0	1	2
Hypergranularité (granulations azurophiles)	0	1	2
Persistance de la basophilie (corps de Döhle...)	0	1	2
Corps d'Auer	0	1	2
Autres anomalies cytoplasmiques (tous autres types, dont vacuoles, grains type Chediak-Higashi...)	0	1	2
Dysmyélo-poïèse sur d'autres cellules : éosinophiles, basophiles, mastocytes, monocytes...	0	1	2
Dysgranulopoïèse >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)	0	1	2

Le myélogramme permet enfin d'évaluer le degré de la fibrose médullaire et la présence éventuelle de cellules non hématologiques, comme les métastases (13). Le recours à la biopsie ostéo-médullaire (BOM) n'est pas systématiquement indiqué devant une suspicion de SMD, excepté en cas d'hypoplasie de la moelle ou d'aspiration médullaire impossible (3).

2.1.5.3 Critères de diagnostic des SMD

Une conférence internationale de consensus a revu la définition des SMD ainsi que les outils et critères de diagnostic et de traitement en 2006 (14).

Tout d'abord, deux critères types sont prérequis dans le diagnostic de SMD :

- une cytopénie marquée et constante (≥6 mois) dans au moins une lignée cellulaire,
- l'exclusion d'une autre maladie hématopoïétique clonale ou non ou d'une maladie non hématopoïétique comme principale raison de cytopénie et/ou de la dysplasie.

De plus, au moins un des critères décisifs suivants doit être retrouvé pour confirmer un état de SMD :

- la présence d'une dysplasie dans la moelle osseuse concernant au moins 10% des cellules dans une ou plusieurs des lignées cellulaires suivantes : lignée érythroïde (un compte de sidéroblastes >15% compte également comme critère de dysplasie érythroïde), lignée granulocytaire et la lignée mégacaryocytaire,
- la présence d'un compte de blastes médullaires entre 5 et 19%,
- la présence d'une anomalie cytogénétique récurrente typique dans les SMD.

L'évaluation des dysplasies cellulaires sur le sang et la moelle osseuse est un examen important pour le diagnostic des SMD. La qualité des étalements et de la coloration des frottis sont essentielles pour l'appréciation du degré de la dysplasie. Les frottis doivent être de taille suffisante (1 à 2 cm) et colorés au May-Grünwald Giemsa (MGG) (15).

Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques des lignées myéloïdes dans le sang et la moelle osseuse (2,13).

Lignées cellulaires		
Erythroïde	Myéloïde	Mégacaryocytaire
Sang périphérique		
Anisocytose	Hypolobulation nucléaire (pseudo-Pelger-Huët)	Anisocytose plaquettaire
Poïkilocytose	Hypogranulation cytoplasmique voire agranulation	Plaquettes géantes
Moelle osseuse		
Bourgeonnement nucléaire	Irrégularités nucléaires	Mégacaryocytes hypolobés ou monolobés
Pont internucléaire	Hypolobulation nucléaire (pseudo-Pelger-Huët)	Mégacaryocytes multinucléés à noyaux séparés
Noyaux irréguliers/fragmentés	Hypersegmentation nucléaire	Micromégacaryocytes
Multinucléarité	Granules de type pseudo Chediak-Higashi	Dégranulation cytoplasmique
Changement de type mégaloblastique	Hypogranulation cytoplasmique voire agranulation	
Sidéroblastes en couronne		
Plages cytoplasmiques de deshémoglobinisation		
Cytoplasme feuilleté		
Vacuolisation cytoplasmique		

2.1.7 Diagnostic cytochimique

L'évaluation des dysplasies médullaires doit comprendre une coloration de Perls afin d'établir la présence éventuelle et le nombre de sidéroblastes en couronne. Cette recherche doit être systématiquement réalisée devant toute suspicion de SMD et permettra la classification de la maladie par la suite (13).

Cette coloration met en évidence le fer insoluble sous forme de grains bleu-vert dans le cytoplasme des érythroblastes. Les érythroblastes possédant de tels grains sont alors appelés sidéroblastes.

La coloration de Perls permet de classer les sidéroblastes en trois catégories selon le nombre de grains de fer cytoplasmiques observés :

- sidéroblaste de type 1 : un à quatre grains,
- sidéroblaste de type 2 : plus de cinq grains dispersés dans le cytoplasme,
- sidéroblaste de type 3 : plus de cinq grains disposés en « couronne », entourant le noyau ou englobant au moins un tiers de la circonférence nucléaire.

La présence de plus de 15% de sidéroblastes de type 3, appelés « sidéroblastes en couronne » permet d'identifier les anémies sidéroblastiques (16).

2.1.8 Diagnostic cytogénétique

L'analyse cytogénétique de la moelle osseuse doit être réalisée devant toute suspicion de SMD afin de confirmer le diagnostic, et d'établir le pronostic le cas échéant. Le caryotype tient un rôle majeur dans l'identification d'anomalies chromosomiques clonales, critère essentiel pour établir les scores pronostiques.

Selon les recommandations de l'ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), l'évaluation du caryotype doit être effectuée sur un minimum de 20 métaphases (17). Les nouvelles méthodes et les récents progrès technologiques permettent de détecter de plus en plus de mutations et ce, de manière plus précise (18).

Ces anomalies chromosomiques sont observées dans 50 à 60% des cas. Les plus fréquentes sont :

- les SMD associés à une délétion du bras long du chromosome 5 : del(5q),
- monosomie du chromosome 7 ou délétion du bras long du chromosome 7 : del(7q),

- monosomie du chromosome 8,
- et une délétion du bras long du chromosome 20 : del(20q) (13).

Certaines anomalies clonales sont corrélées à des anomalies morphologiques et cliniques.

Les SMD associés à une del(5q) (syndrome 5q-) sont caractérisés par la présence de mégacaryocytes hypo voire mono-lobés, une anémie réfractaire macrocytaire, un taux de plaquettes normal ou augmenté et une évolution clinique favorable (2). Les SMD avec des anomalies des PNN de type pseudo-Pelger-Huët ou à cytoplasme vacuolés, sont associés à une perte du bras court du chromosome 17 : del(17p). Cette anomalie est de mauvais pronostic et est plus fréquente dans les SMD secondaires (2).

Les caryotypes complexes décrits par au moins trois anomalies, impliquent typiquement le chromosome 5 et/ou le chromosome 7 (monosomie 5 ou del(5q) ; monosomie 7 ou del(7q)), et sont généralement associés à une évolution clinique défavorable (2).

Certaines anomalies cytogénétiques clonales survenant dans les SMD ne sont pas la preuve définitive de cette maladie en l'absence de critères morphologiques. C'est le cas de la perte du chromosome Y, la trisomie 8 et la del(20q). En revanche, la présence d'anomalies chromosomiques récurrentes telles que décrites dans le tableau 3 est un argument présomptif pour établir le diagnostic de SMD en l'absence de preuves morphologiques de la dysplasie. En effet, la présence de cytopénie sans dysplasie ne peut être interprétée comme SMD qu'en présence de ces anomalies cytogénétiques (2).

Lorsque l'analyse cytogénétique classique de la moelle osseuse n'est pas possible ou a échoué, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a un intérêt dans l'évaluation diagnostique et pronostique. Cette technique est utile pour la clarification des aberrations complexes et permet de détecter des anomalies chez plus de 15% de patients atteints de SMD avec un caryotype normal. Bien que les systèmes de notation pronostiques établis soient basés sur la cytogénétique conventionnelle, certaines études ont montré que les anomalies chromosomiques détectées par FISH pouvaient fournir des informations pronostiques et pouvaient être utiles pour soutenir la prise de décision clinique dans certains cas, tels que la del(5q), la del(7q) ou encore une monosomie 7 (2,9,13).

Tableau 3 : Anomalies chromosomiques récurrentes selon l'OMS (2).

Anomalie	SMD	t-SMD
Non équilibrée		
Trisomie 8*	10 %	
Monosomie 7 ou del(7q)	10 %	50 %
Monosomie 5 ou del(5q)	10 %	40 %
del(20q)*	5 - 8 %	
-Y*	5 %	
i(17q) ou t(17p)	3 - 5 %	
Monosomie 13 ou del(13q)	3 %	
del(11q)	3 %	
del(12p) ou t(12p)	3 %	
del(9q)	1 - 2 %	
idic(X)(q13)	1 - 2 %	
Équilibrée		
t(11;16)(q23;p13.3)		3 %
t(23;21)(q26.2;q22.1)		2 %
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1 %	
t(3;11)(p21;q23)	1 %	
inv(3)(q21;q26.2)	1 %	
t(6;9)(p23;q34)	1 %	
*La présence de ces anomalies comme seule anomalie cytogénétique, en l'absence de critère cytologique de dysplasie, n'est pas considérée comme critère définitif de SMD. Dans le cas de cytopénies persistantes d'origine indéterminée, les autres anomalies de ce tableau sont considérées comme critère présomptif de SMD en l'absence d'anomalie morphologique.		

2.1.9 Autres examens biologiques

Certains examens biologiques sont nécessaires afin de préciser le diagnostic différentiel :

- dosage de la vitamine B12 et des folates,
- bilan martial, inflammatoire, thyroïdien, hépatique, rénal et recherche d'hémolyse,
- sérologies virales : hépatite B, hépatite C, virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Le typage HLA (*human leukocyte antigen*) du patient âgé de moins de 65 ans et de sa fratrie doit être systématique en cas d'indication à une allogreffe.

Le phénotypage érythrocytaire est indiqué en cas de traitement substitutif (transfusions).

L'ensemble des examens sanguins à réaliser lorsqu'un SMD est suspecté est détaillé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Liste des examens sanguins à réaliser devant une suspicion de SMD (13).

Catégories d'analyse sanguine	Test spécifique
Hématologie	Hémogramme Compte des réticulocytes Morphologie des 3 lignées myéloïdes sur le frottis sanguin
Biochimie	Folates (érythrocytaire et plasmatique) Vitamine B12 Fer Capacité totale de fixation à la transferrine Ferritine Lactate déshydrogénase Bilirubine Haptoglobine Test de Coombs Protéine C réactive Transaminases Phosphatase alcaline Albumine Acide urique Créatinine Electrophorèse des protéines β-2microglobuline Electrophorèse de l'hémoglobine Bilan thyroïdien
Virologie	VIH Parvovirus B19 Cytomégalovirus Hépatite B et hépatite C
Autres	Hémoglobinurie paroxystique nocturne

2.1.10 Diagnostic différentiel

La présence d'une dysplasie n'est pas la preuve définitive d'un SMD, la principale difficulté est de déterminer si la dysmyélopoïèse est liée à un trouble clonal ou si elle due à une cause secondaire (2).

De nombreux facteurs sont responsables de dysplasies, parmi ceux-ci les carences nutritionnelles sont les plus fréquemment retrouvées avec la carence en vitamine B12/folates. Des causes médicamenteuses comme un traitement par cotrimoxazole, une chimiothérapie anticancéreuse (méthotrexate), ou encore l'utilisation de facteur de croissance granulocytaire sont à éliminer. L'infection virale par le parvovirus B19, des troubles hématologiques congénitaux (anémie aplasique (AA), anémie congénitale dysérythropoïétique) ou encore l'hémoglobinurie paroxystique nocturne sont des pathologies responsables de

dysmyélopoïèse et sont donc à écarter lors du diagnostic. On retrouve également des causes toxiques comme l'exposition aux métaux lourds en particulier l'arsenic (2). Deux conditions où les critères diagnostiques de SMD ne sont pas satisfaits, bien qu'une cytopénie ou une dysplasie soient présentes, ont été récemment définies (19). Il s'agit de la cytopénie idiopathique de signification indéterminée (*idiopathic cytopenia of undetermined significance : ICUS*) et la dysplasie idiopathique de signification indéterminée (*idiopathic dysplasia of undetermined significance IDUS*). Ces termes ont été adoptés en 2006 et inclus dans la classification de l'OMS en 2008 (14). La définition des ICUS est basée sur une cytopénie inexpliquée persistante, et l'échec à établir un diagnostic de SMD selon les critères définis par l'OMS (caryotype normal, absence de sidéroblastes en couronne, *etc*). Contrairement aux ICUS, les patients souffrant d'IDUS montrent des dysplasies importantes (>10% dans une ou plusieurs lignées) mais ne souffrent pas de cytopénies persistantes (20). Selon la littérature, les ICUS et les IDUS représentent le stade précoce d'un processus néoplasique, et peuvent évoluer vers un SMD (19). Ainsi, le diagnostic d'ICUS devrait conduire à un suivi hématologique similaire à celui de SMD de faible risque (21). En raison du faible nombre de patients décrits jusqu'ici, la période de latence et l'évolution clinique de ces patients ne peuvent être prédites. L'analyse cytogénétique par la technique de FISH peut s'avérer utile dans les ICUS, mettant en évidence un petit clone portant un défaut cytogénétique pouvant être un facteur prédictif indiquant l'imminence d'un SMD (14). Une nouvelle ponction de la moelle osseuse et l'analyse répétée de la numération de la formule sanguine sont donc recommandées chez ces patients (19).

La plupart des patients souffrant d'un SMD présentent une moelle osseuse normale ou hypercellulaire. Elle peut cependant être hypocellulaire dans une minorité de cas (<10%) nommés SMD hypoplasiques (2,22–24). Les échantillons de faible cellularité obtenus dans les SMD hypoplasiques rendent l'identification des dysplasies et la numération des blastes difficiles, ce qui peut conduire à un diagnostic différentiel délicat avec les AA (2,15). Ces dernières présentent des anomalies morphologiques communes aux SMD, notamment la présence d'érythrocytes macrocytaires sur le frottis sanguin. En revanche, certaines anomalies comme la présence de PNN pseudo-Pelger-Huët et/ou hypogranulaires sont en faveur d'un SMD (15). Dans la moelle osseuse, l'augmentation du pourcentage des progéniteurs myéloïdes, la dysgranulopoïèse et la dysmégacaryopoïèse sont également des arguments en faveur d'un SMD (15).

Dans environ 10% des cas, les patients présentent un SMD avec myélofibrose (2). Ces cas identifient un sous-groupe de SMD caractérisé par une dysplasie multilignée, une dépendance transfusionnelle et un pronostic péjoratif (25). Les SMD avec myélofibrose sont souvent la cause de problèmes de diagnostic. En effet, une ponction correcte de moelle osseuse est rarement obtenue, de sorte que l'évaluation de la dysplasie et le pourcentage précis de blastes médullaires sont difficiles à établir (15). Dans ce contexte, une BOM est indiquée et permet de mettre en évidence des foyers de cellules immatures de type ALIP (localisation anormale de précurseurs immatures) ainsi que la présence d'agrégats de progéniteurs myéloïdes (26). Certains sous-types de LAM, telles que la leucémie aiguë à mégacaryocytes et la *panmyelosis* aiguë avec fibrose ainsi que certains syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont souvent associés à la présence de myélofibrose dans la moelle osseuse et leur distinction avec les SMD est parfois difficile (15).

2.1.11 Oncogenèse et biologie moléculaire

Les SMD progressent selon un modèle leucémogène en trois étapes :

- l'initiation qui se traduit par une mutation génétique initiale de la CSH,
- la promotion de la tumeur, qui correspond à l'expansion clonale du contingent cellulaire anormal, accompagnée d'anomalies de la différenciation des progéniteurs myéloïdes et d'apoptose, ce qui se traduit par une insuffisance médullaire responsable des cytopénies périphériques,
- la transformation maligne qui correspond à un blocage de la différenciation cellulaire à un stade précoce de la maturation et à une résistance à l'apoptose aboutissant à la transformation en LAM (27).

Chaque étape du processus s'accompagne d'altérations génétiques multiples responsables :

- de l'auto-renouvellement de la CSH,
- de l'augmentation de la capacité proliférative du clone,
- d'un blocage de la différenciation,
- d'une instabilité génétique et épigénétique,
- de mécanismes anti-apoptotiques,
- de l'évasion du système immunitaire,
- et d'une hématopoïèse inefficace.

L'évolution clonale est associée à une hématopoïèse inefficace, une perte de la fonctionnalité cellulaire et à l'aggravation des cytopénies périphériques. La mesure dans laquelle chaque étape est affectée peut déterminer comment la maladie se manifestera cliniquement, définissant les types et le degré des cytopénies ainsi que l'évolution de la maladie (28).

2.1.11.1 L'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est le processus physiologique normal par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal précis. L'hématopoïèse inefficace des SMD est en partie due à une apoptose accrue des précurseurs de la moelle osseuse. Chez les patients atteints de SMD, des niveaux relativement élevés de protéines pro-apoptotiques ont été mis en évidence au stade précoce de la maladie. Puis une résistance des cellules dysplasiques aux signaux apoptotiques se met en place avec le temps, aboutissant à une résistance à l'apoptose avec une prolifération augmentée et une progression du SMD en LAM. Une décroissance de l'apoptose des progéniteurs serait également associée à une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p15INK4b et p53 contribuant à l'expansion clonale (29).

Les phénomènes responsables de l'apoptose passent par le recrutement et l'activation de protéases, les caspases. Il pourrait exister une relation entre l'activation excessive des caspases et les anomalies de différenciation observées dans les SMD (27,30).

2.1.11.2 Microenvironnement local

Les cellules stromales de la moelle osseuse jouent un rôle important dans la prolifération du clone chez les patients atteints de SMD (30). Les niveaux de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de plusieurs cytokines inflammatoires sont élevés dans la moelle osseuse de ces patients (28). Ces changements sont considérés comme le résultat de l'interaction complexe entre les cellules hématopoïétiques anormales et la réponse immunitaire adaptative. Il a été montré que les fibroblastes et les macrophages médullaires des patients atteints des SMD présentaient un index apoptotique augmenté et produisaient plus de cytokines apoptogènes telles que l'*Inter-Leukine* (IL6) et de *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) que dans une moelle normale (30). Ces modifications du microenvironnement peuvent

influer négativement sur l'hématopoïèse normale, fournissant une explication possible de la survenue des cytopénies (28).

Le rôle des métalloprotéinases a été suggéré, dans lequel leur production inappropriée par les monocytes, augmente l'auto-renouvellement des progéniteurs hématopoïétiques ce qui permet l'expansion de ces cellules hors des niches hématopoïétiques (31).

2.1.11.3 Principales anomalies chromosomiques et moléculaires

Grâce aux progrès technologiques des dernières années, certaines anomalies cytogénétiques associées à des sous-types spécifiques de SMD avec des manifestations cliniques et une réponse thérapeutique distinctes ont été découvertes. Bien que les SMD soient associés à un large éventail d'anomalies cytogénétiques récurrentes, environ la moitié des patients ont un caryotype normal. L'avènement des nouvelles technologies de séquençage génomique telles que la *CGH array* (*comparative genomic hybridization*) et la *SNP* (*single nucleotide polymorphism*) a permis une résolution plus fine que la cytogénétique conventionnelle. Ces technologies ont contribué à l'identification d'anomalies génétiques somatiques acquises dans plus de 80% des SMD (32,33). Ainsi, les nouvelles mutations génétiques récurrentes récemment découvertes et portant sur l'épissage de l'acide ribonucléique (ARN), la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la modification des histones, soulignent l'hétérogénéité moléculaire de ces pathologies. Ces mutations apparaissent comme une composante de la pathogenèse des SMD, le lien de causalité entre les anomalies cytogénétiques et moléculaires retrouvées au cours des SMD et leur phénotype n'est cependant pas encore mis en évidence (30).

Tableau 5 : Anomalies moléculaires et leurs caractéristiques dans les SMD (30).

Nom du gène	Fréquence de mutation	Rôle physiologique	Caractéristiques particulières
TP53	> 20% si haut-risque	Gène suppresseur de tumeur ubiquitaire pour les cancers chez l'homme	Communément associée avec les SMD secondaires ; de mauvais pronostic indépendamment du score IPSS
RUNX1 (AML1)	20%	Facteur critique de la régulation de la transcription	Plus commune dans les SMD tardifs ou associés à un traitement (SMD secondaires) ; mauvais pronostic
TET2	19 - 26%	Catalyseur de conversion de la 5-mC en 5-hmC lors de la déméthylation de la cytosine	Mutation associée à un bon pronostic ; investigations en cours pour évaluer son rôle prédictif dans la réponse au traitement par agents hypométhylants
RAS	5 - 15%	Protéine kinase clé de la signalisation, fréquemment mutée dans les cancers humains	Mauvais pronostic, risque de transformation en LA augmenté
ASXL1	11%	Protéine de liaison à la chromatine, active le récepteur de l'acide rétinoïque	Associée aux SMD de haut-risque entraînant probablement la prolifération, de prévalence plus élevée dans les SMP ou syndrome frontière SMD/SMP que dans les SMD seuls
ATRX	jusqu'à 8%	Protéine associée à la chromatine importante dans l'érythropoïèse	Gène muté dans l'alpha-thalassémie SMD, investigations en cours pour évaluer son rôle prédictif dans la réponse au traitement par agents hypométhylants
MDS1-EVI1	2%	Régulateur de la transcription	Translocations associées à un mauvais pronostic et à une thrombocytose relative
CBL	<1%	Dégradation du récepteur de la tyrosine kinase par ubiquitination	Associée aux SMD de haut-risque entraînant probablement la prolifération, de prévalence plus élevée dans les SMP ou syndromes frontières SMD/SMP que dans les SMD seuls
IER3	inconnue	Régulation positive dans la réponse au stress cellulaire aboutissant à l'apoptose	Expression diminuée précocement dans l'évolution de la maladie, mais expression augmentée en état avancé de la maladie
UTX	inconnue	Histone déméthylase, modification post-traductionnelle des histones	Altération non confirmée dans les SMD, investigations en cours pour évaluer son rôle prédictif dans la réponse au traitement par agents hypométhylants
RPS14	inconnue	Nécessaire à la biogenèse correcte de la sous-unité 40S du ribosome	Contribue au défaut d'érythropoïèse dans le syndrome 5q-, l'haploinsuffisance entraîne le phénotype
miR-145 et miR-146a	inconnue	Micro-RNAs, affectent la régulation des gènes	Haploinsuffisance contribue à la thrombocytose dans le syndrome 5q-
CDC25c et PP2A	inconnue	Double phosphatases spécifiques de cellules, régulant le checkpoint G2-M du cycle cellulaire	Une augmentation de l'expression peut conférer une résistance au traitement par lénalinomide dans le syndrome 5q-
SPARC	inconnue	Protéine anti-adhésive qui peut entraîner l'apoptose	La délétion peut entraîner la protection stromale des cellules tumorales et à la résistance au traitement par lénalinomide
FLT3	inconnue	Tyrosine kinase qui entraîne la différenciation myéloïde	Mutations plus fréquentes dans les SMD de haut-grade, susceptibles de contribuer à la transformation en LA

2.1.11.3.1 Anomalies chromosomiques

✓ **Délétion du bras long du chromosome 5**

Avec une incidence de 15%, la délétion 5q est l'anomalie chromosomique la plus commune dans les SMD. Deux régions communes de délétions (CDR) ont été identifiées. La plus distale est associée à un phénotype clinique de syndrome 5q- : anémie macrocytaire, thrombocytose, faible risque d'acutisation en LAM et une prédominance féminine. Les lésions des CDR proximales sont associées à des SMD secondaires avec une maladie plus agressive et un phénotype de LAM. De multiples gènes localisés sur le bras long du chromosome 5 sont impliqués dans la pathogénèse des SMD. Le gène RSP14 est un gène critique impliqué dans le syndrome 5q-. Ce gène est transcrit puis traduit en protéine ribosomale S14 qui est nécessaire pour la formation efficace de la sous-unité ribosomale 40S pendant la biogenèse des ribosomes. Or, l'intégrité des ribosomes est essentielle pour une érythropoïèse normale (30). En revanche, il n'est pas retrouvé de thrombocytose dans cette pathologie ce qui suggère qu'une délétion RSP14 seule n'explique pas le phénotype complet du syndrome 5q-. Des études récentes ont montré qu'une haplo-insuffisance de deux microARNs situés dans la région 5q33, miR-145 et miR-146 seraient la cause de la thrombocytose (28).

✓ **Chromosome 7 et délétion 7q**

La monosomie 7 et la délétion 7q sont associées à un mauvais pronostic. Une anomalie du chromosome 7, qu'elle soit isolée ou associée à un caryotype complexe, est retrouvée chez environ 10% des patients atteints de SMD. Cette proportion est proche de 50% dans les cas de SMD secondaires, en particulier après chimiothérapie par les agents alkylants. Au moins trois régions de délétion ont été identifiées mais leur implication dans le développement d'un SMD n'a pas encore été élucidée (28).

✓ **Trisomie 8**

La trisomie 8 est présente isolément chez environ 8% des patients et est considérée comme étant une anomalie cytogénétique de risque intermédiaire. Les cellules ayant une trisomie 8 expriment des niveaux élevés de gènes anti-apoptotiques et sont plus résistantes à l'irradiation que les cellules saines (28).

✓ Chromosome Y et délétion 20q

Les patients porteurs d'une délétion 20q ou d'une perte du chromosome Y sont considérés dans le même groupe de risque que les patients ne présentant pas d'anomalie cytogénétique. La perte isolée du chromosome Y retrouvée chez les hommes augmente avec l'âge, sans être associée à une hémopathie évidente. Les CDR du bras long du chromosome 20 impliquent 19 gènes mais sans lien établi avec la pathogénicité des SMD (28).

2.1.11.3.2 Anomalies génétiques

On retrouve des anomalies génétiques récurrentes dans moins de 20% des SMD indépendamment des anomalies chromosomiques (34).

Ces gènes fréquemment mutés dans les SMD sont essentiellement des gènes codant pour des protéines de transduction du signal ou des facteurs de transcription. Des mutations sont également retrouvées sur des gènes suppresseurs de tumeurs, des régulateurs épigénétiques, des gènes du spliceosome et, de découverte plus récente, des composants du complexe de cohésion (32).

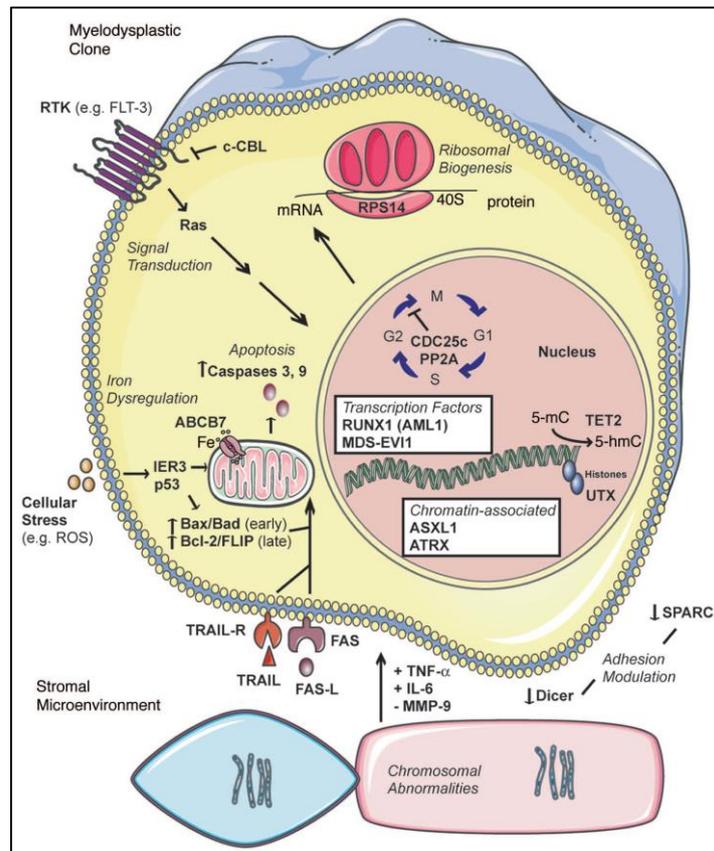


Figure 1 : Schéma général des mutations dans un clone cellulaire de SMD (30).

✓ **Altérations des signaux de transduction et des récepteurs à la surface cellulaire**

Ces anomalies génétiques concernent les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) notamment FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), et les voies de signalisations avec le gène CBL (*Casitas B-lineage Lymphoma*) et le gène RAS (*rat sarcoma*) (28). Contrairement à d'autres hémopathies myéloïdes, ces mutations sont rares dans les SMD (32).

La plupart des mutations de FLT3 retrouvées dans les SMD sont présentes chez des patients à haut risque de transformation en LAM. Les mutations du gène RAS, en particulier NRAS, sont présentes dans 10 à 15% des SMD (30). Prises isolément, ces mutations sont associées à un mauvais pronostic (28).

CBL est un gène codant pour une protéine impliquée dans la signalisation cellulaire, l'E3 ubiquitine ligase. Les anomalies du gène CBL concernent moins de 5% des mutations des SMD (28).

✓ **Altérations des facteurs de transcriptions et des régulateurs du cycle cellulaire**

Ces anomalies concernent principalement trois gènes :

Le gène RUNX1 également connu sous le nom AML1 ou CBFA2, est un gène localisé sur le chromosome 21q22. Les mutations du gène RUNX1 sont retrouvées chez environ 10 à 20% des patients atteints de SMD. Elles sont plus couramment associées à des SMD secondaires à un traitement, à des monosomies ou délétions du chromosome 7 et sont associées à un mauvais pronostic.

Des translocations de RUNX1 conduisent à la formation de gènes de fusion codant pour les protéines chimériques comme EVI1-RUNX1 t(3;21) dans les SMD. Des travaux *in vitro* ont montré que cette translocation peut bloquer la différenciation hématopoïétique, en particulier dans la lignée érythroïde par surexpression du gène muté (28,30,32).

Le gène ETV6 (membre de la famille ETS, protéines de liaison avec l'ADN) est situé sur le chromosome 12p13. Les mutations somatiques (3%) et les délétions hétérozygotes (<1%) se produisent rarement chez les patients atteints de SMD. Bien que la délétion 12p soit placée

dans le groupe cytogénétique de bon pronostic du score IPSS-r, les mutations du gène ETV6 semblent prédire un pronostic défavorable (35).

Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur. La perte de TP53 confère une résistance à l'apoptose et à d'autres signaux de mort cellulaire. Ce gène est muté chez environ 10% des patients atteints d'un SMD *de novo* et plus fréquemment dans les SMD secondaires à un traitement (agents alkylants ou radiations). Les mutations du gène TP53 sont souvent associées à un caryotype complexe et à un pronostic défavorable. Ces mutations sont fortement corrélées avec des anomalies du chromosome 5, en effet 90% des patients présentent une del(5q) isolée ou une monosomie (28,30,32).

✓ Altérations épigénétiques

Le gène TET2 (*Ten Eleven Translocation 2*) est localisé sur le chromosome 4q24 et code pour une famille de protéine (TET) connue pour jouer un rôle dans la régulation de la méthylation de l'ADN. La fréquence des mutations du gène TET2 varie entre 15% et 27% dans les SMD. Les mutations de TET2 dans les SMD n'ont pas de valeur pronostique (32). Elles sont retrouvées dans plus de 44% des LMMC. Leur présence dans les SMP indique qu'elles ne sont *a priori* pas la cause des dysplasies. Une possibilité thérapeutique intéressante est que l'état de mutation TET2 peut aider à prédire la sensibilité aux agents hypométhylants de l'ADN tels que l'azacitidine et la décitabine (30).

Le gène ASXL1 (*Additional Sex-Comb Like 1*) est situé sur le chromosome 20q11.1 et semble jouer un rôle plus important dans la prolifération que dans la différenciation cellulaire. Des anomalies ont été décrites dans 10% à 21% des cas de SMD où ce gène est généralement supprimé. Ces mutations sont plus fréquentes dans le groupe avec un score IPSS élevé (28,30).

D'autres gènes participant à la régulation épigénétique sont impliqués dans la pathogénèse des SMD :

- le gène IDH (isocitrate déshydrogénase) qui code pour enzyme intervenant dans le cycle de Krebs. Deux gènes, IDH1 et IDH2, ont été identifiés comme des oncogènes mutés avec une fréquence de 4% à 12% dans les SMD (28,32).
- Le gène EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) est responsable de la méthylation de l'histone H3. Les mutations de ce gène sont présentes chez environ 6% à 8% des patients atteints de SMD (32).
- Le gène DNMT3 (*mammalian de novo DNA methyltransferase 3*) est muté dans 3% à 13% des SMD. Les mutations de ce gène sont associées à un risque accru de transformation en LAM (32).

✓ **Mutations des gènes du splicéosome**

Le splicéosome est un complexe dynamique de particules ribonucléoprotéiques localisé dans le noyau des cellules. Son rôle est d'assurer l'épissage de l'ARN. Même si tous les composants mutés du splicéosome sont impliqués dans les premières étapes de l'épissage de l'ARN, ils semblent avoir des effets différents sur les fonctions cellulaires, manifestant des phénotypes uniques dans les SMD (32).

Les mutations du gène SF3B1 (*splicing factor 3b, subunit 1*) sont présentes dans 10 à 20% des SMD avec une fréquence élevée dans l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS) (60% à 83%) (32). Le phénotype de ces mutations, en dehors de la présence de sidéroblastes en couronne, comprend également une thrombocytose.

Les mutations du gène U2AF1 (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*) sont retrouvées dans 5% à 12% des SMD et sont associées à un mauvais pronostic. Ces mutations semblent être les événements génétiques déclencheurs dans la pathogénèse. Elles sont détectées en phase de myélodysplasie et persistent lors de la transformation en LAM (32).

Les mutations du gène SRSF2 (*serine/arginine-rich splicing factor 2*) sont retrouvées dans 10% à 13% des SMD. La présence de plusieurs mutations génétiques co-existantes (en particulier RUNX1, IDH2 et ASXL1) chez les mutants SRSF2, indique une induction mutagène secondaire à la perte de la protéine SRSF2. La signification pronostique de la mutation SRSF2 est encore controversée (32).

Les mutations ZRSR2 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor, small subunit 2*) sont retrouvées dans 3% à 11% des patients atteints de SMD avec une prédilection chez les hommes et sont souvent associées à une neutropénie isolée (32).

D'autres mutations touchant les composants du spliceosome comme PRPF40B, SF1, SF3A1, U2AF2, LUC7L2 et PRPF8, sont retrouvées avec une fréquence extrêmement faible (<2%) dans les SMD. Leurs conséquences dans la pathogenèse des SMD reste encore à élucider (32).

2.1.12 Classification des SMD

2.1.12.1 Classification Franco-Américaino Britannique (FAB)

La première publication concernant la classification des LAM ainsi que les caractères cliniques et morphologiques des SMD a été publiée en 1976 à l'initiative d'équipes françaises, américaines et anglaises (classification FAB) (36). Cette même année, une étude a mis en évidence le fait que tous les patients atteints de SMD n'évoluaient pas en LAM, mais que certains pouvaient décéder de complications liées à l'insuffisance médullaire. Les SMD d'abord dénommés « état pré-leucémique » ont vu leur appellation évoluer à la suite de cette étude. C'est en 1982 que le groupe FAB introduit le terme de « syndrome myélodysplasique » et propose des directives plus détaillées pour le diagnostic et la classification reposant sur la dysplasie des lignées cellulaires et le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse. De nombreuses études ont par la suite validé l'efficacité de cette classification qui est ainsi devenue la première référence pour le diagnostic et la classification des SMD (37).

Tableau 6 : Classification FAB des SMD (37).

Catégorie	Dysplasie	% de blastes médullaires	% de blastes sanguins
Anémie réfractaire (AR)	Erythroblastique	< 5	< 1
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	Erythroblastique	< 5	< 1
Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB)	Au moins 2 lignées	5 - 20	0 - 4
Anémie réfractaire avec excès de blastes en cours de transformation (T-AREB)	Généralement au moins 2 lignées	21 - 30	≥ 5
Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)	Variable ; monocytes ≥ 1G/L	< 20	

2.1.12.2 Classification OMS

En 1997 la classification de l'OMS modifie le système FAB en prenant également en compte les critères cliniques, biologiques et génétiques en plus de la morphologie et du compte de blastes médullaires. La classification OMS a été introduite en 2001 puis revue en 2008 intégrant ainsi les données les plus récentes (tableau 7). C'est cette classification qui est utilisée à l'heure actuelle.

Tableau 7 : Classification OMS 2008 des SMD (2).

Pathologie	Sang	Moelle
Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU) <ul style="list-style-type: none"> Anémie réfractaire Neutropénie réfractaire Thrombopénie réfractaire 	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie isolée ou bicytopénie* Absence ou rares blastes (<1%)** 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie unilignée ≥10% des cellules de la lignée touchée sont dysplasiques <5% blastes <15% des précurseurs érythroïdes sont des sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	<ul style="list-style-type: none"> Anémie Pas de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie érythroïde isolée ≥15% des précurseurs érythroïdes sont des sidéroblastes en couronne <5% blastes
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multi-lignée (CRMD)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) Absence ou rares blastes (<1%)** Pas de corps d'Auer <1 G/L monocytes 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie ≥10 % des cellules dans 2 ou plusieurs lignées myéloïdes (granuleuse et/ou érythroïde et/ou mégacaryocytaire) <5% blastes Pas de corps d'Auer ± 15% de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec excès de blastes-1 (AREB I)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) <5% blastes Pas de corps d'Auer*** <1 G/L monocytes 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie uni ou multi-lignée 5-9% blastes Pas de corps d'Auer***
Anémie réfractaire avec excès de blastes-2 (AREB II)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) 5-19% blastes Corps d'Auer ±*** <1 G/L monocytes 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie uni ou multi-lignée 10-19% blastes Corps d'Auer ±***
Syndrome myélodysplasique non classable (SMD-I)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénies <1% blastes** 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie évidente dans moins de 10% des cellules dans une ou plusieurs lignées myéloïdes <5% blastes
Syndrome myélodysplasique avec délétion 5q isolée	<ul style="list-style-type: none"> Anémie Généralement plaquettes normales ou augmentées Absence ou rares blastes (<1%) 	<ul style="list-style-type: none"> Mégacaryocytes en nombre normal ou augmenté avec noyau hypolobé <5% blastes Anomalie cytogénétique isolée del(5q) Pas de corps d'Auer

*Une bicytopénie peut parfois être observée. Les cas avec pancytopénie sont classés en syndrome myélodysplasique inclassable (SMD-I).
**Si le pourcentage de blastes médullaires est <5% mais que le pourcentage de blastes circulants est compris entre 2% et 4%, le diagnostic est celui d'anémie réfractaire avec excès de blastes de type 1. Si le pourcentage de blastes médullaire est <5% mais que le pourcentage de blastes circulant est de 1%, le diagnostic est celui de syndrome myélodysplasique inclassable.
***Les cas avec corps d'Auer, <5% blastes circulants et <10% de blastes médullaires doivent être classés comme anémie réfractaire avec excès de blastes de type 2.

Les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/SMP), formes frontières entre les SMD et les SMP, sont classés à part par l'OMS. Ces maladies sont des hémopathies clonales qui, au moment de leur manifestation initiale, présentent une expression clinique, des caractéristiques biologiques et cytologiques compatibles avec un SMD et un SMP. Les SMD/SMP sont caractérisés par une hypercellularité de la moelle osseuse en raison de la prolifération d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Toutes les maladies regroupées dans cet ensemble associent une composante proliférative concernant principalement les leucocytes

et les plaquettes ainsi qu'une composante dysplasique responsable d'une ou plusieurs cytopénies (10).

Le pourcentage de blastes dans le sang et la moelle osseuse est toujours inférieur à 20%. Les patients ayant des antécédents d'un SMP bien défini et qui développent une dysplasie associée à une hématopoïèse inefficace ne doivent cependant pas être placés dans ce groupe.

Tableau 8 : Classification OMS 2008 des syndromes frontières SMD/SMP.

Pathologie	Sang	Moelle
Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)	<ul style="list-style-type: none"> • Monocytes > 1 G/L • Absence du transcrite BCR-ABL1 • Blastes <20% 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie d'une ou plusieurs lignée(s)* • Blastes (myéloblastes, monoblastes, promonocytes) <20% • Pas de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB
Leucémie myéloïde chronique atypique	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperleucocytose, neutrophilie • Dysplasie neutrophile • Myélémie >10% • Blastes <20% • Absence de BCR-ABL1 • Pas de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie granuleuse ± d'une autre lignée • Blastes <20%
Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile	<ul style="list-style-type: none"> • Monocytes >1 G/L • Blastes <20% • Hyperleucocytose 	<ul style="list-style-type: none"> • Blastes (myéloblastes, monoblastes, promonocytes) <20%
Syndrome frontière myélodysplasique/myéloprolifératif inclassable	<ul style="list-style-type: none"> • Association de caractères myélodysplasiques et myéloprolifératifs • Pas d'antécédent de SMD ou SMP • Pas de traitement récent par facteur de croissance ou chimiothérapie • Absence de BCR-ABL1 • Pas de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB 	<ul style="list-style-type: none"> • Association de caractères myélodysplasiques et myéloprolifératifs • Blastes <20%
*En l'absence de dysplasie significative, le diagnostic de leucémie myélomonocytaire chronique peut être retenu si les autres caractéristiques sont présentes et qu'une anomalie clonale acquise, moléculaire ou génétique, est retrouvée ou que la monocytose persiste depuis plus de 3 mois, en l'absence d'autre cause.		

L'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (ARS-T) constitue une entité provisoire appartenant aux formes inclassables de SMD/SMP.

Tableau 9 : Caractéristiques des ARS-T.

Pathologie	Sang	Moelle
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose	<ul style="list-style-type: none"> • Thrombocytose persistante > 450 G/L • Absence de BCR-ABL1 • Absence de t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26), et del(5q) isolée 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspect cytologique d'une anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne • Sidéroblastes en couronne >15% • Mégacaryocytes anormaux, semblables à ceux des syndromes myéloprolifératifs non BCR-ABL1

Les SMD de l'enfant sont rares et représentent moins de 5% des pathologies hématologiques néoplasiques chez les sujets de moins de 14 ans (2). La suspicion d'un SMD chez un enfant requiert obligatoirement une évaluation de la moelle osseuse avec un examen cytogénétique (38). Ces patients doivent avoir un bilan d'exclusion de nombreuses pathologies pouvant être responsables d'un aspect dysplasique de la moelle osseuse. On retrouve des pathologies non hématologiques comme les infections virales, les carences nutritionnelles ou encore les maladies métaboliques (10). Les SMD *de novo* ou primaires doivent être distingués des formes secondaires à une insuffisance médullaire congénitale (anémie de Fanconi, syndrome de Shwachman-Diamond, dyskératose congénitale) ou acquise, ou à une chimiothérapie.

2.1.13 Pronostic

Les SMD forment un groupe de maladies extrêmement hétérogène présentant une grande variation de l'évolution clinique allant de pathologies avec une espérance de vie presque normale à des maladies se rapprochant des LAM.

Les systèmes de notation du pronostic dans les SMD sont des outils utiles afin de prévoir l'évolution de la maladie et proposer aux patients un traitement adapté.

2.1.13.1 Score IPSS

En 1997, Greenberg *et al.* (12) ont proposé un score pronostique : l'IPSS (*International Prognosis Scoring System*). Ce score établi à partir de l'étude de données européennes, américaines et japonaises, prend en compte le pourcentage de blastes médullaires, le nombre de cytopénies et la cytogénétique. Il permet de reconnaître quatre groupes pronostiques : risque faible, intermédiaire-1, intermédiaire-2 et élevé (tableau 11). Ce score permet de séparer schématiquement les SMD de « bas grade » avec un IPSS faible ou intermédiaire-1 des SMD de « haut grade » avec un IPSS élevé ou intermédiaire-2 (10).

Le score IPSS est limité aux SMD primaires non traités préalablement à l'exclusion de la LMMC (39).

Il est devenu la référence pour prédire la survie ainsi que le risque de transformation en LAM. Il est également utilisé pour la prise en charge thérapeutique (13,39).

Tableau 10 : Anomalies cytogénétiques pour le score IPSS et le score WPSS (2).

Risque bas	Risque intermédiaire	Risque haut
Normal -Y del(5q) del(20q)	Autres anomalies	Caryotype complexe Anomalies du chromosome 7

Tableau 11 : Score IPSS (2).

Score	0	0,5	1	1,5	2
Pourcentage de blastes médullaires	0 - 4	5 - 10		11 - 20	21 - 29
Nombre de cytopénies*	0 - 1	2 - 3			
Groupe cytogénétique de risque	Bas	Intermédiaire	Haut		
Groupe de risque					
Bas risque	0				
Risque intermédiaire 1	0,5 - 1				
Risque intermédiaire 2	1,5 - 2				
Haut risque	≥ 2,5				
*Plaquettes <100 G/L ; Hémoglobine <10g/dL ; Polynucléaires neutrophiles <1,8 G/L					

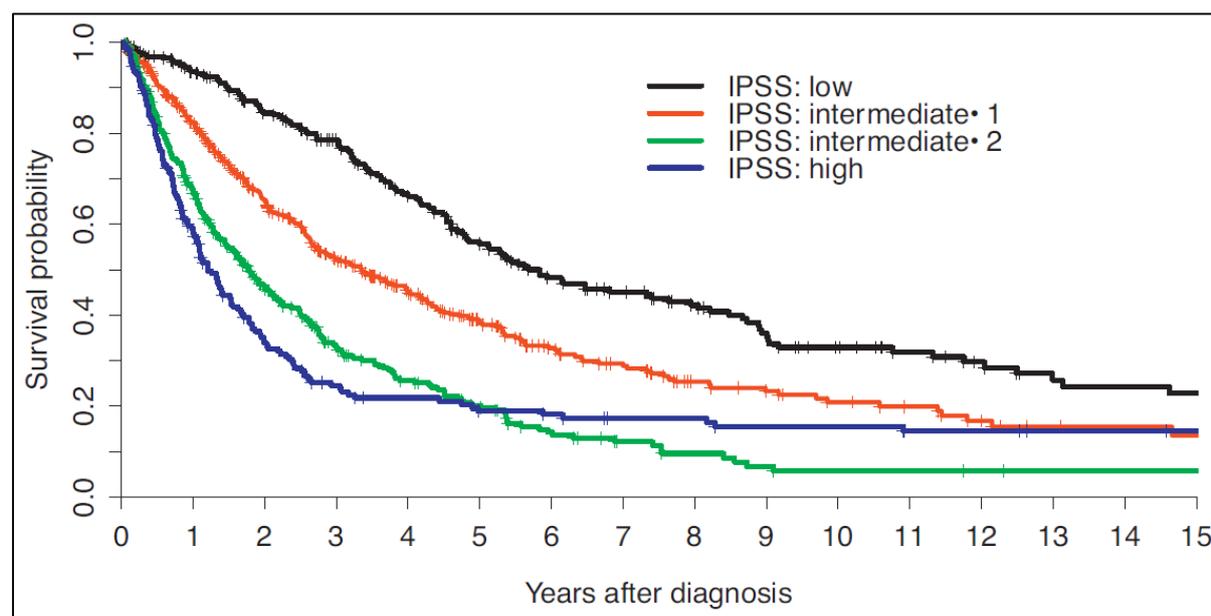


Figure 2 : Probabilité de survie selon les quatre groupes de risque du score IPSS (40).

2.1.13.2 Score WPSS

Le score WPSS (*WHO classification-based prognostic scoring system*) proposé en 2007 par Malcovati *et al.* prend en compte la dysplasie des lignées cellulaires, la dépendance transfusionnelle, la classification selon l'OMS et la cytogénétique pour laquelle il accorde une plus grande importance (41). Cinq catégories de risques sont identifiées selon ce score. Il a été

validé pour toute l'évolution de la maladie et non pas seulement au moment du diagnostic comme le score IPSS (13,39).

Tableau 12 : Score WPSS.

Score	0	1	2	3
Type de SMD selon l'OMS	AR/ARS/5q-	CRDM/CRDM-RS	AREB-I	AREB-II
Caryotype	Bas	Intermédiaire	Haut	
Transfusion*	non	oui		
Groupe de risque	Score			
Très bas risque	0			
Bas risque	1			
Risque intermédiaire	2			
Haut risque	3 – 4			
Très haut risque	5 – 6			

*Besoin transfusionnel : au moins 1 transfusion toutes les 8 semaines pendant une période d'au moins 3 mois.

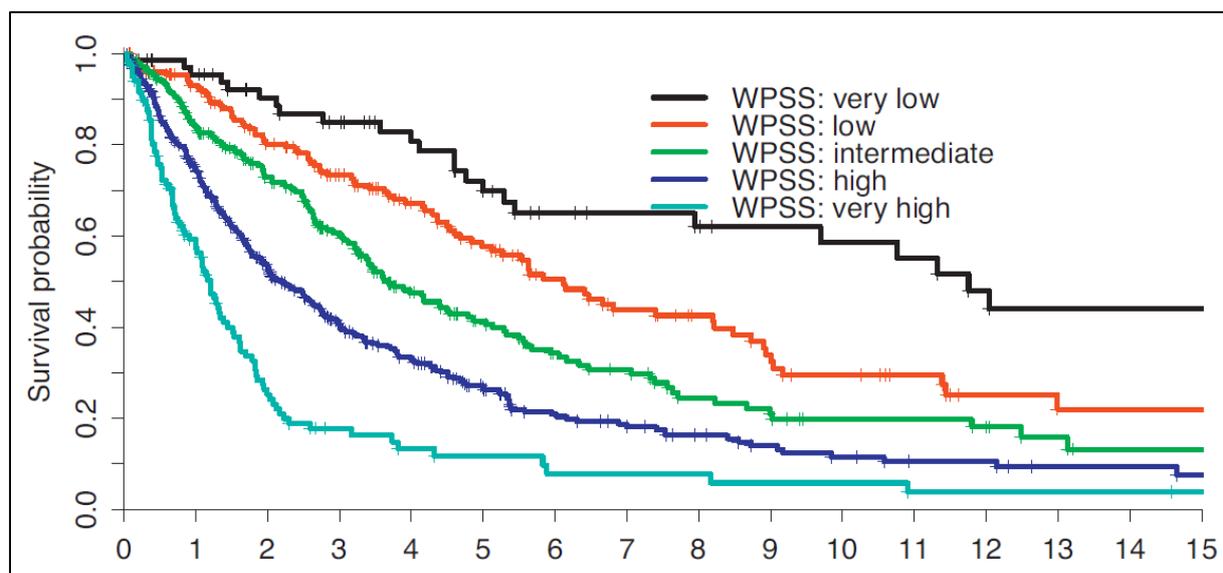


Figure 3 : Probabilité de survie selon les cinq groupe de risque du score WPSS (40).

2.1.13.3 Score IPSS-r

Greenberg *et al.* ont révisé le score IPSS en 2011. La cytogénétique, le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse et les cytopénies sont restés la base de ce nouveau score. Les nouveaux paramètres inclus sont des nouvelles données cytogénétiques décrivant des sous-groupes moins communs, une nouvelle répartition du pourcentage de blastes avec un partage plus

précis, et la profondeur des cytopénies. Ce score a permis de définir cinq catégories plutôt que les quatre présentes dans le score IPSS (13,42).

Il a été montré que le score IPSS-r permettait une meilleure évaluation pronostique concernant la survie globale et le risque de transformation en LAM par rapport au score IPSS, notamment pour les groupes intermédiaires 1 et 2 (42).

Tableau 13 : Score IPSS-r (39).

Valeur pronostic	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogénétique	Très bon		Bon		Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
% de blastes médullaires	≤2		[2 – 5]		5 - 10 %	>10 %	
Hémoglobine (g/dL)	≥10		[8 – 10[<8			
Plaquettes (G/L)	≥100	[50 – 100[<50				
Leucocytes (G/L)	≥0,8	<0,8					
Catégorie de risque	Score						
Très bas	≤1,5						
Bas	2 – 3						
Intermédiaire	3,5 – 4,5						
Haut	5 – 6						
Très haut	>6,5						

Tableau 14 : Anomalies cytogénétiques pour le score IPSS-r (39).

Catégorie cytogénétique	Très bon	Bon	Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
Anomalies cytogénétiques	-Y del(11q)	Normal del(5q) del(12p) del(20q) 2 anomalies cytogénétiques incluant la del(5q)	del(7q) Trisomie 8 Trisomie 19 i(17q) Autre anomalie isolée ou deux clones indépendants ou double anomalie (sans anomalie du 7)	-7 inv(3), t(3q), del(3q) Double anomalie incluant -7/del(7q) Complexe : 3 anomalies	Anomalies complexes > 3

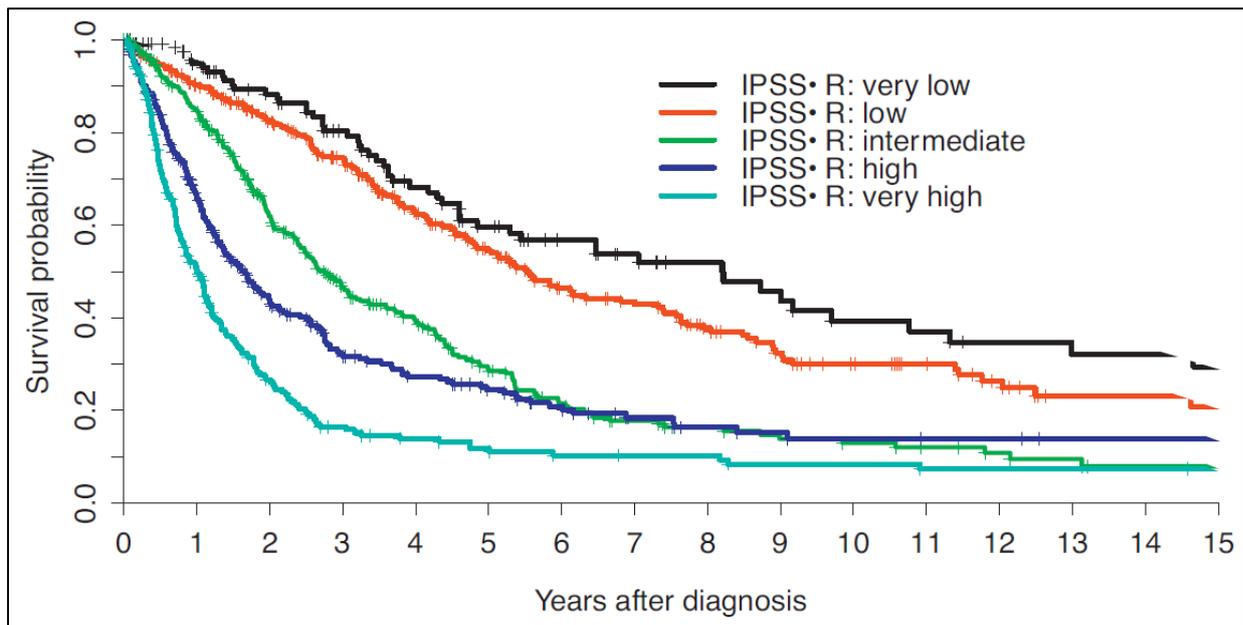


Figure 4 : Probabilité de survie selon les cinq groupes de risque du score IPSS-r (40).

2.1.14 Traitement et prise en charge

2.1.14.1 Traitement symptomatique

Les traitements symptomatiques ont une place importante dans la prise en charge des SMD et visent avant tout à corriger les cytopénies (3).

Les patients atteints de SMD primaires de faible risque avec des cytopénies asymptomatiques et modérées ne nécessitent pas de traitement et doivent être suivis régulièrement (13).

Lorsque l'anémie est symptomatique, un traitement permettant de prévenir les transfusions est préféré, l'érythropoïétine (EPO) est recommandée dans ce cas précis (3). L'objectif est de maintenir un taux d'hémoglobine entre 10 et 11 g/dL. L'addition de facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) peut améliorer l'effet de l'EPO. Lorsque le taux d'hémoglobine devient inférieur à 8 g/dL (seuil critique) la transfusion de culot globulaire devient le traitement optimal. Chez les patients régulièrement transfusés, on instaure de plus un traitement chélateur permettant de lutter contre la surcharge en fer (3).

Dans le traitement de la neutropénie, la place du G-CSF n'a pas été démontrée. Il permet de corriger la neutropénie dans 2/3 des cas, cependant son effet sur la diminution du risque infectieux n'est pas prouvé. La prise en charge des infections est identique à celle des patients en post-chimiothérapie. Les SMD provoquent de plus un déficit fonctionnel des PNN ce qui

accroît le risque infectieux. Il est recommandé aux patients atteints de SMD de disposer d'antibiotiques à large spectre (3).

En routine, la transfusion de plaquettes ne doit pas être instaurée chez les patients stables ne présentant pas de saignement et ne recevant pas de chimiothérapie intensive. Son indication est limitée à un geste opératoire, un syndrome hémorragique ou lorsque le taux de plaquettes est inférieur à 10 G/L (9). L'utilisation de la thrombopoïétine (TPO) a été évaluée mais ne fait pas partie des recommandations actuelles (6).

2.1.14.2 Traitement curatif

2.1.14.2.1 Place de l'allogreffe

L'allogreffe de CSH reste le seul traitement véritablement curatif des SMD (10). Jusqu'à la fin des années 1990, les patients âgés de plus de 55 ans n'étaient qu'exceptionnellement proposés à l'allogreffe conventionnelle du fait d'une mortalité précoce dans 30 à 40% des cas les trois premiers mois (10). Cependant, l'avènement récent des techniques de greffes à conditionnement atténué et l'amélioration de la prise en charge des complications post-allogreffe ont permis de réduire cette mortalité précoce. Ainsi, l'âge limite de l'allogreffe se décale progressivement, permettant à un plus grand nombre de patients d'en bénéficier ; en effet, les SMD affectent des patients âgés de plus de 60 ans dans 75% des cas (10). Son indication dans les SMD est un équilibre à trouver entre la réaction du greffon contre l'hôte et un taux de rechute élevé chez des patients présentant des formes agressives (10).

Dans une étude récente, Culter *et al.* ont montré que pour les groupes de risque faible ou intermédiaire-1, l'allogreffe de CSH retardée était associée une espérance de vie maximale. En revanche, c'est une transplantation précoce qui assurera une espérance de vie maximale dans les groupes de risque intermédiaire-2 ou élevé (43).

L'état de la maladie au moment de la transplantation affecte de manière significative le risque de rechute. Chez les patients atteints de SMD de haut grade, il peut être conseillé d'instaurer un traitement initial pour réduire la masse tumorale. Le but est d'induire une réponse cytogénétique complète et/ou de réduire le pourcentage de blastes (<5%) (9).

Les comorbidités associées à l'âge doivent être prises en compte lors de l'évaluation des patients pour la transplantation (9).

2.1.14.2.2 Prise en charge des SMD de bas grade

Les SMD de bas grade correspondent aux patients ayant un score IPSS avec un risque faible ou intermédiaire-1 et/ou un score IPSS-r très faible ou faible.

Le principal traitement des SMD de bas grade est le traitement symptomatique qui permet de pallier les cytopénies lorsqu'elles ont un retentissement sur la qualité de vie.

Les traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs ont une place importante dans la prise en charge des SMD de bas grade. Le taux de réponse au sérum anti-lymphocytaire (*anti-thymocyte globulin* ATG) chez ces patients est d'environ 30% à 40% (9).

Le bénéfice du lénalidomide (REVLIMID®) a été démontré pour le traitement de l'anémie des patients atteints de SMD de bas grade avec délétion du bras long du chromosome 5 isolée (9). Chez ces patients, le taux de réponse au traitement est de 83%, comparativement à un taux de 57% chez les patients avec une cytogénétique normale et un taux de réponse de seulement 12% chez les patients présentant d'autres anomalies cytogénétiques (9).

L'utilisation du lénalidomide est recommandée par la HAS (Haute Autorité de Santé) pour les SMD de faible risque, avec une del(5q), une dépendance transfusionnelle et ne répondant pas à l'EPO. Son mécanisme d'action dans les SMD est incertain, on retient ses rôles anti-angiogénique, anti-inflammatoire et immunomodulateur (9). La figure 5 ci-dessous décrit l'algorithme de la prise en charge des SMD de bas grade.

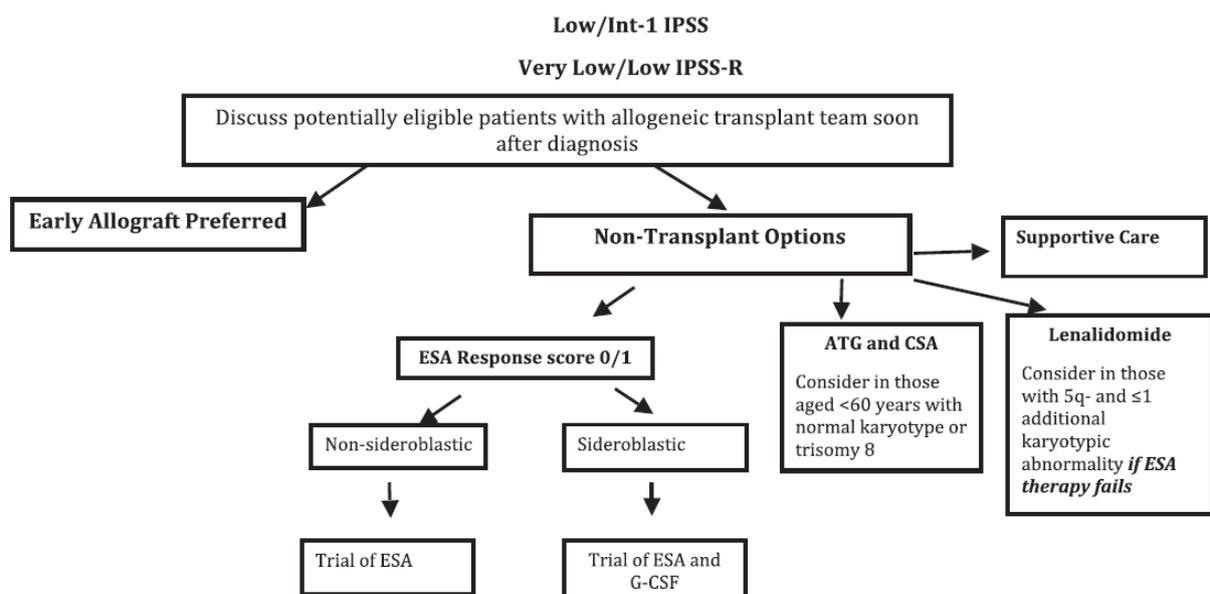


Figure 5 : Algorithme de prise en charge des SMD de bas grade (9).

2.1.14.2.3 Prise en charge des SMD de haut grade

Les SMD de haut grade correspondent aux patients ayant un score IPSS de risque intermédiaire-2 ou élevé et/ou un score IPSS-r élevé ou très élevé.

Ces patients ont 33% à 45% de risque d'évoluer vers une LAM et ont une médiane de survie d'environ 12 mois sans traitement (9).

Pour les patients atteints de SMD de haut grade qui ne sont pas admissibles à une allogreffe de CSH, une chimiothérapie intensive précoce offre un avantage de survie (9).

Les agents déméthylants comme l'azacitidine (VIDAZA®) et la décitabine (DACOGEN®), apportent un gain de survie et sont bien tolérés chez les personnes âgées et les personnes ayant des comorbidités (9).

L'utilisation de la cytarabine à faible dose a une activité à la fois sur les SMD de bas et haut grade. La supériorité de l'azacitidine a été démontrée au cours de l'étude AZA 001 et rend la thérapie par la cytarabine obsolète dans les SMD de haut grade (9). De faibles doses de melphalan pourraient être envisagées pour un groupe précis de patients ayant un excès de blastes médullaires supérieur à 5% dans une moelle hypocellulaire et un caryotype normal pour lesquels aucun traitement actif n'est disponible et/ou approprié (9). La figure 6 détaille l'algorithme de prise en charge des SMD de haut grade.

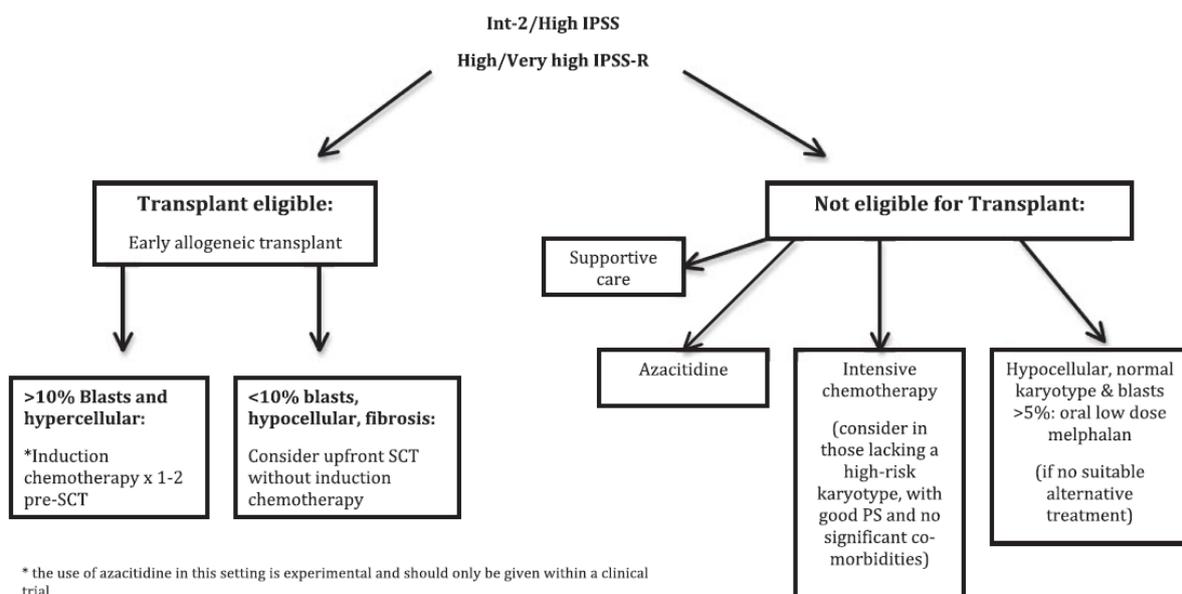


Figure 6 : Algorithme de prise en charge des SMD de haut grade (9).

2.2 La cytométrie en flux

2.2.1 Définitions

La cytométrie en flux (CMF) est une technologie récente qui s'est développée principalement au cours des quinze dernières années. C'est une technique d'analyse multiparamétrique développée pour l'analyse cellulaire, elle permet la caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

La CMF est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Cette méthode de typage cellulaire repose sur l'existence, à la surface des cellules ou dans leur cytoplasme, de molécules spécifiques appelées antigènes de différenciation. Ces marqueurs sont désignés depuis 1982 par un terme générique : « *cluster of differentiation* » ou « CD ». En nomenclature internationale, on les désigne par les lettres CD suivies d'un nombre : par exemple CD45. L'identification cellulaire basée sur ces marqueurs est appelée plus communément un immunophénotypage. Son objectif est de déterminer les caractéristiques immunologiques de chaque cellule puis de les classer en populations homogènes. Pour cela, on utilise des anticorps monoclonaux (couplés à des fluorochromes ou molécules fluorescentes) qui permettent de détecter très précisément les antigènes de différenciation voulus.

L'immunophénotypage d'un prélèvement sanguin ou médullaire est donc constitué du panel des CD exprimés par les cellules de l'échantillon (44).

2.2.2 Principes de la CMF

La CMF consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule traversant le faisceau lumineux d'un laser. Cette analyse est réalisée au sein d'un automate appelé cytomètre en flux constitué de trois systèmes :

- le système fluidique entraîne l'échantillon jusqu'à la zone de mesure et le met en forme selon le principe de la focalisation hydrodynamique,
- le système optique est constitué du laser comme source de lumière et de filtres optiques qui séparent la lumière émise et la dirigent vers les détecteurs,

- le système électronique et informatique convertit les photons en signal électrique et gère le stockage et l'affichage des mesures.

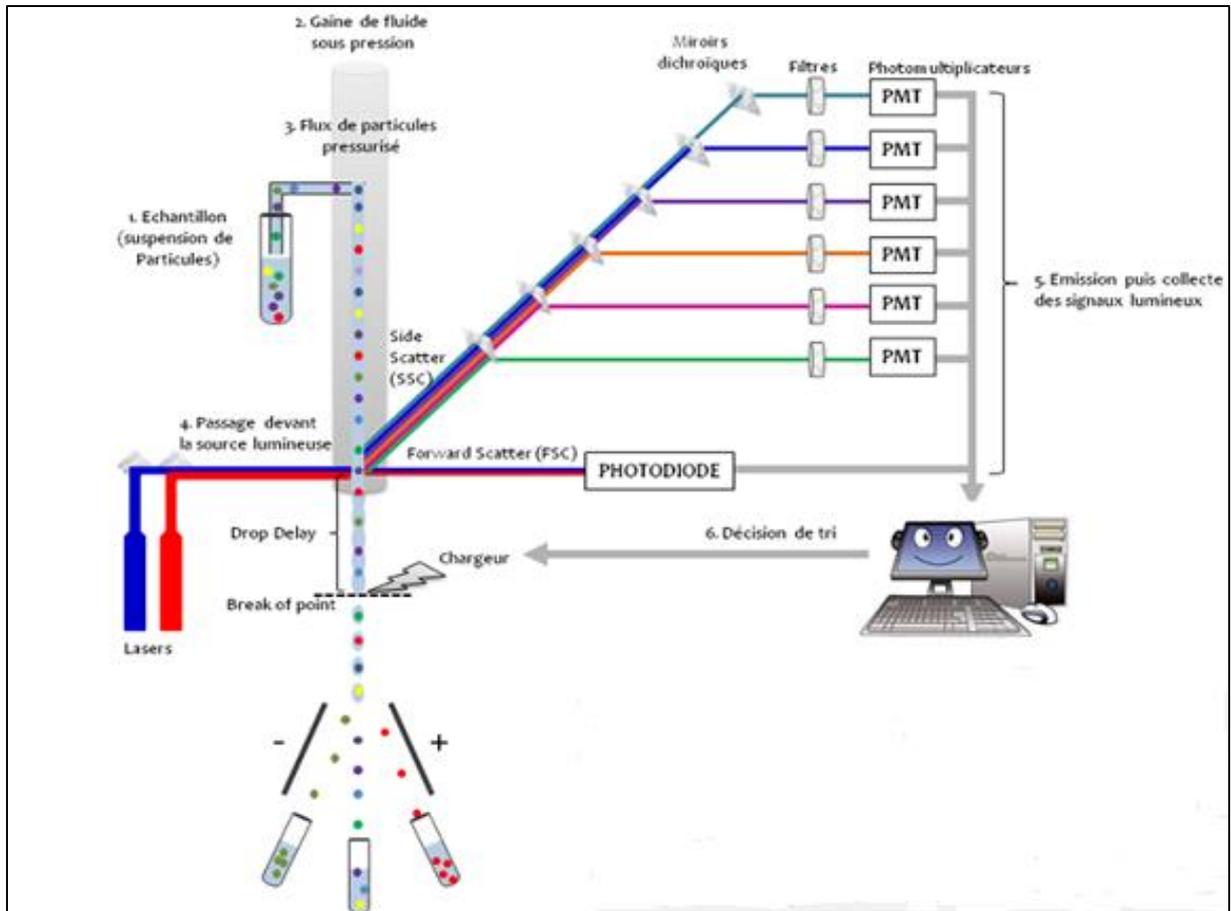


Figure 7 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (45).

2.2.2.1 Système fluide : focalisation hydrodynamique

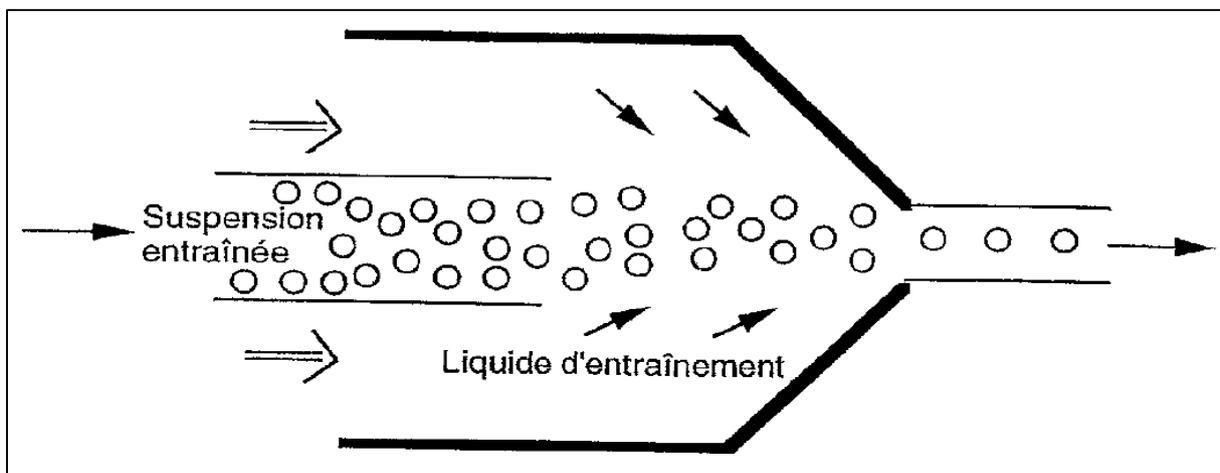


Figure 8 : Focalisation hydrodynamique (46).

Le but de la focalisation hydrodynamique est de positionner l'échantillon au centre d'un liquide de gaine afin que le faisceau laser exciteur vienne frapper précisément les cellules en suspension une par une. Pour cela, la suspension cellulaire est injectée à l'intérieur du flux du liquide de gaine dont la vitesse est constante. Celui-là, entraînant l'échantillon, s'écoule ensuite par une buse de faible diamètre. A débit constant et le diamètre diminuant, la vitesse d'écoulement va augmenter. Le liquide de gaine subit alors une accélération progressive entraînant un étirement de la suspension cellulaire pour ainsi aligner les cellules au centre du jet. Le débit d'injection de l'échantillon conditionne la qualité de la focalisation hydrodynamique car plus il est important, moins les cellules sont centrées dans le liquide de gaine (47). Ce centrage hydrodynamique est à la base de la CMF puisqu'il permet d'analyser les cellules individuellement.

2.2.2.2 Système optique

Le système optique, également nommé banc optique, comprend une source lumineuse d'excitation qui frappe les cellules marquées par des molécules fluorescentes.

Le passage des cellules devant le faisceau laser entraîne une diffusion de la lumière en fonction de leurs caractéristiques physiques et une émission de fluorescence en fonction de leurs constituants membranaires. Un système collecteur, composé de miroirs dichroïques et de filtres, achemine ensuite toute cette lumière selon des longueurs d'onde précises vers des détecteurs : les photomultiplicateurs ou PMT pour «*photomultiplier tube*» (48).

Plusieurs paramètres sont mesurés simultanément :

- la diffusion axiale de la lumière correspond à la diffusion d'une partie de la lumière par la surface membranaire de la cellule. Elle est proportionnelle à la taille de la cellule, à la même longueur d'onde que le faisceau exciteur et, est recueillie dans l'axe du laser. On l'appelle lumière diffusée aux petits angles ou *Forward Scatter (FS)* (48).
- La diffraction de la lumière correspond à la diffusion dans toutes les directions de l'espace d'une autre partie de la lumière qui traverse la membrane. Elle reflète l'hétérogénéité des cellules (granularité du cytoplasme). On l'appelle diffusion aux grands angles ou *Side Scatter (SS)* (48).

- L'intensité de fluorescence. Les molécules fluorescentes excitées par une source de lumière à une longueur d'onde donnée émettent un signal lumineux d'une longueur d'onde supérieure à celle qui a été absorbée. La fluorescence est émise dans toutes les directions de l'espace et est mesurée à 90° de l'axe du faisceau excitateur. Ce dernier étant beaucoup plus lumineux n'interfère donc pas dans la détection (48).

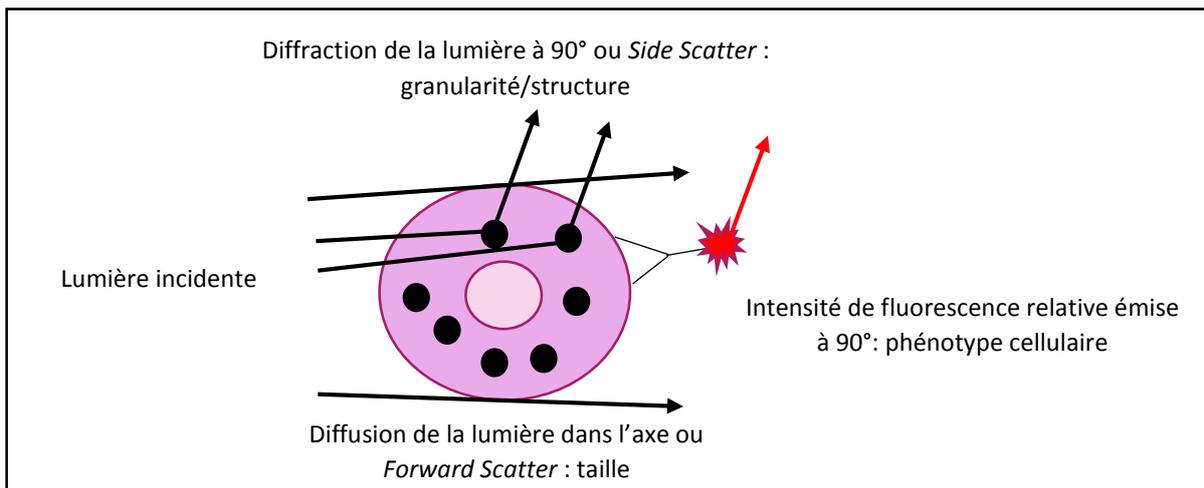


Figure 9 : Différents modes de traitement de la lumière par la cellule (46).

Le signal du FS constitué d'une seule longueur d'onde est directement capté par une photodiode. C'est un autre type de détecteur de signal lumineux qui est moins sensible que le PMT et qui est utilisé pour recueillir le signal du FS car ce dernier possède une intensité lumineuse beaucoup plus importante que le signal SS (48).

En revanche, le signal du SS et l'intensité de la fluorescence sont tous deux diffractés à 90°. Il faut donc trier ces différents types de signaux lumineux. Pour cela, des jeux de miroirs sélectifs (dichroïques) et des filtres interférentiels sont répartis au niveau du banc optique. Les miroirs dichroïques réfléchissent certaines longueurs d'onde et transmettent les autres, ils permettent donc de dévier une partie de la lumière vers un PMT. Les filtres interférentiels bloquent certaines longueurs d'onde et permettent ainsi de purifier la lumière afin qu'elle soit quasi monochromatique en arrivant aux PMT (49).

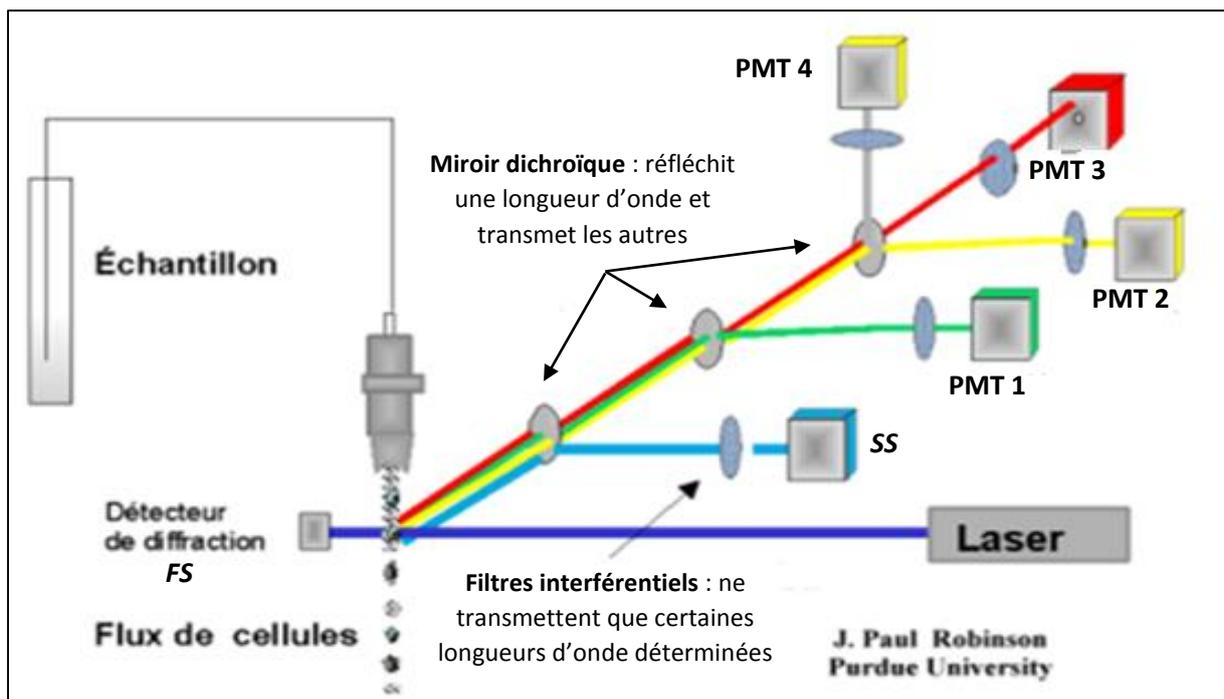


Figure 10 : Banc optique d'un CMF (50).

2.2.2.3 Système électronique et informatique

Les différents types de signaux lumineux sont séparés par des filtres optiques, collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Les signaux lumineux recueillis par ces photo-détecteurs doivent pouvoir être convertis en signaux électriques puis en données assimilables par un programme informatique. La conversion du signal lumineux en courant électrique est assurée par les PMT qui sont également dénommés FLn ($1 < n < 10$), pour détecteur de fluorescence. Un courant électrique est généré lorsque les photons du faisceau lumineux acheminés vers le PMT frappent ce dernier. La quantité de courant générée dépend du nombre de photons frappant le PMT et sera amplifiée afin d'être comprise entre 0 et 10 V (47,48).

Les signaux électriques vont être analysés par un convertisseur analogique-digital. Les données concernant chaque cellule sont enregistrées par le logiciel d'exploitation du cytomètre sous forme de fichiers portant l'extension LMD (*List Mode Data*) ou FCS (*Flow Cytometry Standard*) (48). Ces fichiers LMD ou FCS peuvent par la suite être modifiés à distance de la session d'acquisition des données grâce à des logiciels spécifiques comme Kaluza®, Infinicyt®, Flow Jo®, CXP® ou Diva®.

L'ordinateur calcule les données statistiques associées à la distribution des paramètres mesurés et les représente sous deux formes classiques :

- les nuages de points (ou *dot-plots*) qui montrent l'expression de deux paramètres l'un par rapport à l'autre (les axes représentant alors les intensités de fluorescence),
- les histogrammes mono-paramétriques qui montrent l'intensité de fluorescence en abscisse et le nombre d'événements en ordonnée.

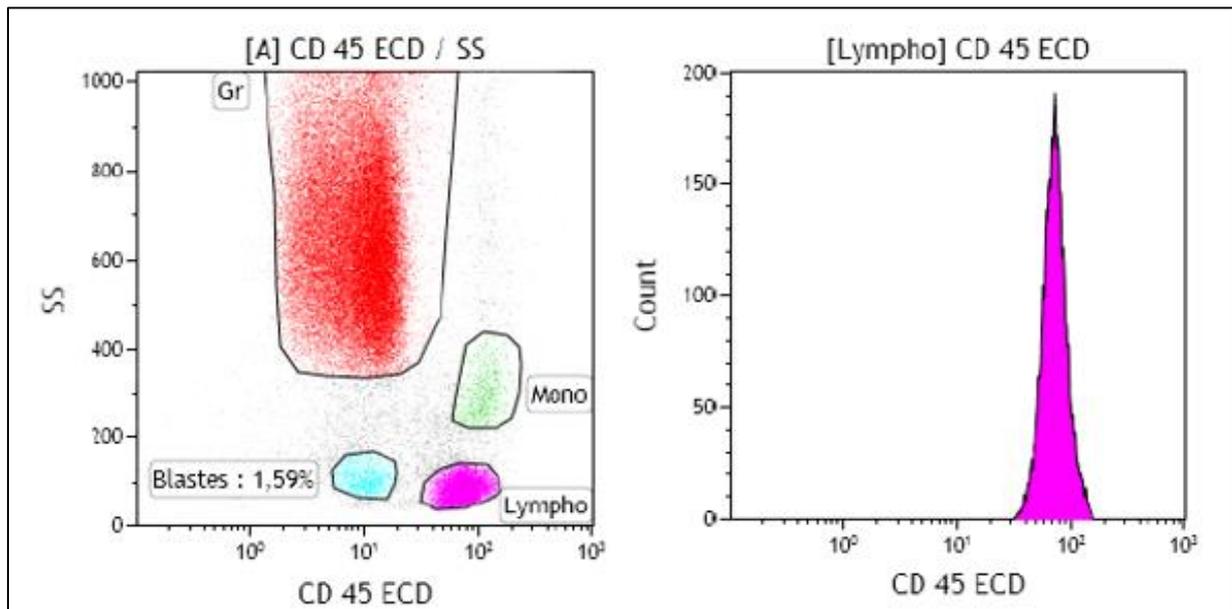


Figure 11 : Exemple d'un dot-plot (à gauche) et d'un histogramme mono-paramétrique (à droite).

2.2.3 Applications de la CMF dans les hémopathies

2.2.3.1 Diagnostic des hémopathies

La CMF est le complément indispensable de l'analyse morphologique pour le diagnostic et le suivi d'un certain nombre de pathologies. L'étendue des possibilités de la CMF est telle, qu'en permanence, de nouvelles analyses sont imaginées et réalisées (46).

La première application clinique en hématologie a été la numération des hématies et des globules blancs. La CMF est la méthode de référence pour compter les éléments cellulaires circulants. L'immunophénotypage est un élément clé du diagnostic des hémopathies malignes, en particulier pour les syndromes lymphoprolifératifs (B, T, NK) et les leucémies

aiguës (LA). Il s'articule dans une démarche pluridisciplinaire avec la cytologie, la cytogénétique, la biologie moléculaire et l'anatomo-cyto-pathologie.

2.2.3.2 Suivi et évaluation de la réponse au traitement

La maladie résiduelle ou MRD (*minimal residual disease*) est définie par la persistance de cellules tumorales chez un patient en rémission complète. Ces cellules pathologiques ne sont pas détectées en cytologie conventionnelle. Le suivi de la MRD a montré son intérêt dans l'évaluation de la réponse au traitement, l'identification des patients à haut risque de rechute et la détection précoce des rechutes dans de nombreuses hémopathies. La sensibilité de la CMF dans l'évaluation de la MRD est équivalente à celle de la biologie moléculaire, allant jusqu'à 10^{-4} – 10^{-5} cellules.

2.2.3.3 Numération des CSH

Dans le cadre des autogreffes, les CSH du sang périphérique sont collectées chez les patients par cytaphérèse, après mobilisation par des facteurs de croissance. Il est possible de dénombrer rapidement et facilement les progéniteurs hématopoïétiques en comptant les cellules CD34⁺ dans les produits de cytaphérèse par CMF (46).

2.2.3.4 Mise en évidence de modifications des antigènes de surface

- Hémoglobinurie paroxystique nocturne,
- thrombopathies : déficits en glycoprotéines plaquettaires (thrombasthénie de Glanzmann, maladie de Bernard Soulier).

2.2.3.5 Réticulocytes

La mise en évidence d'ARN ribosomal dans les érythrocytes permet de distinguer les réticulocytes des hématies matures qui ne contiennent plus d'ARN. La numération des réticulocytes est un examen primordial pour la classification et le diagnostic d'une anémie (46).

2.2.3.6 Hématies fœtales

La détection d'hématies fœtales dans le sang maternel et leur quantification informent sur l'importance de l'hémorragie fœto-maternelle ; ceci peut être important en cas de lésion placentaire avec risque d'allo-immunisation fœto-maternelle. L'analyse en CMF s'effectue, après perméabilisation des érythrocytes, par utilisation d'anticorps conjugués dirigés contre l'hémoglobine fœtale (chaîne gamma de l'hémoglobine) et contre un anti-i. Il est possible de détecter 0,1% de cellules fœtales (46)

2.2.4 Place de la CMF dans les SMD

La CMF occupe une place primordiale dans le diagnostic des hémopathies et de plus en plus d'études en font un outil important dans le diagnostic, le pronostic et le suivi des SMD (33). En 2006, Valent *et al.* ont défini les critères généraux pour établir le diagnostic d'un SMD (14). Ce dernier est cependant difficile à poser lorsque les anomalies morphologiques sont frustrées et que les critères décisifs sont absents (dysplasie >10%, caryotype anormal, coloration de Perls positif ou blastes médullaires >5%). Dans ces contextes, il existe un besoin de marqueurs supplémentaires et c'est ainsi que la CMF s'est imposée en tant que co-critère intéressant dans le diagnostic des SMD (51,52).

2.2.4.1 La CMF comme outil de diagnostic dans les SMD

L'intérêt de la CMF dans le diagnostic des SMD est décrit depuis le début des années 2000 avec la mise en évidence de multiples anomalies immunophénotypiques par différentes études (53–55). Son utilisation dans le diagnostic de ces pathologies a tout d'abord été limitée à la caractérisation des cellules blastiques dans les cas de SMD transformés en LA (51). Puis plusieurs anomalies ont été individuellement mises en évidence sur les précurseurs granuleux, les monocytes et les érythroblastes. Or, aucune caractéristique immunophénotypique unique en CMF ne peut affirmer seule l'existence d'un SMD, car certaines de ces anomalies sont observées dans d'autres pathologies (56). L'étude cytométrique nécessite la combinaison de plusieurs aberrations présentes sur les différentes lignées myéloïdes pour obtenir une sensibilité et une spécificité suffisantes dans le diagnostic de SMD.

Parmi ces anomalies immunophénotypiques, le compartiment des cellules blastiques est fortement perturbé dans les SMD ce qui en fait un compartiment de choix pour l'identification de ces pathologies (57). On retrouve notamment, une augmentation des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ associée à une expression aberrante de marqueurs lymphoïdes (tels que le CD2, le CD5, le CD7, le CD19 et le CD56), une diminution ou une augmentation de l'expression du CD45 ainsi qu'une diminution des progéniteurs lymphoïdes B (58–61). De plus, des anomalies cellulaires de la lignée granuleuse sont présentes au moment du diagnostic chez environ 60% des patients atteints de SMD (59). L'hypogranulation des cellules myéloïdes est une des principales altérations cellulaires retrouvées et est détectée en CMF par une expression diminuée du SS des granuleux matures (54). Davis *et al.* observent un asynchronisme de maturation des cellules granuleuses dans les SMD avec des anomalies d'expression pour les marqueurs granulocytaires tels que le CD11b, le CD13 et le CD16 (62). En ce qui concerne le compartiment des monocytes, les anomalies les plus fréquemment observées chez les patients atteints de SMD comprennent une expression altérée des marqueurs CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD56 et HLA-DR (59). Il a de plus été montré que l'expression du marqueur CD56 était associée aux LMMC (63). Enfin, la dysplasie érythrocytaire est l'anomalie la plus communément retrouvée dans les SMD (59). En 2001, Stetler-Stevenson *et al.* ont mis en évidence un asynchronisme de maturation des érythroblastes avec l'expression anormale du récepteur de la transferrine (CD71) et de la glycophorine A (CD235a) ; puis en 2010 Matarraz *et al.* ont décrit l'expression aberrante du récepteur de la thrombospondine (CD36) au cours des SMD (54,64). Enfin, Mathis *et al.* ont montré en 2013 que les marqueurs CD36 et CD71 étaient les paramètres érythrocytaires les plus sensibles et fiables dans le diagnostic des SMD (65).

Grâce à ces différents marqueurs, la CMF a montré une grande utilité dans le diagnostic des SMD, en particulier pour les cas difficiles où la morphologie et la cytogénétique ne sont pas ou peu contributives (56). La détection en CMF d'au moins trois anomalies immunophénotypiques concernant au moins une lignée myéloïde peut suggérer l'existence d'un SMD mais n'est pas suffisante. Il est recommandé de renouveler ultérieurement (plusieurs mois) l'examen cytologique, l'analyse cytogénétique et la CMF pour poser le diagnostic de certitude (2).

2.2.4.2 L'impact de la CMF dans le pronostic et le suivi thérapeutique des SMD

Les critères d'évaluation classiques, par l'intermédiaire des scores IPSS et WPSS sont en partie subjectifs et manquent de sensibilité et de spécificité. La CMF trouve sa place en contribuant non seulement à la stratification pronostique mais également à l'évaluation de la réponse thérapeutique (66).

Il a été montré que les anomalies immunophénotypiques des lignées myéloïdes et monocytaires détectées en CMF dans les SMD étaient corrélées avec le score IPSS, le score WPSS, la dépendance transfusionnelle et le temps de progression du SMD en LAM (67–69). Les anomalies immunophénotypiques des progéniteurs myéloïdes diffèrent entre les SMD de bas grade et les SMD de haut grade montrant l'impact que peut avoir l'immunophénotypage des progéniteurs myéloïdes sur le pronostic, indépendamment du pourcentage de blastes dans la moelle osseuse (70). Le nombre d'aberrations identifiées dans les SMD en CMF est associé à la survie globale (71). Plusieurs études indiquent que la CMF peut contribuer de manière significative au pronostic des SMD (58,72).

Au cours d'un traitement par chimiothérapie intensive, la CMF peut être importante dans le suivi de la maladie, en particulier lorsque d'autres examens tels que la cytogénétique sont normaux ou peu contributifs. La reconstitution cellulaire normale de la moelle osseuse en réponse au traitement est aisément détectable par la CMF chez les patients bons répondeurs. Enfin, la détection persistante d'anomalies cellulaires peut mettre en évidence l'inefficacité d'un traitement, cela permet alors d'épargner au patient des molécules inactives et toxiques (51).

2.2.4.3 Systèmes de scores en CMF dans les SMD

De nombreux marqueurs de CMF concernant les SMD sont actuellement étudiés dans plusieurs centres et des analyses multicentriques rétrospectives de l'ensemble des données doivent encore déterminer les marqueurs les plus importants et leur combinaison dans des analyses multiparamétriques (52). En considérant dans leur globalité les anomalies immunophénotypiques sur cinq types cellulaires accessibles en CMF (progéniteurs myéloïdes, progéniteurs lymphoïdes, précurseurs granuleux, monocytes, érythroblastes), plusieurs

auteurs ont proposé des scores d'évaluation de la myélodysplasie (tableau 15). Ces scores prennent en compte le nombre et le type d'anomalies immunophénotypiques et permettent d'apprécier la gravité de la dysmyélopoïèse, d'évaluer le pronostic ou la réponse thérapeutique (10). Ces modèles de scores diffèrent selon l'origine de l'échantillon (sang ou moelle osseuse), le traitement et la manipulation des échantillons, le nombre de lignées de cellules analysées et la quantité de paramètres inclus dans l'analyse. Néanmoins, la plupart des modèles proposés respectent les recommandations actuelles de l'ELN (tableau 16) (52). Ces scores apparaissent cependant difficiles à mettre en œuvre en routine à cause de la multiplicité des marqueurs à utiliser et donc de la difficulté d'interprétation des profils de différenciation. Pour pallier cette difficulté, un score de CMF basé sur quatre paramètres et combinant trois marqueurs (CD10, CD34 et CD45) a été proposé par Ogata *et al.* en 2009 (61).

Tableau 15 : Résumé des systèmes de notation en CMF pour l'évaluation des dysplasies (52).

Year	Reference	Diagnosis/ prognosis	Cohort MDS/ path. control/ normal	Subpopulations analyzed	Lineages analyzed	Parameters	Specificity	Sensitivity	Concordance with ELN recommendations
2001	Stetler-Stevenson <i>et al.</i> ²²	D	45/25/4	ImmatMy/ matMy/Mo/ ery/MK	3	>15	100	88	+++
2005	Kussick <i>et al.</i> ⁵²	D	69/46/0	ImmatMy/ matMy/Mo	1	>15	88	89	+++
2005	Malcovati <i>et al.</i> ⁹	D	103/27/19	ImmatMy/ matMy/Mo/ery	2	7	100	87	++
2005	Cherian <i>et al.</i> ³⁵	D	26/20/16	MatMy (blood)	1	>15	90	73	++
2006	Della Porta <i>et al.</i> ³⁶	D	104/69/19	Ery	1	6	98.5	>95	+
2006	Ogata <i>et al.</i> ²³	D	27/76/14	ImmatMy/B	1+1	13	100	41	++
2008	Stachurski <i>et al.</i> ²⁴	D	180/37/0	ImmatMy/ matMy/Mo	1	>15	97	84	+++
2008	Satoh <i>et al.</i> ⁵³	D	27/90/0	ImmatMy/B	1+1	3	83	78	+
2008	Matarraz <i>et al.</i> ²⁵	D	50/29	ImmatMy/ matMy/B	1+1	>15	100	100	+++
2009	Goardon <i>et al.</i> ³⁰	D	100/70/5	ImmatMy	1	1	92	95	-
2009	Ogata <i>et al.</i> ³³	D	134/106/0 multicenter	ImmatMy/ matMy/B	1+1	4	92-98	44-71	++
2009	Truong <i>et al.</i> ⁵⁴	D	12/61/0	ImmatMy/ matMy/Mo	1	>15	94	75	+++
2011	Della Porta <i>et al.</i> (model according to reference 33)	D	416/380/0 multicenter	ImmatMy/ matMy/B	1+1	4	93	72	+
2003	Wells <i>et al.</i> ⁴	D/P	115/104/25	ImmatMy/ matMy/Mo	1	>15	93	70	+++
2007	Lorand-Metze <i>et al.</i> ³⁶	D/P	31/11/11	ImmatMy/ matMy/Mo/ery	2	5	~87	NE	++
2010	Matarraz <i>et al.</i> ²⁸	D/P	56/20/20	ImmatMy/ matMy/Mo/ ery/B	2+1	>15	100	100	+++
2010	Kem <i>et al.</i> ⁵⁵	D/P	459/266/11	ImmatMy/ matMy/Mo/ery	2	>15	95	70	+++
2011	Chu <i>et al.</i> ⁵⁹ (model according to reference 4)	D/P	56/27/0	ImmatMy/ matMy/Mo	1	>15	100	75	+++
1987	Clark <i>et al.</i> ⁵⁰	P	33/4/16	MatMy/Mo (blood)	1	3	NE	NE	+
2004	Arroyo ⁶	P	77/0/0	ImmatMy/ matMy/Mo	1	7	NE	NE	++
2011	Falco <i>et al.</i> ⁶⁶	P	424/0/0	ImmatMy/ matMy/Mo/ery	2	4	NE	NE	+

Abbreviations: D, diagnosis; ELN, European LeukemiaNet; P, prognosis; path. control, pathologic control; immatMy, immature myeloid progenitor cells; matMy, maturing neutrophils; MDS, myelodysplastic syndrome; Mo, monocytes; Ery, erythroid cells; MK, megakaryocytes; NE, not evaluable. All analyses are performed in bone marrow samples unless indicated otherwise. Analysis of B-cell progenitors is indicated as (+1); concordance of analyzed markers with current ELN recommendations is expressed as: (-) no, (+) 1-5, (++) 5-10 and (+++) > 10 markers.

Tableau 16 : Exigences minimales requises pour l'évaluation de la dysplasie par CMF (52).

Bone marrow subset	Recommended analyses	Aberrancy
Immature myeloid and monocytic progenitors	Percentage of cells in nucleated cell fraction ^a Expression of CD45 Expression of CD34 Expression of CD117 Expression of HLA-DR Expression of CD13 and CD33 Asynchronous expression of CD11b, CD15 Expression of CD5, CD7, CD19, CD56 ^b	Increased percentage Lack of/decreased/increased Lack of/decreased/increased Homogenous under/overexpression Lack of/increased expression Lack of/decreased/increased Presence of mature markers Presence of lineage infidelity markers
Maturing neutrophils	Percentage of cells as ratio to lymphocytes SSC as ratio vs SSC of lymphocytes Relationship of CD13 and CD11b Relationship of CD13 and CD16 Relationship of CD15 and CD10	Decreased Decreased Altered pattern ^c Altered pattern ^c Altered pattern ^c ; for example, lack of CD10 on mature neutrophils
Monocytes	Percentage of cells Distribution of maturation stages Relationship of HLA-DR and CD11b Relationship of CD36 and CD14 Expression of CD13 and CD33 Expression of CD56 ^b	Decreased/increased Shift towards immature Altered pattern ^c Altered pattern ^c (Homogenous) under/overexpression Presence of lineage infidelity marker
Progenitor B cells	Enumeration as fraction of total CD34+ based on CD45/CD34/SSC in combination with CD10 or CD19	Decreased or absent
Erythroid compartment ^d	Percentage of nucleated erythroid cells Relationship CD71 and CD235a Expression of CD71 Expression of CD36 Percentage of CD117-positive precursors	Increased Altered pattern ^c Decreased Decreased Increased

^aDiscrepancies in counts between several definitions indicate aberrancies. ^bTo be used with caution, as CD56 can be upregulated upon activation, be aware of normal cut-off values (also in stressed marrow). ^cAltered patterns can include altered distribution of maturation stages and/or altered expression levels of indicated antigens. ^dUnder evaluation. Examples of several flow cytometric aberrancies in myelodysplastic syndrome can be found on the European LeukemiaNet website: www.leukemia-net.org.

2.2.4.4 Le score d'Ogata

Ogata *et al.* ont confirmé en 2009 par une étude sur deux cohortes, une japonaise et une italienne, la capacité à distinguer les SMD de bas grade sans autre marqueur spécifique (cytogénétique ou sidéroblastes en couronne) des cytopénies non clonales, par l'analyse de quatre paramètres médullaires en CMF (61).

Ces quatre paramètres sont :

- le pourcentage des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ au sein des cellules nucléées totales (N <2,4%),
- le pourcentage de progéniteurs lymphoïdes B parmi les cellules CD34⁺ (N >5%),
- le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes (N =]4 – 7,8[),
- le rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes (N >6).

Un point est attribué pour chaque paramètre en dehors des valeurs normales, ainsi le score d'Ogata est quantifié de 0 à 4.

Le choix de ces quatre paramètres s'appuie sur plusieurs critères.

- Le premier critère mis en évidence est basé sur l'évolution opposée des deux principaux composants du compartiment des cellules CD34⁺ dans les SMD par rapport aux échantillons de moelle de sujets témoins : une augmentation des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ et une diminution des progéniteurs lymphoïdes B. L'analyse individuelle de ces deux populations cellulaires est plus précise et plus sensible pour la détection des changements liés aux SMD (61).
- L'intensité d'expression du CD45 des lymphocytes rapportée à celle des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ peut augmenter ou diminuer dans les SMD.
- Il a été démontré que le SS des cellules granulocytaires diminuait chez les patients atteints de SMD et que l'analyse du mode était plus discriminante que l'analyse des autres données (moyenne, médiane) (54,61,67,73). L'utilisation des granuleux CD10 négatif (CD10⁻) n'est pas plus pertinente que l'utilisation de l'ensemble des granulocytes. Néanmoins, elle s'avère intéressante dans l'analyse des échantillons contaminés par le sang périphérique, en effet les PNN circulants expriment le marqueur CD10 (61).

L'ajustement des deux derniers paramètres sur les lymphocytes permet d'assurer la reproductibilité des données en adaptant les résultats des cellules ciblées avec les résultats des lymphocytes dans le même échantillon (61).

Il a été montré que ce score de CMF était corrélé avec les scores IPSS et WPSS (61).

Une validation multicentrique de cette approche a ensuite été réalisée en 2012 par l'ELN afin de la rendre applicable dans la pratique clinique (57). Cette étude conduite dans une large population de patients avait pour but de définir les normes de référence des paramètres du score d'Ogata afin d'harmoniser la stratégie diagnostique des patients suspectés d'être atteints de SMD. Les valeurs seuils validées par l'ELN pour chaque paramètre sont détaillées dans le tableau 17.

Dans cette étude, l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du score de CMF a été déterminée dans une cohorte d'apprentissage comprenant 538 patients et dans une cohorte de validation comprenant 250 patients.

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

Paramètre analysé	Norme selon Ogata <i>et al.</i> 2009 (61)	Norme selon Della Porta <i>et al.</i> 2012 (57)
Progéniteurs myéloïdes CD34 ⁺ parmi les cellules nucléées totales	<2,4%	<2%
Progéniteurs lymphoïdes B parmi les CD34 ⁺ totaux	>5%	>5%
Rapport entre la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des progéniteurs myéloïdes sur celle des lymphocytes]4 – 7,8[]4 – 7,5[
Rapport entre le SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes*	>6	>6

* Le score d'Ogata prend en compte les granuleux CD 10⁻ uniquement alors que le score de l'ELN prend en compte tous les granuleux

3 OBJECTIFS

Les SMD forment un groupe d'hémopathies clonales acquises, hétérogène tant sur le plan clinique que sur le plan biologique. Leur diagnostic repose sur un ensemble de données définies par l'OMS telles que la présence de cytopénies, de blastes médullaires, de sidéroblastes en couronne ou encore d'anomalies cytogénétiques récurrentes. Lorsque ces critères spécifiques sont absents, le diagnostic de SMD peut s'avérer difficile. Dans de tels contextes, il existe un besoin pour des marqueurs supplémentaires intervenant comme co-critères dans le diagnostic des SMD. La CMF, grâce à un score reconnu, est un outil de diagnostic important permettant d'apporter ces informations et d'aider ainsi au diagnostic de SMD.

Le laboratoire d'hématologie du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Limoges est un centre de référence pour le diagnostic des SMD dans toute la région du Limousin. A l'heure actuelle et devant toute suspicion de SMD (une ou plusieurs cytopénies périphériques chroniques, signes cliniques évocateurs), la pratique quotidienne du laboratoire utilise essentiellement l'examen cytologique des frottis médullaires pour la mise en évidence de blastes et de dysplasie des lignées hématopoïétiques pour établir un diagnostic de SMD. Les techniques de cytogénétique sont éventuellement utilisées. L'analyse des prélèvements médullaires par CMF est également pratiquée lorsque les dysplasies cytologiques sont frustrées.

C'est dans ce contexte qu'il nous est apparu essentiel de réaliser une étude sur le score d'Ogata en CMF déjà mis en place au laboratoire. Cette étude nous renseigne tout d'abord sur la sensibilité et la spécificité de ce score dans le diagnostic de SMD. Nous nous sommes également intéressés à l'apport d'un score de CMF utilisant un panel d'anticorps plus étendu. Nous avons enfin étudié la relation entre les résultats de l'analyse en CMF et l'examen cytologique, méthode de référence, pour l'évaluation de la dysplasie médullaire.

Les perspectives de ce travail sont de proposer à terme un examen systématique des prélèvements médullaires par CMF au laboratoire devant toute suspicion de SMD chez un patient ; en complément de l'examen cytologique du frottis médullaire et de l'étude en cytogénétique. Nous voulons également établir la possibilité d'affiner le diagnostic de ces SMD grâce au panel étendu du score d'Ogata en CMF.

4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Constitution des cohortes

Nous avons réalisé pour ce travail une étude observationnelle rétrospective entre les mois de janvier 2011 et août 2013. Nous avons inclus dans cette étude tous les patients avec une suspicion de SMD. Ce travail, piloté par le laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges concernait l'ensemble des services de l'hôpital.

Tous les patients ont eu une ponction de moelle osseuse avec étalement sur lame porte-objet et recueil sur tube avec héparine de sodium BD Vacutainer® (BD Becton Dickinson and Compagny, Franklin Lakes, NJ, EU). Ces ponctions ont été réalisées selon le protocole en vigueur au sein du laboratoire et en accord avec les recommandations de la SFH (Société Française d'Hématologie) (74).

Nous avons réalisé une extraction à partir du Système d'Informatique de Laboratoire (SIL) d'hématologie (logiciel GLIMS®) de tous les patients pour lesquels une CMF avait été réalisée dans la période considérée.

Notre étude inclut, pour tous ces patients, le diagnostic final établi sur l'analyse et le suivi de toutes les données cliniques et biologiques. Ces données ont été recueillies à l'aide des logiciels de gestion des patients du CHU : Crossway® (CLM version 7.1.6.1) et Cyberlabs® (MIPS France, version 9.2). Les critères de diagnostic de SMD sont basés sur la classification OMS 2008 actuellement en vigueur.

Pour l'étude cytométrique :

- une première cohorte a été analysée avec un panel de quatre anticorps correspondant au score d'Ogata,
- une seconde cohorte a été analysée avec un panel de sept anticorps correspondant au score d'Ogata étendu.

Seule une partie de ces patients a bénéficié d'une lecture cytologique des lames de moelle osseuse. Ces résultats cytologiques ont été comparés à l'analyse cytométrique.

4.2 Analyse par CMF

4.2.1 Protocoles de traitement des échantillons de moelle osseuse

Chaque échantillon de moelle osseuse des patients de la cohorte totale a été traité selon le protocole suivant :

- diluer le prélèvement au tiers dans du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*),
- mélanger 50µl de la dilution aux différents anticorps monoclonaux (tableau 18)
- incuber le mélange pendant 20 à 25 minutes dans l'obscurité à température ambiante,
- ajouter 500µl de réactif de lyse (Versalyse®) au mélange, puis incuber à nouveau dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante,
- ajouter le tampon salin phosphaté (PBS),
- centrifuger le mélange pendant 5 minutes à 880 G,
- vider le tube par retournement et reprendre le culot par 300 à 500µl de PBS,
- passer le tube sur le cytomètre.

Tableau 18 : Anticorps monoclonaux utilisés en CMF.

Protocole quatre couleurs Score d'Ogata	Protocole sept couleurs Score d'Ogata étendu
CD45-FITC (10µl), CD34-PC7 (5µl), CD10-PE (10µl), CD19-PC5 (5µl)	CD45-FITC (10µl), CD34-PC7 (5µl), CD10-PE (10µl), CD19-PB (5µl), CD5-A750 (5µl), CD7-A700 (5µl), CD56-APC (5µl)

L'analyse des prélèvements médullaires a été réalisée sur un cytomètre de flux Beckman Coulter Navios™.

Le logiciel d'acquisition des données utilisé était Kaluza® Flow Analysis Software, (Beckman Coulter version 1.2), les résultats de l'analyse par CMF de chaque échantillon ont été recueillis au format informatique LMD.

Pour chaque échantillon, le score d'Ogata a été déterminé à partir du panel d'anticorps tel que décrit par Ogata *et al.* (61). Afin d'améliorer la sensibilité de détection des progéniteurs lymphoïdes, le marqueur CD19 a été ajouté à ce panel. Les normes utilisées sont celles recommandées par l'ELN (57).

Le score d'Ogata a été établi à partir des quatre paramètres suivants :

- le pourcentage des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ au sein des cellules nucléées totales (seuil $\geq 2\%$),
- le pourcentage de progéniteurs lymphoïdes parmi les cellules CD34⁺ (seuil $\leq 5\%$),
- le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes (seuil ≤ 4 ou $\geq 7,5$),
- le rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes (seuil ≤ 6).

Nous nous sommes également intéressés à l'apport diagnostique de la détection de marqueurs aberrants : CD5 et CD7 sur les progéniteurs myéloïdes et CD56 sur les monocytes à l'aide du panel d'anticorps « sept couleurs ». Un score complémentaire au score d'Ogata a été établi, en attribuant un point chaque fois que l'expression d'un marqueur était supérieure ou égale à 30%. A la suite de cette analyse, un score global de CMF reprenant le score d'Ogata et ces trois derniers paramètres a été constitué. Ce score est nommé « score d'Ogata étendu ».

4.2.2 Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata

La CMF permet de classer les populations cellulaires d'un échantillon selon les marqueurs présents à la surface des cellules. Cette séparation des différentes populations est réalisée grâce au fenêtrage (ou *gating*) par les logiciels de traitement des données de CMF.

Le schéma type de l'analyse des données d'acquisition est le suivant :

- ✓ Le premier histogramme (figure 12), intégrant le FS et le SS, permet d'exclure les déchets et de fenêtrer la totalité des cellules (R1).

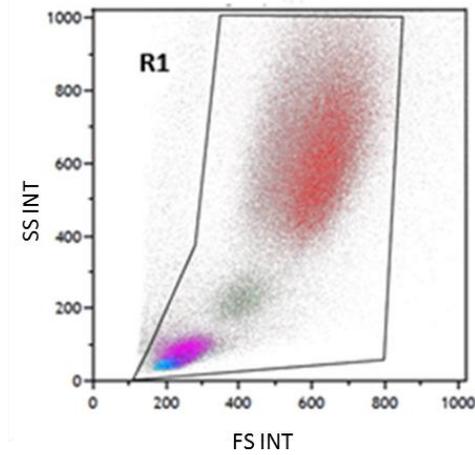


Figure 12 : Histogramme FS/SS permettant le fenêtrage des cellules totales.

✓ Un deuxième histogramme est fenêtré sur la population R1 précédemment isolée et renseigne sur l'intensité d'expression du CD45 et du SS. Il permet l'isolement des principales populations cellulaires (R2) (figure13) :

- les lymphocytes en fuchsia,
- les granuleux en rouge,
- les monocytes en vert,
- les progéniteurs myéloïdes en orange,
- et les progéniteurs lymphoïdes en bleu foncé.

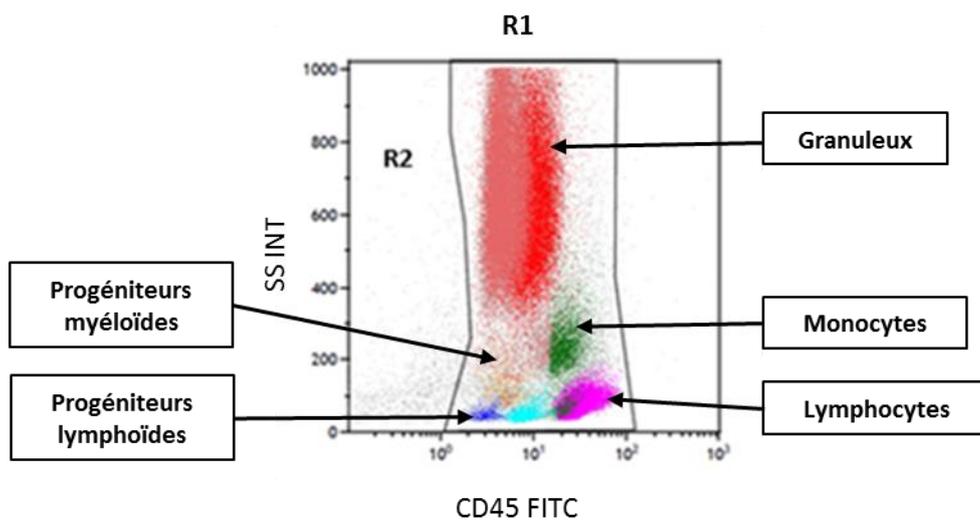


Figure 13 : Histogramme CD45/SS permettant l'isolement des principales lignées cellulaires.

- ✓ A partir de cet histogramme, les cellules avec un SS relativement faible sont fenêtrées en R3 (figure 14).

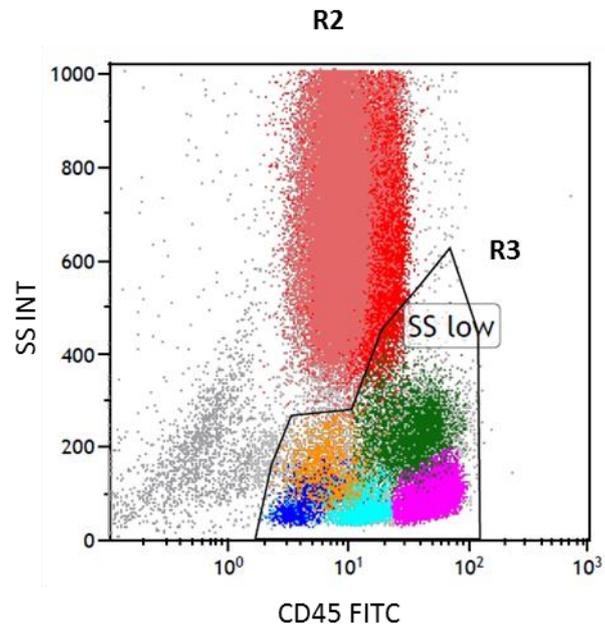


Figure 14 : Histogramme CD45/SS permettant le fenêtrage des cellules avec un SS faible.

- ✓ Un troisième histogramme fenêtré sur la population R3 renseigne sur l'intensité d'expression du CD45 et du CD34. Il permet d'isoler les cellules CD34⁺ (R4) (figure 15).

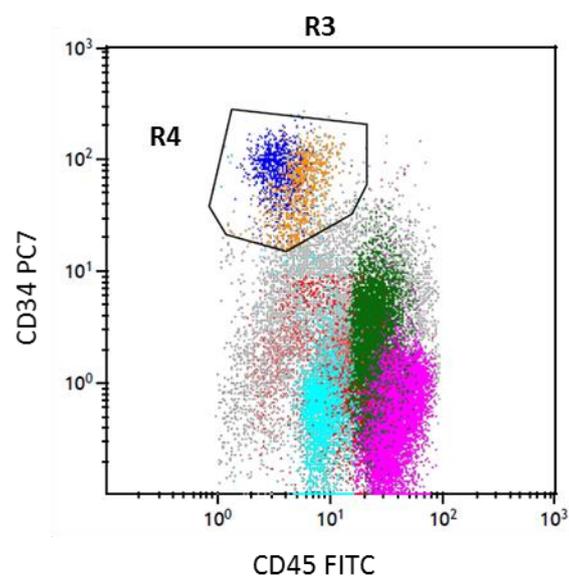


Figure 15 : Histogramme CD45/CD34 permettant d'isoler les cellules CD34⁺.

- ✓ Un quatrième histogramme est fenêtré sur la population R4. Il détaille l'intensité d'expression du CD45 et du SS. Il permet d'isoler deux populations cellulaires (R5) (figure 16 A) :
 - les progéniteurs lymphoïdes reconnaissables par une intensité d'expression du CD45 faible ainsi qu'un SS faible,
 - les progéniteurs myéloïdes qui ont une intensité d'expression du CD45 et un SS plus important.
- ✓ Un cinquième histogramme, fenêtré à partir de la population R5, décrit l'intensité d'expression du CD34 et du CD19. Il permet d'isoler avec plus de précision les progéniteurs lymphoïdes B (R6) en bleu sur la figure 16 B.
- ✓ Un sixième histogramme, fenêtré sur la population des cellules CD34⁺ non progéniteurs lymphoïdes détaille l'intensité d'expression du CD45 et du CD10. Il permet de mettre en évidence avec plus de précision les progéniteurs myéloïdes (R7) en orange sur la figure 16 C.
- ✓ Un septième histogramme, recible la population des progéniteurs lymphoïdes B en fonction de leur expression d'intensité du CD45 et du SS (figure 16 D).

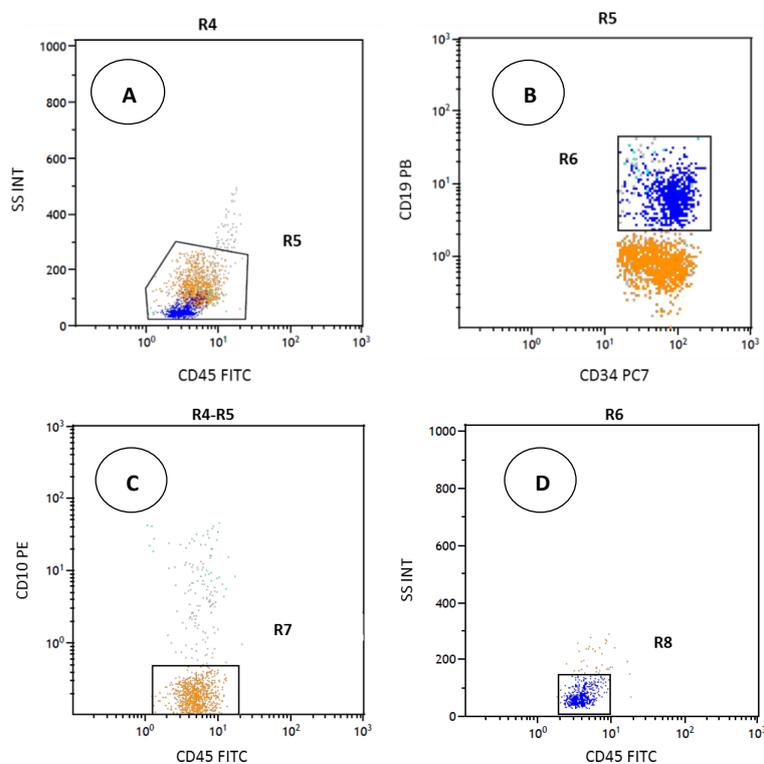


Figure 16 : Histogrammes permettant d'isoler les progéniteurs myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes.

Cette stratégie de fenêtrage nous a permis d'isoler les deux premiers paramètres du score d'Ogata : progéniteurs myéloïdes et progéniteurs lymphoïdes B.

En reprenant le deuxième histogramme (figure 13), nous pouvons alors isoler les deux autres paramètres, notamment les granuleux (R8) et les lymphocytes (R9) (figure 17).

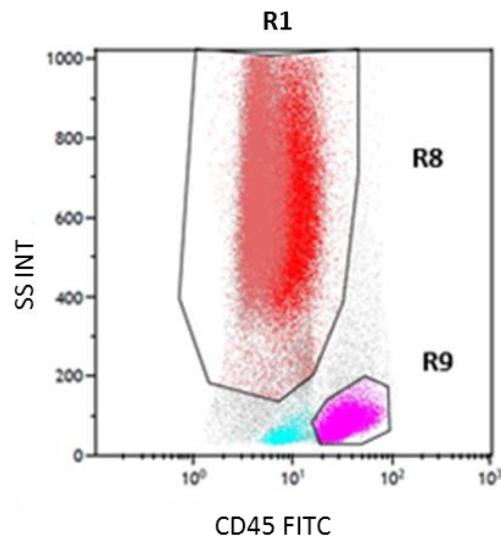


Figure 17 : Histogramme CD45/SS permettant d'isoler les granuleux et les lymphocytes.

- ✓ Un huitième histogramme, fenêtré sur la population des granuleux (R8) permet de mettre en évidence les granuleux CD10⁻ plus immatures (R10) (figure 18).

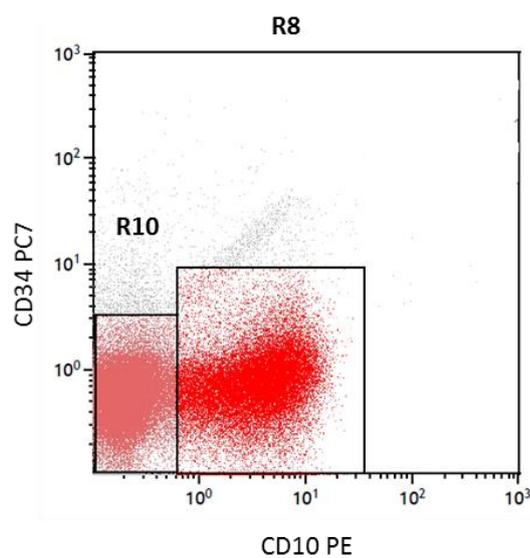


Figure 18 : Histogramme CD10/CD34 permettant d'isoler les granuleux CD10⁻.

Deux histogrammes mono-paramétriques, fenêtrés sur les populations des lymphocytes et des progéniteurs myéloïdes, permettent la visualisation de l'expression de l'intensité du CD45 pour chacune d'elles. A partir de ces données, il nous est possible de calculer le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes (figure 19).

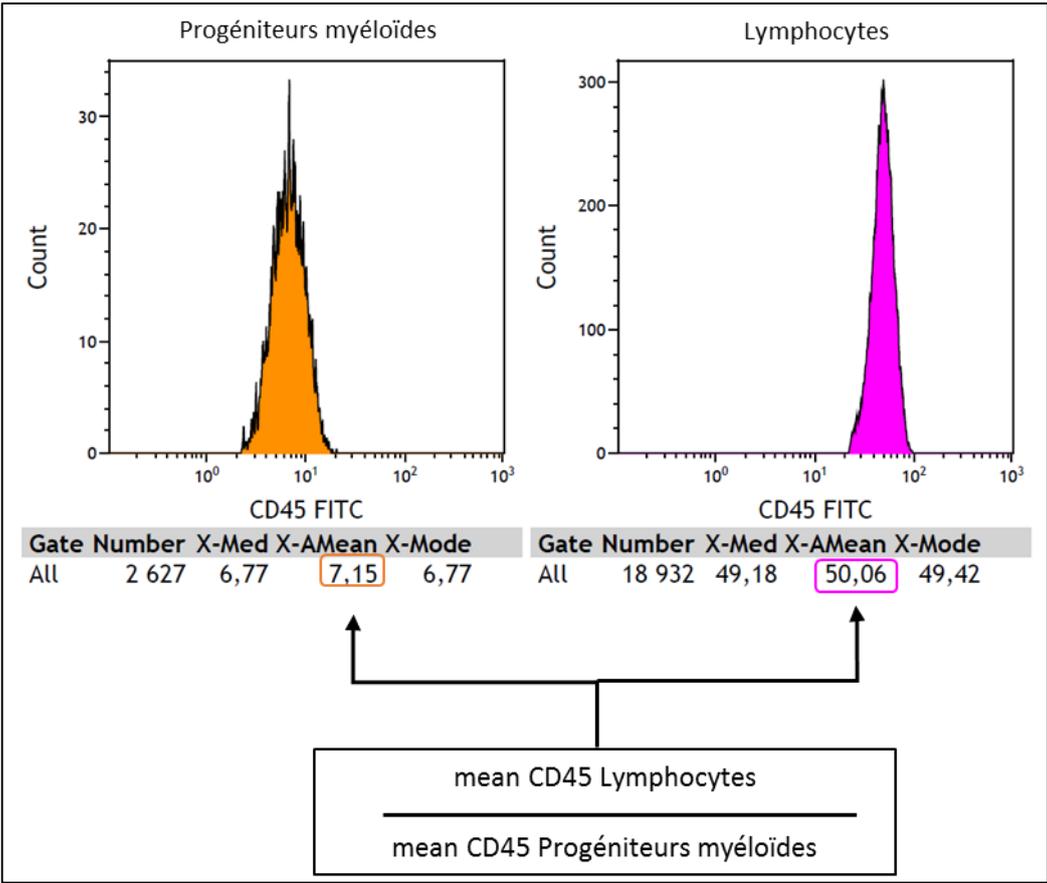


Figure 19 : Rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes.

De la même façon, deux histogrammes mono-paramétriques, fenêtrés sur les populations des granuleux CD10⁻ et des lymphocytes permettent la visualisation du SS. A partir de ces données, il nous est possible de calculer le rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes (figure 20).

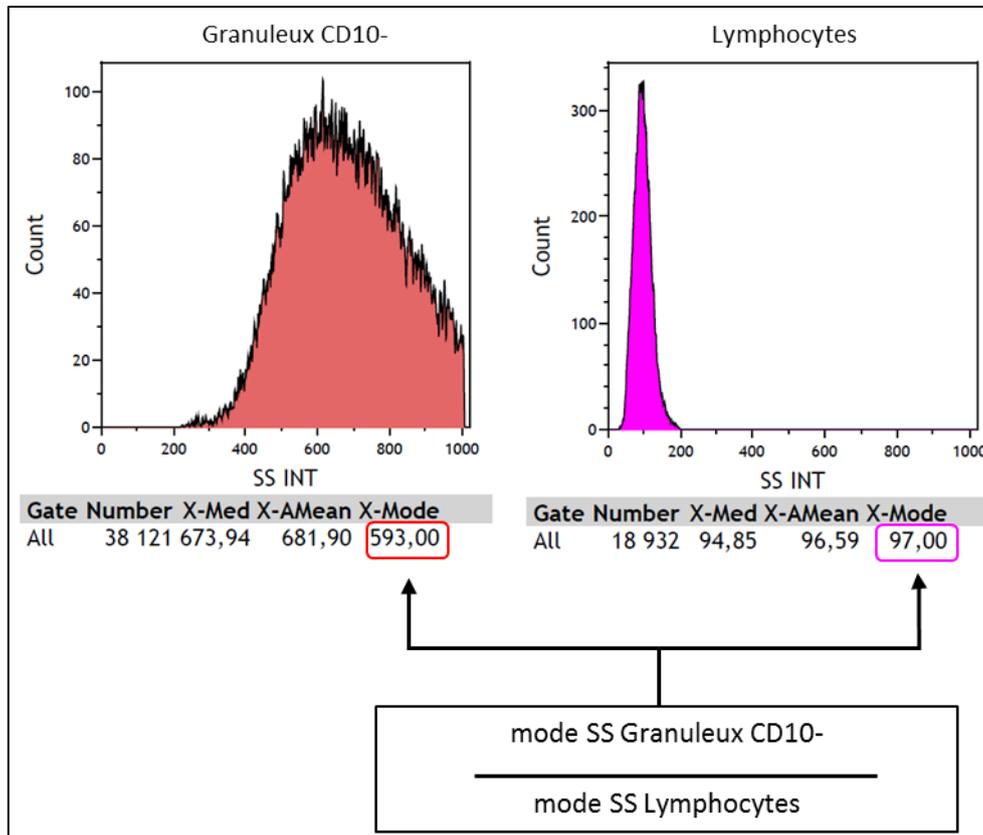


Figure 20 : Rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes.

Finalement, à partir de cette stratégie de fenêtrage, les quatre paramètres du score d'Ogata ont été identifiés :

- le pourcentage des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ parmi les cellules nucléées totales,
- le pourcentage des progéniteurs lymphoïdes B parmi les cellules CD34⁺,
- le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes,
- le rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes.

4.2.3 Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata étendu

Trois histogrammes mono-paramétriques (figure 21), fenêtrés sur les progéniteurs myéloïdes et les monocytes nous permettent la visualisation de l'intensité d'expression du CD5, du CD7 et du CD56 avec un seuil de positivité fixé à 30% afin d'éviter un nombre trop important de faux positifs. Ce seuil est établi à partir de l'expression de ces trois marqueurs sur les lymphocytes.

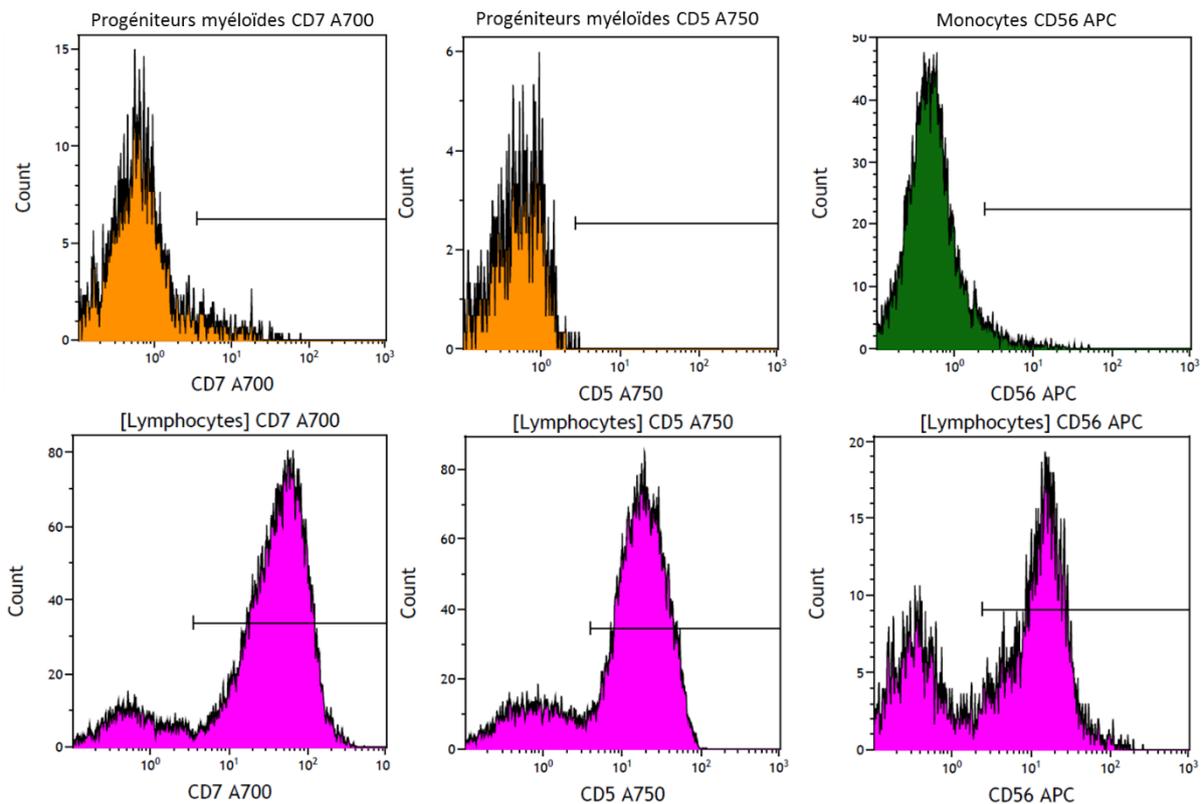


Figure 21 : Fenêtrage des progéniteurs myéloïdes CD7⁺, des progéniteurs myéloïdes CD5⁺ et des monocytes CD56⁺.

Les annexes 1 et 2 reproduisent respectivement le fenêtrage complet en CMF d'un patient sain et d'un patient atteint d'une AREB I.

4.3 Analyse cytologique des frottis de moelle osseuse

Les ponctions de moelle osseuse des patients ont été étalées sur lame porte-objet. Ces frottis ont ensuite été colorés par la coloration de MGG, puis examinés au microscope optique. Les lames ont ensuite été conservées dans la lamothèque au sein du laboratoire d'hématologie.

4.3.1 Grille de lecture et score cytologique

Nous avons conçu une grille de lecture pour l'analyse des frottis de moelle osseuse, établie et adaptée à partir de la grille de quantification des dysplasies proposée par le GFM (annexe 3). Notre grille nous a permis d'élaborer un score cytologique basé sur le degré de dysplasie des différentes lignées myéloïdes.

Ce score quantifie de 0 à 2 les dysplasies de chacune des trois lignées myéloïdes (mégacaryocytaire, érythroblastique et granuleuse). L'attribution des points se fait de la façon suivante :

- 0 point en l'absence d'anomalie,
- 1 point lorsque la dysplasie des cellules est >10% des éléments de la lignée,
- 2 points lorsque l'anomalie des cellules est >50% des éléments de la lignée.

Le score maximum est donc égal à 6.

La présence de micromégacaryocytes ou une coloration de Perls positif donne deux points à la lignée correspondante.

Tableau 19 : Exemple d'un score cytologique.

Evaluation des dysplasies			
	0	1	2
<i>Dysmégacaryopoïèse</i>		X	
<i>Dysérythropoièse</i>			X
<i>Dysgranulopoïèse</i>		X	
Score cytologique		4	

4.3.2 Lecture des lames de moelle osseuse

Nous avons réalisé une première lecture des lames en double aveugle. Une relecture commune entre les deux lecteurs était effectuée lorsque l'appréciation de la dysplasie des

différentes lignées différait. Enfin, lorsque la conclusion de la lecture pour l'établissement du diagnostic cytologique d'un SMD était discordante entre les deux lecteurs, une lecture était effectuée par un troisième lecteur afin de statuer sur le résultat final.

4.4 Analyse des résultats

Nous avons renseigné les résultats des analyses de CMF et de cytologie, rendus anonymes, dans une base de données électronique (Excel 2013®, Microsoft Corporation, WA, EU). Ce logiciel nous a également permis de réaliser les représentations graphiques des résultats. Nous avons confronté les résultats de la lecture cytologique et de l'analyse par CMF pour chaque patient et, recherché une relation entre ces deux méthodes d'analyse.

Deux tests statistiques ont été réalisés pour étudier cette relation:

- un test d'indépendance : test du χ^2 d'indépendance,
- un test non paramétrique de Cohen : coefficient Kappa de Cohen.

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism® v6.03 (GraphPad, San Diego, CA, EU). L'interprétation du coefficient Kappa de Cohen est basée sur le classement proposé par Landis et Koch (tableau 20) (75).

Tableau 20 : Degré d'accord et valeur du coefficient Kappa proposé par Landis et Koch (75).

Accord	Coefficient Kappa de Cohen
Excellent	0,81
Bon	0,80 – 0,61
Modéré	0,60 – 0,21
Mauvais	0,20 – 0,0
Très mauvais	< 0,0

5 RÉSULTATS

5.1 Données initiales

5.1.1 Recueil des données clinico-biologiques

Le recueil des données cliniques et biologiques à l'aide des logiciels Crossway® et Cyberlabs® nous a permis de déterminer le diagnostic final pour chaque patient. Ces diagnostics ont été classés en cinq groupes :

- groupe 1 : patient contrôle non atteint de SMD,
- groupe 2 : SMD de bas grade non-prouvés,
- groupe 3 : SMD de bas grade prouvés,
- groupe 4 : SMD de haut grade (AREB I et AREB II),
- groupe 5 : LMMC et autre SMD/SMP.

Les SMD de bas grade comprennent les : AR, ARS, CRDM et syndrome 5q-.

On parle de SMD de bas grade prouvé chez les patients pour lesquels l'analyse cytogénétique et/ou la coloration de Perls ont permis de confirmer le diagnostic de SMD.

Les SMD de bas grade non-prouvés concernent les patients pour lesquels seul le suivi clinico-biologique sur la période de notre étude, a permis d'affirmer le diagnostic de SMD (persistance d'une ou plusieurs cytopénie, dépendance transfusionnelle, *etc*). Chez ces patients le caryotype est normal et le Perls est négatif.

5.1.2 Les patients

5.1.2.1 Cohorte initiale

Au total, 271 patients ont été inclus dans notre étude, 46 en ont été ensuite exclus pour les causes détaillées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Causes d'exclusion de la cohorte initiale

Patients exclus	
Nombre	Causes
23	Diagnostic incertain ou manque de suivi
9	Lymphome non hodgkinien
4	LA
3	Myélome multiple
1	Plasmocytome
1	Amégacaryocytose acquise
1	Dégénérescence gélatineuse
3	Prélèvement non contributif hémodilué
1	Agranulocytose toxique

La figure 22 décrit les différentes cohortes :

- la cohorte totale (n= 225) pour laquelle nous avons évalué le score d'Ogata grâce aux quatre marqueurs de CMF,
- la cohorte n°1 (n₁ = 140) dans laquelle nous avons évalué le score d'Ogata étendu grâce aux sept marqueurs de CMF,
- et la cohorte n°2 (n₂ = 96) pour laquelle nous avons lu les frottis médullaire selon la grille de lecture préétablie, puis étudié la relation entre la CMF « 4 couleurs » (score d'Ogata) et la cytologie.

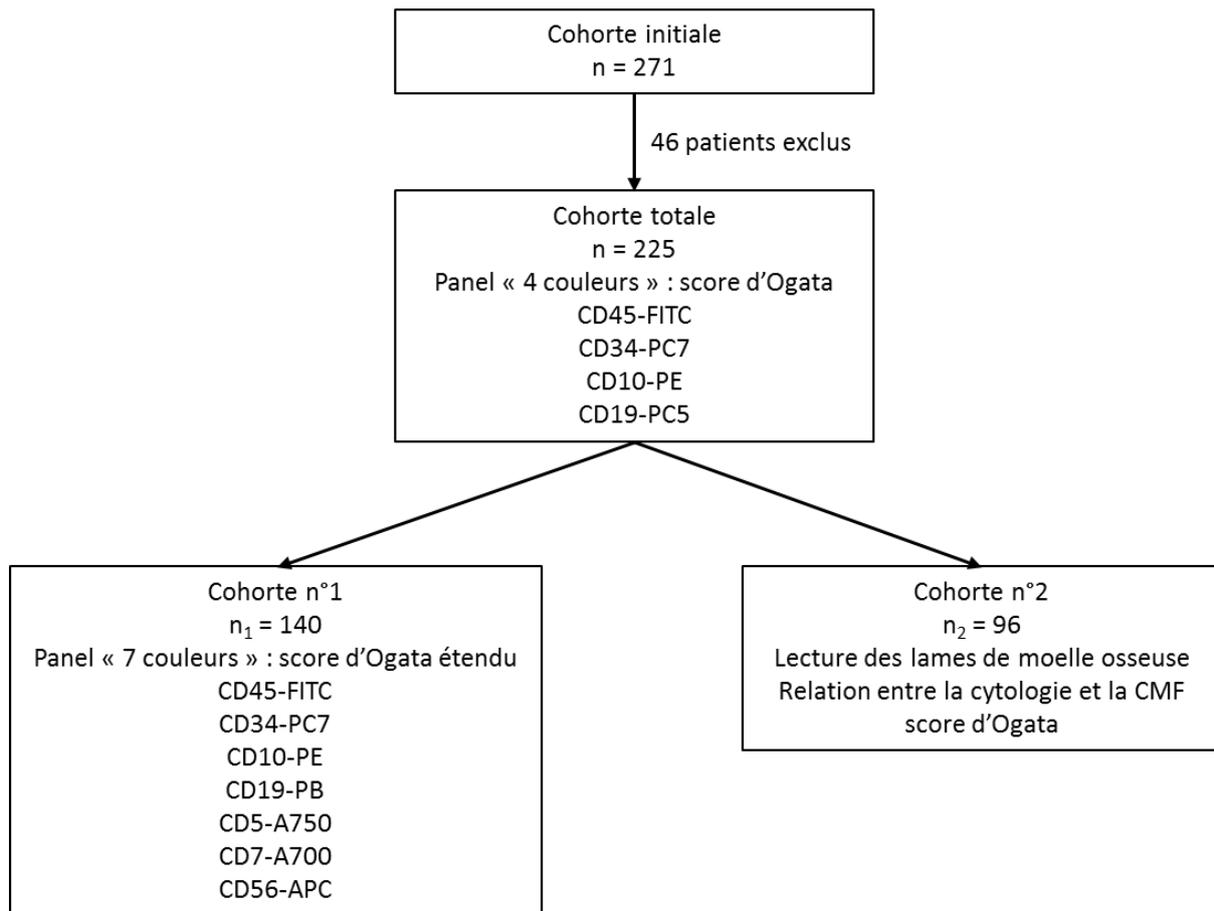


Figure 22 : Logigramme détaillé des cohortes de l'étude.

5.1.2.2 Cohorte totale

Notre première étude en CMF porte sur 225 sujets, 100 femmes (44%) pour 125 hommes (56%). La moyenne d'âge est de $72,4 \pm 14$ ans avec une médiane de 75 ans (Q1=64,2 ; Q3=83 ans). L'annexe 4 reprend l'ensemble des caractéristiques des patients inclus dans cette étude. Notre cohorte est constituée de 110 patients appartenant au groupe contrôle défini par : une moelle normale, l'absence de cytopénie(s) et/ou la présence de cytopénie(s) liée(s) à des causes non hématologiques et de 115 patients avec un diagnostic définitif de SMD.

Les figures 23 et 24 ci-dessous détaillent respectivement :

- la répartition des patients souffrant de SMD,
- la répartition des patients contrôles au sein de la cohorte totale.

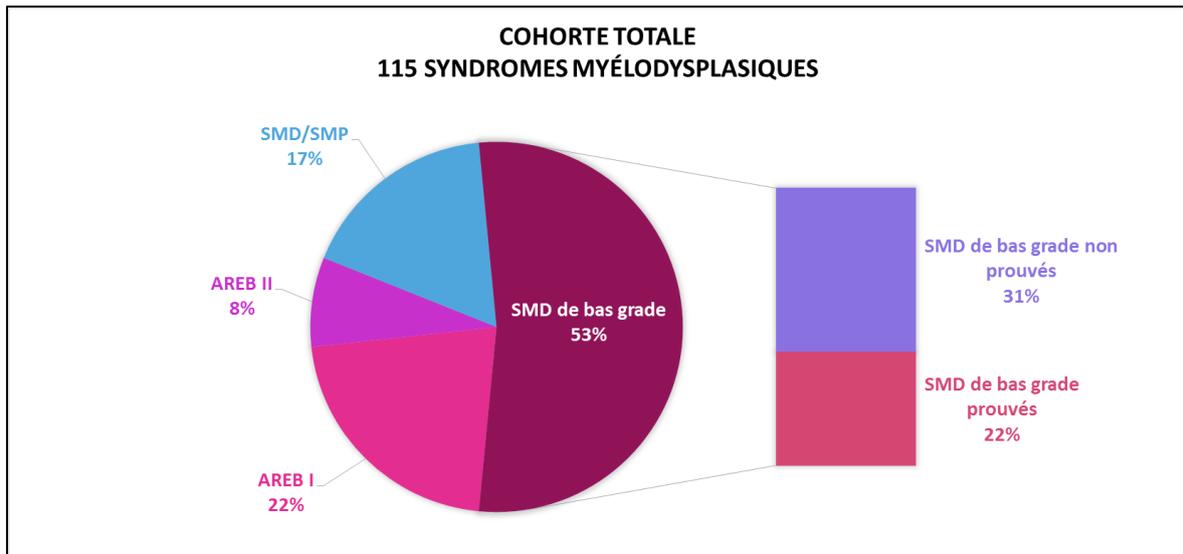


Figure 23 : Répartition des patients souffrant de SMD dans la cohorte totale.

La répartition dans les différentes catégories de SMD est la suivante :

- 61 SMD de bas grade (53%) : 17 AR, 11 ARS, 29 CRDM et 4 syndromes 5q-,
- 34 SMD de haut grade (30%) : 25 AREB I, 9 AREB II,
- 15 LMMC (13%) et 5 SMD/SMP autres (4%).

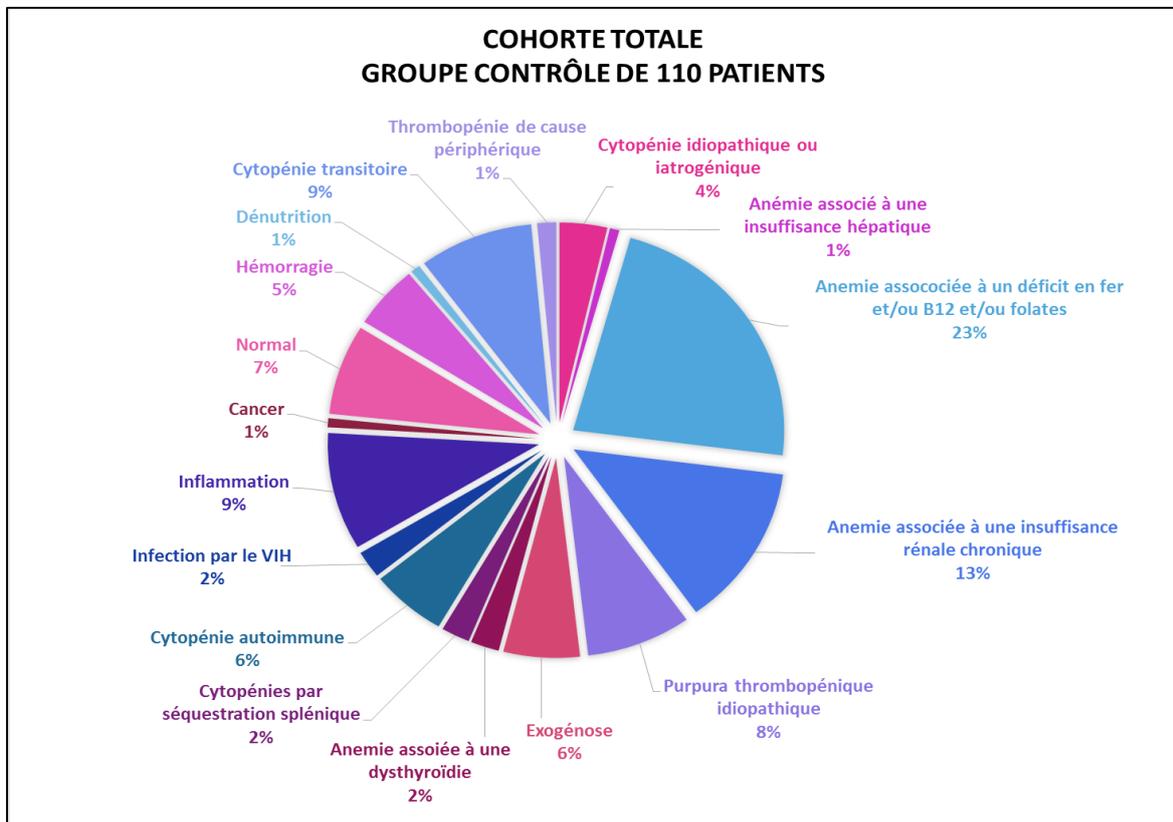


Figure 24 : Répartition des patients du groupe contrôle dans la cohorte totale.

Les principales étiologies des cytopénies non hématologiques sont les suivantes :

- 23% d'anémies associées à une carence en fer/vitamine B12/folates,
- 13% d'anémies associées à une insuffisance rénale chronique,
- 9% d'anémies associées à un syndrome inflammatoire,
- 9% de cytopénies transitoires,
- 8% de purpuras thrombopéniques idiopathiques (PTI),
- 7% de patients sains,
- 6% de cytopénies associées à une exogénose,
- 6% cytopénies auto-immunes,
- 5% de cytopénies associées à une hémorragie.

21 patients présentent plusieurs étiologies responsables de leurs cytopénies.

5.1.2.3 Cohorte n°1 étudiée en CMF : score d'Ogata étendu

La cohorte n°1 est composée d'un effectif total de 140 sujets : 62 femmes (44%) et 78 hommes (56%).

La moyenne d'âge est de $72 \pm 14,9$ ans avec une médiane de 75 ans (Q1=63,8 ; Q3=83 ans).

Cette cohorte est constituée de 77 patients avec un diagnostic définitif de SMD et de 63 patients appartenant au groupe contrôle.

Les figures 25 et 26 ci-dessous détaillent respectivement :

- la répartition des patients souffrant de SMD,
- la répartition des patients contrôles au sein de la cohorte n°1.

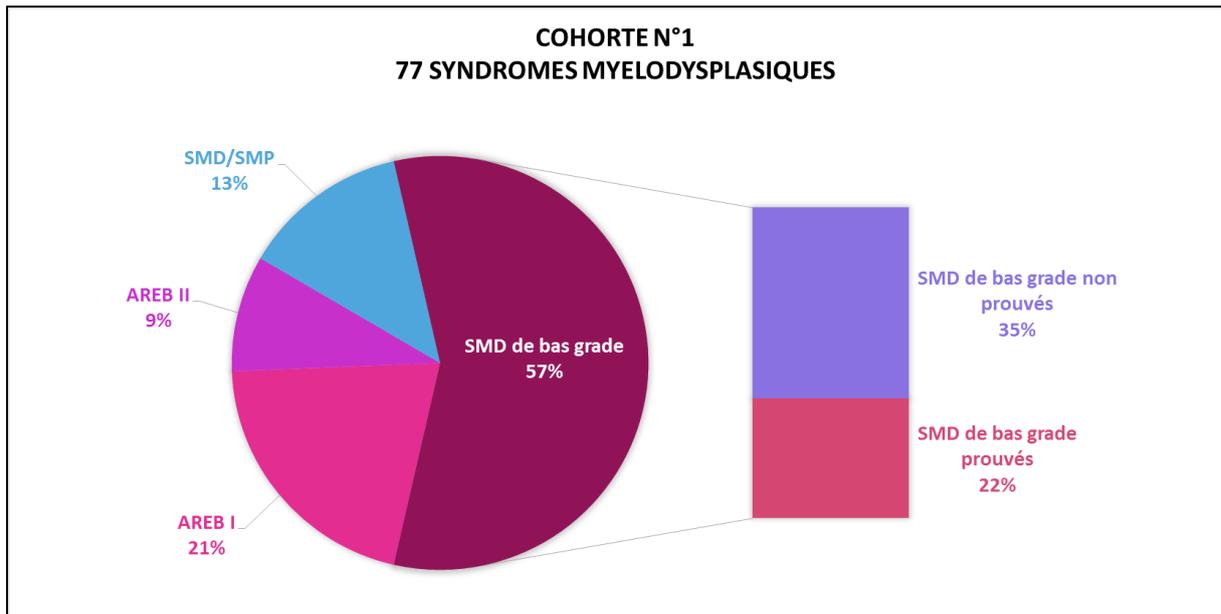


Figure 25 : Répartition des patients souffrant de SMD dans la cohorte n°1.

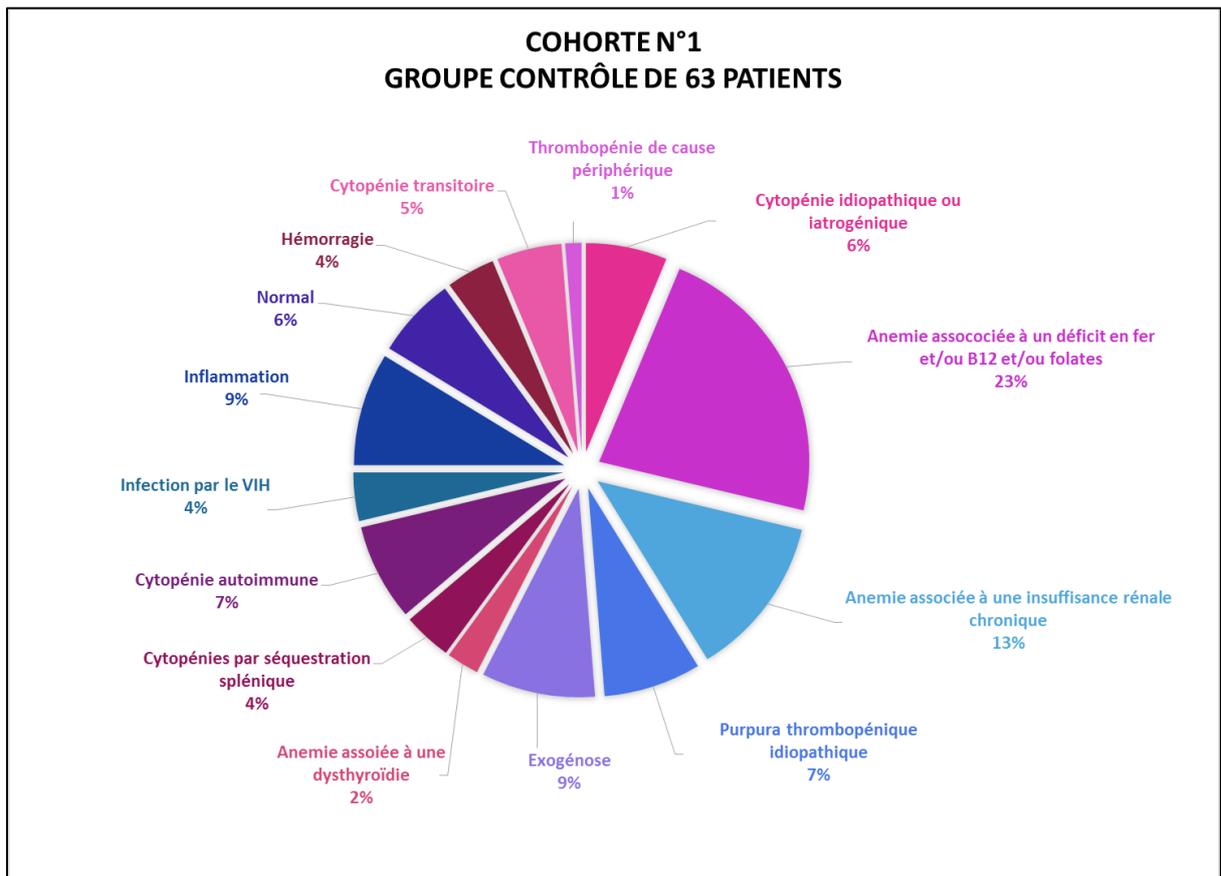


Figure 26 : Répartition des patients du groupe contrôle dans la cohorte n°1.

5.1.2.4 Cohorte n°2 étudiée en cytologie

La cohorte n°2 est composée d'un effectif total de 96 sujets : 47 femmes (49%) et 49 hommes (51%). La moyenne d'âge est de $73,4 \pm 10,7$ ans avec une médiane de 74,5 ans (Q1=66 ; Q3=81 ans).

Cette cohorte est constituée de 61 patients avec un diagnostic définitif de SMD et de 35 patients appartenant au groupe contrôle.

Les figures 27 et 28 ci-dessous détaillent respectivement :

- la répartition des patients souffrant de SMD,
- la répartition des patients contrôles au sein de la cohorte n°2.

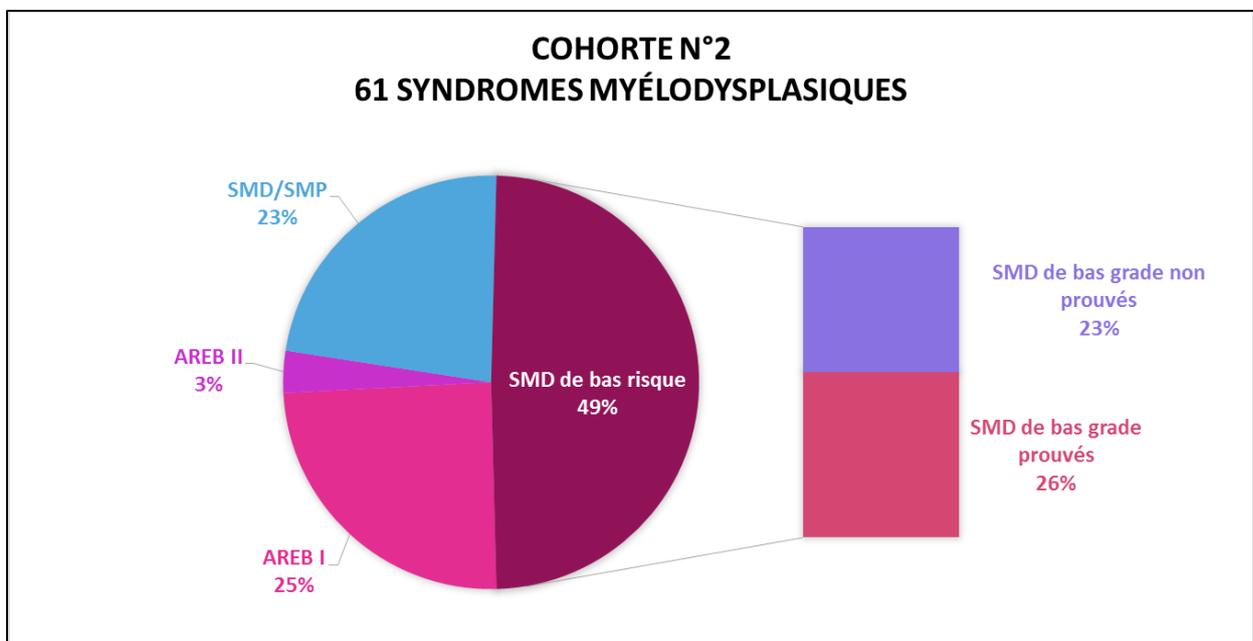


Figure 27 : Répartition des SMD dans la cohorte n°2.

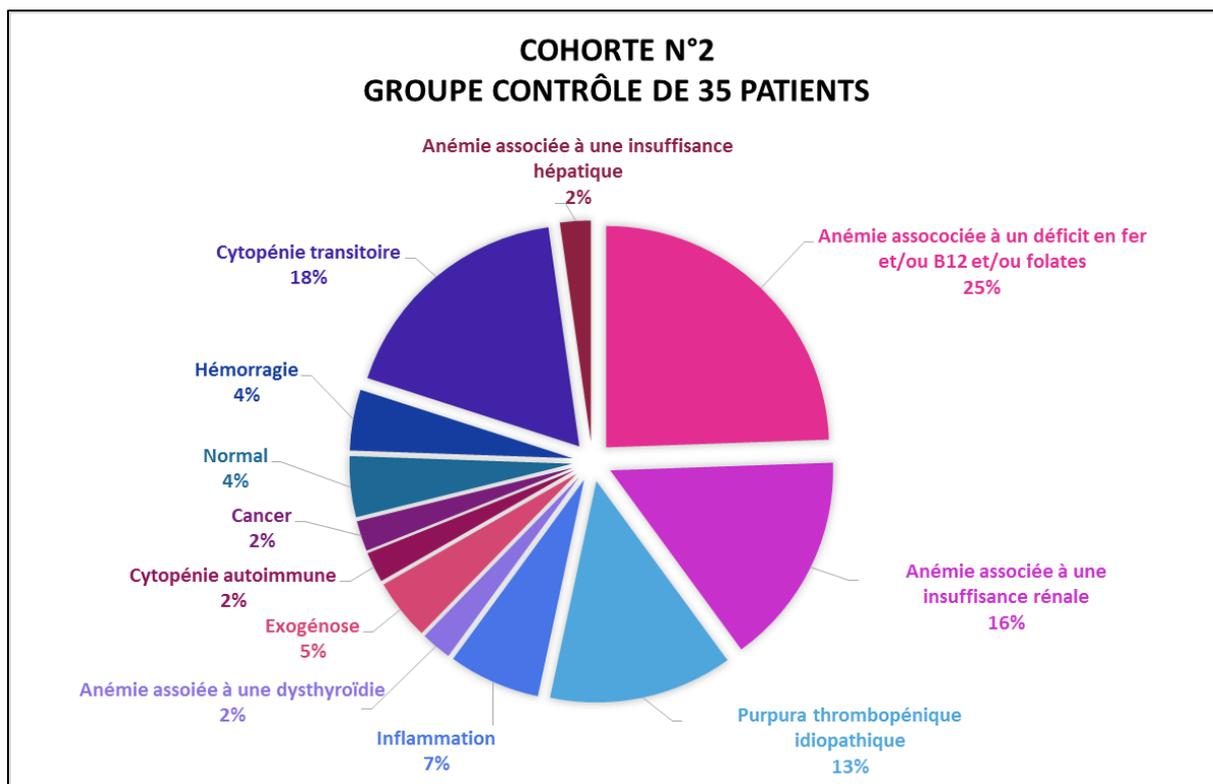


Figure 28 : Répartition des patients du groupe contrôle non SMD de la cohorte n°2.

5.2 Cytométrie en flux

5.2.1 Score d'Ogata

L'évaluation du score d'Ogata est réalisée grâce à un panel de quatre anticorps. Cette analyse est effectuée sur la cohorte totale comprenant 225 patients.

5.2.1.1 Distribution des valeurs des paramètres du score d'Ogata selon le groupe de diagnostic

La distribution des quatre paramètres du score d'Ogata en fonction du diagnostic final est représentée par un graphique en nuage de point. Les figures 29, 30, 31 et 32 représentent les distributions respectives des progéniteurs myéloïdes CD34⁺, des progéniteurs lymphoïdes B, du rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes et du rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes selon les 5 groupes précédemment définis.

5.2.1.1.1 Distribution des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ parmi les cellules nucléées totales selon les groupes de diagnostic

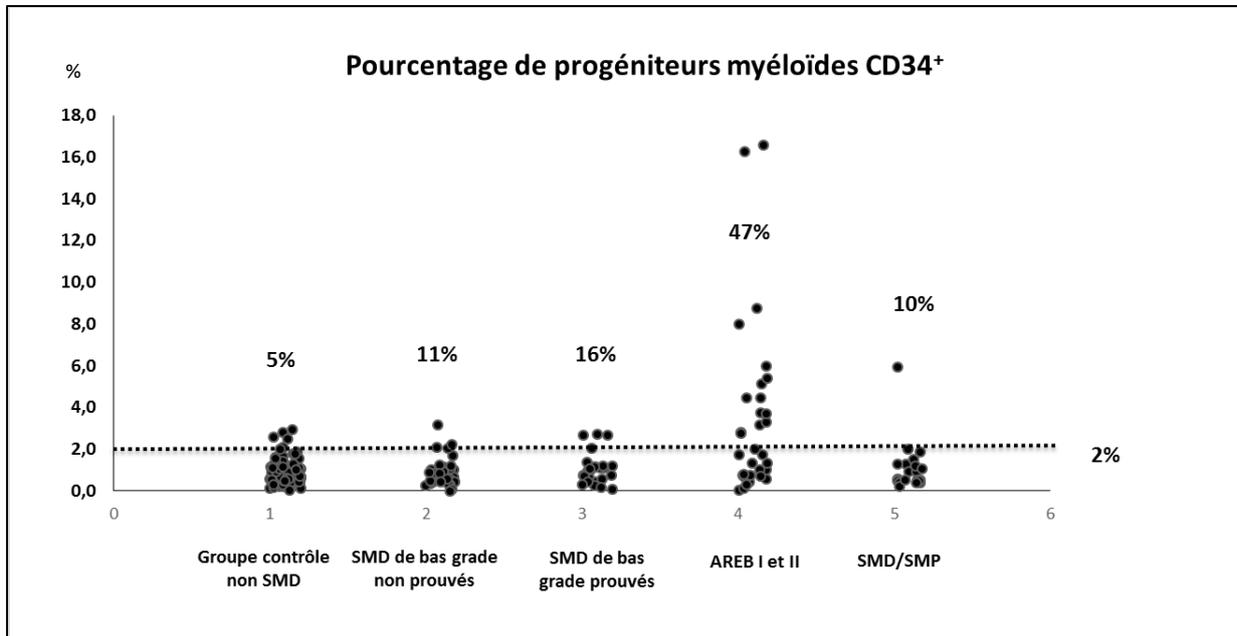


Figure 29 : Distribution des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ parmi les cellules nucléées totales.

Pour un seuil $\geq 2\%$, la spécificité du pourcentage des progéniteurs myéloïdes est de 95%. La sensibilité est très mauvaise pour les SMD de bas grade (11% pour les SMD non-prouvés, 16% pour les SMD prouvés) et les SMD/SMP (10%). Elle reste médiocre dans les AREB (47%).

On observe par ailleurs que le pourcentage de patients supérieurs au seuil pour ce paramètre est plus élevé dans les groupes SMD (tous types confondus) que dans le groupe contrôle. De plus, ce pourcentage est encore plus important dans le groupe des SMD de haut grade que dans celui des SMD de bas grade (prouvés ou non), respectivement 47% et 13%.

5.2.1.1.2 Distribution des progéniteurs lymphoïdes B parmi les CD34⁺ totaux selon les groupes de diagnostic

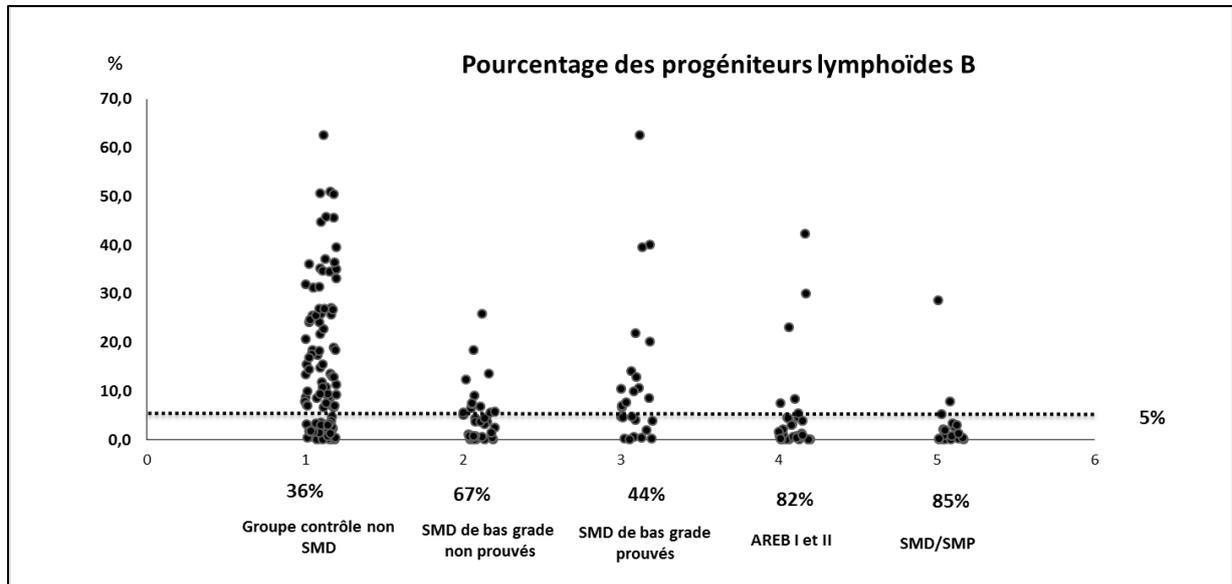


Figure 30 : Distribution des progéniteurs lymphoïdes B parmi les CD34⁺ totaux.

Pour un seuil $\leq 5\%$, la spécificité du pourcentage des progéniteurs lymphoïdes est mauvaise (64%). La sensibilité est médiocre pour les SMD de bas grade (67% pour les SMD non-prouvés, 44% pour les SMD prouvés). Elle en revanche correcte pour les AREB (82%) et les SMD/SMP (85%).

On observe de plus que le pourcentage de patients inférieurs au seuil pour ce paramètre est plus élevé dans les groupes SMD (tous types confondus) que dans le groupe contrôle. Ce pourcentage est plus important dans le groupe des SMD de haut grade que dans les groupes de SMD de bas grade (prouvés ou non), respectivement 82% et 56%.

5.2.1.1.3 Rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes selon les groupes de diagnostic

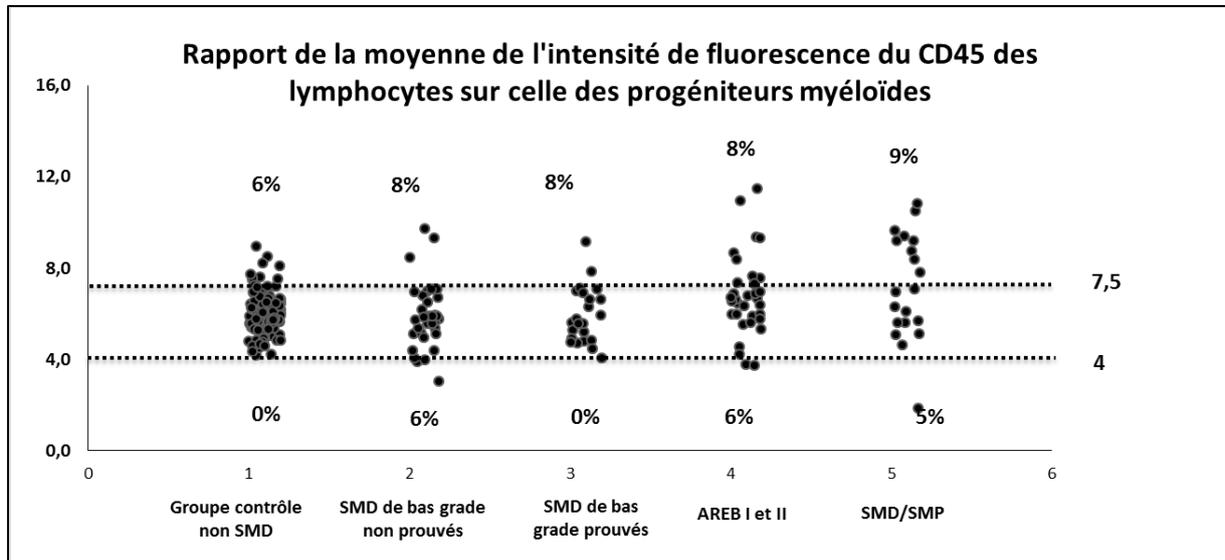


Figure 31 : Rapport de moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes celle des progéniteurs myéloïdes.

Pour un seuil ≤ 4 et $\geq 7,5$, la spécificité du rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes est de 94%. La sensibilité est en revanche mauvaise pour tous les groupes de SMD (8% à 14%).

5.2.1.1.4 Rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes selon les groupes de diagnostic

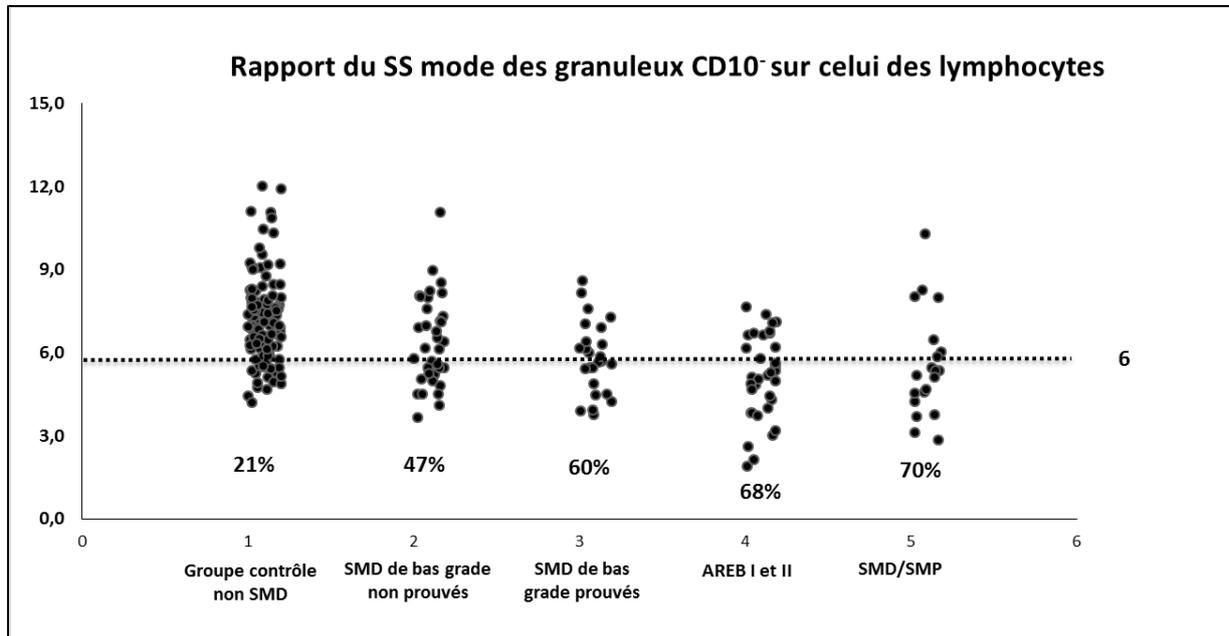


Figure 32 : Rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes.

Pour un seuil $\leq 6\%$, la spécificité du rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes est correcte : 79%. La sensibilité est médiocre et comparable pour les différents groupes de SMD : 47% à 70%.

5.2.1.1.5 Synthèse

- Dans les SMD, on observe une augmentation des progéniteurs myéloïdes CD34⁺, une baisse des progéniteurs lymphoïdes B, un rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes augmenté ou diminué et une diminution du rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes.
- Dans l'ensemble, aucun des paramètres étudiés ne montre une sensibilité et une spécificité suffisantes s'il est analysé isolément.

- Les spécificités de l'augmentation des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ et de l'expression du rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes sont très bonnes.
- La sensibilité de la diminution des progéniteurs lymphoïdes B est correcte.
- Les sensibilités de l'augmentation des progéniteurs myéloïdes et de la diminution des progéniteurs lymphoïdes sont augmentées dans les SMD de haut grade par rapport aux SMD de bas grade (prouvés ou non).

5.2.1.2 Sensibilité et spécificité du Score d'Ogata dans la cohorte totale

Le score d'Ogata est considéré positif pour une valeur supérieure ou égale à 2.

Sa sensibilité correspond à un résultat positif lorsqu'il existe un SMD, sa spécificité correspond à un résultat négatif lorsqu'il n'y a pas de SMD.

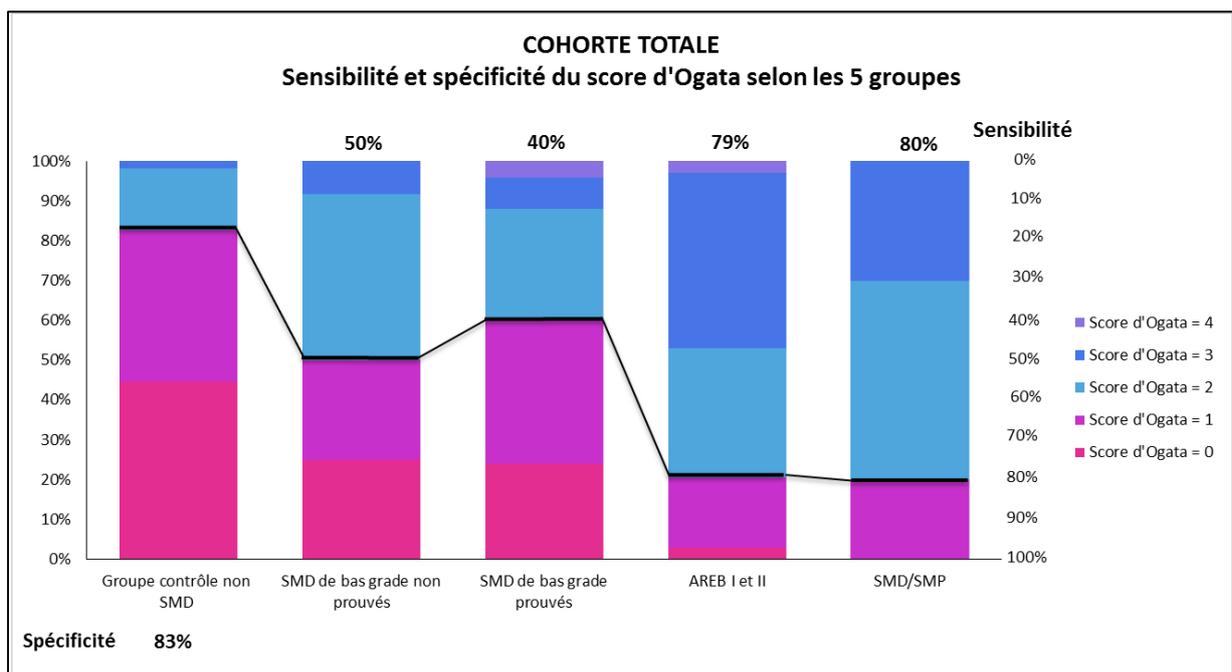


Figure 33 : Sensibilité et spécificité du score d'Ogata selon les cinq groupes dans la cohorte totale.

Dans la cohorte totale (n=225), la spécificité du score d'Ogata est égale à 83%.

La sensibilité globale est retrouvée à 61%. Pour chaque groupe étudié individuellement, elle augmente avec le grade de la maladie : 46% pour les SMD de bas grade (prouvés ou non), 79%

pour les AREB et 80% pour les SMD/SMP. On note également une sensibilité proche pour les groupes des SMD de bas grade (prouvés et non-prouvés).

La valeur prédictive positive (VPP) est de 77% et la valeur prédictive négative (VPN) de 70%.

5.2.2 Cohorte n°1 et score d'Ogata étendu

L'évaluation du score d'Ogata étendu est réalisée grâce à un panel de sept anticorps. Cette analyse est effectuée sur la cohorte n°1 comprenant 140 patients parmi les 225 de la cohorte totale.

Ce score correspond au score d'Ogata auquel sont ajoutés 3 paramètres :

- le pourcentage de progéniteurs myéloïdes CD34⁺ CD5⁺,
- le pourcentage de progéniteurs myéloïdes CD34⁺ CD7⁺,
- le pourcentage de monocytes CD56⁺.

Un point supplémentaire au score d'Ogata est attribué pour chaque nouveau marqueur ayant une expression anormale ($\geq 30\%$).

5.2.2.1 Distribution des trois nouveaux marqueurs selon les cinq groupes

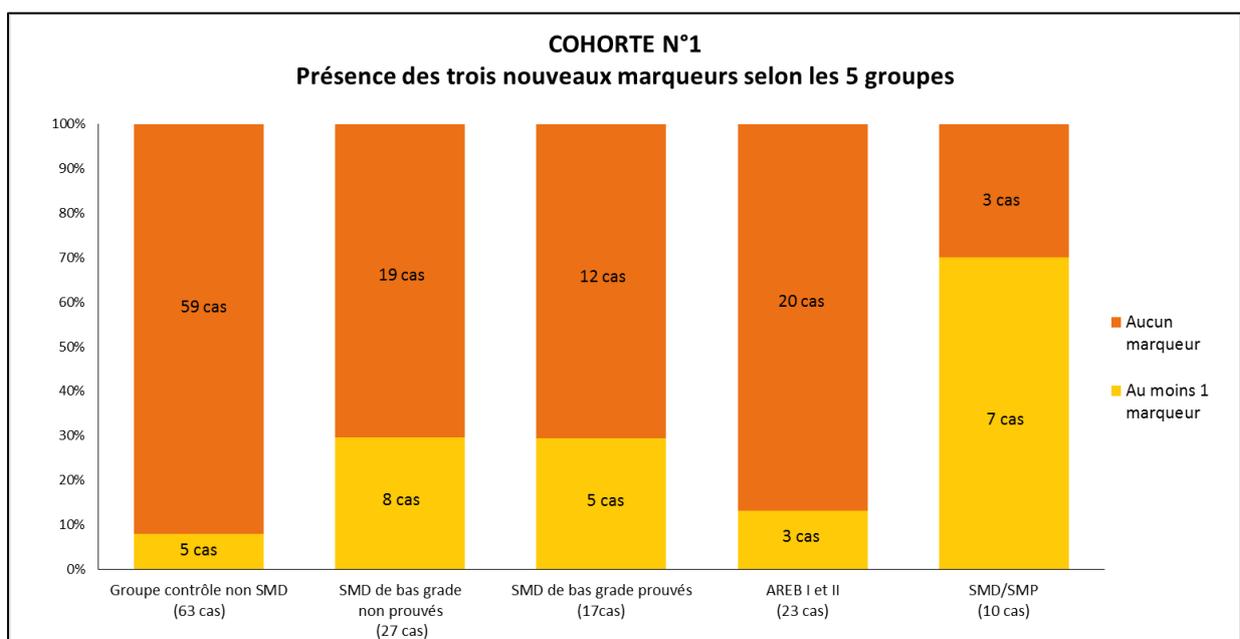


Figure 34 : Présence des trois marqueurs selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.

L'expression d'au moins un des trois nouveaux marqueurs est présente chez seulement 8% des patients du groupe contrôle. Elle est présente dans 30% des cas de SMD de bas grade prouvés et non-prouvés, 13% des cas d'AREB et dans 70% des cas de SMD/SMP.

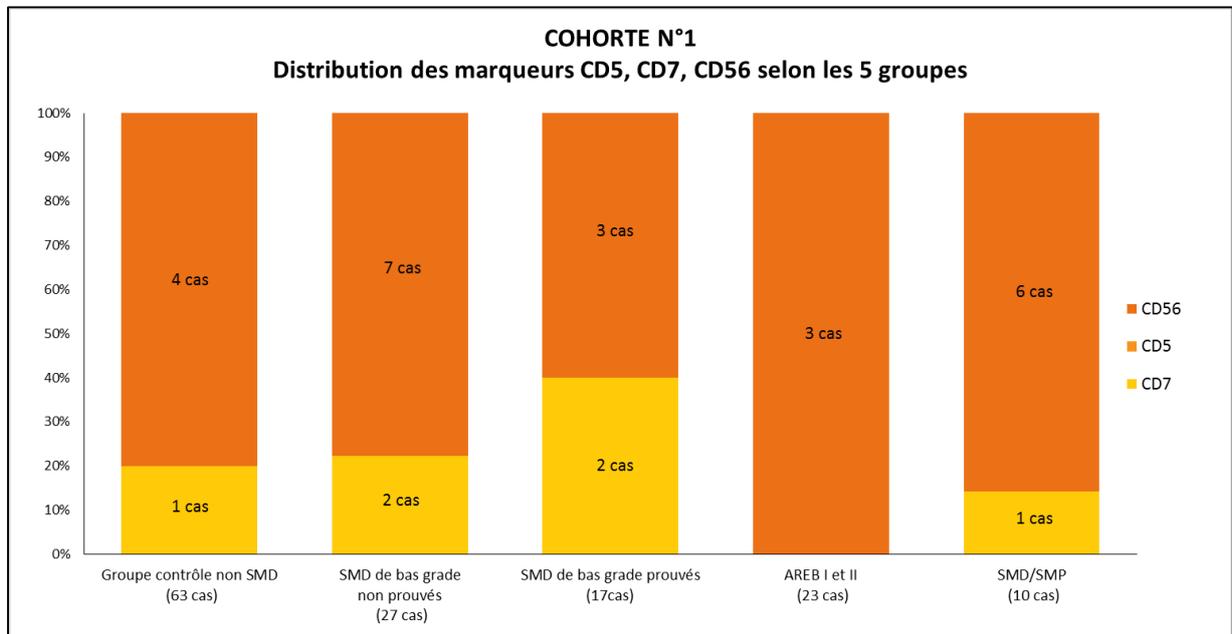


Figure 35 : Distribution des marqueurs CD5, CD7 et CD56 selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.

Parmi les trois nouveaux marqueurs, on remarque que le CD56 est majoritairement retrouvé. Il est présent dans 25% des cas (19/77) de SMD (tous types confondus) et principalement dans le groupe SMD/SMP. L'expression du marqueur CD7 est présente dans 6% des cas (5/77) de SMD (tous types confondus). A l'inverse, le marqueur CD5 n'est pas retrouvé dans cette cohorte n°1.

5.2.2.2 Spécificité et sensibilité du score d'Ogata étendu

Le score d'Ogata étendu est considéré positif pour une valeur supérieure ou égale à 2.

Sa sensibilité correspond à un résultat positif lorsqu'il existe un SMD, sa spécificité correspond à un résultat négatif lorsqu'il n'existe pas de SMD.

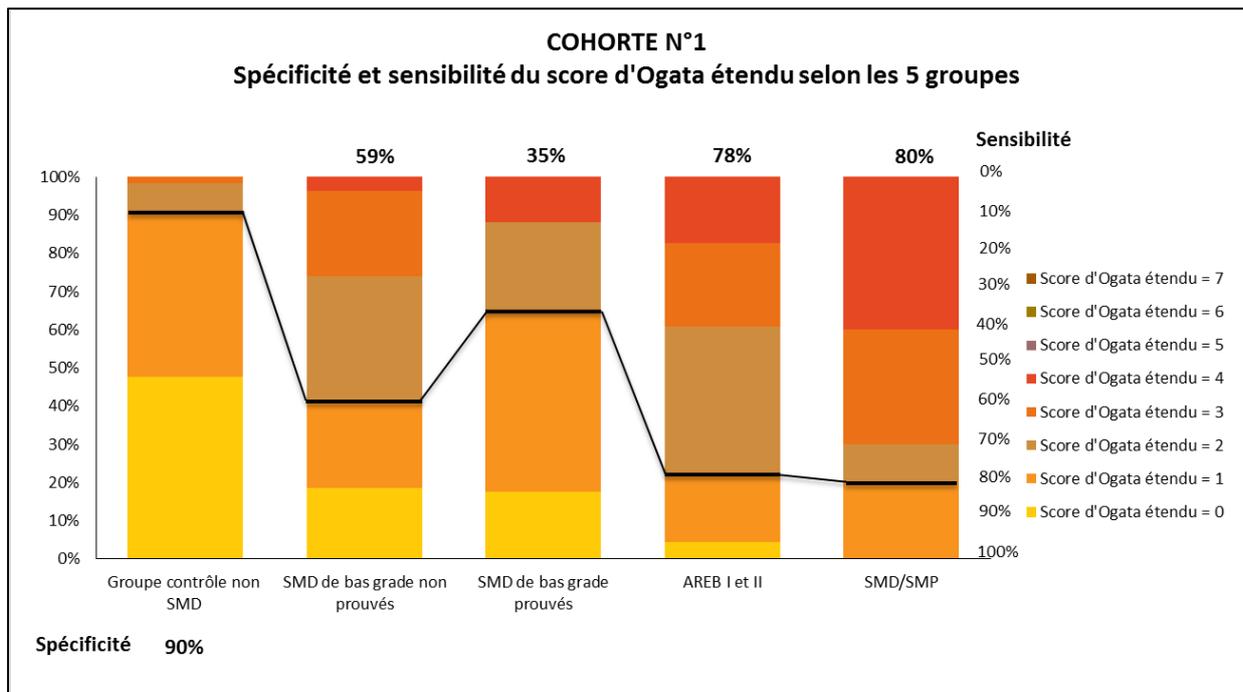


Figure 36 : Spécificité et sensibilité du score d'Ogata étendu selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.

Dans notre cohorte n°1, la spécificité du score d'Ogata étendu est très bonne à 90%.

La sensibilité est retrouvée à 62% (tous types de SMD). Elle est meilleure dans les groupes des SMD de haut grade (78%) et les SMD/SMP (80%) que dans les groupes des SMD de bas grade (prouvés ou non) (35% et 59% respectivement).

La VPP et la VPN du score d'Ogata étendu sont respectivement de 89% et 66%.

5.2.2.3 Comparaison du score d'Ogata étendu par rapport au score d'Ogata dans la cohorte n°1

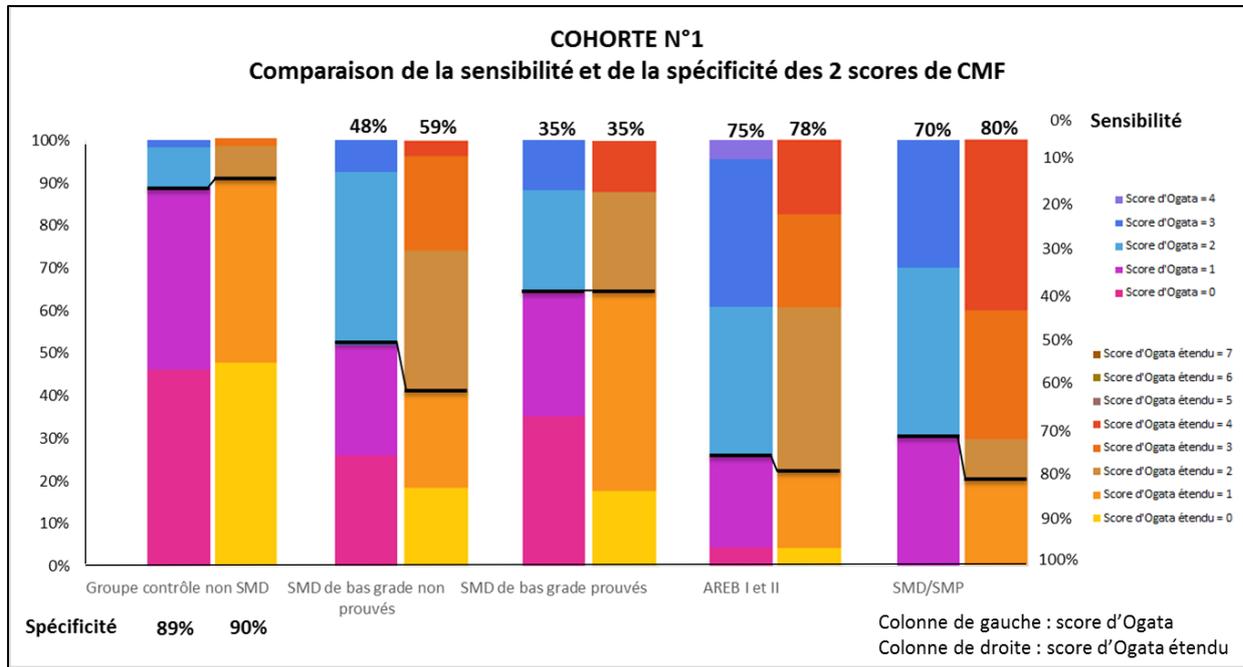


Figure 37 : Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des scores d'Ogata et d'Ogata étendu selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.

La spécificité des deux scores est comparable : 90% pour le score d'Ogata étendu et 89% pour le score d'Ogata. L'ajout des nouveaux marqueurs : le CD7 et notamment le CD56, améliore légèrement la sensibilité du test dans le diagnostic de SMD et de façon plus nette dans les SMD/SMP (70% vs 80% pour le score d'Ogata étendu). En effet, la sensibilité globale du score d'Ogata est de 62% vs 56% pour le score d'Ogata étendu dans la cohorte n°1.

5.3 Cytologie : cohorte n°2

5.3.1 Sensibilité et spécificité du score cytologique

Nous avons lu chacune des lames de moelle osseuse des patients de la cohorte n°2 ($n_2=96$), attribuant pour chacun le score cytologique de lecture.

C'est le diagnostic final établi grâce à l'étude complète du dossier de chaque patient qui a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité pour chacune des valeurs de ce score cytologique (0 à 6). Cela nous a alors permis de statuer sur le seuil cytologique à adopter pour le diagnostic de SMD.

Tableau 22 : Sensibilité et spécificité du score cytologique.

Score cytologique	Sensibilité %	Spécificité %	Correctement classé %
≥0	100%	0%	64%
≥1	98%	37%	76%
≥2	90%	54%	77%
≥3	72%	74%	73%
≥4	44%	89%	60%
≥5	21%	91%	47%
6	7%	91%	38%

Le seuil du score cytologique est fixé à 3 car c'est celui où les valeurs de sensibilité et de spécificité sont les plus satisfaisantes (72% et 74%, respectivement).

Nous avons alors pu diviser les résultats en trois groupes cytologiques :

- le premier groupe correspond à un score cytologique de 0 à 2, représentant une faible dysplasie des lignées myéloïdes,
- le deuxième groupe correspond à un score cytologique égal à 3, pour une dysplasie modérée des lignées myéloïdes,
- le troisième groupe correspond à un score cytologique de 4 à 6, représentant une forte dysplasie des lignées myéloïdes.

5.3.2 Distribution du score cytologique selon les cinq groupes

L'analyse des résultats cytologiques est basée sur les trois catégories de score préalablement définies.

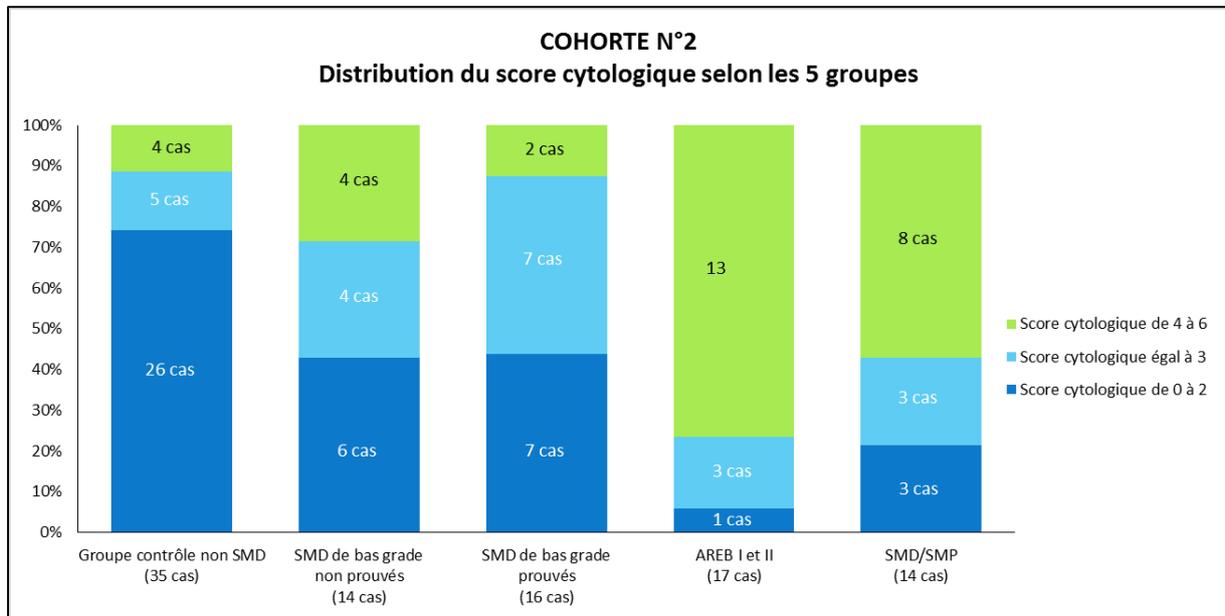


Figure 38 : Distribution du score cytologique selon les cinq groupes dans la cohorte n°2.

Une faible dysplasie (score = 0-2) est retrouvée dans la majorité des cas du groupe contrôle (74%), contrairement au groupe SMD de haut grade (6%). A l'inverse, une forte dysplasie (score = 4-6) est retrouvée dans la majorité des cas de SMD de haut grade (76%), contrairement au groupe contrôle (11%).

Une dysplasie modérée (score = 3) est principalement présente dans le groupe des SMD de bas grade prouvés.

5.4 Relation entre le score d'Ogata et le score cytologique dans la cohorte n°2

5.4.1 Cohorte n°2 tous groupes confondus :

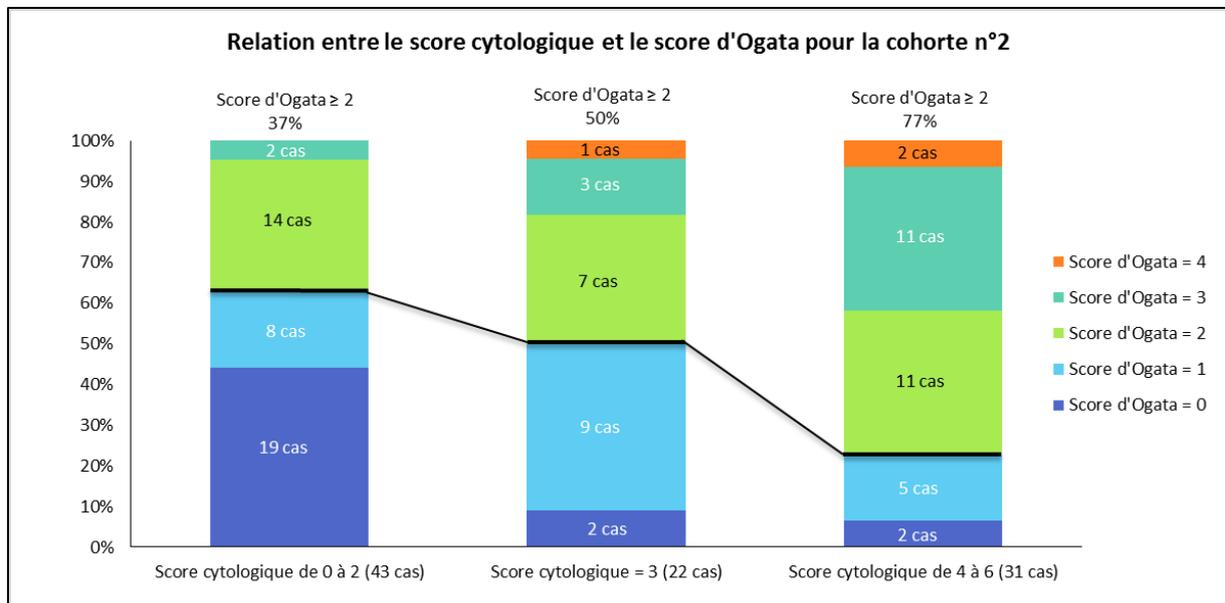


Figure 39 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans la cohorte n°2.

Pour l'ensemble de la cohorte n°2, le pourcentage de patients avec un score d'Ogata positif (≥ 2) est d'autant plus élevé que la dysplasie évaluée en cytologie est forte. En effet, 77% des patients ont un score d'Ogata positif pour un score cytologique de 4 à 6, à l'inverse 37% des patients seulement ont un score d'Ogata positif pour un score cytologique de 0 à 2.

5.4.2 Groupe contrôle non SMD

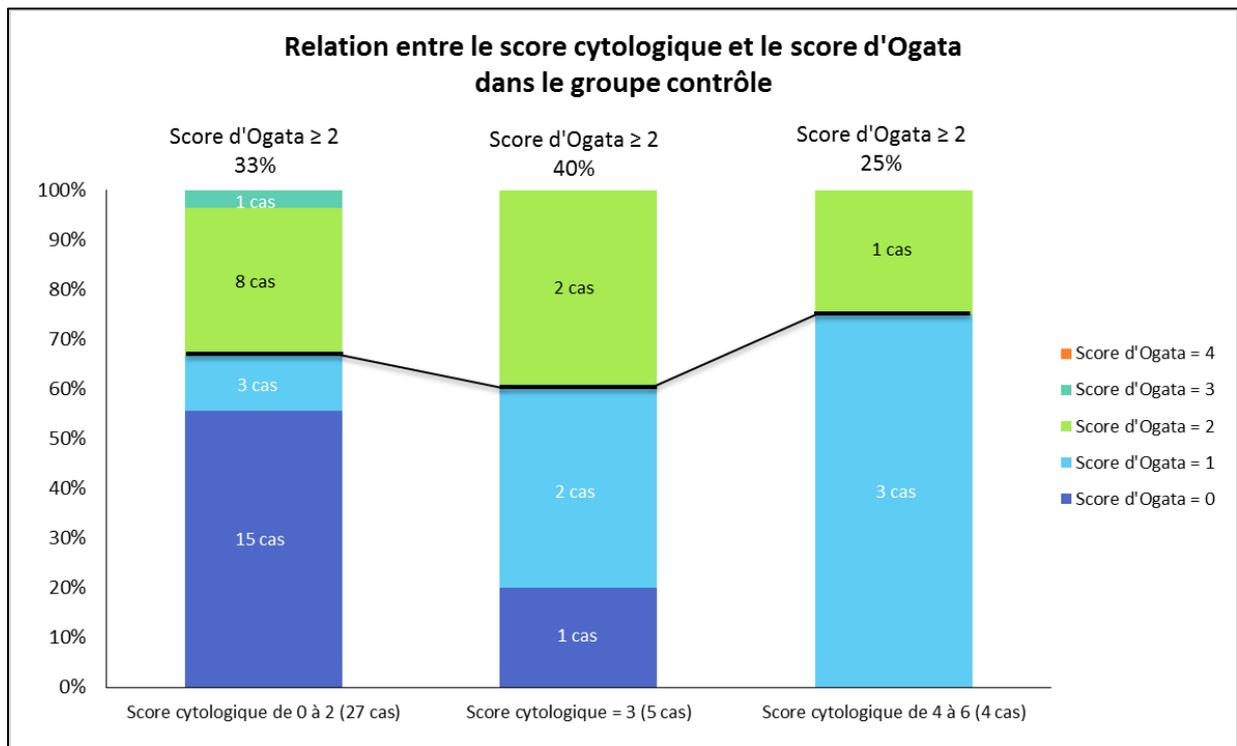


Figure 40 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe contrôle.

Dans le groupe contrôle, nous constatons que le nombre de cas avec une faible dysplasie (score cytologique = 0-2) est plus important que celui avec une forte dysplasie (score = 4-6) : 27 cas vs 4 cas.

Lorsque la dysplasie est forte, l'unique cas ayant un score d'Ogata positif correspond à une anémie par carence en vitamine B12 et/ou folates, les trois autres cas avec un score cytologique élevé mais avec un score d'Ogata négatif sont deux carences en vitamine B12 et/ou folates et une cytopénie transitoire.

5.4.3 Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans les groupes des SMD

5.4.3.1 Ensemble des groupes des SMD

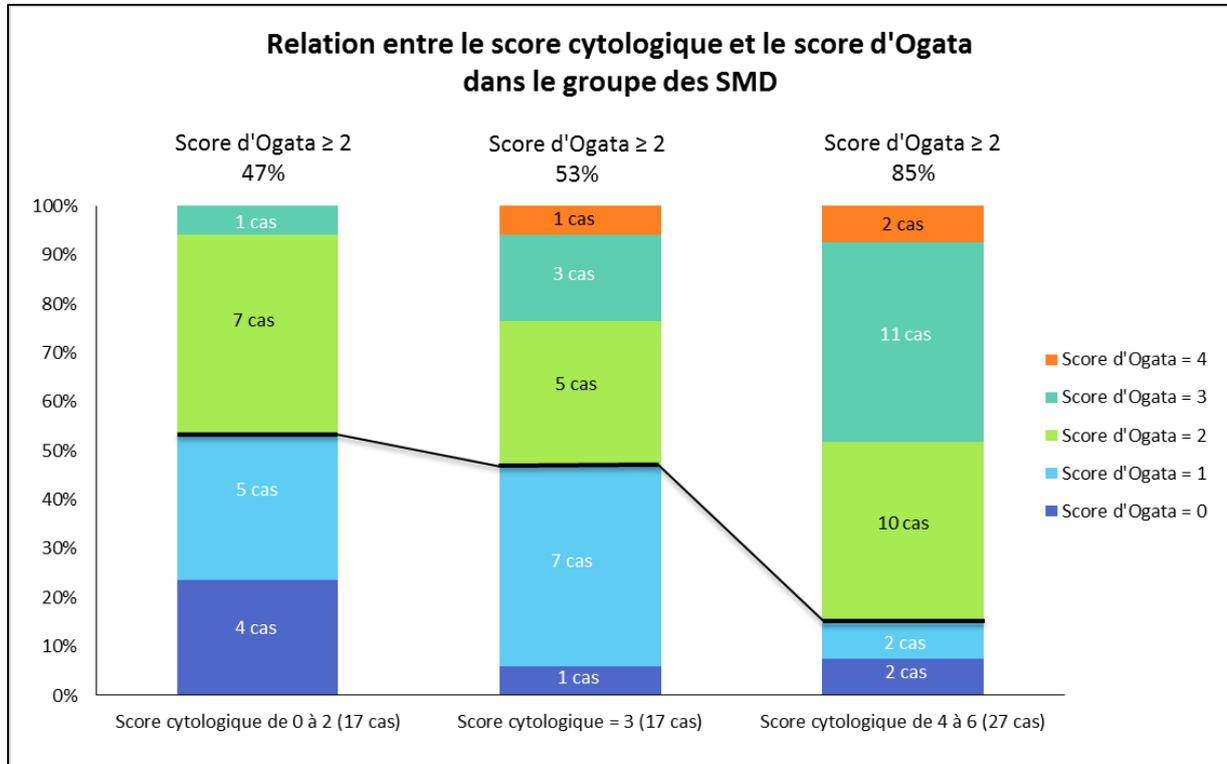


Figure 41 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD.

Pour l'ensemble des SMD, nous constatons tout d'abord que le score d'Ogata est positif dans 85% des cas où la dysplasie est forte (score cytologique = 4-6).

De plus, le score d'Ogata est positif chez 47% des patients présentant une faible dysplasie (score = 0-2). Ces cas identifiés en CMF mais pas en cytologie correspondent à : 4 AR, 1 ARS, 1 AREB II et 2 LMMC.

5.4.3.2 Groupe des SMD de bas grade

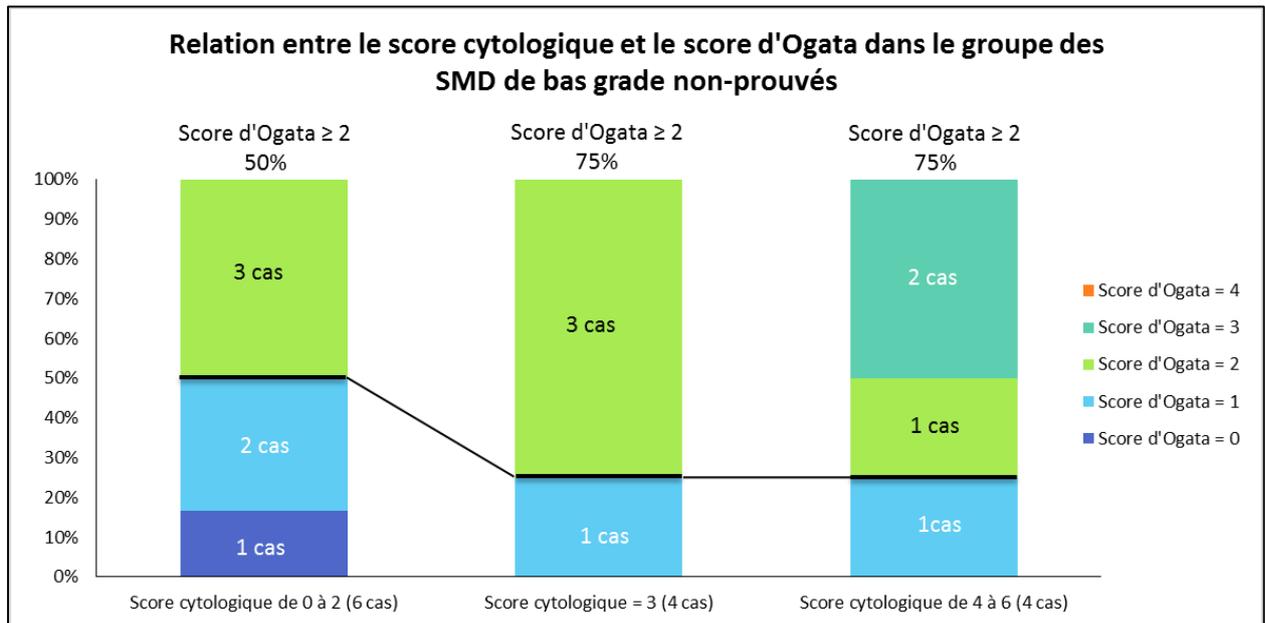


Figure 42 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de bas grade non-prouvés.

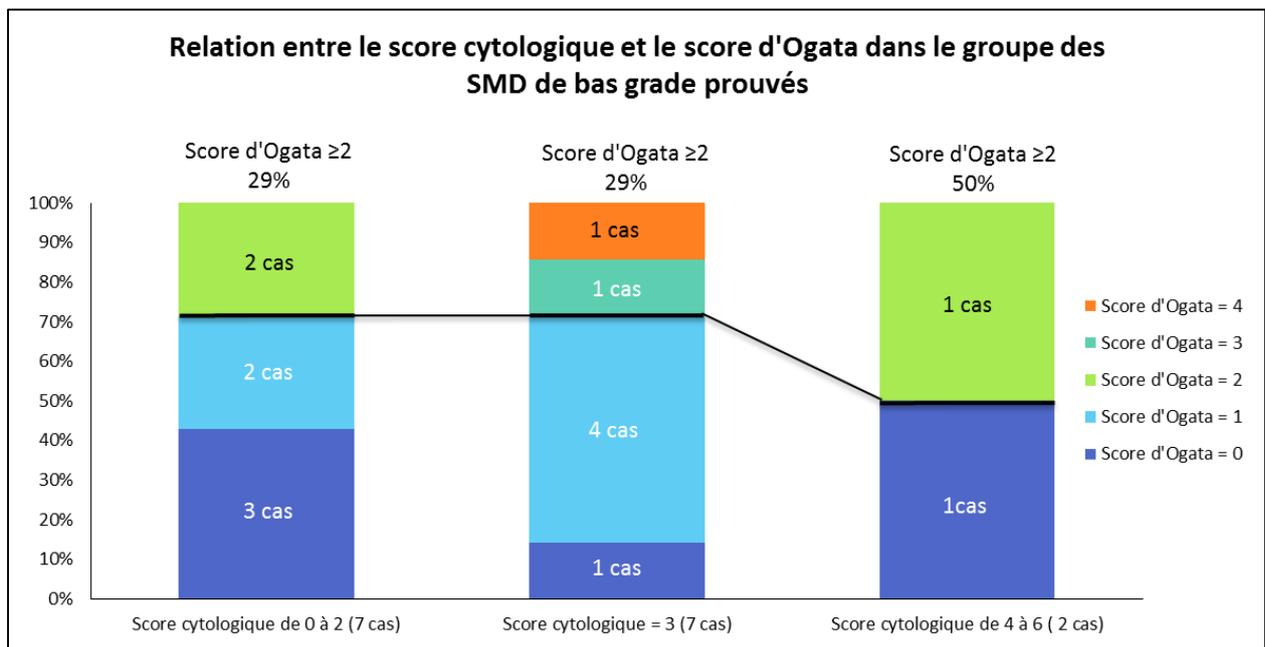


Figure 43 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de bas grade prouvés.

Dans le groupe SMD de bas grade non-prouvés (13 patients), 50% des cas (3/6) présentant une faible dysplasie (score cytologique = 0-2) ont un score d'Ogata positif, de même que 75% des cas (3/4) présentant une dysplasie modérée (score = 3) (figure 42).

De la même manière, 29% des cas (2/7) de SMD de bas grade prouvés présentant une faible dysplasie et 29% des cas (2/7) de ceux présentant une dysplasie modérée ont un score d'Ogata positif (figure 43).

5.4.3.3 Groupe des SMD de haut grade

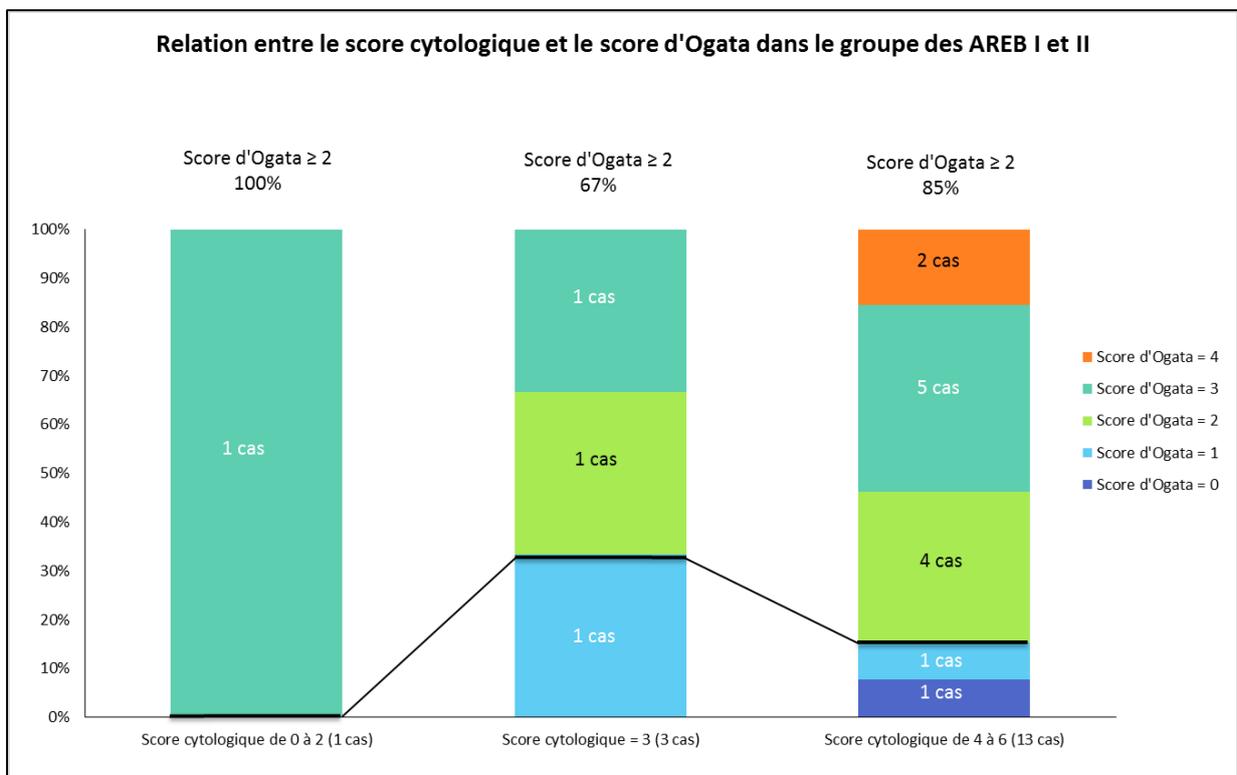


Figure 44 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de haut grade.

Dans le groupe des SMD de haut grade (AREB I et II), 82% des patients (14/17) ont un score d'Ogata positif et 76% (13/17) présentent une forte dysplasie.

5.4.3.4 Groupe des SMD/SMP

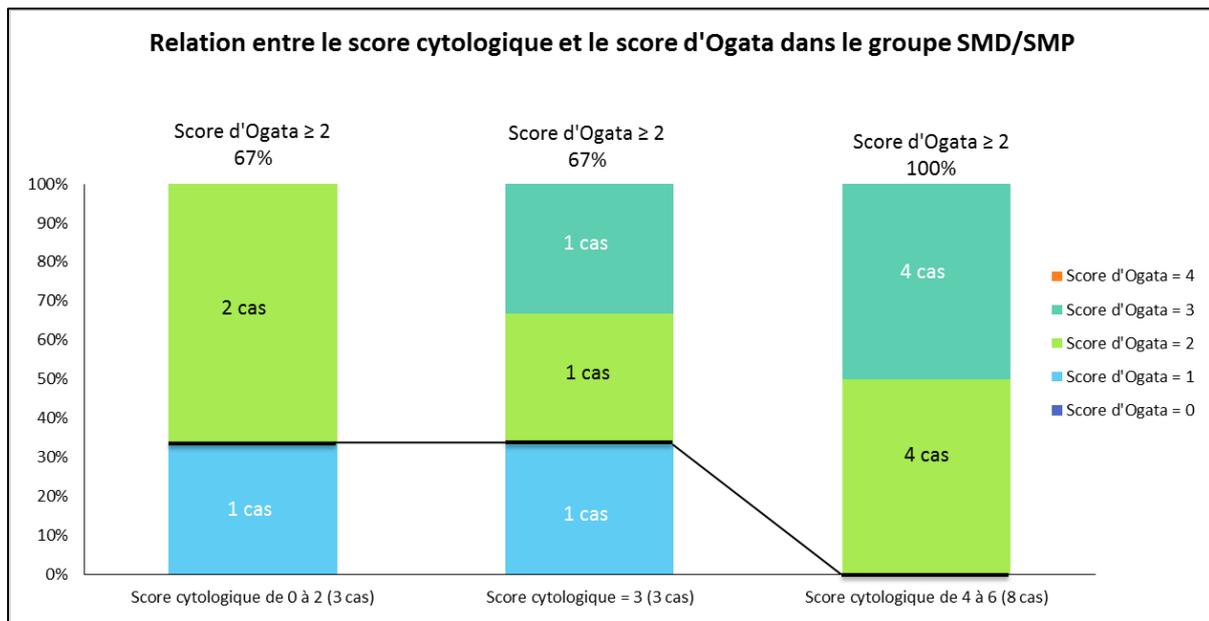


Figure 45 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD/SMP.

Dans ce groupe SMD/SMP, 67% des cas (2/3) présentant une dysplasie faible ou modérée ont un score d'Ogata positif. Tous les patients présentant une forte dysplasie ont un score d'Ogata positif (4 cas/4).

Enfin, 57% des cas (8/14) de SMD/SMP présentent une forte dysplasie.

5.4.3.5 Relation entre la cytologie et le score d'Ogata : analyse statistique

Pour étudier la relation entre la cytologie et la CMF, deux tests statistiques ont été réalisés.

Le premier test appliqué permet de chiffrer l'accord entre deux ou plusieurs observateurs lorsque les jugements sont qualitatifs : test non paramétrique de Cohen.

Dans notre étude, le coefficient Kappa de Cohen calculé est égal 0,204 (score cytologique vs score d'Ogata). Selon le classement de Landis et Koch, l'accord entre ces deux scores est mauvais.

Le deuxième test permet d'évaluer l'indépendance entre deux méthodes : test du Chi² d'indépendance. Pour un score cytologique avec un seuil de positivité fixé à 3 et un score d'Ogata avec un seuil à 2, on rejette l'hypothèse d'indépendance pour un risque $\alpha = 5\%$. La cytologie et la CMF sont donc significativement liées ($p < 0,05$).

Il existe une relation entre la cytologie et la CMF, mais cette association est faible.

6 DISCUSSION

Nous rapportons dans la première partie de ce travail les résultats d'une étude observationnelle afin d'évaluer l'intérêt de la CMF dans le diagnostic des SMD, ainsi que sa contribution à l'analyse cytologique de la moelle osseuse. Cette étude s'est appuyée sur le score d'Ogata initialement décrit en 2009 (61) puis validé par l'ELN en 2012 (57).

Dans ce travail, nous avons utilisé pour l'étude de la CMF le score d'Ogata car il est simple (quatre anticorps), informatif et facilement interprétable par les cliniciens.

Le premier marqueur étudié est le taux de progéniteurs myéloïdes CD34⁺ parmi les cellules nucléées totales de la moelle osseuse. Cette population a déjà été décrite comme étant un compartiment très perturbé dans les SMD (57). Ainsi, les différentes populations liées à ce compartiment sont des paramètres intéressants à étudier. De plus, le diagnostic de certains SMD (AREB I et II) repose sur le taux de blastes médullaires (2).

De nombreuses anomalies ont précédemment été décrites au niveau des cellules CD34⁺ (asynchronisme de maturation, expression aberrante de marqueurs lymphoïdes, etc) et c'est dans ce compartiment qu'interviennent la plupart des transformations clonales (57). Nous retrouvons dans notre étude des taux de progéniteurs myéloïdes CD34⁺ plus augmentés dans les groupes de SMD (11%, 16% et 10% pour les SMD de bas grade non-prouvés, prouvés et les SMD/SMP respectivement) que dans le groupe contrôle (5%). Nos résultats montrent que 48% des patients souffrant d'une AREB (I ou II) présentent un taux de progéniteurs myéloïdes supérieur ou égal au seuil de 2%.

Il est de plus à noter que seul le compartiment des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ est impacté par l'hémodilution du sang périphérique (61).

Le second marqueur étudié concerne la diminution de la proportion des progéniteurs lymphoïdes CD19⁺ CD34⁺ parmi les cellules CD34⁺ (taux inférieur ou égal au seuil de 5%) dans la moelle osseuse. L'intérêt d'exprimer ce marqueur parmi la population des progéniteurs myéloïdes CD34⁺ est de s'affranchir de l'hémodilution relative du prélèvement comme recommandé par Ogata (72).

Si la spécificité du marqueur des progéniteurs lymphoïdes B est très mauvaise (36%), la sensibilité retrouvée est très bonne dans les SMD de haut grade et les SMD/SMP (82% et 85% respectivement). Amin *et al.* ont montré en 2003 que l'apoptose des progéniteurs lymphoïdes B était augmentée dans les SMD, ce qui n'est pas retrouvé dans les LAM ni chez les patients sains. Cela suggère que cet aspect de la physiopathologie de la maladie pourrait constituer une anomalie spécifique des SMD (76).

L'étude de Sternberg *et al.* en 2005 (60) a quant à elle démontré que ces progéniteurs lymphoïdes B étaient absents dans 90% des AR, et que leur apoptose augmentait significativement dans les ARS et les AREB. Enfin, cette population est diminuée jusqu'à 25 fois dans les SMD en phase débutante de la maladie, ce qui pourrait constituer un marqueur précoce de diagnostic des SMD.

Ces deux premiers paramètres font partie du rationnel de choix des marqueurs étudiés en CMF. En effet, ce sont deux composants majeurs de la moelle osseuse qui varient de façon opposés chez les patients souffrant d'un SMD, et l'étude séparée de ces deux paramètres plutôt que l'analyse globale du compartiment des cellules CD34⁺ est plus précise et plus sensible (61).

Le troisième paramètre de notre étude est le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes CD34⁺. Ce marqueur améliore la reproductibilité du test en ajustant les données des progéniteurs myéloïdes sur la population lymphocytaire mature d'un même échantillon. Si certaines études montraient une diminution pure de ce rapport dans les SMD (67,77), Ogata *et al.* ont montré en 2009 que ce rapport pouvait diminuer ou augmenter dans les SMD (61). Les seuils proposés ont ensuite été affinés par l'étude multicentrique de l'ELN en 2012 (57). Dans notre étude, c'est la spécificité de ce marqueur qui est intéressante pour le diagnostic de SMD (94%), la sensibilité étant très mauvaise.

Enfin, le quatrième et dernier paramètre est le rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes. Le seuil limite est fixé à inférieur ou égal 6. Différentes études ont précédemment montré que la moyenne du SS sur les cellules de la lignée granuleuse diminuait significativement dans les SMD du fait de l'hypogranularité fréquemment rencontrée de

l'ensemble des éléments de la lignée (54,69). Ogata estime cependant que l'analyse du mode du SS est plus informative que celle de la moyenne pour discriminer les patients souffrant de SMD par rapport aux patients sains (61).

Nous avons de plus ciblé les granuleux CD10⁻ pour s'affranchir de l'hémodilution par le sang périphérique, les PNN circulants étant CD10⁺. Enfin, nous avons rapporté le SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes matures pour améliorer la reproductibilité du test (57,78). Nos résultats montrent une spécificité correcte (79%) et une sensibilité moyenne comparable pour les différents groupes de SMD (de 46% à 70%).

Si les deux premiers paramètres du score montrent les plus grandes variations lors des SMD, ces deux derniers paramètres affinent les résultats en augmentant la reproductibilité du test et en diminuant les variations inter-laboratoires ou inter-observateurs dans les différents centres (57).

Les trois derniers paramètres ne sont pas affectés par l'hémodilution contrairement aux progéniteurs myéloïdes CD34⁺ (61).

La distribution des quatre paramètres du score d'Ogata selon les cinq groupes dans notre cohorte totale de 225 patients (110 contrôles et 115 SMD) montre que deux des paramètres présentent une très bonne spécificité : 95% pour les progéniteurs myéloïdes CD34⁺ et 94% pour le rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes. En revanche, la sensibilité de ces paramètres est très mauvaise pour le groupe des SMD (tous types confondus) : respectivement de 10% à 47% et de 8% à 14%.

La diminution du pourcentage de progéniteurs lymphoïdes B est très sensible (82% dans les AREB, 85% dans les SMD/SMP), mais d'une spécificité relativement médiocre à 64%.

Enfin, le rapport du SS mode des granuleux CD10⁻ sur celui des lymphocytes présente une bonne spécificité à 79% mais une sensibilité médiocre, comparable pour tous les groupes de SMD (de 47% à 70%).

Les spécificités et sensibilités que l'on retrouve pour chacun de ces quatre paramètres montrent que l'on ne peut pas exploiter leurs résultats individuellement, mais qu'il faut les associer pour disposer d'un test biologique efficace et utile au diagnostic, comme

précédemment décrit par Ogata en 2008 (79). Nos résultats sont confirmés par l'étude d'Ogata qui rappelle qu'aucun paramètre lié au compartiment CD34⁺ ne peut actuellement être utilisé seul, mais que c'est la combinaison des quatre marqueurs précédemment décrits qui est nécessaire pour le diagnostic des SMD (61).

Dans notre étude, la sensibilité globale du score d'Ogata est de 79% pour les SMD de haut grade, et de 46% dans les SMD de bas grade (prouvés ou non). Elle augmente donc avec le grade de la maladie. De plus, la grande sensibilité du score d'Ogata dans les SMD/SMP, évaluée à 80% dans notre étude peut suggérer l'intérêt de la CMF dans ces pathologies.

Enfin, la spécificité globale du score d'Ogata est retrouvée à 83% dans notre cohorte totale (n=225) et est jugée correcte, les différentes données de la littérature retrouvant des résultats similaires (57,61). Ces données sont reproduites en comparaison des résultats de notre étude (tableau 23).

Tableau 23 : Sensibilité et spécificité du score d'Ogata dans trois études.

Etude	Nombre de cas	Sensibilité	Spécificité
CHU Limoges	225	61%	83%
Ogata <i>et al.</i> (61)	89	44%	98%
	151	71%	92%
Della Porta <i>et al.</i> (57)	259	69%	92%
	538	70%	93%

Les résultats de notre deuxième partie décrivent l'apport de l'étude en CMF de trois marqueurs supplémentaires au score d'Ogata : l'expression du CD5 et du CD7 sur les progéniteurs myéloïdes et la présence du CD56 sur les monocytes. Nous retrouvons une expression de ces marqueurs plus importante dans les groupes de SMD (tous types confondus) que dans le groupe contrôle (30% et 8% respectivement).

Nous observons tout d'abord que la présence du CD56 sur les monocytes est le marqueur le plus communément retrouvé dans les SMD (25% tous types confondus). Wells *et al.* retrouvaient des résultats comparables en 2003, mettant en évidence que la présence du

CD56 à la surface des monocytes était le marqueur aberrant le plus fréquent, retrouvé dans 17% des cas de SMD (67).

En revanche, l'expression du marqueur CD5 n'est retrouvée dans aucun groupe (contrôle comme SMD), la recherche de l'expression aberrante de ce marqueur lymphoïde à la surface des progéniteurs myéloïdes n'est donc pas à recommander en routine. De précédentes études menées par Ogata *et al.* concernant ce marqueur lymphoïde montraient des résultats similaires (72).

Enfin, l'expression aberrante du CD7 à la surface des progéniteurs myéloïdes est quant à elle comparable dans les cinq groupes : SMD 6% vs 2% dans le groupe contrôle.

Parmi les groupes de SMD, l'expression d'au moins un de ces trois marqueurs supplémentaires est majoritaire dans le groupe des SMD/SMP. Ainsi, Lacronique-Gazille *et al.* ont rapporté une expression accrue du marqueur CD56 dans les LMMC (63).

La comparaison des deux scores de CMF dans la cohorte n°1 ($n_1=140$) montre que si la spécificité du score d'Ogata étendu est similaire à celle du score d'Ogata (respectivement 90% vs 89%), la sensibilité du score d'Ogata étendu est meilleure que celle du score d'Ogata (62% et 56% respectivement). Ce gain de sensibilité est notamment retrouvé dans le groupe des SMD/SMP (80% pour le score d'Ogata étendu vs 70% pour le score d'Ogata) et dans le groupe des SMD de bas grade non-prouvés (59% pour le score d'Ogata étendu vs 48% pour le score d'Ogata). Enfin, si la VPN du score d'Ogata étendu est similaire à celle du score d'Ogata (66% vs 70%) la VPP et quant à elle augmentée (89% pour le score d'Ogata étendu vs 77% pour le score d'Ogata). Ces résultats suggèrent l'intérêt de ce score étendu dans ce groupe des SMD de bas grade non-prouvés où, en l'absence de critères spécifiques de l'OMS (excès de blastes, anomalies cytogénétiques, etc) le diagnostic s'avère souvent difficile.

La dernière partie de notre étude est portée sur la comparaison des résultats de la cytologie et de la CMF sur une deuxième cohorte de 96 sujets.

Nous avons tout d'abord établi un score de lecture des frottis de moelle osseuse en cytologie basé sur la grille de lecture du GFM. Ce score nous a permis d'évaluer et de quantifier la dysplasie de chacune des trois lignées myéloïdes (faible, modérée, forte).

Ce score est coté de 0 à 6 avec un seuil de positivité arbitrairement fixé à ≥ 3 . Ce seuil a été établi grâce à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité pour chaque valeur du score. C'est avec une sensibilité de 72% et une spécificité de 74%, jugées les plus satisfaisantes, que nous avons pu établir ce seuil de positivité.

Nos résultats montrent tout d'abord que 94% des SMD de haut grade (AREB I et II) sont positifs pour ce score, dont 79% montrent une forte dysplasie (score= 4-6) contre 20% pour les SMD de bas grade et seulement 11% du groupe contrôle. De plus, 78% des patients du groupe SMD/SMP ont un score cytologique positif dont 57% montrent une forte dysplasie.

Comme détaillé dans la figure 39, l'étude de la relation entre la cytologie et la CMF pour l'ensemble de la cohorte n°2 nous montre tout d'abord que 66% des patients ayant un score cytologique positif ont un score d'Ogata positif et que seulement 37% des patients ayant un score cytologique négatif ont un score d'Ogata positif. Le pourcentage de patients avec un score d'Ogata positif est donc d'autant plus élevé que la dysplasie évaluée en cytologie est forte.

On observe également que 67% des patients du groupe contrôle ayant un score cytologique positif ont un score d'Ogata négatif. Ces patients correspondent à des carences vitaminiques (fer, vitamines B12 ou folates), et à des anémies diverses non dues à des hémopathies.

Concernant le groupe de SMD (tous types confondus), on observe que 73% des patients diagnostiqués SMD en cytologie le sont également en CMF. Cependant, dans 27% des cas le score cytologique est positif alors que le score d'Ogata est négatif.

On observe enfin que 47% des patients du groupe SMD (tous types confondus) ayant un score cytologique négatif ont un score d'Ogata positif (figure 41). Ces patients correspondent à : 4 AR, 1 ARS, 1 AREB II et 2 LMMC dont 3 SMD de bas grade non-prouvés. La CMF nous a donc permis de récupérer des diagnostics de SMD non détectés en cytologie.

Les résultats de notre étude sont comparables à ceux de de Kern *et al.* publiés en 2010 (71) et portant sur 1013 patients. Ces résultats montraient une relation forte entre la cytologie et la CMF, en effet 82% des patients diagnostiqués SMD (tous types) en cytologie l'étaient également en CMF ; et 23% des patients non diagnostiqués en cytologie étaient rattrapés par la CMF.

Le test d'indépendance du Chi² que nous avons réalisé sur cette deuxième cohorte montre une dépendance significative entre le score cytologique et le score d'Ogata pour les seuils utilisés dans notre étude ($p < 0,05$). Cependant, l'accord évalué entre ces deux méthodes par le coefficient Kappa de Cohen est mauvais selon la classification de Landis et Koch (75). Nous observons donc une certaine relation entre le degré des dysplasies cytologiques et les anomalies détectées en CMF.

Les résultats de notre étude suggèrent que la CMF présente un intérêt pour confirmer le diagnostic de SMD de bas grade, notamment lorsque la cytologie et/ou la cytogénétique ne sont pas ou peu contributives (SMD de bas grade non-prouvés). Cependant, quelques cas de SMD clairement identifiés en cytologie n'ont pas présenté d'anomalies en CMF. Ces résultats confirment que la cytologie et la CMF sont deux méthodes d'examen complémentaires et qu'il est nécessaire de les associer pour une évaluation diagnostique plus précise des patients chez qui l'on suspecte un SMD.

7 CONCLUSION

Les SMD sont des hémopathies myéloïdes clonales acquises extrêmement hétérogènes sur les plans clinique et biologique dont le diagnostic peut s'avérer délicat en l'absence des critères cytologiques et cytogénétiques définis par l'OMS. Dans de tels contextes, la CMF occupe une place de plus en plus importante dans le diagnostic biologique des SMD, permettant d'apporter de précieuses informations. Bien que cette méthode soit de plus en plus utilisée dans le diagnostic d'autres hémopathies malignes, la CMF n'est cependant toujours pas recommandée dans l'approche diagnostique systématique des SMD malgré l'existence d'un score de diagnostic récemment proposé par l'ELN.

Nous avons tout d'abord pu mettre en évidence l'intérêt de la CMF et du score d'Ogata dans le diagnostic biologique des SMD. Ce score présente ainsi une très bonne spécificité, et une sensibilité modérée dans les SMD de haut grade et les SMD/SMP. En revanche, sa sensibilité reste pauvre dans le diagnostic des SMD de bas grade non-prouvés, ce qui constitue une limite de cette technique car c'est dans ce groupe que l'apport de co-critères de diagnostic est crucial.

En évaluant l'apport de trois marqueurs supplémentaires en CMF, la deuxième partie de notre travail portant sur le score d'Ogata étendu dans le diagnostic des SMD a permis de proposer une alternative. Ce score étendu a en effet montré un gain de sensibilité dans le groupe des SMD de bas grade non-prouvés.

Enfin, l'étude de la relation entre l'analyse en CMF et la cytologie, méthode de référence, pour l'évaluation de la dysplasie médullaire a montré que ces deux méthodes permettaient d'apprécier efficacement l'intensité de la dysmyélopoïèse au cours d'un SMD. La CMF ayant permis de « rattraper » la moitié des cas de SMD de bas grade non-prouvés non détectés par la cytologie seule.

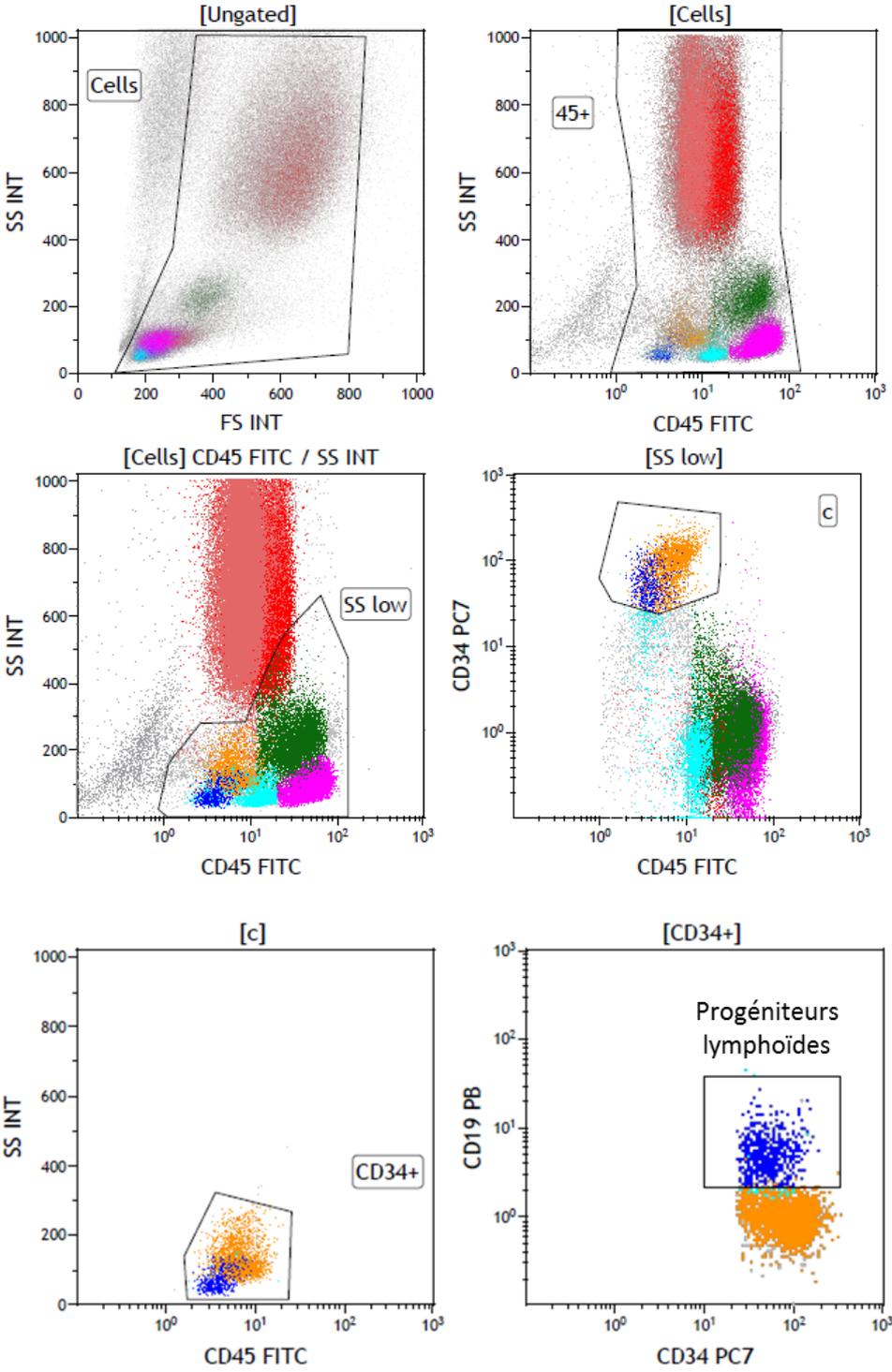
Ainsi, la CMF est une méthode spécifique et de sensibilité modeste pour le diagnostic des SMD en exploitant les paramètres du score d'Ogata. Mais elle est également capable de récupérer certaines pathologies non détectées par d'autres techniques (cytologie, cytogénétique). Le faible coût des marqueurs et la simplicité d'interprétation du résultat font que ce score d'Ogata est un test à proposer systématiquement en routine pour tout patient chez qui l'on suspecte un SMD. Cependant, bien que nos tests statistiques mettent en évidence une

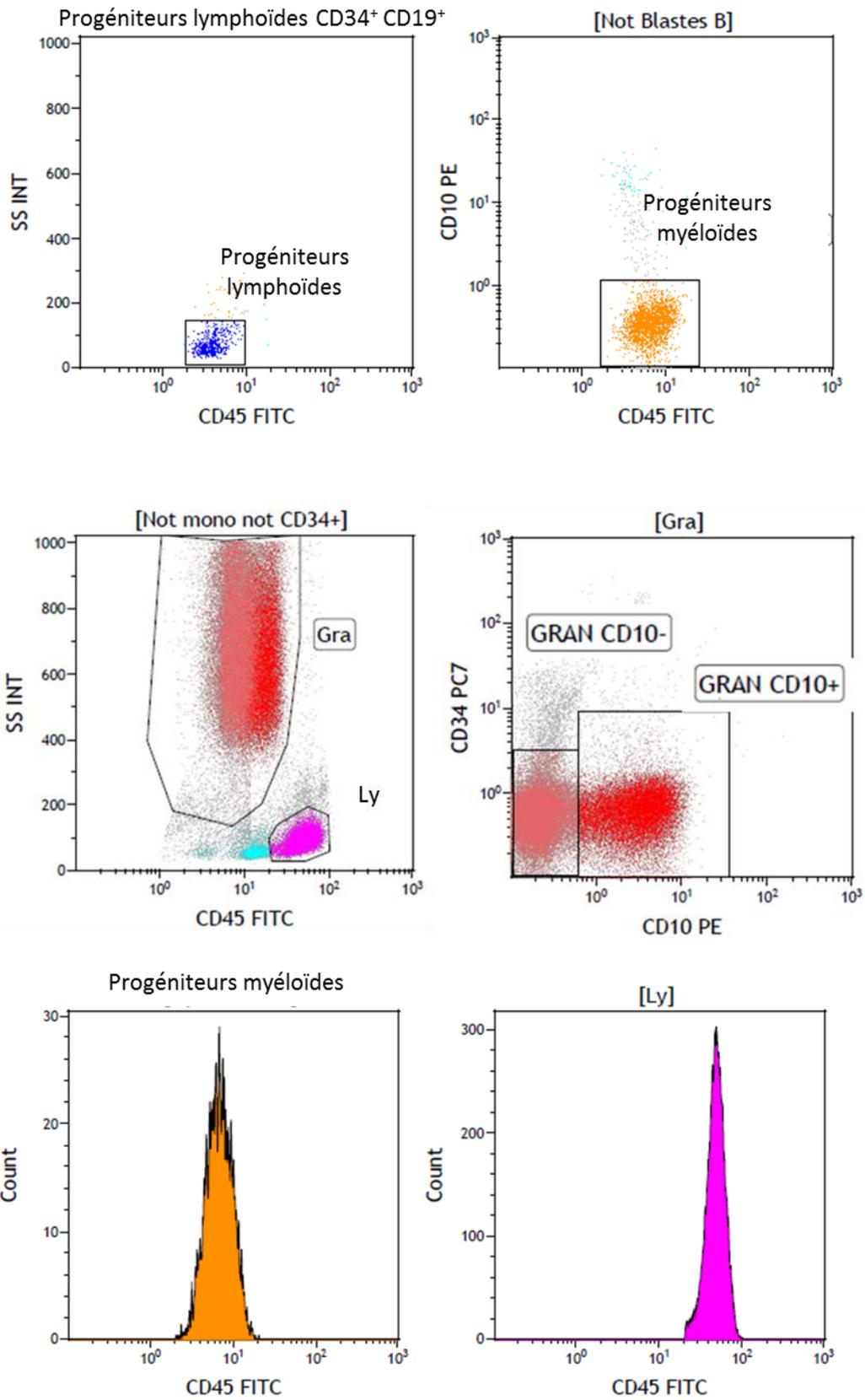
relation de dépendance entre la cytologie et la CMF, ces deux méthodes de diagnostic restent complémentaires et ne peuvent pas se substituer l'une à l'autre. Il faut donc considérer ces deux méthodes dans une approche combinée pour optimiser la stratégie diagnostique des SMD.

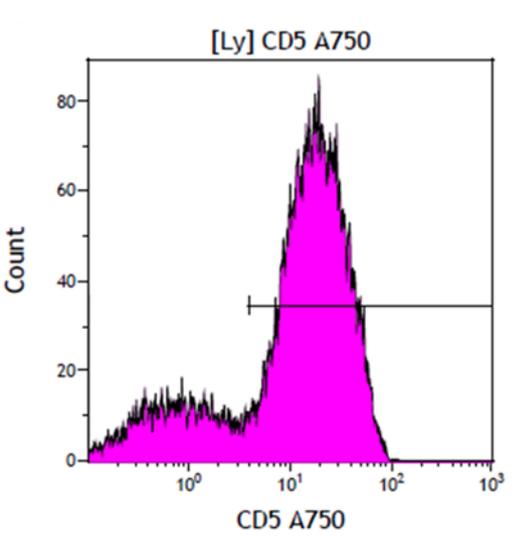
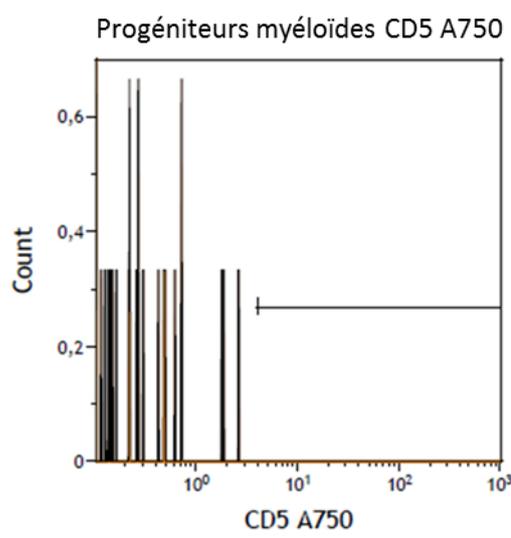
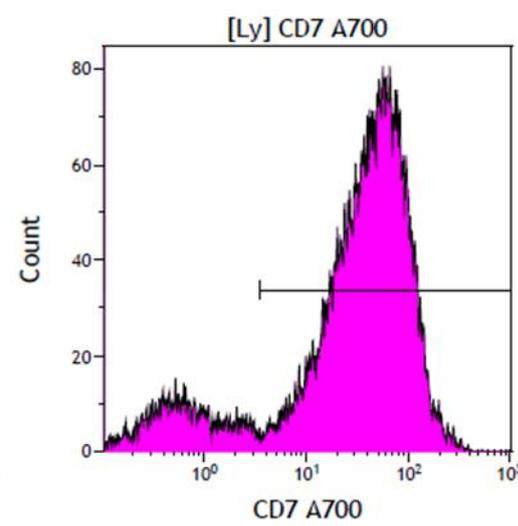
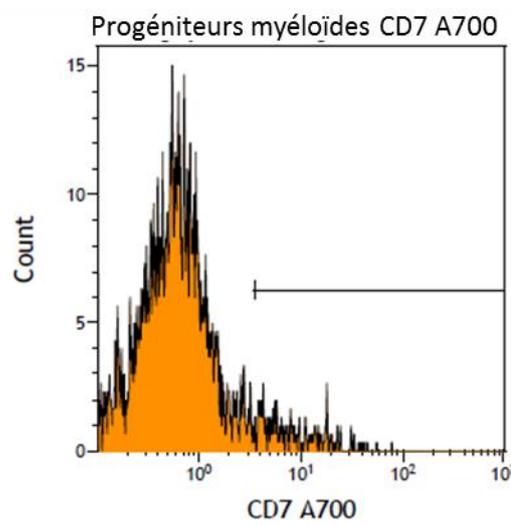
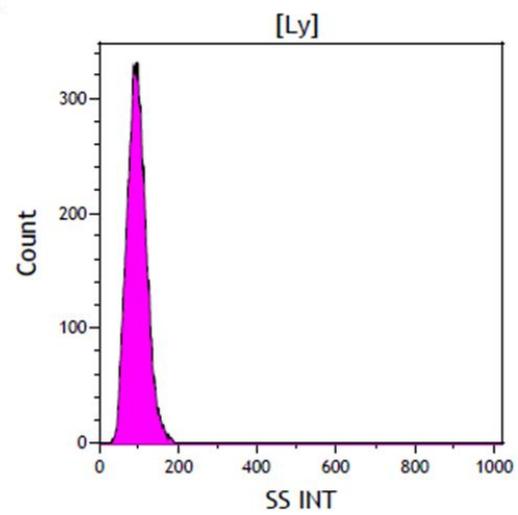
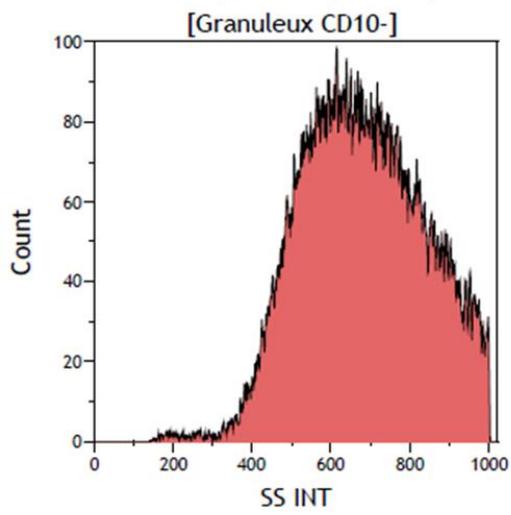
Il serait alors intéressant d'étudier de nouveaux marqueurs de CMF, notamment sur la lignée érythroïde, et de les associer aux marqueurs du score étendu, permettant ainsi d'améliorer la sensibilité de cette méthode et de proposer sa standardisation.

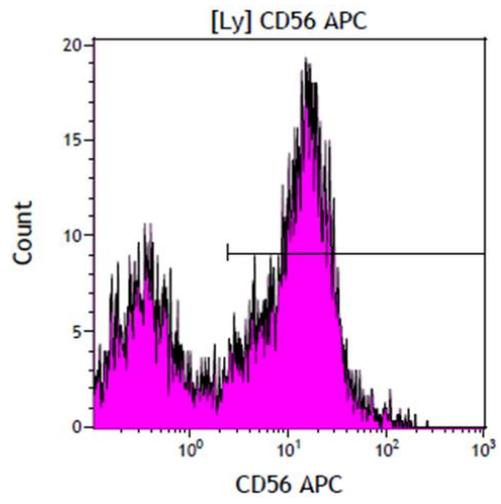
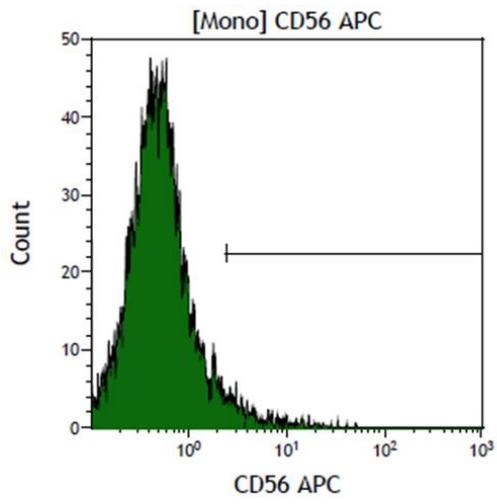
8 ANNEXES

Annexe 1 : Exemple d'un patient sain en CMF.

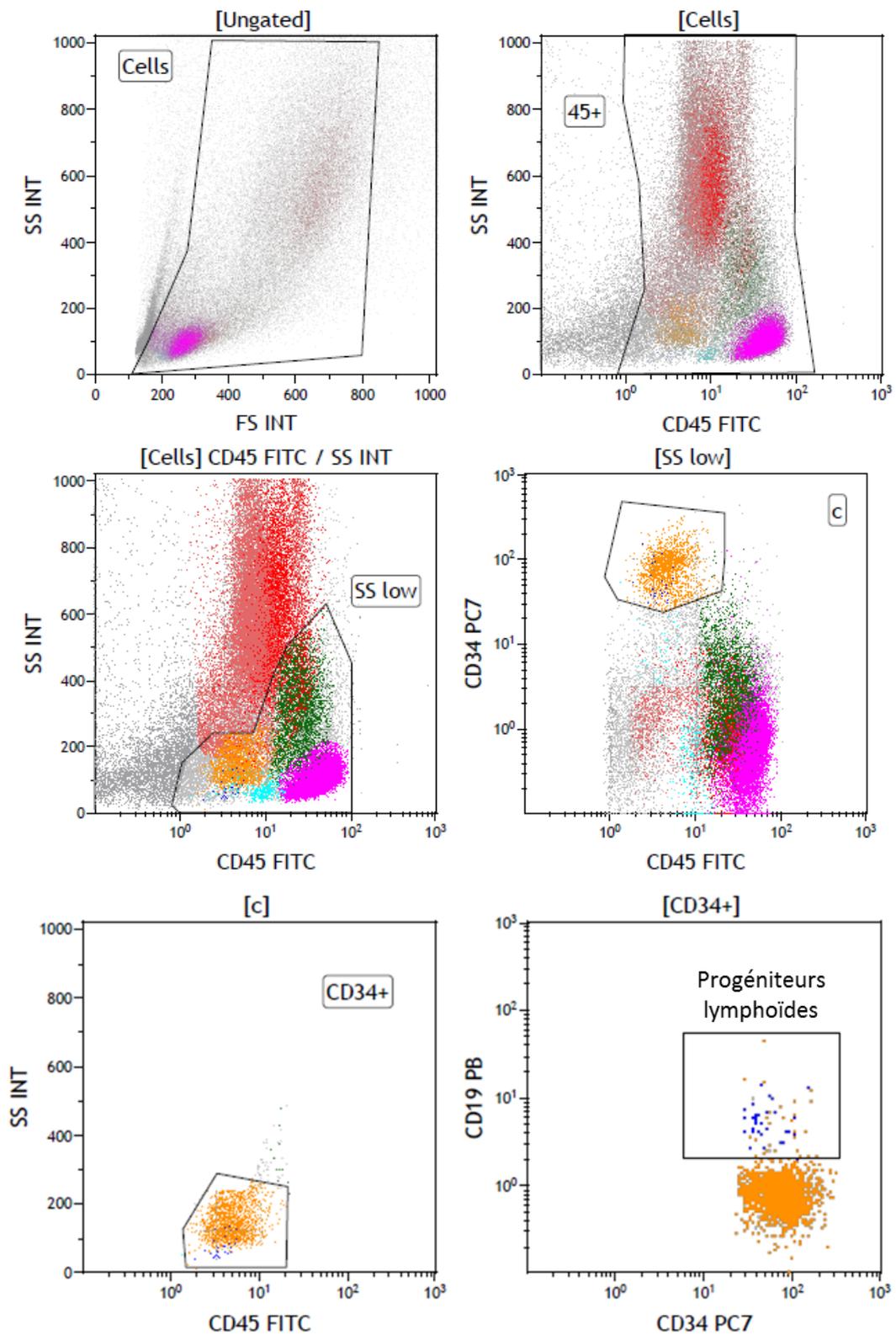


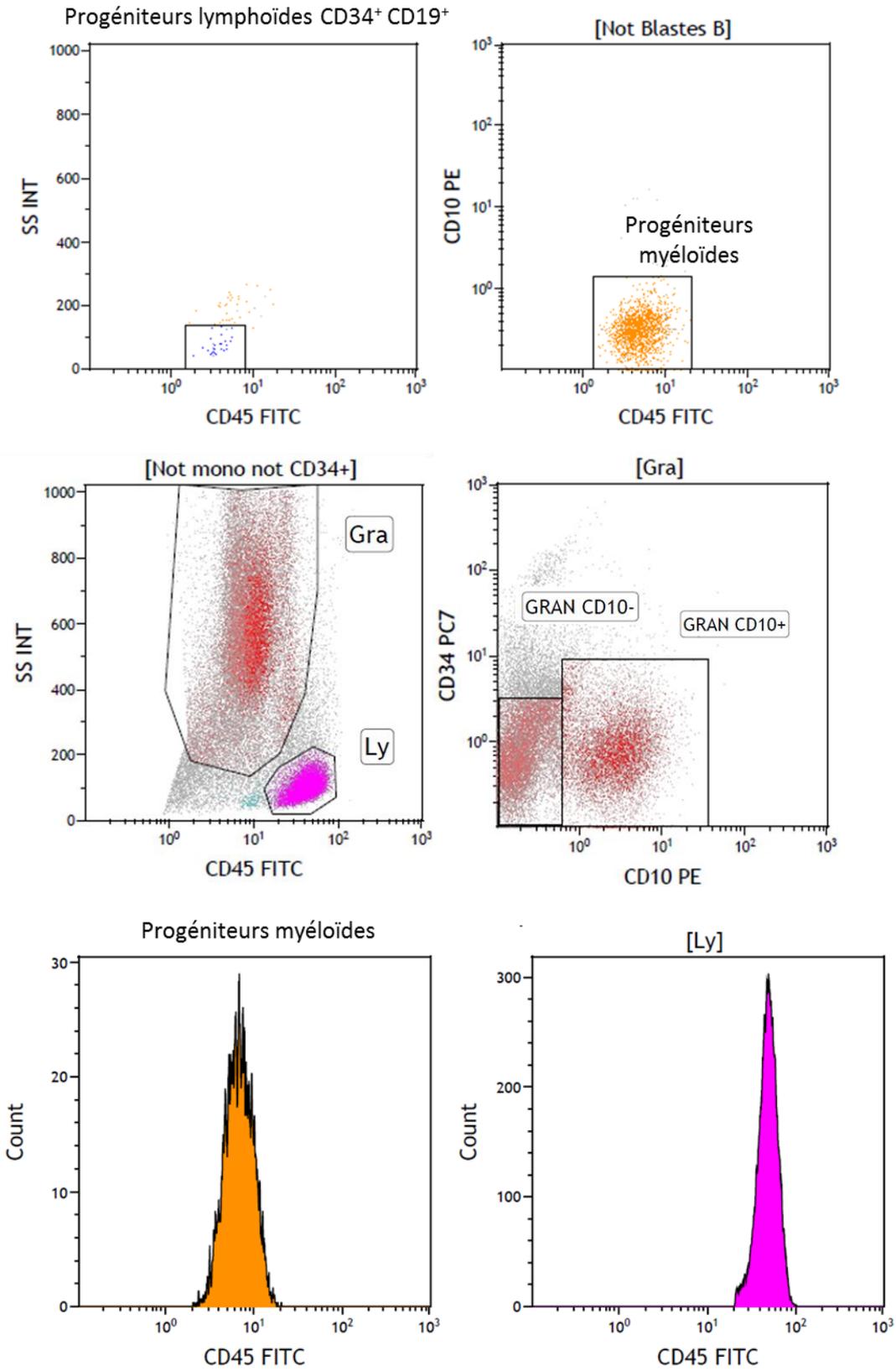


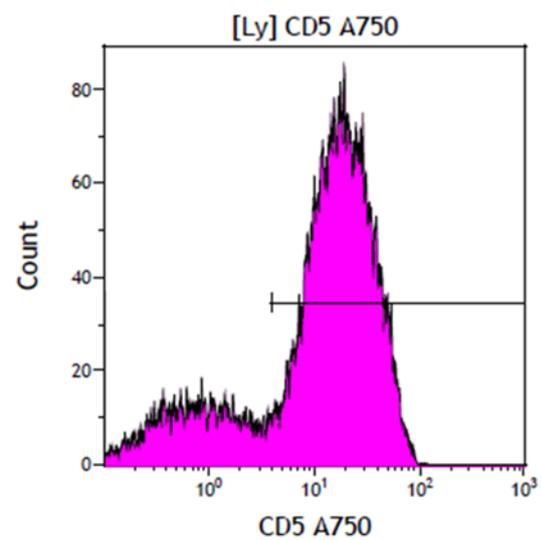
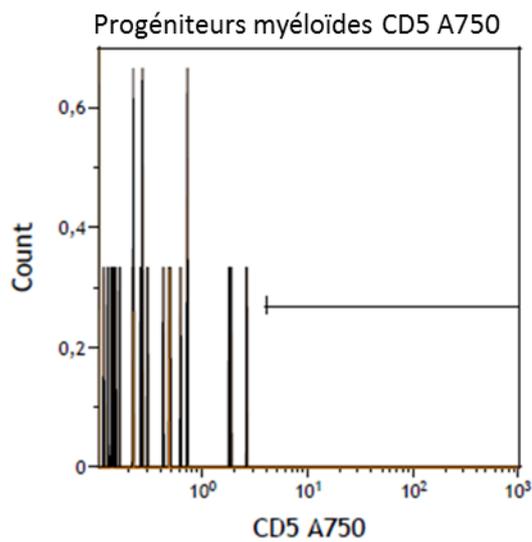
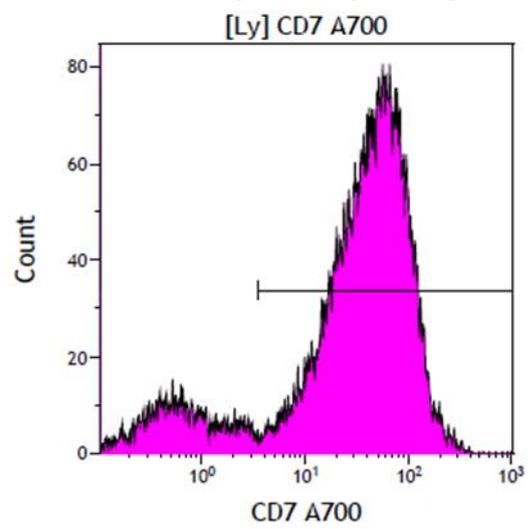
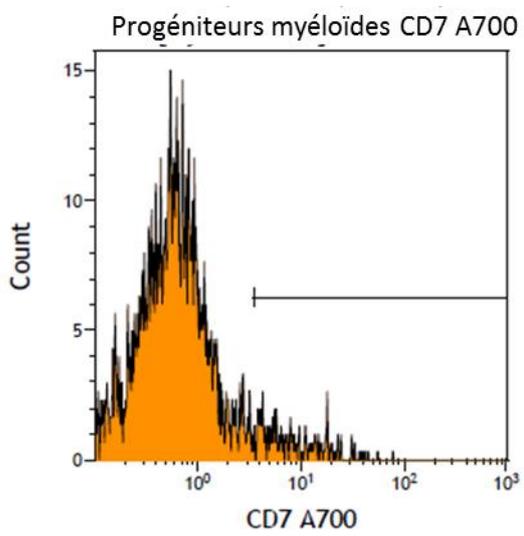
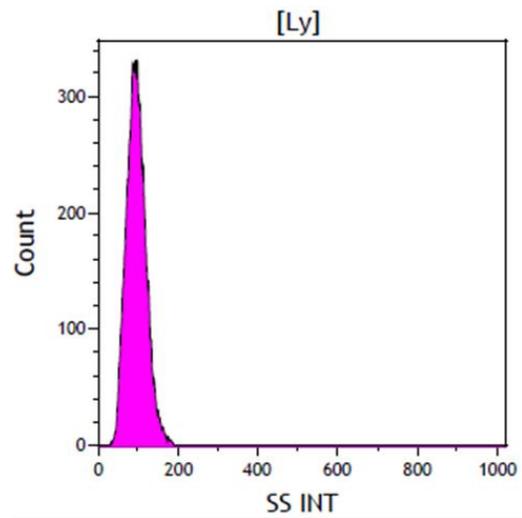
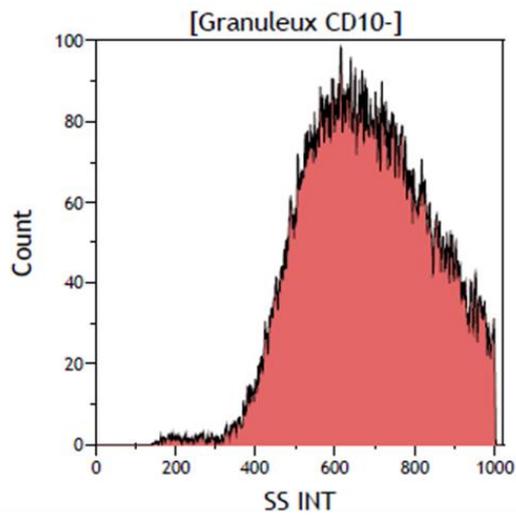


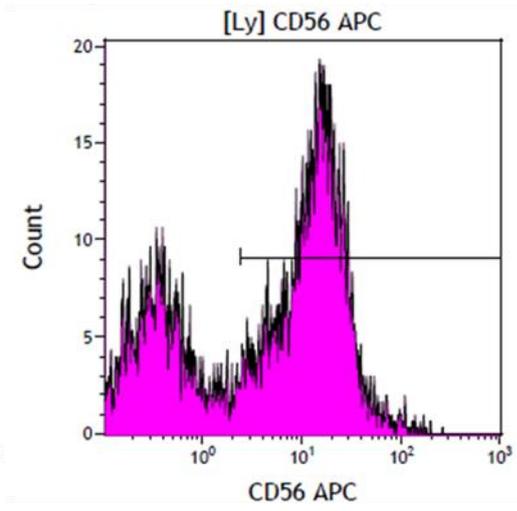
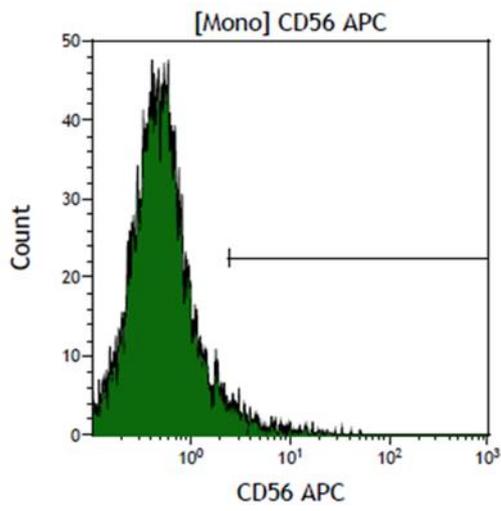


Annexe 2 : Exemple d'une AREB I en CMF.









Annexe 3 : Fiche de lecture des lames de moelle osseuse adaptée de la grille de quantification des dysplasies proposée par le GFM.

Fiche de lecture des lames de moelle osseuse

Patient	Première lecture	Deuxième lecture	Troisième lecture
Nom	Nom	Nom	Nom
Prénom	Date	Date	Date
N° lame			

Richesse du frottis		
Pauvre	Normale	Augmentée
Cytopénie(s) associée(s)		

Dysmégacaryopoïèse	0	1	2
Micromégacaryocytes			
Mégacaryocytes bi-tri ou multinucléés (noyaux séparés)			
Mégacaryocytes hypolobés (type 5q- et autres)			
Anomalies cytoplasmiques (tous types : vacuoles, coloration...)			
Dysmégacaryopoïèse >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)			

Dysérythro-poïèse	0	1	2
Anomalies nucléaires (irrégularités, multinucléarité, gigantisme)			
Anomalie cytoplasmiques (défaut d'hémoglobinisation)			
Macroérythroblastos-mégalo-blastes			
Sidéroblastos en couronne >15%			
Dysérythro-poïèses >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)			

Dysgranulopoïèse	0	1	2
Dysgranulopoïèse/anomalies nucléaires			
Défaut de segmentation (tous types : pseudo Pelger-Huet, bissac, ou autre hypossegmentation)			
Condensation anormale de la chromatine			
Autres anomalies nucléaires (tous autres types dont binucléarité...)			
Dysgranulopoïèse/anomalies cytoplasmiques			
Hypogranularité-agranulaire (grains faiblement ou non visibles)			
Hypergranularité (granulations azurophiles)			
Persistance de la basophilie (corps de Döhle...)			
Corps d'Auer			
Autres anomalies cytoplasmiques (tous autres types, dont vacuoles, grains type Chediak-Higashi...)			
Dysmyélo-poïèse sur d'autres cellules : Eosinophiles, Basophiles, Mastocytes, Monocytes...			
Dysgranulopoïèse >10% (si aucune des anomalies ci-dessus >10%)			

	0	1	2
Dysmégacaryocytopoïèse			
Dysérythro-poïèse			
Dysgranulopoïèse			

Avis du biologiste	OUI	NON	NE SAIT PAS
MDS			

Annexe 4 : Récapitulatif des caractéristiques des patients de l'étude au CHU de Limoges.

SMD		Nb*	H/F	Age (années) Q2[Q1-Q3]	Hb** <10 g/dL	Plt*** <100 G/L	PNN <1,8 G/L	Prouvés	Caryotype anormal	Sidéroblastes en couronne	IPSS 0/0,5/1/1,5/2
Bas grade	AR	10	5/5	79[77,25-80,5]	1	2	0	2	2	0	5/2/0/0/0
	CRDM	9	6/3	76[73-80]	2	2	1	3	3	0	5/1/1/0/0
	ARS	9	6/3	66[63-75]	3	1	3	9	1	8	7/1/0/0/0
	5q-	2	0/2	65,5[59,25-71,75]	0	0	1	2	2	0	2/0/0/0/0
Haut grade	AREB I	15	7/8	77[70,5-80]	8	7	8	2	2	0	0/8/5/2/0
	AREB II	2	1/1	64[61-67]	0	0	2	1	1	0	0/0/0/2/0
SMP	LMMC	10	8/2	71,5[66,25-77,75]	2	2	2	1	1	1	9/1/0/0/0
	Autres SMD/SMP	4	1/3	74,5[64,75-83,5]							
Contrôles	Anémie associée à un déficit en fer et/ou B12 et/ou folates	11	5/6	69[61-84,5]	4	4	3				
	Cytopénie transitoire	8	2/6	75[69,75-80,75]	3	2	1				
	Anémie associée à une insuffisance rénale	7	4/3	81[73-83,5]	1	1	1				
	Purpura thrombopénique idiopathique	6	3/3	70,5[68,25-74,25]	1	2	3				
	Inflammation	3	½	83[82,5-85,5]	0	0	0				
	Normal	2	1/1	55[52-58]	0	0	0				
	Exogénose	2	1/1	69	1	0	1				
	Anémie associée à une dysthyroïdie	1	0/1	82	0	0	0				
	Cytopénie auto-immune	1	1/0	77	1	0	1				
	Cancer	1	1/0	79							
	Hémorragie	1	1/0	68	0	0	0				

*Nb : nombre
**Hb : hémoglobine
***Plt : plaquettes

9 BIBLIOGRAPHIE

1. Greenberg PL. The multifaceted nature of myelodysplastic syndromes: clinical, molecular, and biological prognostic features. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. juill 2013;11(7):877-884; quiz 885.
2. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
3. Fontenay M, Raynaud S, Rose C, Gardin C, Varet B, Baumelou E, et al. Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) : diagnostic, classification, traitement. Par le Groupe Francophone des Myélodysplasies, www.gfmgroup.org;
4. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. juill 2012;125(7 Suppl):S2-5.
5. Fritz AG. International classification of diseases for oncology: ICD-O. Geneva: World Health Organization; 2000.
6. Varet B, Belanger C. Hématologie. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2007.
7. Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. déc 2013;26(4):319-326.
8. Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. juill 2012;125(7 Suppl):S6-13.
9. Killick SB, Carter C, Culligan D, Dalley C, Das-Gupta E, Drummond M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. févr 2014;164(4):503-525.
10. Fenaux P, Adés L, Dreyfus F. Les syndromes myélodysplasiques de l'adulte. Montrouge: J. Libbey Eurotext; 2011.
11. Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. juill 2012;125(7 Suppl):S6-13.
12. 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):2079-2088.
13. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 24 oct 2013;122(17):2943-2964.
14. Valent P, Horny H-P, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. juin 2007;31(6):727-736.
15. Vardiman JW. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;199-204.

16. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. nov 2008;93(11):1712-1717.
17. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, éditeurs. Basel: Karger; 2013.
18. Lukackova R, Gerykova Bujalkova M, Majerova L, Mladosevicova B. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov*. 20 nov 2013;
19. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wimazal F, Sperr WR, Mufti G, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*. janv 2012;36(1):1-5.
20. Valent P, Horny H-P. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *Eur J Clin Invest*. juill 2009;39(7):548-553.
21. Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, Schwarzingler I, Müllauer L, Sperr WR, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res*. nov 2007;31(11):1461-1468.
22. Huang T-C, Ko B-S, Tang J-L, Hsu C, Chen C-Y, Tsay W, et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. *Leukemia*. mars 2008;22(3):544-550.
23. Sloan EM. Hypocellular myelodysplasia. *Hematol Oncol Clin North Am*. avr 2009;23(2):347-360.
24. Maschek H, Kaloutsi V, Rodriguez-Kaiser M, Werner M, Choritz H, Mainzer K, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome: incidence, morphology, cytogenetics, and prognosis. *Ann Hematol*. mars 1993;66(3):117-122.
25. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical Relevance of Bone Marrow Fibrosis and CD34-Positive Cell Clusters in Primary Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 10 févr 2009;27(5):754-762.
26. Della Porta MG, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Haematologica*. 1 févr 2011;96(2):180-183.
27. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. janv 1998;83(1):71-86.
28. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 févr 2011;29(5):504-515.
29. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*. janv 2000;14(1):2-8.
30. Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther*. 15 août 2010;10(4):309-319.

31. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions-a review. *Br J Haematol.* sept 2008;142(5):695-708.
32. Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* sept 2013;162(5):587-605.
33. Cluzeau T, Fenaux P. [New tools and treatments in myelodysplastic syndromes]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne.* mars 2013;34(3):159-167.
34. Fontenay M. Physiopathologie des syndromes myélodysplasiques [Internet]. *EM-Consulte.* [cité 31 mars 2014]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/218211/article/physiopathologie-des-syndromes-myelodysplasiques>
35. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 30 juin 2011;364(26):2496-2506.
36. 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):451-458.
37. Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk Res.* déc 2012;36(12):1453-1458.
38. Glaubach T, Robinson LJ, Corey SJ. Pediatric myelodysplastic syndromes: they do exist! *J Pediatr Hematol Oncol.* janv 2014;36(1):1-7.
39. Germing U, Kündgen A. Prognostic scoring systems in MDS. *Leuk Res.* déc 2012;36(12):1463-1469.
40. Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, Giagounidis A, Lübbert M, Martino S, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res.* janv 2014;38(1):57-64.
41. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 août 2007;25(23):3503-3510.
42. 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):2454-2465.
43. Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, Deeg HJ, Pérez WS, Anasetti C, et al. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood.* 15 juill 2004;104(2):579-585.
44. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res.* 1 juin 2001;61(11):4483-4489.

45. Principe de fonctionnement d'un analyseur trieur. Université Paris Diderot, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251. <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>.
46. Jouault H, Imbert M. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. *Rev Fr Lab.* avr 1995;1995(275):29-35.
47. Belloc F. Les principes de la cytométrie en flux. *Rev Fr Lab.* 1991;218:21-27.
48. Becton Dickinson. Introduction to Flow Cytometry : A Learning Guide [Internet]. Disponible sur: http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf
49. Hawley TS, Hawley RG, éditeurs. *Flow cytometry protocols*. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press; 2004. 434 p.
50. Accadémie Amiens. Schéma de principe de la cytométrie en flux. A partir de document de JP Robinson, Purdue University http://svt.ac-amiens.fr/archives_svt/info/logiciels/cytometrie/Cytometrie2.html.
51. Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* août 2009;94(8):1124-1134.
52. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia.* juill 2012;26(7):1730-1741.
53. Elghetany MT. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* déc 1998;83(12):1104-1115.
54. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood.* 15 août 2001;98(4):979-987.
55. Maynadié M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1 oct 2002;100(7):2349-2356.
56. Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Myelodysplastic syndromes: the role of flow cytometry in diagnosis and prognosis. *Int J Lab Hematol.* oct 2009;31(5):479-483.
57. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica.* août 2012;97(8):1209-1217.
58. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1 août 2006;108(3):1037-1044.

59. Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L, for the Italian Society of Cytometry (GIC). Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* juill 2011;80B(4):201-211.
60. Sternberg A. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1 nov 2005;106(9):2982-2991.
61. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica.* août 2009;94(8):1066-1074.
62. Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, Ball E, Witzig T, Foon KA, et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. *Cytometry.* 15 oct 1997;30(5):249-263.
63. Lacronique-Gazaille C, Chaury M-P, Le Guyader A, Faucher J-L, Bordessoule D, Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica.* juin 2007;92(6):859-860.
64. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom.* mai 2010;78(3):154-168.
65. Mathis S, Chapuis N, Debord C, Rouquette A, Radford-Weiss I, Park S, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* oct 2013;27(10):1981-1987.
66. Burbury KL, Westerman DA. Role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: diagnosis, classification, prognosis and response assessment. *Leuk Lymphoma.* avr 2014;55(4):749-760.
67. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1 juill 2003;102(1):394-403.
68. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1 oct 2008;112(7):2681-2686.
69. Van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Dräger AM, van der Velden VHJ, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):1067-1077.
70. Van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, Della Porta MG, Alhan C, Balleisen JS, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma.* mars 2013;54(3):472-475.
71. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer.* 1 oct 2010;116(19):4549-4563.

72. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1 déc 2002;100(12):3887-3896.
73. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, Li Y, Chang A, Norwood TH, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol*. août 2005;124(2):170-181.
74. Cellulaire GF d'Hématologie. GUIDE DE BONNES PRATIQUES DES PONCTIONS MEDULLAIRES. [cité 20 avr 2014]; Disponible sur: http://sfh.hematologie.net/fr/telechargements/Pratiques_Professionnelles/Guide_Bonnes_Pratiques.pdf
75. Bergeri I, Michel R, Boutin JP. [Everything (or almost everything) about the Kappa coefficient]. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon*. 2002;62(6):634-636.
76. Amin HM, Jilani I, Estey EH, Keating MJ, Dey AL, Manshoury T, et al. Increased apoptosis in bone marrow B lymphocytes but not T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1 sept 2003;102(5):1866-1868.
77. Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. CD34 and CD117 expression abnormalities are common. *Am J Clin Pathol*. juin 2006;125(6):884-894.
78. Satoh C, Dan K, Yamashita T, Jo R, Tamura H, Ogata K. Flow cytometric parameters with little interexaminer variability for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. mai 2008;32(5):699-707.
79. Ogata K. Diagnostic flow cytometry for low-grade myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol*. déc 2008;26(4):193-198.

10 TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	12
2	GÉNÉRALITÉS	14
2.1	Les syndromes myélodysplasiques.....	14
2.1.1	Définitions	14
2.1.2	Épidémiologie.....	14
2.1.3	Étiologie.....	15
2.1.4	Signes cliniques et circonstances de découverte.....	16
2.1.5	Diagnostic biologique et cytologique.....	16
2.1.5.1	Hémogramme et formule sanguine.....	16
2.1.5.2	Myélogramme.....	18
2.1.5.3	Critères de diagnostic des SMD	20
2.1.7	Diagnostic cytochimique	22
2.1.8	Diagnostic cytogénétique.....	22
2.1.9	Autres examens biologiques	24
2.1.10	Diagnostic différentiel	25
2.1.11	Oncogenèse et biologie moléculaire.....	27
2.1.11.1	L'apoptose.....	28
2.1.11.2	Microenvironnement local	28
2.1.11.3	Principales anomalies chromosomiques et moléculaires.....	29
2.1.11.3.1	Anomalies chromosomiques.....	31
2.1.11.3.2	Anomalies génétiques.....	32
2.1.12	Classification des SMD.....	36
2.1.12.1	Classification Franco-Américaino Britannique (FAB).....	36
2.1.12.2	Classification OMS.....	37
2.1.13	Pronostic.....	40
2.1.13.1	Score IPSS.....	40
2.1.13.2	Score WPSS	41
2.1.13.3	Score IPSS-r	42
2.1.14	Traitement et prise en charge.....	44
2.1.14.1	Traitement symptomatique	44
2.1.14.2	Traitement curatif	45
2.1.14.2.1	Place de l'allogreffe.....	45
2.1.14.2.2	Prise en charge des SMD de bas grade	46

2.1.14.2.3	Prise en charge des SMD de haut grade	47
2.2	La cytométrie en flux	48
2.2.1	Définitions	48
2.2.2	Principes de la CMF	48
2.2.2.1	Système fluide : focalisation hydrodynamique	49
2.2.2.2	Système optique	50
2.2.2.3	Système électronique et informatique	52
2.2.3	Applications de la CMF dans les hémopathies.....	53
2.2.3.1	Diagnostic des hémopathies	53
2.2.3.2	Suivi et évaluation de la réponse au traitement.....	54
2.2.3.3	Numération des CSH	54
2.2.3.4	Mise en évidence de modifications des antigènes de surface	54
2.2.3.5	Réticulocytes	54
2.2.3.6	Hématies fœtales	55
2.2.4	Place de la CMF dans les SMD.....	55
2.2.4.1	La CMF comme outil de diagnostic dans les SMD	55
2.2.4.2	L'impact de la CMF dans le pronostic et le suivi thérapeutique des SMD	57
2.2.4.3	Systèmes de scores en CMF dans les SMD	57
2.2.4.4	Le score d'Ogata.....	59
3	OBJECTIFS	62
4	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	63
4.1	Constitution des cohortes	63
4.2	Analyse par CMF	64
4.2.1	Protocoles de traitement des échantillons de moelle osseuse	64
4.2.2	Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata	65
4.2.3	Stratégie de fenêtrage pour établir le score d'Ogata étendu.....	72
4.3	Analyse cytologique des frottis de moelle osseuse.....	73
4.3.1	Grille de lecture et score cytologique	73
4.3.2	Lecture des lames de moelle osseuse	73
4.4	Analyse des résultats	74
5	RÉSULTATS.....	75
5.1	Données initiales	75
5.1.1	Recueil des données clinico-biologiques.....	75
5.1.2	Les patients.....	76
5.1.2.1	Cohorte initiale	76

5.1.2.2	Cohorte totale	77
5.1.2.3	Cohorte n°1 étudiée en CMF : score d'Ogata étendu.....	79
5.1.2.4	Cohorte n°2 étudiée en cytologie	81
5.2	Cytométrie en flux	82
5.2.1	Score d'Ogata	82
5.2.1.1	Distribution des valeurs des paramètres du score d'Ogata selon le groupe de diagnostic	82
5.2.1.1.1	Distribution des progéniteurs myéloïdes CD34 ⁺ parmi les cellules nucléées totales selon les groupes de diagnostic.....	83
5.2.1.1.2	Distribution des progéniteurs lymphoïdes B parmi les CD34 ⁺ totaux selon les groupes de diagnostic	84
5.2.1.1.3	Rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes selon les groupes de diagnostic.....	85
5.2.1.1.4	Rapport du SS mode des granuleux CD10 ⁻ sur celui des lymphocytes selon les groupes de diagnostic	86
5.2.1.1.5	Synthèse	86
5.2.1.2	Sensibilité et spécificité du Score d'Ogata dans la cohorte totale	87
5.2.2	Cohorte n°1 et score d'Ogata étendu	88
5.2.2.1	Distribution des trois nouveaux marqueurs selon les cinq groupes	88
5.2.2.2	Spécificité et sensibilité du score d'Ogata étendu.....	90
5.2.2.3	Comparaison du score d'Ogata étendu par rapport au score d'Ogata dans la cohorte n°1	91
5.3	Cytologie : cohorte n°2	92
5.3.1	Sensibilité et spécificité du score cytologique	92
5.3.2	Distribution du score cytologique selon les cinq groupes	93
5.4	Relation entre le score d'Ogata et le score cytologique dans la cohorte n°2	94
5.4.1	Cohorte n°2 tous groupes confondus :	94
5.4.2	Groupe contrôle non SMD	95
5.4.3	Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans les groupes des SMD	96
5.4.3.1	Ensemble des groupes des SMD	96
5.4.3.2	Groupe des SMD de bas grade.....	97
5.4.3.3	Groupe des SMD de haut grade.....	98
5.4.3.4	Groupe des SMD/SMP	99
5.4.3.5	Relation entre la cytologie et le score d'Ogata : analyse statistique.....	100
6	DISCUSSION	101
7	CONCLUSION.....	108

8	ANNEXES.....	110
9	BIBLIOGRAPHIE	120
10	TABLE DES MATIÈRES	126
11	TABLES DES FIGURES	130
12	TABLE DES TABLEAUX.....	131

11 TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général des mutations dans un clone cellulaire de SMD (30).	32
Figure 2 : Probabilité de survie selon les quatre groupes de risque du score IPSS (40).	41
Figure 3 : Probabilité de survie selon les cinq groupe de risque du score WPSS (40).	42
Figure 4 : Probabilité de survie selon les cinq groupes de risque du score IPSS-r (40).	44
Figure 5 : Algorithme de prise en charge des SMD de bas grade (9).	46
Figure 6 : Algorithme de prise en charge des SMD de haut grade (9).	47
Figure 7 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (45).	49
Figure 8 : Focalisation hydrodynamique (46).	49
Figure 9 : Différents modes de traitement de la lumière par la cellule (46).	51
Figure 10 : Banc optique d'un CMF (50).	52
Figure 11 : Exemple d'un dot-plot (à gauche) et d'un histogramme mono-paramétrique (à droite). .	53
Figure 12 : Histogramme FS/SS permettant le fenêtrage des cellules totales.	66
Figure 13 : Histogramme CD45/SS permettant l'isolement des principales lignées cellulaires.	66
Figure 14 : Histogramme CD45/SS permettant le fenêtrage des cellules avec un SS faible.	67
Figure 15 : Histogramme CD45/CD34 permettant d'isoler les cellules CD34 ⁺	67
Figure 16 : Histogrammes permettant d'isoler les progéniteurs myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes.	68
Figure 17 : Histogramme CD45/SS permettant d'isoler les granuleux et les lymphocytes.	69
Figure 18 : Histogramme CD10/CD34 permettant d'isoler les granuleux CD10 ⁻	69
Figure 19 : Rapport de la moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celle des progéniteurs myéloïdes.	70
Figure 20 : Rapport du SS mode des granuleux CD10 ⁻ sur celui des lymphocytes.	71
Figure 21 : Fenêtrage des progéniteurs myéloïdes CD7 ⁺ , des progéniteurs myéloïdes CD5 ⁺ et des monocytes CD56 ⁺	72
Figure 22 : Logigramme détaillé des cohortes de l'étude.	77
Figure 23 : Répartition des patients souffrant de SMD dans la cohorte totale.	78
Figure 24 : Répartition des patients du groupe contrôle dans la cohorte totale.	78
Figure 25 : Répartition des patients souffrant de SMD dans la cohorte n°1.	80
Figure 26 : Répartition des patients du groupe contrôle dans la cohorte n°1.	80
Figure 27 : Répartition des SMD dans la cohorte n°2.	81
Figure 28 : Répartition des patients du groupe contrôle non SMD de la cohorte n°2.	82
Figure 29 : Distribution des progéniteurs myéloïdes CD34 ⁺ parmi les cellules nucléées totales.	83
Figure 30 : Distribution des progéniteurs lymphoïdes B parmi les CD34 ⁺ totaux.	84
Figure 31 : Rapport de moyenne de l'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes celle des progéniteurs myéloïdes.	85
Figure 32 : Rapport du SS mode des granuleux CD10 ⁻ sur celui des lymphocytes.	86
Figure 33 : Sensibilité et spécificité du score d'Ogata selon les cinq groupes dans la cohorte totale. .	87
Figure 34 : Présence des trois marqueurs selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.	88
Figure 35 : Distribution des marqueurs CD5, CD7 et CD56 selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.	89
Figure 36 : Spécificité et sensibilité du score d'Ogata étendu selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.	90
Figure 37 : Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des scores d'Ogata et d'Ogata étendu selon les cinq groupes dans la cohorte n°1.	91
Figure 38 : Distribution du score cytologique selon les cinq groupes dans la cohorte n°2.	93
Figure 39 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans la cohorte n°2.	94

Figure 40 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe contrôle.	95
Figure 41 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD.	96
Figure 42 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de bas grade non prouvés.	97
Figure 43 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de bas grade prouvés.....	97
Figure 44 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD de haut grade.....	98
Figure 45 : Relation entre le score cytologique et le score d'Ogata dans le groupe des SMD/SMP.....	99

12 TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Grille de quantification de la dysplasie proposée par le GFM.....	20
Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques des lignées myéloïdes dans le sang et la moelle osseuse (2,13).	21
Tableau 3 : Anomalies chromosomiques récurrentes selon l'OMS (2).	24
Tableau 4 : Liste des examens sanguins à réaliser devant une suspicion de SMD (13).	25
Tableau 5 : Anomalies moléculaires et leurs caractéristiques dans les SMD (30).	30
Tableau 6 : Classification FAB des SMD (37).	37
Tableau 7 : Classification OMS 2008 des SMD (2).	38
Tableau 8 : Classification OMS 2008 des syndromes frontières SMD/SMP.	39
Tableau 9 : Caractéristiques des ARS-T.	39
Tableau 10 : Anomalies cytogénétiques pour le score IPSS et le score WPSS (2).	41
Tableau 11 : Score IPSS (2).	41
Tableau 12 : Score WPSS.	42
Tableau 13 : Score IPSS-r (39).	43
Tableau 14 : Anomalies cytogénétiques pour le score IPSS-r (39).	43
Tableau 15 : Résumé des systèmes de notation en CMF pour l'évaluation des dysplasies (52).	58
Tableau 16 : Exigences minimales requises pour l'évaluation de la dysplasie par CMF (52).	59
Tableau 17 : Valeurs seuils définies pour les quatre paramètres analysés en CMF.	61
Tableau 18 : Anticorps monoclonaux utilisés en CMF.	64
Tableau 19 : Exemple d'un score cytologique.	73
Tableau 20 : Degré d'accord et valeur du coefficient Kappa proposé par Landis et Koch (75).	74
Tableau 21 : Causes d'exclusion de la cohorte initiale.....	76
Tableau 22 : Sensibilité et spécificité du score cytologique.....	92
Tableau 23 : Sensibilité et spécificité du score d'Ogata dans trois études.	104

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.

RELATION ENTRE L'ANALYSE CYTOLOGIQUE ET L'ANALYSE CYTOMÉTRIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES

RÉSUMÉ :

En l'absence de marqueur spécifique décrit par l'OMS ou d'anomalie cytologique évidente, le diagnostic de certains syndromes myélodysplasiques (SMD) peut se révéler difficile. Dans de tels contextes, il existe un réel besoin de marqueurs supplémentaires intervenant comme co-critères dans le diagnostic des SMD. La cytométrie en flux (CMF), grâce au score d'Ogata, validé par l'*European LeukemiaNet* en 2012, constitue un outil de diagnostic supplémentaire. Ce travail présente l'évaluation du score d'Ogata en CMF au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges ainsi que sa relation avec la cytologie, méthode de référence, pour l'évaluation de la dysplasie médullaire. L'intérêt de marqueurs supplémentaires en CMF et l'amélioration attendue de la sensibilité de ce score d'Ogata étendu, sont également évalués. Nous avons pu ainsi démontrer que le score d'Ogata étendu augmente la sensibilité du test, et qu'il existe une relation entre la dysplasie cytologique et les anomalies mises en évidence par la CMF. Mais parce qu'elles ne sont pas absolument spécifiques et qu'elles ne permettent pas d'établir le diagnostic de SMD à elles seules, ces deux méthodes de diagnostic restent complémentaires et ne peuvent se substituer l'une à l'autre. Il faut donc considérer la cytologie et la CMF dans une approche combinée pour optimiser la stratégie diagnostique des SMD.

Les perspectives de ce travail sont de proposer à terme un examen systématique au laboratoire des prélèvements médullaires par CMF devant toute suspicion de SMD chez un patient. L'étude de nouveaux paramètres de CMF, et notamment les marqueurs érythroïdes, permettra d'améliorer la sensibilité de cette technique.

MOTS CLÉS : Biologie médicale – Hématologie – Syndromes myélodysplasiques – Cytométrie en flux – Cytologie – score d'Ogata

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie – DES de Biologie Médicale

Laboratoire d'Hématologie Centre Hospitalo-Universitaire de Limoges Hôpital Dupuytren
2 Avenue Martin Luther King 87042 Limoges