

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2015

THÈSE N°

Cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques : nouvelle approche standardisée et étude des altérations de l'ancre GPI au cours de la maturation granuleuse

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 21 septembre 2015

par

Batiste SIMONET

Né le 22 septembre 1988 à Guéret (23)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme. le Professeur Sylvie Rogez.....Président
M. le Professeur Jean FeuillardJuge
M. le Professeur Gilles Dreyfuss.....Juge
Mme le Docteur Marie-Pierre GourinJuge
Mme le Docteur Estelle Guérin.....Juge
M. le Docteur Patrice PerroudJuge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2015

THÈSE N°

Cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques : nouvelle approche standardisée et étude des altérations de l'ancre GPI au cours de la maturation granuleuse

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 21 septembre 2015

par

Batiste SIMONET

Né le 22 septembre 1988 à Guéret (23)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme. le Professeur Sylvie Rogez.....Président
M. le Professeur Jean FeuillardJuge
M. le Professeur Gilles Dreyfuss.....Juge
Mme le Docteur Marie-Pierre GourinJuge
Mme le Docteur Estelle Guérin.....Juge
M. le Docteur Patrice PerroudJuge

A mamie

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

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

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
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
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – EMERITES :

DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES :

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 CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
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 :

PARENT Marianne	PHARMACOTECHNIE, PHARMACIE GALENIQUE
VEDRENNE Nicolas	CHIMIE ANALYTIQUE
MBAKIDI Jean-Pierre	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE ET TOXICOLOGIE

DETACHEMENT à compter du 1/09/2014 pour 2 ans

MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
------------------------------	-----------------------------------

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, pour la place plus qu'essentielle que vous avez tenue tout au long de mes études de pharmacie et de mon internat, ainsi que pour nos nombreux échanges. Merci pour votre soutien constant. Soyez assurée de mon plus grand respect ainsi que de ma plus haute considération.

Monsieur le Professeur Jean Feuillard

Pour l'honneur que vous me faites en participant à ce jury, pour votre aide dans la réalisation de ce travail, pour vos précieux conseils et pour le temps que vous m'avez consacré. Travailler à votre contact est un enrichissement permanent. Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Gilles Dreyfuss

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse. Vous avez profondément marqué mon cursus d'étudiant et avez grandement contribué à me faire aimer la biologie. Soyez assuré de ma très profonde gratitude.

Madame le Docteur Estelle Guérin

Pour m'avoir proposé ce sujet et l'avoir dirigé, pour ton dynamisme communicatif et ta gentillesse. Ce fut un grand plaisir que de travailler avec toi et l'idée de pouvoir recommencer prochainement me ravit.

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.

Monsieur le Docteur Patrice Perroud

Pour l'honneur que vous me faites aujourd'hui par votre participation à ce jury et pour votre gentillesse. Vous êtes pour moi plus qu'un modèle et je m'efforcerai, tout au long de ma vie professionnelle, de me nourrir de votre exemple.

Je tiens à associer à ce travail toute l'équipe du secteur de cytométrie en flux du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges, et tout particulièrement Adélaïde, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci pour votre accueil et pour votre aide.

Je remercie l'ensemble des personnels des laboratoires qui m'ont accueilli pour leur participation active à ma formation professionnelle. J'ai une pensée particulière pour toute l'équipe du laboratoire de l'hôpital de Guéret, merci pour votre gentillesse et votre dynamisme, je suis honoré – et impatient – de pouvoir prochainement vous rejoindre.

Je tiens également à remercier :

Mes parents, merci pour votre indéfectible soutien tout au long de ces années qui furent parfois difficiles, pour votre écoute, pour les sacrifices consentis. J'ai beau chercher je ne trouverai jamais de termes assez forts pour vous exprimer mon affection et ma reconnaissance, mais des mots le pourraient-ils seulement ?

Ma sœur Angélique et toute sa petite famille, pour leur soutien et leur affection. Puisse Jade être fière de son tonton.

Elsa et Clémence pour leur amitié se mesurant désormais en décennies.

Les deux Aurélien qui se reconnaîtront. Il est des rencontres dans une vie qui vous marquent plus que toutes autres et vous changent à jamais, vous êtes de celles-là.

Jérémy, papy croco et mamie croco. Vous êtes tout simplement fantastiques. Je n'oublierai jamais les bons moments que nous avons passés ensemble et qui ne sont je l'espère, qu'un

début, même si, malheureusement pour vous, mon humour a désormais peu de chances d'évoluer.

La dream team : Alice, Elsa, Marianne et Sanaa. Quoi que j'ai pu en dire, vous ne fûtes que fort rarement une bande de désagréables. Bien que nous nous apprêtions à nous éparpiller aux quatre coins de France et de Navarre j'espère que le fil de l'amitié de ne se rompra jamais.

Tous mes co-internes, qui auront réussi à supporter mes blagues au fil des semestres : Angèle, Mélanie, les 2 Claire, les 2 Thomas, Anne-Laure, Sandra, Guillaume, Nicolas, Marilynne, Ana, Eve, Camille, Céline, Florent, France, Romain, Thierry, Jean-Baptiste. Je considère bon nombre d'entre vous comme des amis.

« Ne craignez jamais de vous faire des ennemis ; si vous n'en avez pas, c'est que vous n'avez rien fait ».

Georges Clémenceau

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Table des matières

Introduction	13
1. Généralités	14
1.1. Les syndromes myélodysplasiques (SMD)	14
1.1.1. Définition.....	14
1.1.2. Epidémiologie	14
1.1.3. Etiologies	15
1.1.4. Circonstances de découverte et manifestations cliniques	16
1.1.5. Diagnostic biologique.....	16
1.1.5.1. Hémogramme	16
1.1.5.2. Myélogramme	17
1.1.5.3. Cytochimie	21
1.1.5.4. Cytogénétique.....	22
1.1.5.5. Cytométrie en flux (CMF)	24
1.1.5.6. Biopsie ostéo-médullaire (BOM) et histologie.....	24
1.1.5.7. Autres examens biologiques	25
1.1.5.8. Bilan : Critères diagnostiques.....	25
1.1.6. Classification.....	27
1.1.6.1. Classification FAB	27
1.1.6.2. Classification OMS.....	28
1.1.7. Scores de pronostic	31
1.1.7.1. Score IPSS (International Pronostic Scoring System)	31
1.1.7.2. Score WPSS (WHO-based Pronostic Scoring System).....	32
1.1.7.3. Score IPSS-R (Score IPSS Révisé)	33
1.1.7.4. Autres scores	34
1.1.8. Traitement	34
1.1.8.1. Traitements symptomatiques	35
1.1.8.2. Immunomodulateurs	35
1.1.8.3. Place de la chimiothérapie	36
1.1.8.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques	36
1.1.8.5. Bilan : arbres décisionnels	37
1.2. La cytométrie en flux (CMF).....	39
1.2.1. Composition du système.....	39
1.2.1.1. Système fluide et focalisation hydrodynamique	40
1.2.1.2. Système optique	40
1.2.1.3. Système électronique.....	42
1.2.2. Traitement des données	43
1.2.2.1. Compensation du signal.....	43
1.2.2.2. Exploitation des données	45
1.2.3. La cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques.....	46
1.2.3.1. Intérêt de la CMF dans les SMD	46
1.2.3.2. Problématiques	48
1.2.3.3. Le score d'Ogata.....	52
1.3. Syndromes myélodysplasiques et ancre GPI.....	54
1.3.1. Ancre GPI et Hémoglobinurie paroxystique nocturne.....	54
1.3.2. Clone HPN et syndromes myélodysplasiques.....	55
1.3.3. Marqueur Flaer (Fluorescent Aerolysin)	56
2. Objectifs	58
3. Matériels et méthodes	60
3.1. Constitution de la cohorte	60
3.2. Analyse par Cytométrie en flux	63
3.2.1. Choix des anticorps	63
3.2.2. Protocole de traitement des échantillons.....	63
3.2.3. Standardisation de la quantification antigénique	64

3.2.4. Stratégie de fenêtrage	66
3.2.4.1. Tube « Ogata »	66
3.2.4.2. Tube « Flaer »	66
3.2.5. Collecte et traitement des données	72
3.2.5.1. Calcul du score Ogata	72
3.2.5.2. Etude des anomalies de la maturation granuleuse	73
3.2.5.3. Etude du marqueur Flaer	76
4. Résultats	78
4.1. Cohorte de patients	78
4.2. Score d'Ogata	80
4.3. Etude de la maturation granuleuse	81
4.4. Etude du marqueur Flaer	85
4.4.1. Etude quantitative	85
4.4.1.1. Au cours de la maturation granuleuse normale	85
4.4.1.2. Entre les différents groupes de patients	86
4.4.2. Etude qualitative	88
4.5. Score global	91
5. Discussion	94
5.1. Protocole mis au point	94
5.2. Cohorte de patients	96
5.3. Score d'Ogata	96
5.4. Etude de la maturation granuleuse	97
5.5. Etude du marqueur Flaer	100
5.6. Score global	100
Conclusion	102
Références bibliographiques	103

Table des abréviations

AR:	Anémie Réfractaire
AREB :	Anémie Réfractaire avec Excès de Blastés
ARS :	Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes
BOM :	Biopsie Ostéo-Médullaire
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CMF :	Cytométrie en Flux
CRDM :	Cytopénie(s) Réfractaire(s) avec Dysplasie Multilignée
CRDU :	Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Unilignée
CV:	Coefficient de Variation
ELN :	European Leukemia Net
EMA:	European Medicines Agency (Agence européenne du médicament)
EPO :	Erythropoïétine
FAB:	Franco-Américano-Britannique
FISH :	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization (Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence)
FITC :	Isothiocyanate de Fluorescéine
Flaer :	Fluorescent Aerolysin
FS ou FSC :	Forward Scatter (diffusion de la lumière aux petits angles)
GB :	Globules Blancs
G-CSF:	Granulocytes Colony-Stimulating Factor (Facteur de croissance granuleux)
GFM:	Groupe Français des Myélodysplasies
Gmean :	Moyenne géométrique de fluorescence
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GVH :	Graft Versus Host (Réaction du greffon contre l'hôte)
GVL:	Graft Versus Leukemia (Réaction du greffon contre l'hémopathie)
Hb :	Hémoglobine
HLA :	Human Leucocyte Antigens

HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

IPSS : International Pronostic Scoring System

ISCN : International System for Human Cytogenetic Nomenclature

LAM : Leucémies aiguës myéloïdes

LMMC : Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique

MEF : Molécules d'Equivalent Fluorochrome

MEFL : Molécules d'Equivalent FITC

MFI : Mean Fluorescence Intensity (Moyenne d'intensité de fluorescence)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate Buffered Saline (= tampon phosphate salin)

PE : Phycoérythrine

PMT : Photomultiplicateur

PNN : Polynucléaires neutrophiles

Se : Sensibilité

SFH : Société Française d'Hématologie

SMD : Syndromes Myélodysplasiques

SMD-I : Syndromes Myélodysplasiques Inclassables

SMP/SMD : Syndromes Myéloprolifératifs/Myélodysplasiques

Sp : Spécificité

SS ou SSC : Side Scatter (diffusion de la lumière aux grands angles)

t-SMD : Syndromes Myélodysplasiques secondaires à des traitements cytotoxiques

VGM : Volume Globulaire Moyen

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WPSS : Who-based Pronostic Scoring System

Introduction

Les syndromes myélodysplasiques représentent un groupe hétérogène d'hémopathies affectant principalement les sujets âgés. D'évolution souvent indolente, ils se manifestent principalement par des cytopénies persistantes associées à des dysplasies cellulaires, ils présentent également un risque accru de transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM). Leur diagnostic reste encore parfois délicat - notamment dans les formes de bas grade – retardant ainsi une prise en charge appropriée pour les patients. Dans ce contexte, de nombreuses études s'attachent à rechercher de nouveaux marqueurs, de nouvelles techniques ou de nouveaux critères permettant d'affirmer le diagnostic.

La cytométrie en flux, qui permet l'étude phénotypique automatisée d'un grand nombre de cellules, s'est donc imposée depuis les années 2000 comme un co-critère intéressant. De nombreux travaux ont montré la pertinence de son usage dans ce contexte mais, à ce jour, aucun protocole n'associe une sensibilité, une spécificité, et une facilité d'utilisation pleinement satisfaisantes. Il apparaît donc pertinent de rechercher à la fois de nouveaux marqueurs mais aussi de nouveaux protocoles utilisant ceux déjà connus.

Au cours de ce travail nous avons tout d'abord cherché à mettre au point un nouveau protocole basé sur une étude standardisée, reproductible et objective de la maturation granuleuse, en s'appuyant sur des marqueurs connus dans la littérature. Nous nous sommes également intéressés à l'étude quantitative et qualitative de l'expression du marqueur FlaeR au cours de la maturation granuleuse.

1. Généralités

1.1. Les syndromes myélodysplasiques (SMD)

1.1.1. Définition

Les syndromes myélodysplasiques constituent un groupe hétérogène d'hémopathies clonales qui associent à la fois :

- une dysmyéloïpoïèse avec prolifération excessive de précurseurs myéloïdes se différenciant de manière anormale. Ces anomalies de maturation se traduisent par des dysplasies sur une ou plusieurs des lignées hématopoïétiques ;
- une hématopoïèse inefficace par défaut de production de cellules matures, due à l'apoptose excessive des précurseurs. Celle-ci se manifeste par une ou plusieurs cytopénies sanguines ;
- une instabilité génétique avec un risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans 30% des cas. Ceci explique la dénomination « d'état pré-leucémique » qui leur a parfois été donnée.

L'évolution est prolongée et relativement indolente dans 70% des cas avec aggravation progressive des cytopénies (1,2).

1.1.2. Epidémiologie

Les SMD ont une incidence estimée de 3 à 5 cas pour 100 000 habitants par an et on note une prédominance masculine (sexe ratio compris entre 1,5 et 2).

Ils touchent essentiellement les sujets âgés, c'est d'ailleurs l'hémopathie maligne la plus fréquente au sein de cette population. L'âge médian au diagnostic est de 76 ans et leur incidence augmente avec l'âge (Figure 1). On observe de très rares cas chez l'enfant et en général de pronostic très péjoratif (2–5).

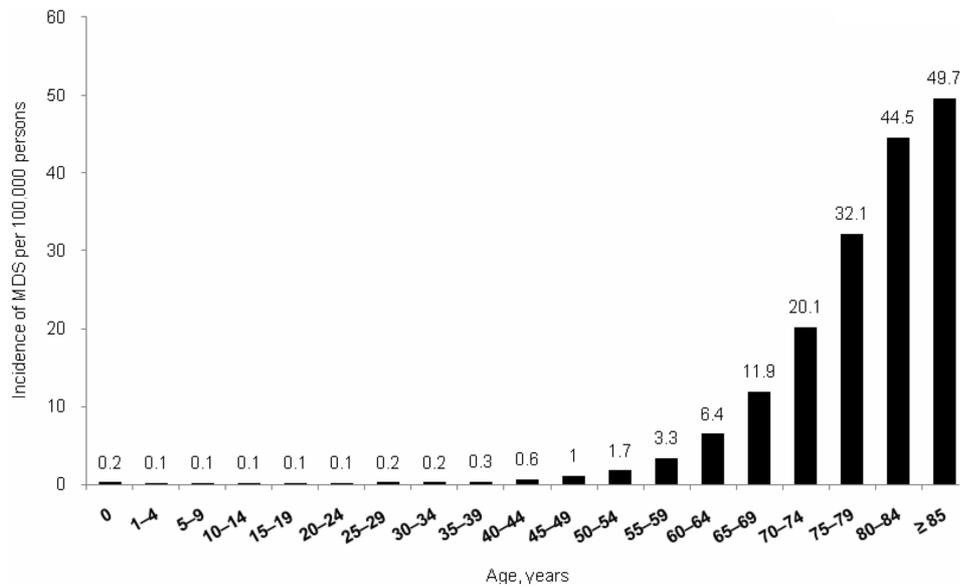


Figure 1 : Incidence des SMD dans les différentes classes d'âge aux Etats-Unis (3)

1.1.3. Etiologies

Du fait de leur caractère hétérogène, de leur évolution souvent indolente et de leur diagnostic parfois difficile, il est en général délicat d'identifier une ou plusieurs étiologies. On estime que 10% des SMD surviennent après l'exposition à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie anticancéreuse. L'OMS les considère alors comme secondaires et ils appartiennent au groupe des SMD dits liés au traitement (therapy related en anglais), souvent d'emblée pancytopéniques et évoluant rapidement vers une LAM. Les molécules qui sont le plus souvent incriminées sont les agents alkylants (busulphan, melphalan, chlorambucil, etc.) mais aussi les inhibiteurs de la topoisomérase II (2,4,5).

Pour les autres, dits primaires ou de novo, de nombreux facteurs de risques ont été identifiés. Ils sont principalement environnementaux, tels que l'exposition au benzène, les radiations ionisantes ou encore le tabagisme actif (probablement en raison de la présence de benzène dans la fumée de cigarette). D'autres produits font l'objet de controverses comme les pesticides, les produits de colorations capillaires ou encore les solvants en général. L'exposition à certains champs magnétiques est également évoquée (4,6,7). D'autres part, certaines pathologies congénitales, telles que l'anémie de Fanconi, la trisomie 21, les syndromes de Diamond-Blackfan et Shwachmann-Diamond s'accompagnent d'un risque accru (5).

1.1.4. Circonstances de découverte et manifestations cliniques

Les SMD sont souvent découverts de façon fortuite lors d'un bilan biologique de routine. Les signes cliniques, essentiellement liés aux cytopénies, sont peu spécifiques, inconstants et de sévérité variable. On peut retrouver :

- des troubles liés à l'anémie : pâleur, asthénie progressive, tachycardie. Ce sont les plus fréquents ;
- des infections, associées à la neutropénie ;
- des signes hémorragiques - notamment des purpuras - liés à la thrombopénie.

On observe également, parfois, une splénomégalie palpable ou encore des manifestations auto-immunes telles que des arthropathies, des vascularites, des polychondrites ... (2,4,8,9).

L'examen clinique et l'interrogatoire doivent donc s'attacher à évaluer les éléments suivants (10):

- le retentissement des cytopénies, qui doit tenir compte de l'âge du patient et de ses co-morbidités,
- l'ancienneté de ces cytopénies, ce qui permet d'apprécier l'évolutivité de la maladie,
- la présence éventuelle de signes dysimmunitaires,
- l'exposition à des facteurs de risques : chimiothérapie, radiothérapie, exposition au benzène etc.

1.1.5. Diagnostic biologique

1.1.5.1. Hémogramme

Le premier critère biologique pour le diagnostic est la présence d'une ou plusieurs cytopénie(s) persistante(s) depuis au moins six mois. Les seuils consensuels, issus du score IPSS (International Prognostic Scoring System), sont les suivants :

- une hémoglobine inférieure à 11g/dL,
- des polynucléaires neutrophiles (PNN) inférieurs à 1,5 G/L,
- des plaquettes inférieures à 100 G/L.

L'anémie est l'anomalie la plus fréquente - on la retrouve dans plus de 80% des cas - elle est en générale arégénérative, normo ou macrocytaire. L'hémogramme doit aussi s'attacher à rechercher la présence de blastes - qui va orienter immédiatement le diagnostic vers une

forme de haut grade - ainsi que celle d'une monocytose significative (>1G/L) qui va faire évoquer un syndrome mixte myéloprolifératif/myélodysplasique de type Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique (LMMC) (2,11).

Il faut également noter qu'en cas de co-critères spécifiques associés, tels que des anomalies en cytométrie en flux ou encore en biologie moléculaire, un diagnostic de SMD peut être posé devant une cytopénie datant de moins de 6 mois.

Outre l'aspect quantitatif, l'examen du frottis sanguin peut montrer des anomalies cytologiques même si elles sont presque toujours « moins intenses » que dans la moelle osseuse. Cela tient autant au fait que seules les cellules matures accèdent à la circulation sanguine - restreignant de fait la diversité des anomalies pouvant être observées - que d'un effet de sélection positive pour les cellules les moins anormales ayant réussi leur maturation terminale. On peut donc parfois observer (4,12) :

- quelques anomalies peu spécifiques des globules rouges : anisocytose, poïkylocytose, présence de ponctuations cytoplasmiques basophiles,
- une anisocytose plaquettaire avec des plaquettes géantes et parfois la présence de micromégacaryocytes,
- des anomalies affectant la lignée granuleuse : hypogranulation (très spécifique), persistance de plages cytoplasmiques basophiles (corps de Döhle), hyposegmentation nucléaire avec parfois des aspects de type pseudo-Pelger-Huet, anomalies de condensation de la chromatine...

1.1.5.2. Myélogramme

L'analyse de la cytologie médullaire est un examen central dans les SMD que ce soit pour éliminer des diagnostics différentiels, pour affirmer le diagnostic de myélodysplasie, pour classer la pathologie ou encore en évaluer le pronostic. Les deux paramètres importants dans ce contexte sont le nombre de blastes et l'existence éventuelle d'anomalies morphologiques signant la dysplasie.

Dans ces pathologies la moelle présente habituellement une richesse normale ou augmentée - contrastant avec les cytopénies observées en périphérie - d'où le qualificatif de « pancytopenies à moelle riche » qui leur a parfois été donné. On retrouve néanmoins une moelle hypoplasique chez 10% des patients. Dans ce dernier cas, il faut envisager le recours à une biopsie ostéo-médullaire (BOM) (4,12).

1.1.5.2.1. Anomalies morphologiques

Les anomalies morphologiques vont toucher une ou plusieurs des lignées hématopoïétiques : on parle de dysmégacaryopoïèse dans le cas des mégacaryocytes, de dysérythroïèse dans le cas de la lignée rouge et de dysgranulopoïèse pour les granuleux. Les dystrophies observées peuvent être très variées et elles n'ont pas toutes la même significativité. L'OMS considère qu'une lignée est dysplasique lorsque les anomalies sont observées sur au moins 10% des cellules de cette lignée (5).

Pour évaluer une éventuelle dysmégacaryopoïèse l'OMS recommande de s'intéresser à au moins 30 cellules. Les dystrophies observables affectent ici essentiellement le noyau. Ainsi on recherchera les mégacaryocytes présentant une hypo et surtout une monolobulation qui peut orienter vers une SMD de type 5q-. A l'inverse on peut aussi observer des cellules à noyaux arrondis, multiples et bien séparés, on parle alors de mégacaryocytes en « sac de billes ». Il faut également s'attacher à rechercher les micromégacaryocytes qui se présentent comme des cellules de petite taille avec un noyau à chromatine dense, un cytoplasme peu abondant et souvent entouré de plaquettes (4,5,12). La Figure 2 illustre quelques-unes de ces anomalies.

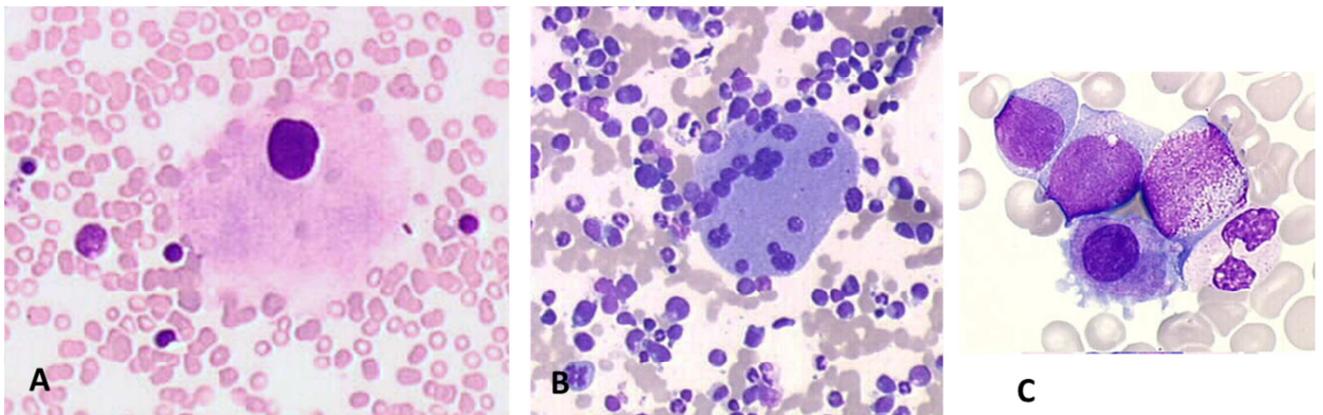


Figure 2 : Quelques images de dysmégacaryopoïèse: monolobulation (A), mégacaryocyte en sac de billes (B), micromégacaryocyte (C) (13)

Une dysérythroïèse (Figure 3) est observée dans la plupart des cas. Là encore ce sont les anomalies nucléaires qui sont les plus spécifiques. On peut ainsi noter des contours irréguliers voire bosselés, des bourgeonnements nucléaires, des aspects binucléés voire multinucléés. Le cytoplasme, quant à lui, peut-être de coloration hétérogène - traduisant un défaut d'hémoglobinisaison - ce qui se manifeste par des aspects feuilletés. On peut également observer des vacuoles cytoplasmiques correspondant à des mitochondries

balonisées, des corps de Howell-Jolly, des ponctuations cytoplasmiques basophiles ou encore des aspects mégaloblastiques avec des formes géantes (4,5,12,13).

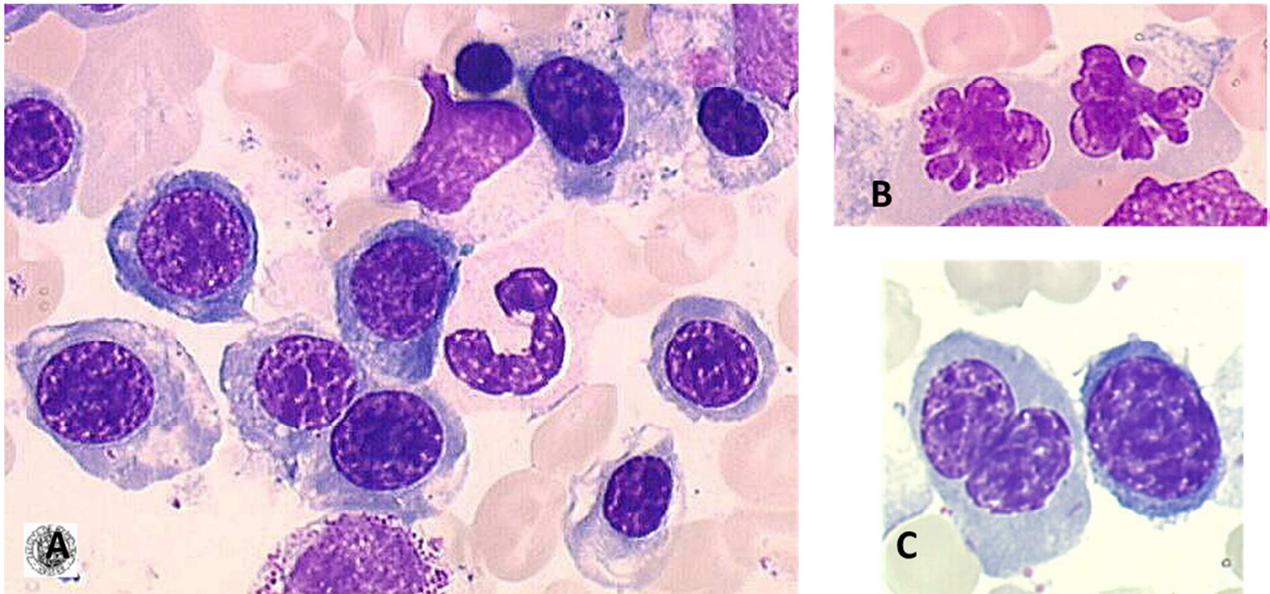


Figure 3: Quelques images de dysérythropoïèse: cytoplasmes feuilletés et vacuolisés (A), bourgeonnements nucléaires (B), érythroblaste géant binucléé (C) (13)

La dysgranulopoïèse se manifeste, quant à elle, à la fois par des atteintes cytoplasmiques et nucléaires. Au niveau cytoplasmique, on peut observer des éléments hypogranulaires (peu spécifiques) voire agranulaires (très spécifiques) ce qui peut parfois rendre leur identification difficile. On peut également noter une anisocytose ainsi que la présence de granules de Chediak-Higashi (volumineuses granulations azurophiles). Les anomalies nucléaires peuvent être de deux types, souvent associés : on peut tout d'abord observer une condensation imparfaite de la chromatine avec présence de mottes très denses séparées par des zones plus claires ; on peut d'autre part constater des anomalies de segmentation, qui peuvent se traduire, d'une part, par des lobes anormaux - au niveau de leur taille ou de leur forme hétérogène – et, d'autre part, par des anomalies de nombre avec parfois des polynucléaires bilobés - d'aspect pseudo-Pelger-Huët - ou à l'inverse, par des formes hypersegmentées (4,5,12,13). La Figure 4 illustre quelques-unes de ces anomalies.

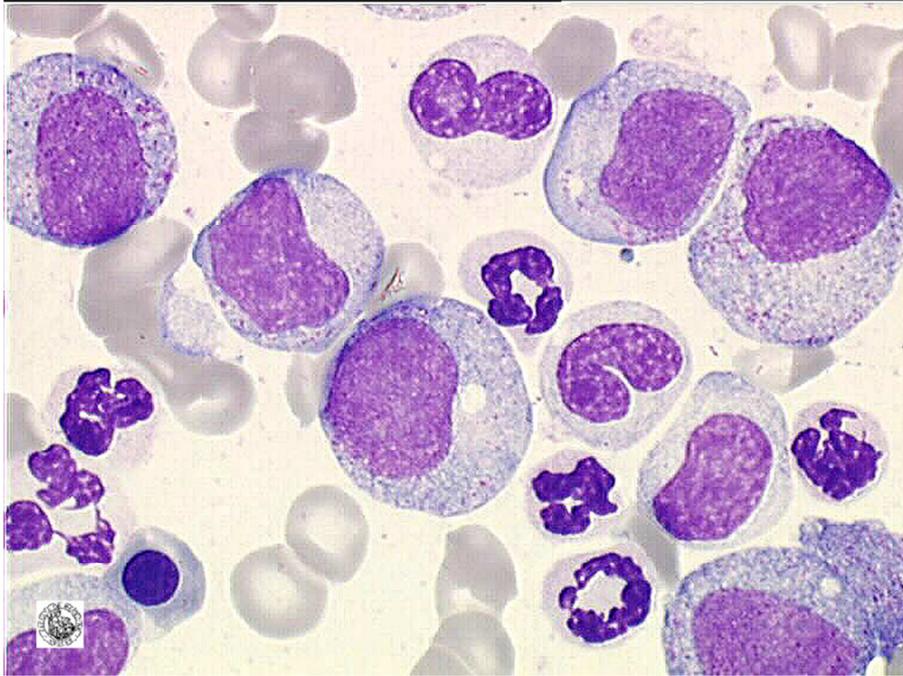


Figure 4 : Exemple de dysgranulopoïèse (13)

1.1.5.2.2. Décompte des blastes

Le décompte des blastes est essentiel et doit être fait de façon rigoureuse. En effet c'est l'un des piliers de la classification OMS, c'est également un critère majeur de gravité et enfin, s'il atteint 20% cela signe l'évolution en LAM. Par conséquent il est recommandé d'effectuer le décompte sur 500 éléments afin d'être le plus juste possible (5).

1.1.5.2.3. Bilan

L'évaluation des dystrophies sur le myélogramme est essentielle et déterminante mais elle est parfois délicate et subjective. Quelques règles sont donc à observer :

- évaluer les dysplasies sur au moins 30 mégacaryocytes, 200 leucocytes et 200 érythroblastes (recommandations du Groupe Français des Myélodysplasies (GFM)),
- effectuer le compte de blastes sur au moins 500 éléments,
- prendre en compte la spécificité variable des anomalies selon le type et la lignée considérés : la dysmégaryopoïèse (micromégacaryocytes et aspects de type 5q-) a la plus forte significativité, suivie par la dysgranulopoïèse (éléments

agranulaires et hyposégmentation) puis la dysérythropoïèse qui est peu spécifique (4).

Au final l'étude de la cytologie médullaire doit s'attacher à évaluer le plus précisément possible :

- le nombre de lignées atteintes,
- la proportion d'éléments atteints dans une lignée,
- le type d'anomalie morphologique,
- l'intensité de ces anomalies,
- le décompte de blastes.

Afin d'améliorer la standardisation une grille a été proposée dans les années 1990 par G.Flandrin puis adaptée par le Groupe Français des Myélodysplasies (GFM). Les anomalies morphologiques sont cotées sur 2 points :

- 0 : absence d'anomalies,
- 1 : dysplasies présentes chez plus de 10% des cellules,
- 2 : dysplasies présentes chez plus de 50% des cellules.

Cette grille est disponible sur le site du GFM.

1.1.5.3. Cytochimie

Le seul examen cytochimique utile dans le diagnostic des SMD est la coloration de Perls qui doit être effectuée systématiquement (10). Elle permet de détecter les sidéroblastes - c'est à dire les érythroblastes contenant du fer extra-hémique dans leur cytoplasme - grâce à une coloration au bleu de Prusse qui colore en bleu-vert les vacuoles chargées de fer. On définit trois types de sidéroblastes :

- sidéroblastes de type I : contenant 1 à 5 granules,
- sidéroblastes de type II : contenant au moins 5 granules mais sans répartition périnucléaire,
- sidéroblastes de type III ou sidéroblastes en couronne (ring sideroblast en anglais) : ils correspondent aux sidéroblastes présentant plus de 5 granules entourant le noyau sur au moins un tiers de sa circonférence (Figure 5).

Un excès de sidéroblastes en couronne supérieur à 15% - décomptés sur au moins 100 sidéroblastes - est un argument diagnostique et permet de différencier les anémies

réfractaires des anémies sidérolastiques en l'absence de signes de dysplasie associés (4,5,12).

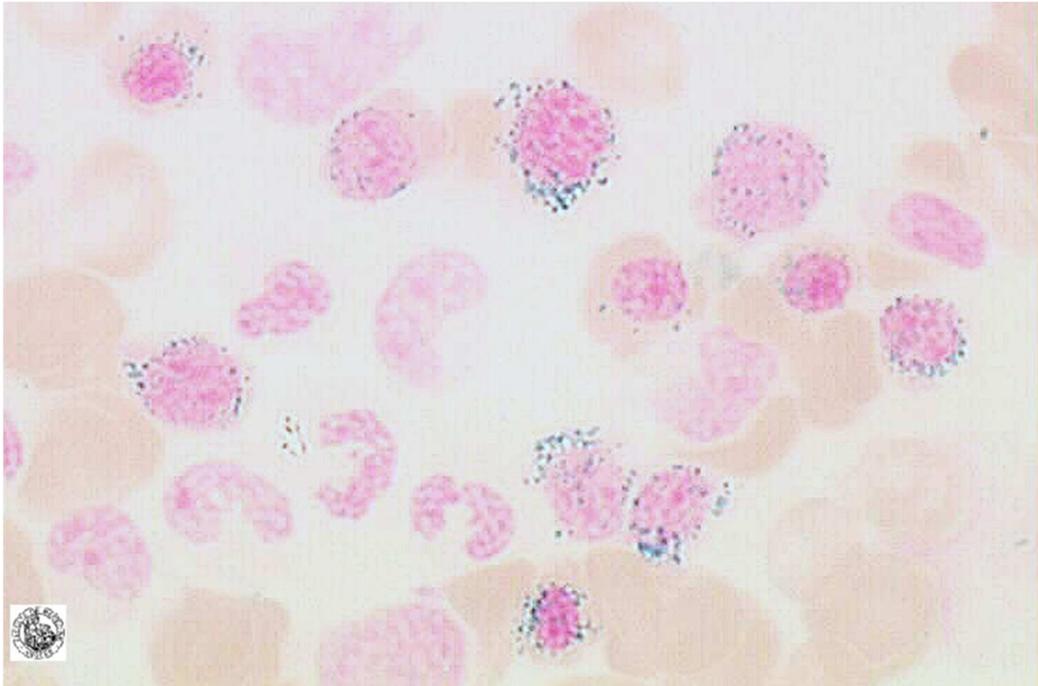


Figure 5 : Coloration de Perls avec présence de sidérolastiques de type III (13)

1.1.5.4. Cytogénétique

La cytogénétique est essentielle dans les syndromes myélodysplasiques pour plusieurs raisons (5,12,14):

- elle peut permettre d'affirmer une clonalité et donc jouer un rôle déterminant dans le diagnostic,
- elle est importante pour la classification, en effet l'entité SMD 5q- est définie sur un critère cytogénétique (cf. infra),
- elle est déterminante pour l'évaluation du pronostic (cf. infra),
- elle peut servir de marqueur pour suivre l'efficacité thérapeutique.

Un caryotype médullaire devrait donc être réalisé dans tous les cas de SMD, sauf peut-être chez les sujets très âgés chez qui le diagnostic est certain et pour lesquels le résultat n'influera pas sur la prise en charge (10).

On estime que des anomalies cytogénétiques clonales sont observées dans environ 50% des cas de SMD (Tableau 1), les anomalies les plus fréquentes étant la délétion du bras long du chromosome 5 del(5q), la monosomie 7, la délétion du bras long du

chromosome 7 del(7q), la trisomie 8 et la délétion du bras long du chromosome 20 del(20q) (5,12).

D'un point de vue analytique, au moins 20 à 25 métaphases devraient être analysées et décrites selon les normes de l'ISCN (International System for human Cytogenetic Nomenclature). Dans le cas où l'analyse cytogénétique classique n'est pas possible ou a échoué, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est recommandée en complément. Cette dernière est, par ailleurs, plus sensible et permet notamment de détecter des anomalies chez plus de 15% des patients atteints de SMD et présentant un caryotype normal.

Anomalie	Fréquence dans les SMD	Fréquence dans les t-SMD
Non équilibrées		
trisomie 8 *	10%	
monosomie 7 ou del(7q)	10%	50%
monosomie 5 ou del(5q)	10%	40%
del(20q) *	5-8%	
perte du 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%	
Equilibrées		
t(11;16)(q23;p13.3)		3%
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2%
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%	
t(2;11)(p21;q23)	1%	
inv(3)(q21q26.2)	1%	
t(6;9)(p23;q34)	1%	
* La présence de ces anomalies comme seules anomalies cytogénétiques et en l'absence de critère morphologique ne peut être considérée comme un critère définitif de SMD. En revanche, dans le cas de cytopénies persistantes, les autres anomalies mentionnées ici sont considérées comme des critères présomptifs de SMD et ce même en l'absence de dysplasies.		

Tableau 1 : Anomalies chromosomiques récurrentes dans les SMD (5)

Ces dernières années de nouvelles techniques ont été développées, telle que la SNP (Single Nucleotid Polymorphism) et permettent, d'après diverses études, la mise en évidence d'anomalies chromosomiques non détectées par les techniques conventionnelles. Elles ne sont pour l'instant pas utilisées en routine.

1.1.5.5. Cytométrie en flux (CMF)

Bien que reconnue comme un co-critère par l'OMS, la cytométrie en flux n'est actuellement pas recommandée en France dans le diagnostic des SMD (5,10). Elle sera abordée plus en détail dans une autre partie de notre travail.

1.1.5.6. Biopsie ostéo-médullaire (BOM) et histologie

La Biopsie ostéo-médullaire, et son corollaire l'analyse histopathologique, présentent quelques avantages par rapport au myélogramme (1) :

- ils permettent d'apprécier exactement la richesse médullaire et le degré de fibrose,
- les anomalies morphologiques de la lignée mégacaryocytaire sont beaucoup plus visibles,
- ils peuvent mettre en évidence une augmentation de l'angiogenèse,
- un immunomarquage dirigé contre le marqueur CD34 pourra montrer une répartition anormale des progéniteurs médullaires, qui peuvent se retrouver localisés au sein de logettes au lieu d'être situés contre les travées osseuses. Ce signe est appelé ALIP (Abnormal Localisation of Immature Precursor) et semble être un marqueur pronostic de la transformation en LAM (4). Il faut néanmoins noter que tous les blastes n'expriment pas le CD34.

En France, la BOM n'est pas recommandée pour le diagnostic des SMD, sauf devant un myélogramme pauvre rendant le diagnostic différentiel difficile avec une aplasie ou un myélofibrose (10).

1.1.5.7. Autres examens biologiques

D'autres examens biologiques sont nécessaires, certains pour exclure des diagnostics différentiels et d'autres dans la perspective du traitement (Tableau 2).

Diagnostiques différentiels	Biochimie	<ul style="list-style-type: none"> • bilan martial : fer sérique + transferrine • recherche de carences : vitamine B12 sérique + folates sériques et érythrocytaires • recherche d'une insuffisance rénale : créatininémie • bilan biologique hépatique • recherche d'un syndrome inflammatoire : CRP • recherche d'une hémolyse : haptoglobine + bilirubine • recherche d'une pathologie thyroïdienne : dosage de la TSH
	Virologie	<ul style="list-style-type: none"> • sérologie VIH • sérologie hépatite B • sérologie hépatite C
En vue du traitement		<ul style="list-style-type: none"> • phénotypage érythrocytaire : chez tous les patients • typage HLA du patient et de sa fratrie : si une allogreffe ou une chimiothérapie intensive sont envisagées • dosage d'EPO : dans les SMD de faible risque ou de risque intermédiaire 1

Tableau 2 : Examens biologiques complémentaires à réaliser dans les SMD (10)

1.1.5.8. Bilan : Critères diagnostiques

Le diagnostic de SMD est fréquemment difficile à poser. En effet, non seulement l'évaluation cytologique des anomalies est subjective, mais en plus, une authentique dysplasie peut aussi être le résultat d'une somme d'autres facteurs, sans lien avec une pathologie clonale. On peut citer notamment (5) :

- les carences en vitamines B12 et/ou folates,
- l'exposition à des métaux lourds, en particulier l'arsenic,
- un certain nombre de médicaments courants, en particulier le cotrimoxazole qui peut être à l'origine d'une hypolobulation marquée non différenciable de celle observée dans les SMD,
- certaines affections hématologiques congénitales,
- les infections à Parvovirus B19,
- les chimiothérapies cytotoxiques,
- etc.

Dans ce contexte des critères précis ont été établis. Ils sont présentés dans le Tableau 3 (1,11).

Critères prérequis
<ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie(s) persistante(s) (>6mois en théorie) • Exclusion des autres causes potentielles de cytopénies/dysplasies
Critères décisifs = critères liés aux SMD
<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie significative (>10%) sur au moins une des 3 lignées • Sidéroblastes en couronne >15% • Blastos médullaires compris entre 5 et 19% • Anomalie cytogénétique (caryotype standard ou FISH)
Co-critères
<ul style="list-style-type: none"> • Immunophénotypage anormal en CMF • Signes moléculaires de la présence d'une population médullaire clonale (toute technique de biologie moléculaire) • Anomalies fonctionnelles des cellules souches médullaires : diminution de leur capacité à former des colonies cellulaires (culture cellulaire)

Tableau 3 : Critères diagnostic dans les SMD

Plusieurs cas sont donc possibles (1,11) :

- présence des critères prérequis et d'au moins un critère décisif : le diagnostic de SMD peut être établi ;
- présence des critères prérequis, sans critère décisif, mais avec au moins un co-critère : il faut conclure à un SMD très probable ;
- présence uniquement des critères prérequis : on parle d'ICUS (Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance) devant une cytopénie persistante sans cause évidente ou d>IDUS (Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance) en présence d'une dysplasie d'origine indéterminée. Cela peut être le signe d'un état pré-SMD et ces patients devront faire l'objet d'un suivi attentif en répétant les examens afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic.

1.1.6. Classification

1.1.6.1. Classification FAB

La première vraie classification est celle du groupe Franco-Américano Britannique, dite FAB (Tableau 4). Apparue en 1976, et revue en 1982, elle a prédominé jusqu'au début des années 2000.

Elle définit 5 catégories en se basant sur l'évaluation de 3 critères (15,16) :

- la dysplasie médullaire,
- le pourcentage de blastes médullaires,
- le pourcentage de blastes dans le sang périphérique.

Catégorie	Dysplasie médullaire	Pourcentage de blastes médullaires	Pourcentage de blastes dans le sang
Anémie réfractaire (AR)	Erythrocytaire	<5	<1
Anémie réfractaire avec sidérobastes en couronne (ARS)	Erythrocytaire	<5	<1
Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB)	2 ou 3 lignées	5-20	0-4
Anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (AREB-T)	Habituellement 2 ou 3 lignées	21-30	≥5
Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)	Variable	<20	Monocytes > 1G/L

Tableau 4 : Classification FAB des SMD(15)

Au fil du temps, cette classification a montré plusieurs limites dont voici quelques exemples (15):

- elle ne prend pas en compte la cytogénétique,
- certains patients atteints de SMD présentent des dysplasies sur plusieurs lignées tout en ayant un pourcentage de blastes médullaires inférieur à 5%,
- le pourcentage de blastes médullaires s'est révélé corrélé au pronostic alors que la classification FAB ne prend en compte que les seuils de 5 et 20%,
- plusieurs études ont montré que le pronostic ainsi que la réponse au traitement des patients atteints d'AREB-T étaient identiques à ceux atteints de LAM,
- etc.

1.1.6.2. Classification OMS

Le principe de la classification OMS (Tableau 5) est d'utiliser toutes les informations disponibles : morphologie, compte de blastes mais aussi clinique, génétique, immunophénotypage etc. Introduite en 2001, elle a été révisée en 2008 et c'est elle qui est utilisée à l'heure actuelle.

Pathologie	Dans le sang	Dans la 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"> Monocytopénie ou bicytopénie¹ Absence ou rares blastes (<1%)² 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie unilignée : ≥10% des cellules de la lignée sont dysplasiques <5% de blastes <15% des érythroblastes 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 érythrocytaire isolée <5% de blastes ≥15% des érythroblastes sont des sidéroblastes en couronne
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (CRDM)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) Absence ou rares blastes (<1%)² Pas de corps d'Auer Monocytes <1G/L 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie sur au moins 10% des cellules dans 2 ou 3 des lignées myéloïdes (neutrophiles et/ou érythroblastes et/ou mégacaryocytes) <5% de blastes Pas de corps d'Auer +/- 15 % de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec excès de blastes – 1 (AREB-1)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) < 5% de blastes Pas de corps d'Auer Monocytes <1G/L 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie unilignée ou multilignée 5-9% de blastes Pas de corps d'Auer
Anémie réfractaire avec excès de blastes – 2 (AREB-2)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) 5-19% de blastes +/- corps d'Auer Monocytes <1G/L 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie unilignée ou multilignée 10-19% de blastes +/- corps d'Auer³
Syndromes myélodysplasiques inclassables (SMD-I)	<ul style="list-style-type: none"> Cytopénie(s) ≤ 1% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> Dysplasie évidente affectant moins de 10% des cellules d'une ou plusieurs lignées myéloïdes Anomalie cytogénétique considérée comme évocatrice de SMD (cf. Tableau 1) <5% de blastes
Syndrome myélodysplasique associé à une del5q isolée	<ul style="list-style-type: none"> Anémie Nombre de plaquettes normal ou augmenté Absence ou rares blastes (<1%) 	<ul style="list-style-type: none"> Mégacaryocytes en nombre normal ou augmenté avec un noyau hypolobé <5% de blastes Del(5q) isolée Pas de corps d'Auer

1 : Des bicytopénies peuvent être parfois observées. Les pancytopénies doivent être considérées comme des SMD-I.
2 : Si le pourcentage de myéloblastes médullaires est <5%, mais que le pourcentage de myéloblastes sanguins est compris entre 2 et 4%, le diagnostic est celui d'une AREB-1. Les cas de CRDU et de CRDM avec 1% de myéloblastes sanguins doivent être considérés comme des SMD-I.
3 : Les cas associant corps d'Auer, <5% de myéloblastes sanguins et <10% de blastes médullaires doivent être considérés comme des AREB-2.

Tableau 5 : Classification OMS des SMD (5)

La classification OMS a également introduit un nouveau groupe distinct de pathologies: les syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques dits SMP/SMD. Toutes les maladies regroupées dans cet ensemble associent une composante proliférative portant principalement sur les globules blancs ou les plaquettes (mais sans chromosome Philadelphie ni réarrangement BCR-ABL) et une composante dysplasique plus ou moins marquée, responsable d'une ou plusieurs cytopénies. La plus fréquente de ces pathologies est la LMMC qui était auparavant associée aux SMD, notamment dans la classification FAB (4).

Pathologie	Dans le sang	Dans la moelle
Leucémie myélomonocytaire -1 (LMMC-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Monocytes >1G/L de façon persistante • Absence de transcrite BCR-ABL • <5% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de chromosome Philadelphie • Dysplasie sur au moins une des lignées myéloïdes* • <10% de blastes • Absence de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB
Leucémie myélomonocytaire -2 (LMMC-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Monocytes >1G/L de façon persistante • Absence de transcrite BCR-ABL • <20% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de chromosome Philadelphie • Dysplasie sur au moins une des lignées myéloïdes* • 10-19% de blastes ou blastes moins nombreux mais comportant des corps d'Auer • Absence de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB
Leucémie myéloïde chronique atypique (Très rare)	<ul style="list-style-type: none"> • Leucocytes \geq 13 G/L avec prédominance de granuleux • Myélemie > 10% • Dysgranulopoïèse • < 10% de monocytes • Absence de transcrite BCR-ABL • < 20% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de chromosome Philadelphie • Hyperplasie granuleuse • Dysplasie granuleuse +/- autre(s) lignée(s) • <20% de blastes • Absence de réarrangement PDGFRA ou PDGFRB
Leucémie myélomonocytaire juvénile	<ul style="list-style-type: none"> • Monocytes >1G/L de façon persistante • Absence de transcrite BCR-ABL • <20% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de chromosome Philadelphie • Dysplasie sur au moins une des lignées myéloïdes • <20% de blastes
SMP/SMD inclassables	Association de caractères myélodysplasiques et myéloprolifératifs sans réunir les critères des autres pathologies sus-mentionnées	
*En l'absence de signes significatifs de myélodysplasie, le diagnostic de LMMC peut être posé si on retrouve soit une anomalie cytogénétique ou moléculaire clonale acquise, soit une monocytose persistante depuis au moins 3 mois après en avoir éliminé les autres causes potentielles.		

Tableau 6 : Classification OMS des syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (4,5)

1.1.7. Scores de pronostic

Du fait de l'hétérogénéité des SMD l'espérance de vie des patients peut varier de quelques mois à des décennies. Les classifications permettent de définir des groupes de pathologies avec des caractères communs mais il est nécessaire de leur adjoindre une évaluation complémentaire du pronostic pour adapter au mieux la prise en charge.

1.1.7.1. Score IPSS (International Pronostic Scoring System)

Apparu en 1997 le score IPSS est resté longtemps le score de référence. Il est d'ailleurs encore utilisé aujourd'hui en pratique courante pour le choix des traitements, malgré ses limites. Il permet de définir 4 catégories de risques (Tableau 9) : faible, intermédiaire 1, intermédiaire 2 et élevé en se basant sur l'évaluation de 3 paramètres (Tableau 8) :

- le nombre de cytopénies,
- le pourcentage de blastes médullaires,
- la cytogénétique (Tableau 7).

Catégorie	Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Anomalies cytogénétiques	<ul style="list-style-type: none"> • Normal • -Y • Del(5q) • Del(20q) 	Autres anomalies	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du chromosome 7 • Caryotype complexe (≥ 3 anomalies)

Tableau 7 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS (5)

Points	0	0,5	1	1,5	2
Pourcentage de blastes médullaires	<5%	5-10%		11-19%	20-30%
Caryotype	Favorable	Intermédiaire	Défavorable		
Cytopénie(s)*	0 ou 1	2 ou 3			
*Hémoglobine<10g/dL, Polynucléaires neutrophiles<1,8G/L, Plaquettes<100G/L					

Tableau 8 : Calcul du score IPSS (5,17)

Groupe de Risque	Score IPSS	Médiane de survie (années)
Faible	0 point	5,7
Intermédiaire 1	0,5 à 1 point	3,5
Intermédiaire 2	1,5 à 2 points	1,1
Elevé	≥ 2,5 points	0,2

Tableau 9 : Groupes de risque issus du score IPSS et médiane de survie (18,19)

Bien qu'étant encore très utilisé, le score IPSS présente quelques défauts (4,20) :

- il n'est utilisable qu'au diagnostic et pour les patients présentant un SMD primaire non encore traité,
- les SMD présentant plus de 20% de blastes médullaires sont désormais classés dans la catégorie des LAM ce qui rend son usage un peu désuet,
- il ne prend pas en compte la profondeur des cytopénies et notamment les besoins transfusionnels.

Pour toutes ces raisons, d'autres scores ont été proposés par plusieurs équipes.

1.1.7.2. Score WPSS (WHO-based Pronostic Scoring System)

Le score WPSS (Tableau 11) est lui aussi basé sur l'évaluation de 3 paramètres (Tableau 10) mais avec quelques différences par rapport à l'IPSS :

- le pourcentage de blastes est remplacé par le type de SMD selon la classification OMS, ce qui permet une stratification plus fine. En effet celle-ci prend en compte, outre le nombre de blastes, l'importance des dysplasies ;
- une plus grande importance est donnée à la cytogénétique ;
- il intègre la dépendance transfusionnelle qui reflète mieux l'importance des cytopénies.

Points	0	1	2	3
Catégorie OMS	CRDU, ARS, Syndrome 5q-	CRDM	AREB-1	AREB-2
Caryotype ¹	Favorable	Intermédiaire	Défavorable	
Besoins transfusionnels en Globules rouges ²	Non	Oui		

¹ Pour le caryotype ce sont les mêmes critères que ceux du score IPSS
² Au moins un culot globulaire toutes les huit semaines pendant 4 mois.

Tableau 10 : Calcul du score WPSS (17)

Groupe de Risque	Score WPSS	Médiane de survie (années)
Très faible	0 point	> 10
Faible	1 point	8 - 9
Intermédiaire	2 points	4,5 - 5,5
Elevé	3 - 4 points	1,8 – 2,5
Très élevé	5 - 6 points	0,5 – 1

Tableau 11 : Groupes de risque issus du score WPSS et médiane de survie (19)

1.1.7.3. Score IPSS-R (Score IPSS Révisé)

Un nouveau score de référence (Tableau 13 et Tableau 14) a été publié en 2012 par Greenbergen *et al.* (21). Il présente les caractéristiques suivantes :

- tout comme le score IPSS il n'est utilisable qu'au diagnostic et pour les patients présentant un SMD primaire non encore traité,
- il prend en compte un plus grand nombre d'anomalies cytogénétiques et permet donc de mieux stratifier le risque qui leur est associé (Tableau 12),
- à la différence du score IPSS, il comprend la profondeur des cytopénies, définies sur des critères biologiques et non cliniques comme dans le cas du score WPSS,
- il intègre le taux de blastes à partir de 2%, ce qui peut apparaître peu pertinent compte tenu de l'incertitude de mesure associée à l'évaluation du nombre de blastes par le cytologiste pour les valeurs inférieures à 5%,
- il définit 2 sous-groupes supplémentaires aux extrémités : très bon pronostic et très mauvais pronostic.

Catégorie	Très bon	Bon	Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
Anomalies cytogénétiques	-Y Del(11q)	Normal Del(5q) Del(12p) Del(20q) 2 anomalies incluant la del(5q)	Del (7q) Trisomie 8 Trisomie 19 Autres anomalies isolées ou 2 clones indépendants	-7 Inv(3), t(3q), del(3q) Anomalie double incluant -7/del(7q) Complexe : 3 anomalies	Complexe > 3 anomalies

Tableau 12 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS-R (21)

Points	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogénétique	Très bon		Bon		Intermédiaire	Mauvais	Très mauvais
%^{age} de blastes médullaires	≤ 2%		>2%-<5%		5-10%	>10%	
Hémoglobine (g/dL)	≥10		≥8-<10	<8			
Plaquettes (G/L)	≥100	≥50-<100	<50				
PNN (G/L)	≥0,8	<0,8					

Tableau 13 : Calcul du score IPSS-R (17,21)

Groupe de Risque	Score IPSS-R	Médiane de survie (années)
Très faible	≤ 1,5 point	8,8
Faible	2 - 3 points	5,3
Intermédiaire	3,5 – 4,5 points	3,0
Elevé	5 - 6 points	1,6
Très élevé	> 6 points	0,8

Tableau 14 : Groupes de risque issus du score IPSS-R et médiane de survie (21)

1.1.7.4. Autres scores

D'autres scores, moins utilisés, ont également été développés tels que le MD Anderson Lower-Risk Prognostic Scoring System (LR-PSS) ou le MD Anderson Comprehensive Scoring System (MDA-CSS) (19). Ils ne seront pas développés ici.

1.1.8. Traitement

Du fait de la diversité des pathologies et des pronostics, il ne peut être envisagé, à l'heure actuelle, une approche thérapeutique unique vis-à-vis des SMD. En effet comme le montre une étude de Malcovati *et al.* (22), les patients de plus de 70 ans atteints de formes de bas grade telles que les anémies réfractaires ou les syndromes 5q- ne présentent pas de réduction significative de leur espérance de vie par rapport à la population générale. Dans ces situations les traitements vont donc avoir comme principal objectif de maintenir la qualité de vie. A l'inverse, chez les sujets jeunes et/ou atteints de formes de haut grade, il faudra opter pour une approche curative.

1.1.8.1. Traitements symptomatiques

L'anémie est l'atteinte la plus fréquente et, en première intention, il faudra envisager un traitement par érythropoïétine (EPO), associée ou non à des facteurs de croissance granulocytaires (GCS-F). L'action de l'EPO est limitée dans le temps - avec une durée médiane d'échappement de 24 mois - et elle est variable selon les patients. Elle est généralement peu efficace lorsque le taux d'EPO endogène est supérieur à 500 U/L. Si l'anémie n'est pas suffisamment corrigée, il faudra envisager de recourir aux transfusions de concentrés érythrocytaires. Dans ce cas, il faudra surveiller la survenue d'une éventuelle surcharge martiale et mettre en place un traitement chélateur si besoin. Il est à noter que c'est le retentissement clinique de l'anémie et non le taux d'hémoglobine en lui-même qui va justifier le recours à une transfusion (2,4,14).

Dans le cas de la neutropénie, l'intérêt des facteurs de croissance n'est pas réellement démontré. En effet si l'utilisation de G-CSF permet de corriger la neutropénie dans environ deux tiers des cas, l'effet sur la diminution du risque infectieux et sur la survie n'est pas prouvé. On ne peut donc envisager leur usage que dans des cas très ciblés comme par exemple en cas d'épisodes infectieux graves chez des patients très neutropéniques. En cas d'infection les patients doivent être traités comme les autres sujets neutropéniques (4,14).

De la même façon, peu de molécules sont disponibles dans la thrombopénie : le Danazol peut être utilisé sur une courte période avec un taux de réponse de 30%, quant aux analogues du récepteur de la thrombopoïétine - tels que le romiplostim - ils doivent encore faire l'objet d'essais cliniques concluants dans cette indication. Le recours aux transfusions plaquettaires doit être limité à des indications très précises.

1.1.8.2. Immunomodulateurs

Chez un certain nombre de patients, les SMD semblent être associés à une dérégulation immunologique. En effet, on retrouve parfois des manifestations auto-immunes associées et, d'autre part, certaines publications décrivent une augmentation ou une dérégulation de l'activité T-cytotoxique qui pourraient contribuer à l'inhibition de l'hématopoïèse (23,24). Ces constats pourraient expliquer l'efficacité de certains traitements immunomodulateurs.

Le sérum anti-lymphocytaire, seul ou associé à la ciclosporine, donne 10 à 30% de réponses, à type d'amélioration des cytopénies. Son usage devrait être limité aux sujets

relativement jeunes (moins de 60 ans), sans excès de blastes, avec une maladie récente (4,14).

Le lénalidomide (Revlimid®) apparaît lui particulièrement intéressant dans les SMD de type syndrome 5q-. En effet, chez les patients atteints, l'anémie semble répondre dans environ 75% des cas. Néanmoins, du fait de l'importance des cytopénies induites à l'initiation du traitement et des réserves émises par l'agence européenne du médicament (EMA) sur les risques de progression de la maladie, le lénalidomide ne devrait être utilisé que chez certains types de patients et uniquement en cas d'échec des traitements par EPO (4,14).

1.1.8.3. Place de la chimiothérapie

L'introduction de la chimiothérapie intensive dans les SMD remonte aux années 1980. Désormais ses indications tendent à se réduire et elle est surtout réalisée avant une allogreffe, chez les patients avec un excès de blastes médullaires, et en l'absence de caryotype défavorable (4).

Par contre, depuis la fin des années 2000, une nouvelle classe thérapeutique bénéficie d'une AMM dans les SMD : les agents hypométhylants, représentés principalement par l'azacitidine (Vidaza®). Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas encore totalement compris, ces molécules - en agissant sur la méthylation de l'ADN - influent sur l'expression de différents gènes (4). Le taux de réponse à ces traitements – objectivé par une indépendance transfusionnelle – est estimé à 45% avec une durée médiane de réponse de 13 mois (14). Ils sont devenus le traitement de première ligne de référence dans la grande majorité des SMD de haut risque, y compris jusqu'à un âge avancé (4).

1.1.8.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques

A ce jour, seule l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est susceptible d'aboutir à une guérison et tout doit donc être mis en œuvre pour qu'elle puisse être envisagée. Sa toxicité et les complications potentielles sont également bien connues et elle doit donc être précédée d'une évaluation rigoureuse du rapport bénéfice risque (Cf. Figure 6).

Jusqu'à la fin des années 1990, les patients âgés de plus de 55 ans n'étaient qu'exceptionnellement allogreffés du fait de l'importante mortalité précoce, qui pouvait atteindre 30 à 40% dans les 3 mois suivant la greffe. Aujourd'hui l'amélioration de la qualité

des soins et le développement des nouveaux conditionnements, dits atténués, permet de greffer des patients plus âgés (4).

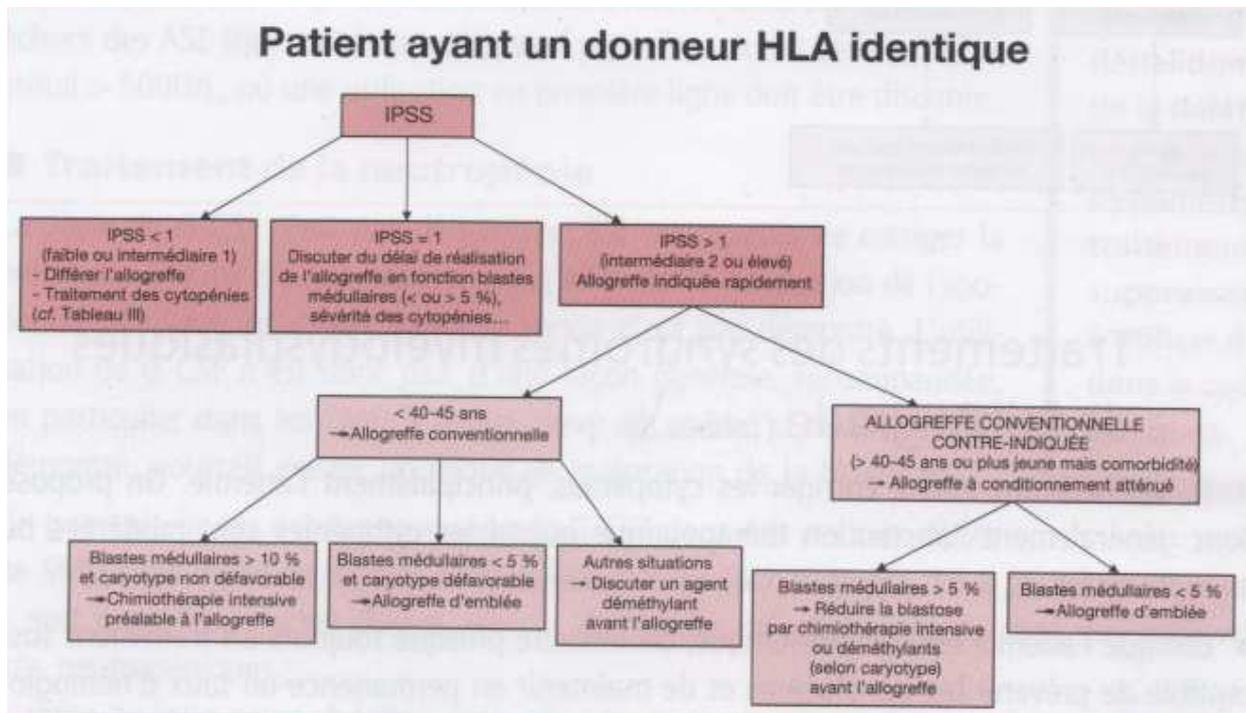


Figure 6 : Place de l'allogreffe dans les SMD (4)

Du fait de l'hétérogénéité des SMD, les protocoles peuvent varier sur les points suivants (4):

- faire précéder ou non l'allogreffe d'une chimiothérapie intensive,
- recourir rapidement à la greffe, sans chimiothérapie préalable, ou au contraire la différer dans le temps,
- le choix du greffon qui doit mettre en balance, d'un côté la recherche de l'effet GVL (Graft Versus Leukemia) pour prévenir le risque de rechute, et de l'autre, le risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVH).

1.1.8.5. Bilan : arbres décisionnels

Chez les patients pour qui l'allogreffe n'est pas l'option retenue, on peut appliquer la hiérarchisation thérapeutique présentée dans la Figure 7 et la Figure 8, en distinguant les formes de bas risque et celles de risque élevé.

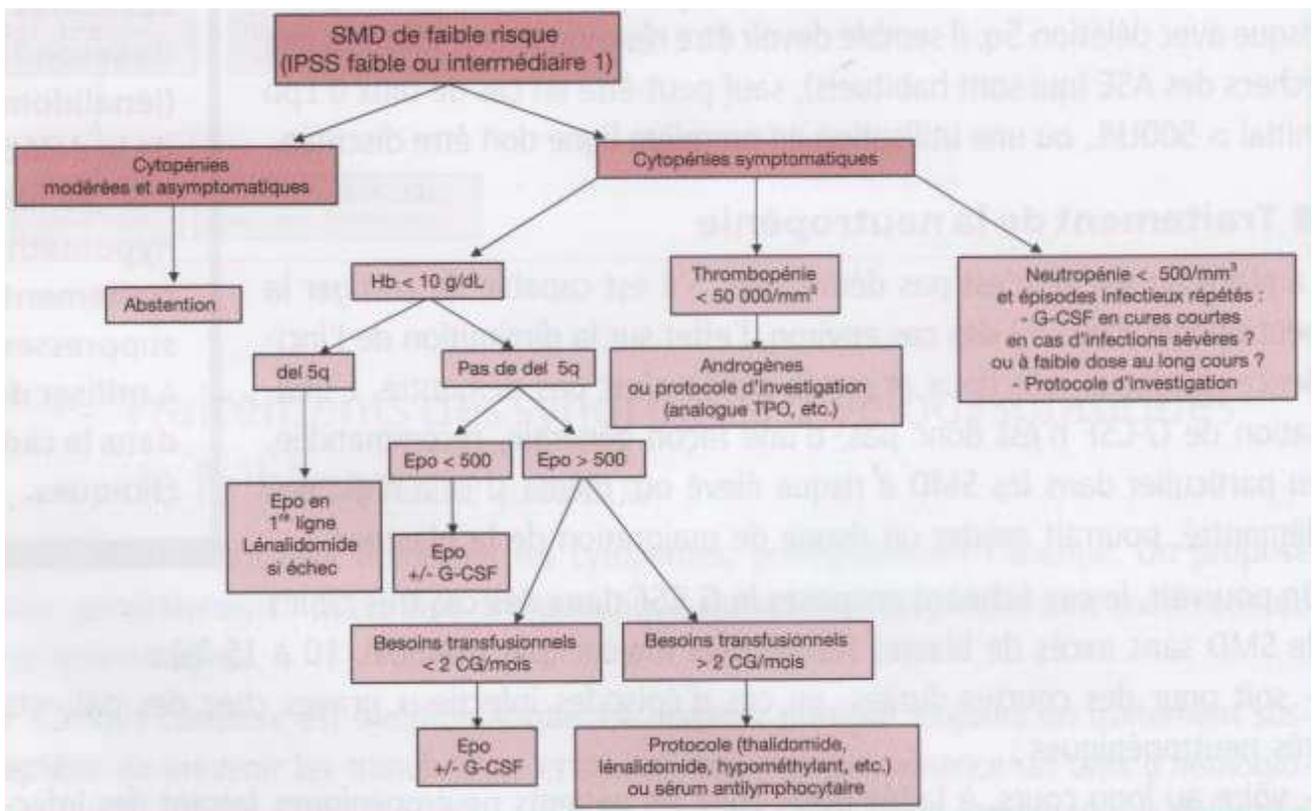


Figure 7 : Protocole de traitement des patients atteints de SMD de faible risque (4)

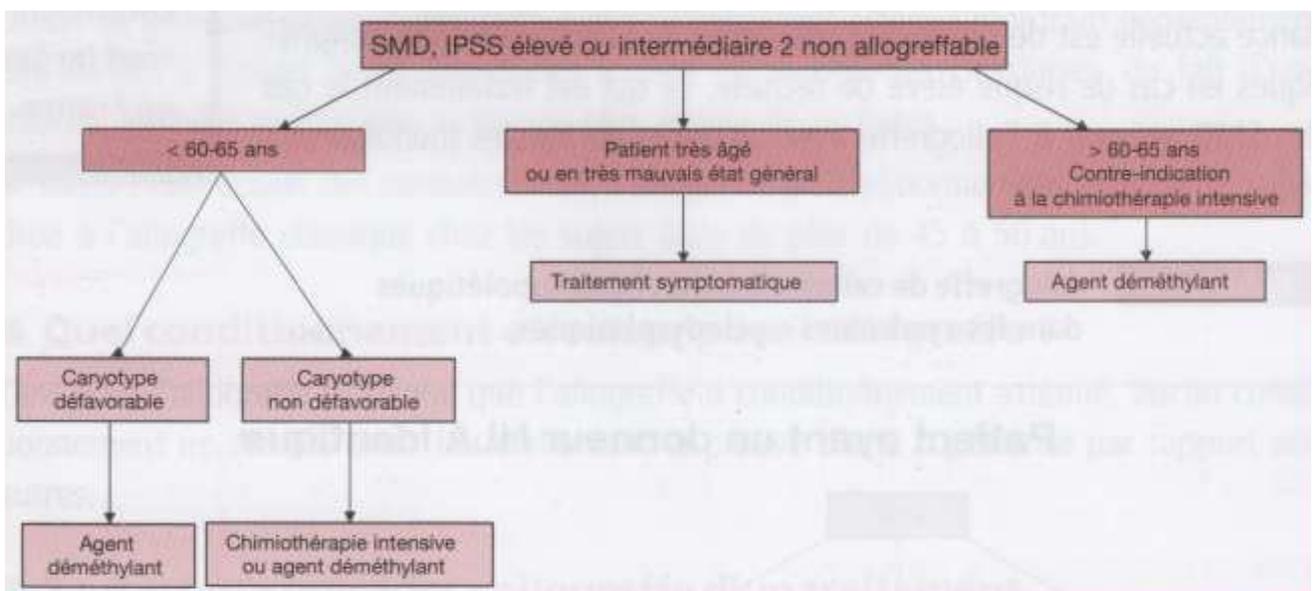


Figure 8 : Protocole de traitement des patients atteints de SMD de risque élevé (4)

1.2. La cytométrie en flux (CMF)

1.2.1. Composition du système

La cytométrie en flux permet d'étudier les paramètres physiques et biologiques de chaque cellule individuellement, puis, en regroupant les informations issues d'un très grand nombre de cellules, d'en déduire les caractéristiques de la population étudiée. Pour cela le système se décompose schématiquement en 3 éléments (Figure 9):

- un système fluide : il a pour objectif d'une part d'aligner les cellules les unes derrière les autres dans une veine liquide et, d'autre part, de permettre le passage d'un maximum de cellules en un minimum de temps ;
- un système optique : il a pour but de transformer les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en informations lumineuses mesurables ;
- un système électronique : il va permettre de convertir les différents signaux lumineux en données informatiques exploitables par le biologiste.

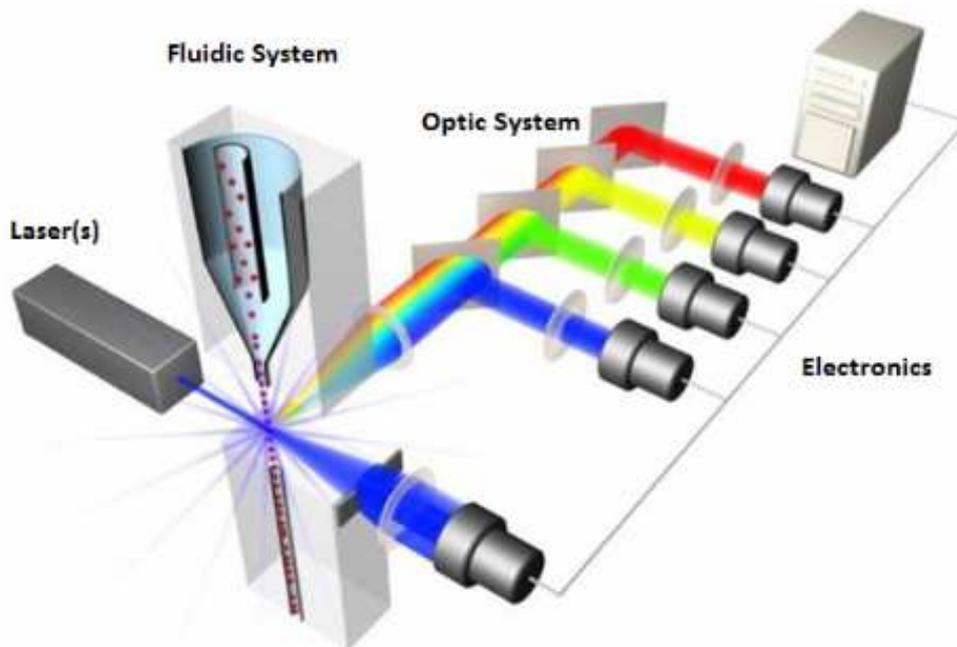


Figure 9 : Schéma général d'un cytomètre en flux (25)

1.2.1.1. Système fluide et focalisation hydrodynamique

Avant toute analyse de CMF les cellules sont d'abord mises en suspension. L'échantillon est ensuite introduit, grâce à un injecteur, au centre d'une buse contenant un liquide dit de gaine s'écoulant à un débit constant. Le diamètre de la buse se réduisant petit à petit, la vitesse d'écoulement va donc progressivement augmenter pour atteindre plusieurs mètres par seconde au niveau de l'orifice. Cette accélération du liquide de gaine va entraîner une séparation des cellules qui vont ainsi pouvoir défiler les unes derrière les autres, de manière rapide et régulière, à la sortie. Ce phénomène, illustré par la Figure 10, est appelé focalisation hydrodynamique (26,27).

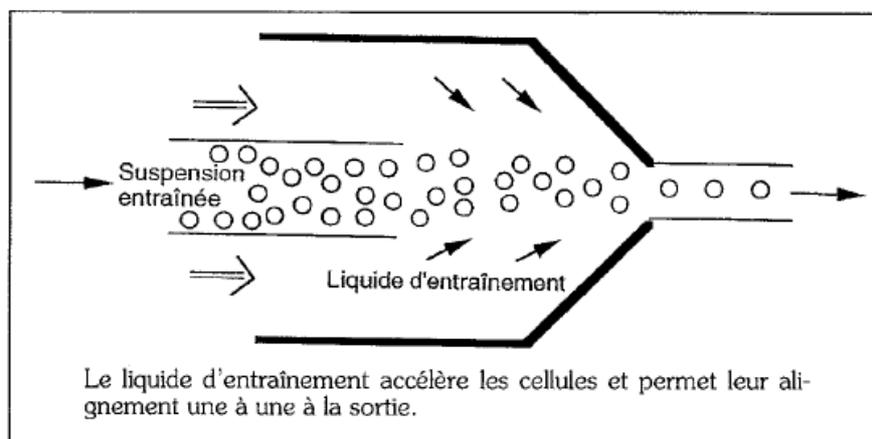


Figure 10 : Focalisation hydrodynamique (27)

1.2.1.2. Système optique

1.2.1.2.1. Excitation lumineuse

Une fois alignées au sein du flux les cellules vont passer chacune leur tour devant un faisceau laser ce qui va permettre de générer 3 grands types d'informations lumineuses (26,27) :

- la diffusion aux petits angles, forward scatter (FS ou FSC) en anglais : Elle est collectée dans l'axe du faisceau laser et correspond à la diffraction de la lumière lors du passage des cellules devant le faisceau. Elle est donc liée à la taille des cellules (Figure 11) ;
- la diffusion aux grands angles, side scatter (SS ou SSC) en anglais : Elle est collectée perpendiculairement au faisceau laser et correspond à la lumière

diffusée par les éléments intracellulaires. Elle est donc liée à la granulosité et au contenu cellulaire (Figure 11) ;

- la fluorescence, également collectée perpendiculairement au faisceau laser. Lorsqu'il y a présence d'anticorps marqués, fixés à la surface des cellules, les fluorochromes qui leur sont associés vont être excités par le laser et émettre en retour une fluorescence de longueur d'onde spécifique. La nature et l'intensité de cette fluorescence sont donc liées au type et au nombre d'anticorps fixés sur la cellule. Ainsi, pour mettre en évidence des caractères phénotypiques précis au sein d'une population cellulaire, il faudra au préalable incuber l'échantillon en présence - par exemple - d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes et dirigés contre les antigènes d'intérêt.

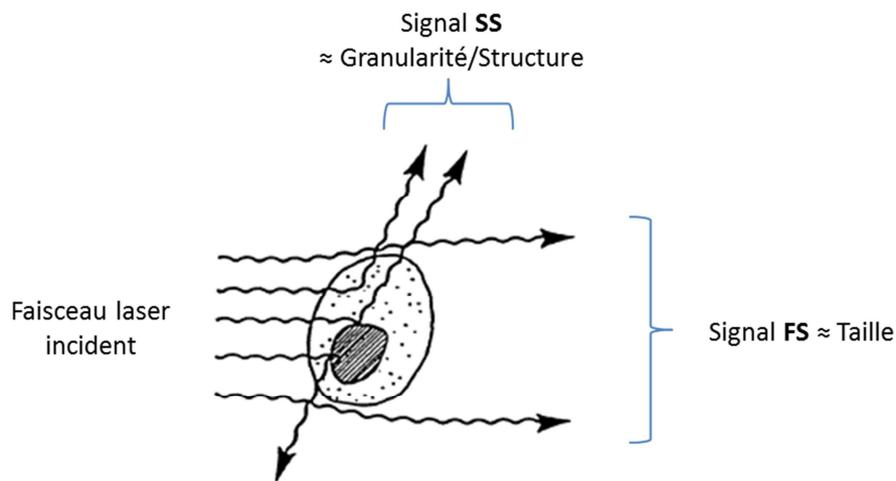


Figure 11 : Différents modes de dispersion de la lumière par la cellule (28)

1.2.1.2.2. Banc optique

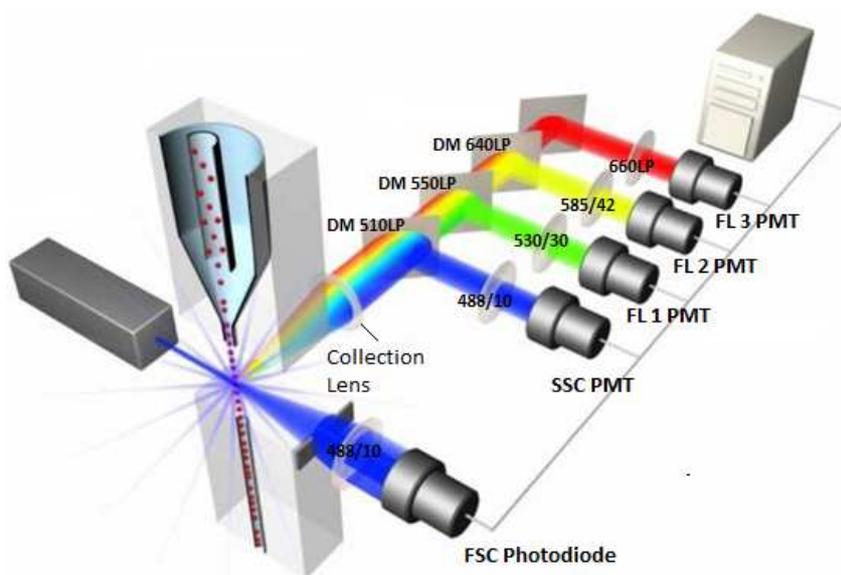


Figure 12 : Schéma général d'un banc optique (25)

Le banc optique (Figure 12) a pour objectif de séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence et d'acheminer chacune d'entre elles vers un détecteur dédié. Pour cela il va combiner essentiellement deux types d'éléments dits diviseurs optiques (26) :

- des miroirs dichroïques : ils ont la propriété de laisser passer certaines longueurs d'onde et d'en réfléchir d'autres. Ainsi, par exemple, un miroir dichroïque passe-bas de 560 transmet les longueurs d'onde inférieures à 560 nm et réfléchit les autres. Ce type de diviseur optique va permettre de diriger la longueur d'onde d'intérêt vers le détecteur tout en laissant passer les autres ;
- des filtres optiques (Figure 13) : ils vont permettre de « purifier » la lumière envoyée vers le détecteur en ne sélectionnant que la gamme de longueurs d'onde à mesurer. On peut combiner des filtres passe-haut qui laissent passer la lumière au-dessus d'une certaine longueur d'onde, des filtres passe-bas qui laissent passer la lumière au-dessous d'une certaine longueur d'onde et des filtres passe-bande qui laissent passer la lumière comprise entre 2 longueurs d'onde.

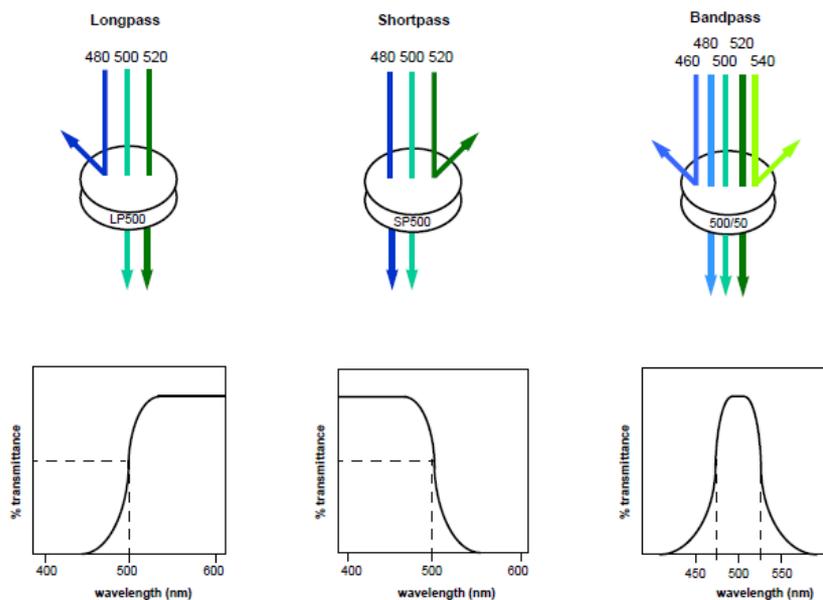


Figure 13 : Différents types de filtres pouvant être utilisés (28)

1.2.1.3. Système électronique

Une fois sélectionnés, les photons issus des différentes longueurs d'onde vont venir frapper un détecteur – une photodiode ou un photomultiplicateur (PMT) – ce qui va générer un courant électrique. Ce dernier est alors converti en données électroniques grâce à un convertisseur analogique-numérique (26).

1.2.2. Traitement des données

1.2.2.1. Compensation du signal

Les données collectées vont parfois devoir faire l'objet de compensations et ce, en raison de la conjonction de deux éléments :

- premièrement, les fluorochromes utilisés n'émettent pas un seul type de photon de longueur d'onde donnée mais présentent au contraire un spectre d'émission plus ou moins large. De ce fait, lorsqu'ils sont combinés, leurs spectres risquent de se chevaucher générant ainsi des interférences ;
- deuxièmement, le système optique décrit plus haut ne permet de sélectionner que des plages de longueurs d'onde, augmentant ainsi le risque que plusieurs des fluorochromes utilisés n'émettent de la lumière au sein de cet intervalle, comme l'illustre la Figure 14.

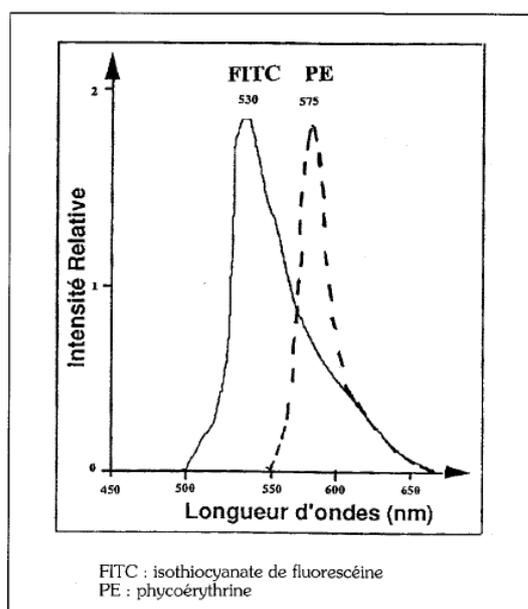


Figure 14 : Comparaison des spectres d'émission du FITC et de la PE (27)

Il résulte de tout ceci que certains fluorochromes vont émettre des photons qui seront captés par des PMT qui ne leur étaient pas destinés. Ainsi, si nous prenons l'exemple d'un signal fort émis par FITC, celui-ci est mesuré comme prévu par un PMT_A . Néanmoins, il peut être associé à un autre signal au niveau d'un PMT_B - mesurant par exemple l'intensité de la PE - sans que la cellule étudiée ne soit couplée à la moindre molécule de PE. Il va donc falloir compenser le signal, c'est-à-dire soustraire informatiquement de l'intensité mesurée par le PMT_B un certain pourcentage de l'intensité mesurée par le PMT_A , ce pourcentage correspondant à l'interférence (Cf Figure 15).

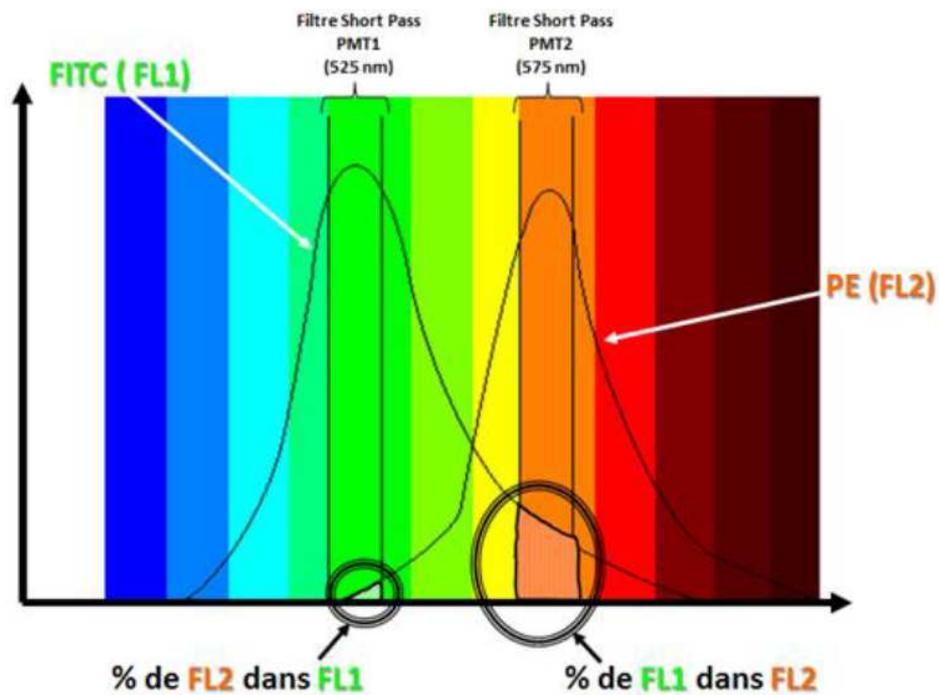


Figure 15 : Exemple de compensation entre les fluorochromes FITC et PE (d'après Beckman Coulter®)

Si le principe apparaît simple, les choses se complexifient rapidement lorsque l'on associe de nombreux fluorochromes, comme l'illustre la Figure 16.

Le réglage des compensations - qui doit être effectué lors de la mise au point de chaque protocole de CMF - est donc tout à fait essentiel car un signal mal compensé peut être à l'origine de résultats complètement erronés.

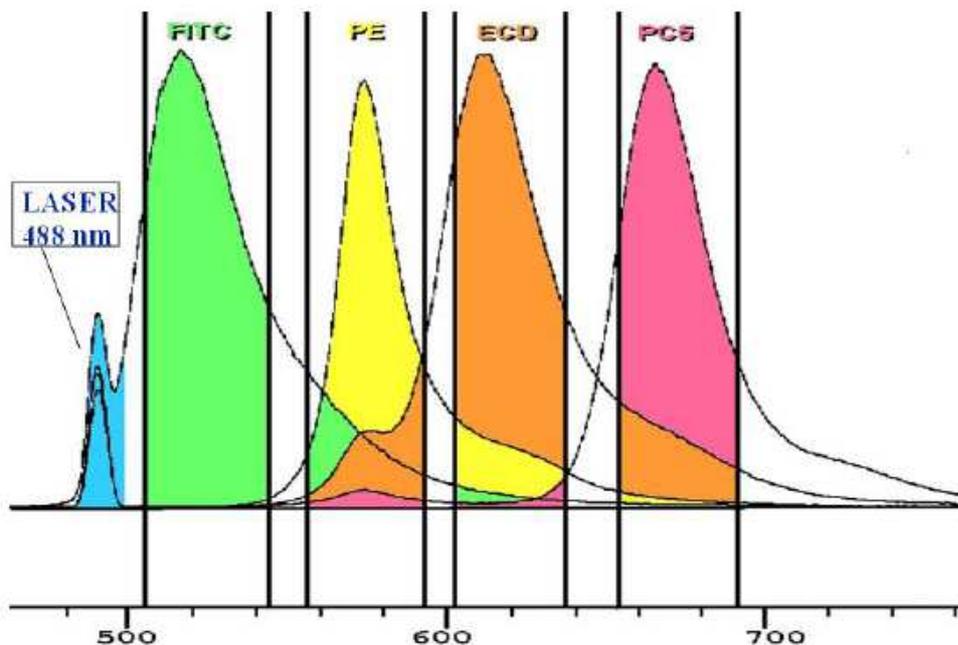


Figure 16 : Exemple de chevauchement des spectres d'émission de plusieurs fluorochromes (d'après Beckman Coulter®)

1.2.2.2. Exploitation des données

Les informations provenant de 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) (28). Ces fichiers LMD ou FCS peuvent par la suite être modifiés et retraités grâce à des logiciels informatiques spécifiques comme Kaluza®, Infinicyt®, Flow Jo®, CXP® ou Diva®. Plusieurs représentations sont possibles mais les 2 plus classiques sont les suivantes (Figure 17) :

- des histogrammes bi-paramétriques, où chaque cellule est représentée par un point dont les coordonnées dépendent de l'intensité d'expression de chacun des 2 marqueurs étudiés. On obtient ainsi des nuages de points ou « dot-plots ». Ces histogrammes permettent, entre autre, de mettre en évidence et de fenêtrer - on parle de « gating » - différentes populations cellulaires ;
- des histogrammes monoparamétriques représentant l'intensité de fluorescence en abscisse et le nombre d'événements en ordonnée.

Les logiciels sont ensuite capables de récupérer différentes données statistiques afférentes aux populations étudiées : moyenne, médiane, mode, CV, etc.

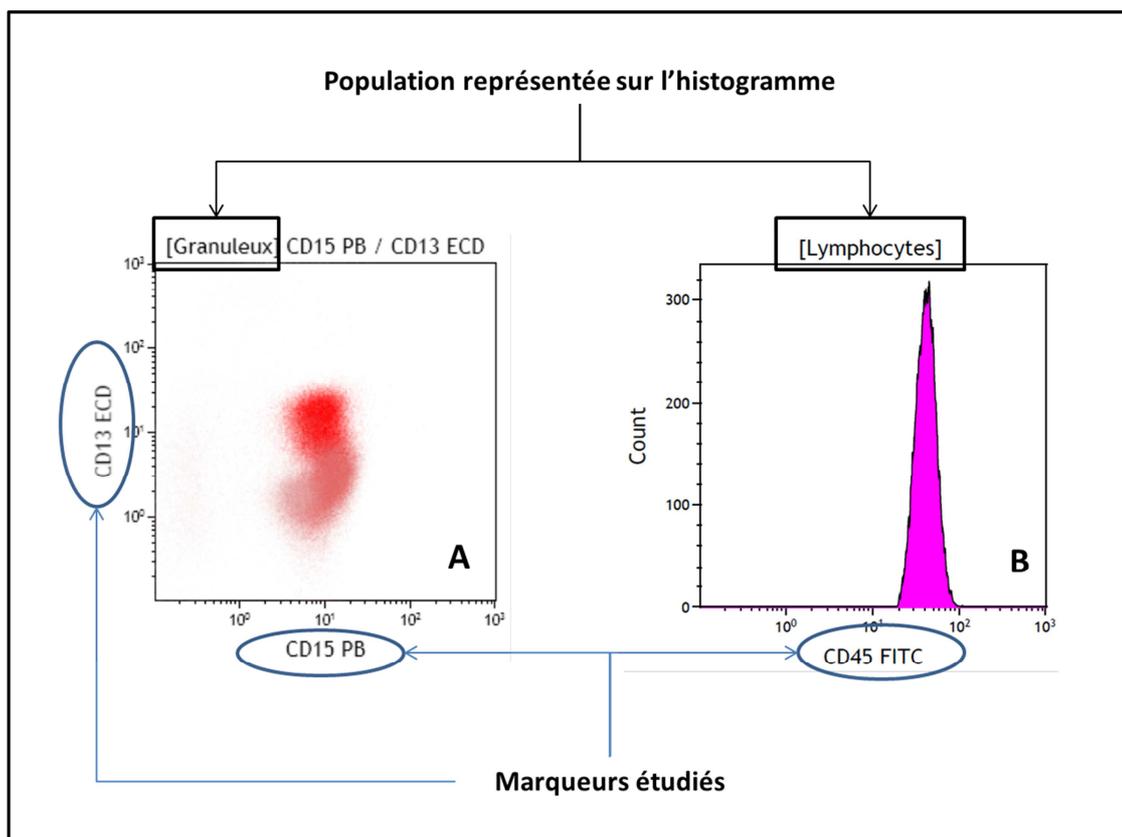


Figure 17 : Exemple d'un histogramme bi-paramétrique (A) et d'un histogramme mono-paramétrique (B)

1.2.3. La cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques

1.2.3.1. Intérêt de la CMF dans les SMD

1.2.3.1.1. Intérêt diagnostic

Dans les SMD, la CMF semble tout d'abord présenter un intérêt diagnostic. En effet, s'il est relativement facile d'évoquer l'hypothèse d'un SMD, le diagnostic de certitude peut être difficile à poser, notamment en l'absence de blastes, et lorsque les anomalies cytologiques sont frustrées et ne portent que sur une fraction minoritaire des cellules. Le caryotype peut prouver l'existence d'une anomalie clonale et ainsi confirmer l'existence de la myélodysplasie mais il est souvent normal dans les formes de bas grade, précisément celles pour lesquelles le diagnostic est le plus délicat. Dans ce contexte, la cytométrie en flux, qui étudie le phénotype d'un grand nombre de cellules, s'est imposée en tant que co-critère intéressant dans le diagnostic de ces pathologies. Au cours des années 2000, de nombreuses études ont ainsi été conduites (29–38). Elles ont clairement indiqué que cette approche était pertinente et que l'on pouvait identifier des anomalies spécifiques sur les compartiments matures ou immatures de plusieurs lignées cellulaires, comme l'illustre le Tableau 15.

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.

Tableau 15 : Anomalies identifiées par CMF au cours des SMD (39)

Néanmoins, aucun marqueur unique ne semble permettre de caractériser les SMD et l'association d'anomalies multiples a montré une meilleure valeur prédictive que la présence d'éléments isolés. Dans ce contexte de nombreux systèmes de score, présentés dans le Tableau 16, ont été proposés. Ils sont très divers, que ce soit par le protocole, l'origine de l'échantillon (sang ou moelle osseuse), les combinaisons de marqueurs – allant de 1 à plus de 15 – ou encore les lignées hématopoïétiques auxquelles ils s'intéressent. Leurs spécificités respectives s'échelonnent de 83 à 100% et leur sensibilité de 41 à 100%, ce qui illustre bien la pertinence de l'usage de la CMF dans ces pathologies. Néanmoins du fait du nombre de marqueurs ou des stratégies d'analyses employés, peu d'entre eux sont compatibles avec une utilisation en routine au sein des laboratoires ce qui encourage à poursuivre les recherches.

Table 4. Summary of scoring models for flow cytometric evaluation of dysplasia

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> ⁶²	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> ²⁵	D	26/20/16	MatMy (blood)	1	> 15	90	73	++
2006	Della Porta <i>et al.</i> ⁵⁶	D	104/69/19	Ery	1	6	98.5	>95	+
2006	Ogata <i>et al.</i> ⁵²	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	Sato <i>et al.</i> ⁶³	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> ³⁵	D	134/106/0 multicenter	ImmatMy/ matMy/B	1+1	4	92-98	44-71	++
2009	Truong <i>et al.</i> ⁶⁴	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> ⁶⁵	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> ⁶⁰	P	33/4/16	MatMy/Mo (blood)	1	3	NE	NE	+
2004	Arroyo ⁸	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 : Résumé des scores de CMF développés dans les SMD (39)

1.2.3.1.2. Place de la CMF dans le pronostic et le suivi thérapeutique

Les outils classiques utilisés pour évaluer le pronostic des patients atteints de SMD, tels que les scores IPSS et WPSS, sont en partie subjectifs et manquent de sensibilité et de spécificité. La CMF pourrait donc avoir toute sa place pour contribuer à la stratification du risque. En effet, différentes études ont montré que les anomalies des lignées granuleuse et monocyttaire - identifiées par CMF - étaient corrélées aux scores pronostic IPPS et WPSS mais aussi à la dépendance transfusionnelle, ou encore à la survie sans progression (40–42). Les atteintes immunophénotypiques des progéniteurs myéloïdes semblent même avoir un impact indépendant sur le pronostic, et ce quel que soit le taux de blastes (41). Le nombre global d'anomalies identifiées apparaît, quant à lui, corrélé à la survie globale (43).

La cytométrie en flux peut également présenter un intérêt dans le monitoring des traitements, particulièrement lorsque d'autres examens tels que la cytogénétique sont normaux ou peu contributifs. En effet, au cours d'un traitement par chimiothérapie, le nombre et l'intensité des anomalies détectées par CMF semblent diminuer voire disparaître, leur persistance peut donc mettre en évidence l'inefficacité de la thérapeutique, ce qui peut alors permettre d'épargner au patient des molécules inactives et toxiques (44). D'autre part, les patients avec des taux sériques bas d'érythropoïétine (EPO) et qui ne présentent pas d'anomalies au niveau des précurseurs myéloïdes semblent avoir une forte probabilité de répondre aux facteurs de croissance. A l'inverse, lorsque les profils immunophénotypiques de ces progéniteurs sont aberrants, les chances de réponse semblent être considérablement réduites (45).

1.2.3.2. Problématiques

Malgré de multiples études montrant l'intérêt indéniable de la cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques, le cap du passage en routine dans les laboratoires d'hématologie peine à être franchi et ce pour plusieurs raisons (46,47).

Premièrement aucun paramètre unique ne semble spécifiquement associé aux SMD, ce qui complique de facto les stratégies d'analyses qui se doivent d'être multiparamétriques.

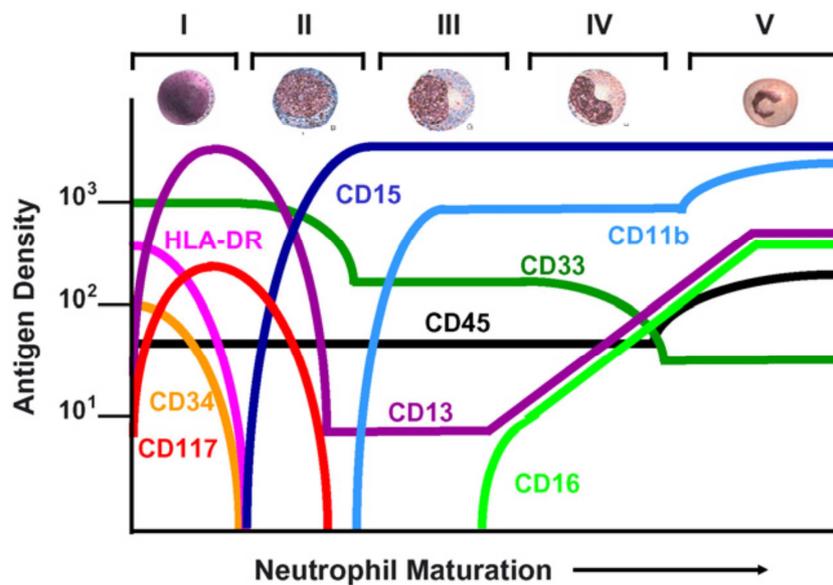
Deuxièmement, l'évaluation de la dysplasie érythrocytaire, qui est une composante majeure dans ces pathologies, est particulièrement difficile à établir, à la fois car elle nécessite des protocoles de préparation particuliers, mais aussi en raison du faible nombre de marqueurs spécifiques disponibles.

Troisièmement, les habitudes des laboratoires doivent être standardisées que ce soit au niveau du pré-analytique - comme par exemple l'anticoagulant choisi pour conserver le prélèvement - ou de l'analytique. En effet, certains éléments, tels que le mode de préparation de l'échantillon, peuvent très fortement impacter les résultats et ainsi le nombre et l'importance des anomalies détectées. Pour pallier ce problème, un certain nombre de recommandations ont été émises par l'European Leukemia Net (ELN) et sont détaillées dans le Tableau 17.

Paramètres	Recommandations
Type d'échantillon	Moelle osseuse
Anticoagulant utilisé pour conserver l'échantillon	Préférentiellement de l'héparine (alternative : EDTA)
Température de conservation	Température ambiante
Délai de réalisation	<24H
Prétraitement (optionnel ¹)	Lyse des érythrocytes avec du chlorhydrate d'ammonium (sans fixateur)
Tampon de lavage (optionnel ¹)	Phosphate-buffered saline (PBS) avec 0,5% d'albumine bovine ou issue de sérum humain
Coloration	Minimum 4 couleurs/anticorps Minimum 500 000 cellules incubées avec le mix d'anticorps
Préservation de l'expression de l'antigène après la coloration	Fixation par du paraformaldéhyde (0,5%)
Cellules myéloïdes immatures	Désignées progéniteurs plutôt que blastes
Doublets ²	Doivent être éliminés à l'aide d'un histogramme biparamétrique FSC hauteur/ FSC aire sous la courbe
Neutrophiles hypogranulaires ³	Evalués en comparant leur SSC (sur une échelle linéaire ou logarithmique) à celui des lymphocytes
Antigènes GPI dépendants (ie. CD14, CD16, CD24)	Expressions altérées en présence d'une Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne(HPN) sans porter atteinte au diagnostic de SMD
¹ Un coloration sans lyse ni lavage peut être utilisée, mais il faudra en tenir compte lors de l'interprétation de l'expression de marqueurs présents sur les érythrocytes matures, comme par exemple la glycophorine A. ² Cellules accolées qui n'ont pas été séparées lors du processus de focalisation hydrodynamique et qui sont donc passées simultanément devant le laser. ³ Ces cellules vont chevaucher les progéniteurs et/ou les monocytes et doivent être identifiées à l'aide de marqueurs appropriés.	

Tableau 17 : Recommandations générales de l'ELN pour l'étude des SMD par CMF

Quatrièmement, aucun consensus complet n'existe quant aux anticorps à sélectionner. En effet, ce choix peut vite devenir cornélien compte tenu du fait qu'il faut arriver à concilier deux contraintes opposées : suffisamment de marqueurs pour atteindre une bonne sensibilité et spécificité, mais pas trop non plus, pour pouvoir envisager un passage en routine sur les cytomètres en flux des laboratoires, sans avoir à effectuer des analyses pléthoriques nécessairement chronophages et dispendieuses. Pour choisir pertinemment les anticorps, il est nécessaire de déterminer d'abord des populations cibles. Ensuite il faut avoir à l'esprit que bien que les maturations - qu'elles soient myéloïdes, monocytaires ou érythrocytaires - sont hétérogènes, différents stades peuvent être définis grâce à des changements parmi les antigènes exprimés. Ainsi, les marqueurs choisis doivent permettre de sélectionner plusieurs stades de maturation des cellules d'intérêts avant d'autoriser l'identification d'éventuelles anomalies. Tout ceci nécessite bien évidemment de connaître au préalable la cinétique normale d'expression des différents antigènes au cours de la maturation (47). La Figure 18 illustre certaines de ces variations physiologiques au sein de la lignée myéloïde.



Stades → I : Myeloblasts, II : Promyelocytes, III : Myelocytes, IV Metamyelocytes, V : Polynucléaires neutrophiles

Figure 18 : Intensité d'expression de différents marqueurs myéloïdes au cours de la maturation granuleuse (47)

Bien qu'une grande latitude soit laissée aux différents laboratoires, un certain nombre de recommandations ont été émises par l'ELN quant aux choix des anticorps. Ainsi le groupe d'experts propose un panel de marqueurs de base à privilégier pour l'étude des différentes lignées (Cf. Tableau 18). Il considère par ailleurs que l'analyse cytométrique devrait a minima s'intéresser aux progéniteurs myéloïdes, et que l'étude de la maturation granuleuse devrait

systématiquement inclure les marqueurs CD13, CD11b et CD16 (39). Il constate enfin que le marqueur CD45 semble être un pivot dans toutes les combinaisons développées jusqu'à ce jour.

Table 3. Proposed core markers in the analysis of dysplasia by flow cytometry

<i>General core markers</i>	<i>Erythroid</i>	<i>Progenitors</i>	<i>Maturing neutrophils</i>	<i>Monocytes</i>
CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
-	CD71	-	-	-
-	CD235a	-	-	-
CD34	-	CD34	CD34	CD34
CD117	CD117	CD117	CD117	CD117
HLA-DR	-	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
CD11b	-	CD11b	CD11b	CD11b
CD13	-	CD13	CD13	CD13
CD16	-	-	CD16	CD16
CD33	-	-	CD33	CD33
CD14	-	-	CD14	CD14
-	CD36	-	-	CD36
-	-	-	CD64	CD64
CD7	-	CD7	-	-
CD56	-	CD56	CD56	CD56
CD19	-	CD19	-	-
-	-	CD5	-	-
-	-	-	-	CD2
-	-	CD15	CD15	-
-	-	-	CD10	-

Tableau 18 : Anticorps de base recommandés par l'ELN pour l'étude par CMF des différentes lignées (39)

Cinquième problématique évoquée ici : l'exploitation des données doit être suffisamment simple, objective et reproductible afin que tous les centres rendent des résultats identiques. L'approche la plus utilisée, pour évaluer la dysplasie myéloïde par CMF, est l'étude des patterns de différenciation. Cette méthode qualitative repose sur l'identification visuelle, par le biologiste, de déviations par rapport à des images de maturation normale. Or cette technique présente plusieurs points faibles. Elle est tout d'abord subjective, peu reproductible par essence, et ne peut être mise en œuvre que par des opérateurs très expérimentés. La définition de ce qu'est un pattern normal est par ailleurs délicate. Les approches quantitatives, moins utilisées, font également face à un certain nombre d'écueils. Une première façon de procéder consiste à déterminer le pourcentage de cellules positives pour un marqueur, dans ce cas la difficulté repose sur la définition du seuil qui est souvent tout à fait subjectif. Une méthode alternative consiste à exprimer les différents marqueurs par leur moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), définie comme le ratio entre la fluorescence mesurée pour un marqueur sur l'auto-fluorescence mesurée des cellules. Ce mode d'expression, très prometteur, nécessite néanmoins des cytomètres parfaitement standardisés or, les variations inhérentes aux

appareils et aux habitudes de réglages des photomultiplicateurs peuvent être à l'origine de différences significatives dans les données collectées (46). Ainsi peu de protocoles mis au point à ce jour semblent suffisamment simples et reproductibles pour être utilisés en routine par plusieurs laboratoires distincts, à l'exclusion du score d'Ogata.

1.2.3.3. Le score d'Ogata

Ogata *et al.* ont développé un score de CMF, validé ensuite conjointement avec une équipe italienne, permettant de distinguer les SMD de bas grade ne présentant pas de marqueur spécifique (cytogénétique ou coloration de Perls positive) des cytopénies non clonales. Il repose sur l'évaluation des 4 paramètres suivants (48):

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

Chaque paramètre anormal contribue à hauteur d'un point et le score est considéré comme positif s'il est supérieur ou égal à 2.

Le choix de ces 4 marqueurs est guidé par les raisons suivantes (48):

- dans les SMD si la proportion globale des blastes a tendance à augmenter, la composition en est modifiée. En effet, le taux de myéloblastes tend à croître alors que celui des progéniteurs B CD34+ tend lui à diminuer. Ainsi, l'étude séparée de ces 2 sous populations est plus précise et plus spécifique des variations observées au cours de ces pathologies. Il faut par ailleurs noter que leur ciblage à l'aide des marqueurs CD45, CD34 et SSC est relativement aisé et reproductible ;
- plusieurs études ont rapporté que l'expression du marqueur CD45 sur les myéloblastes avait tendance à augmenter ou diminuer chez les sujets atteints de SMD. Or l'expression du CD45 sur les lymphocytes étant supposée constante, et non affectée par la maladie, le calcul d'un rapport entre les 2 permet une standardisation tout en conservant l'information. Il faut néanmoins avoir à l'esprit que ce dernier postulat concernant les lymphocytes n'est pas

valable chez les patients atteints de lymphome B non Hodgkinien qui ne peuvent donc bénéficier du score d'Ogata ;

- l'hypogranulation est un phénomène bien connu dans les myélodysplasies et se retrouve dans une baisse du paramètre SS. D'autre part, selon plusieurs études, l'analyse du mode semble être plus discriminante que celle des autres données, telles que la moyenne ou la médiane. Enfin, ici encore, le fait d'ajuster ce paramètre au SS des lymphocytes permet de standardiser les résultats.

En 2012, une étude multicentrique a été conduite par l'ELN afin d'évaluer ce score à grande échelle. Une première cohorte, de 538 patients, a permis d'ajuster les valeurs de références des 4 paramètres utilisés - présentées dans le Tableau 19 - et un second groupe, de 259 individus, a servi à valider les performances. Sur cette dernière population, il a été retrouvé une sensibilité de 69% et une spécificité de 92% (49). Ainsi, bien que le score d'Ogata présente une facilité d'utilisation, une bonne reproductibilité et une spécificité très satisfaisante, sa sensibilité reste relativement moyenne.

Paramètres de CMF	Valeurs seuils	Nombre de points
Pourcentage de blastes myéloïdes CD34+ parmi les cellules nucléées	$\geq 2\%$	1
Pourcentage de progéniteurs lymphoïdes B CD34+ parmi les cellules CD34+	$\leq 5\%$	1
Rapport de la moyenne d'intensité de fluorescence du CD45 des lymphocytes sur celles des blastes myéloïdes CD34+	≤ 4 ou $\geq 7,5$	1
Rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes	≤ 6	1
Un diagnostic de SMD peut être formulé si le score est ≥ 2		

Tableau 19 : Calcul du score d'Ogata pour le diagnostic des SMD de bas grade (49)

1.3. Syndromes myélodysplasiques et ancre GPI

1.3.1. Ancre GPI et Hémoglobinurie paroxystique nocturne

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava-Micheli est une maladie rare de la cellule souche hématopoïétique qui se manifeste, dans sa forme la plus classique, par une anémie hémolytique accompagnée d'urines foncées le matin - en raison de l'hémoglobinurie – et parfois d'un ictère modéré (50).

Cette pathologie est due à une mutation du gène PIG-A impliqué dans la synthèse des molécules de glycoprophatidylinositol (GPI). Ces dernières constituent des édifices complexes (Cf. Figure 19), permettant l'ancrage membranaire de très nombreuses protéines cellulaires, parmi lesquelles CD14, CD16, CD24, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD66b, CD87, CD109, CD157, etc. (51). Ainsi, dans l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, même si les protéines sont normalement synthétisées, elles ne sont pas présentes sur les cellules en raison d'un défaut de synthèse du système d'ancrage GPI. Cette structure – extrêmement bien conservée dans le règne animal - confère à la protéine non seulement des propriétés mécaniques d'attache, mais aussi des caractéristiques biochimiques (clivage par des phospholipases spécifiques) et des propriétés physiologiques particulières comme par exemple une grande mobilité latérale (50). Elle joue donc un rôle essentiel.

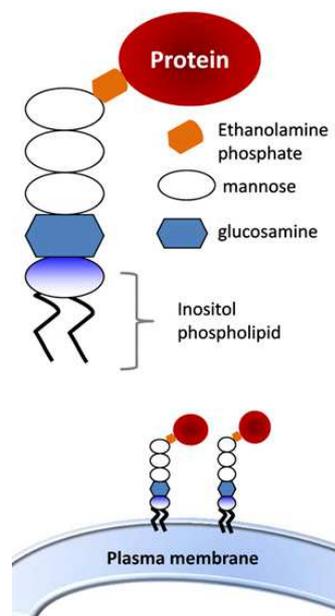


Figure 19 : Ancre GPI. Elle associe un phosphatidylinositol dont les acides gras pénètrent dans le feuillet lipidique de la membrane. La partie inositol est liée à une molécule de glucosamine, puis à trois molécules de mannose dont le troisième porte un éthanolaminephosphate (52)

Parmi l'ensemble des protéines concernées, 2 vont jouer un rôle physiopathologique important dans l'HPN : CD55 et CD59. En effet, elles ont toutes deux pour rôle d'inhiber le complément, comme on peut le voir sur la Figure 20, et ainsi de protéger les cellules de son action. On va donc observer une sensibilité anormale des érythrocytes à l'action du complément, ce qui est à l'origine de l'hémolyse.

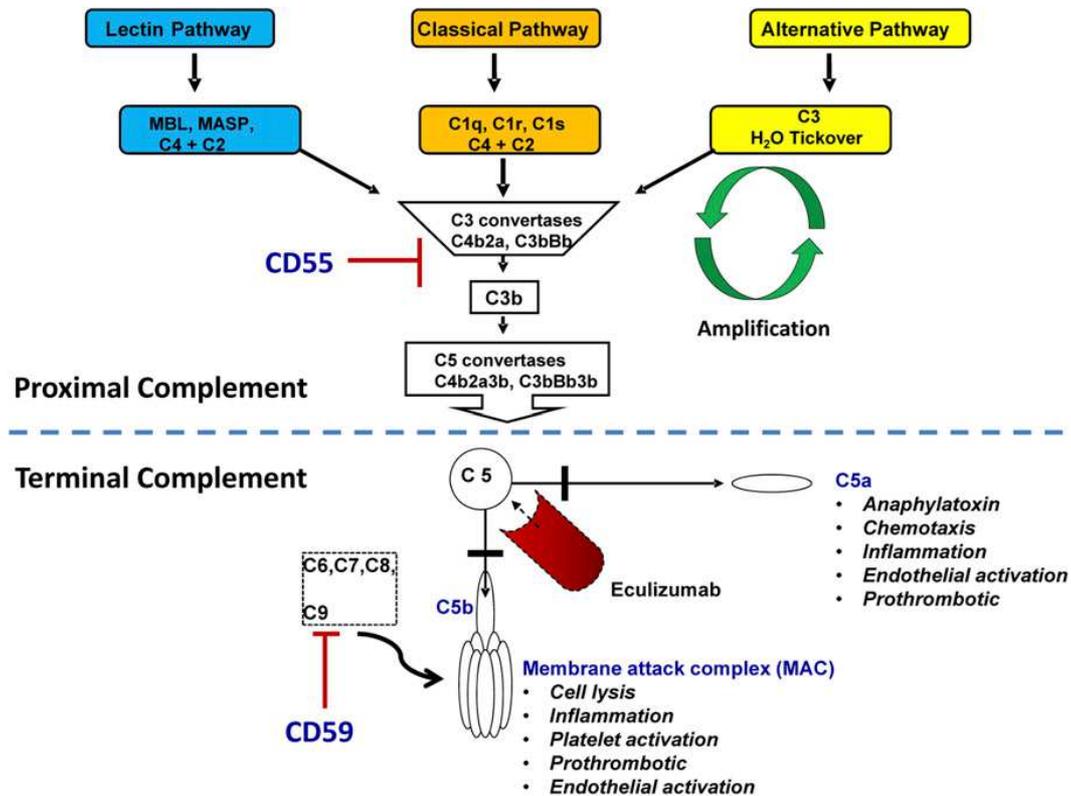


Figure 20 : Régulation du système du complément par les protéines CD55 et CD59 (52)

Au niveau clinique, outre la forme classique associant anémie hémolytique et hémoglobinurie, cette affection est également fréquemment associée à des thromboses et à des aplasies médullaires.

1.3.2. Clone HPN et syndromes myélodysplasiques

La présence de clones cellulaires HPN a été décrite, dès les années 90, dans diverses hémopathies myéloïdes et notamment dans les SMD (53,54). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas connus, la proximité pouvant exister entre les anémies aplasiques sévères et certaines formes de SMD hypoplasiques pourrait indiquer des similitudes au niveau de leur physiopathologie, et ainsi expliquer la présence de ces petits clones (55).

Quoi qu'il en soit, plusieurs études ont été conduites en cytométrie en flux, toutes basées sur l'étude de protéines GPI dépendantes sur les granuleux matures sanguins. Dans tous les cas, des clones HPN ont été retrouvés chez certains patients atteints de SMD, la proportion variant de 6,6 à 15% en fonction des études. Les résultats présentent néanmoins quelques discordances quant aux sous populations concernées : certains travaux retrouvent ces clones majoritairement dans des formes de bas grade - de type anémie réfractaire - et d'autres au contraire dans des formes de haut grade. L'ensemble des différentes études est résumé dans le Tableau 20 (56–59).

Etude	Iwanaga <i>et al.</i> 1998	Wang <i>et al.</i> 2002	Kaiafa <i>et al.</i> 2008	Wang <i>et al.</i> 2009
Effectifs	48 sujets : - 40 SMD - 3 HPN - 5 témoins	164 patients SMD	110 sujets : - 90 SMD - 20 témoins	166 sujets : - 136 SMD - 30 témoins
Matrice	Sang périphérique	Sang périphérique	Sang périphérique	Sang périphérique
Paramètre(s)	Granuleux CD59 -	Granuleux CD55- /CD59-	Granuleux CD55-/CD59-	Granuleux soit: - CD55-/CD59- - CD16-/CD66b-
Résultats	Granuleux CD59- chez 10% des patients (tous atteints d' AR)	Clone chez 12,8% des patients : - Groupe AR:17,6% - Autres SMD: 0%	Groupe SMD : clone chez 15,5% des patients (surtout formes haut grade)	Clone chez 6,6% des patients (que des formes de bas grade)

Tableau 20 : Recherche par CMF de clones HPN dans les SMD (56–59)

Toutes ces études confirment donc bien la présence de petits clones HPN chez certains patients atteints de SMD.

1.3.3. Marqueur Flaer (Fluorescent Aerolysin)

Le marqueur Flaer dérive de l'aérolysine, une toxine produite par la bactérie *Aeromonas hydrophila*. Cette protéine va se fixer à l'ancre GPI des cellules, puis entraîner leur lyse en formant des canaux membranaires. Ainsi les cellules issues de clones HPN sont résistantes à son action (60). Partant de ce constat, un variant inactif d'aérolysine, mais conservant sa capacité de fixation sur l'ancre GPI, a été développé. Il a été couplé à un chromophore Alexa Fluor 488 afin d'obtenir le marqueur Flaer. Celui-ci permet donc d'étudier

directement les molécules GPI par CMF, alors que les anticorps monoclonaux ne permettent qu'une étude indirecte, en s'intéressant à des molécules GPI-dépendantes (61). Ce marqueur s'est donc rapidement imposé grâce à sa très bonne sensibilité et spécificité supplantant ainsi les autres techniques pour l'étude des clones HPN et plus généralement de l'ancre GPI.

2. Objectifs

Les syndromes myélodysplasiques restent aujourd'hui encore un groupe d'hémopathies de diagnostic délicat, d'où les recherches constantes conduites dans ce domaine. Depuis le milieu des années 2000, de nombreuses études ont montré l'intérêt potentiel de la cytométrie en flux, mais aucun marqueur ou groupe de marqueur ne s'est encore réellement imposé par ses performances. D'autre part, même si les résultats sont prometteurs, peu de protocoles semblent utilisables en routine à l'exception de celui développé par Ogata *et al.* Partant de ces constats, notre travail s'est orienté dans deux directions distinctes.

Nous avons tout d'abord cherché à mettre au point un protocole standardisé et utilisable en routine. Pour cela, nous avons décidé de nous intéresser à la maturation granuleuse, en choisissant des marqueurs ayant montré leur intérêt dans d'autres études. Nous avons donc mis au point notre protocole en suivant les 4 principes suivants :

- respecter les recommandations de l'ELN que ce soit au niveau du pré-analytique ou de l'analytique,
- choisir une stratégie de fenêtrage simple, la plus efficiente possible, et facile à mettre en œuvre par un opérateur peu expérimenté,
- utiliser des critères de jugements quantitatifs basés sur des approches statistiques simples et objectives, compatibles avec une mise en place relativement facile dans divers laboratoires,
- trouver une méthode de standardisation de ces données quantitatives afin de s'affranchir des différences, issues des cytomètres ainsi que des habitudes de réglages, et ainsi obtenir des données potentiellement comparables entre différents centres.

Nous nous sommes d'autre part intéressés aux anomalies de l'ancre GPI dans les SMD, mais selon une approche non explorée jusqu'ici. En effet, plutôt que d'étudier la présence d'authentiques petits clones HPN, nous avons cherché à savoir si des anomalies d'expression – observées pour de nombreux marqueurs au cours de la maturation granuleuse – se retrouvent également au niveau des molécules GPI, système d'ancrage central pour les protéines membranaires. Pour cela nous avons suivi les 3 principes suivants :

- travailler sur la moelle osseuse afin d'étudier l'ensemble des stades de la maturation granuleuse,
- utiliser le nouveau marqueur de référence Flaer,

- combiner à la fois une approche quantitative – en recherchant des variations d'intensité d'expression – et qualitative, en étudiant les patterns de différenciation.

Pour cette deuxième partie, nous avons également essayé de travailler de la manière la plus objective et reproductible possible, que ce soit au niveau de la stratégie de fenêtrage ou encore de la standardisation des données quantitatives.

3. Matériels et méthodes

3.1. Constitution de la cohorte

Nous avons réalisé pour ce travail une étude prospective entre les mois de juin et d'octobre 2014. Nous avons inclus tous les patients n'ayant jamais reçu de traitement cytoréducteur et bénéficiant d'un myélogramme pour suspicion de syndrome myélodysplasique, aucune limite d'âge n'étant appliquée. Les critères de non inclusion furent les suivants :

- traitement de la myélodysplasie par des agents cytotoxiques ou immunomodulateurs,
- tout patient atteint d'une hémopathie lymphoïde, car celle-ci peut être à l'origine d'interférences dans le calcul du score d'Ogata,
- refus de participation au « registre » du GFM,
- tout patient ayant signé un formulaire d'opposition à la réalisation d'analyses autres que celles prescrites par son médecin,
- patient sous tutelle ou curatelle,
- absence de reliquat de prélèvement médullaire à l'issu de la procédure de diagnostic ou de suivi.

Ce travail, piloté par le laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges, concernait l'ensemble des services de l'hôpital et le recrutement s'est fait quotidiennement, au fil de l'eau, parmi les patients prélevés au laboratoire.

Tous les patients ont eu une ponction de moelle osseuse avec étalement sur lame porte-objet et recueil sur tube héparinate de sodium sans gel séparateur BD Vacutainer® (BD Becton Dickinson and Company, 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) (62).

Pour chaque patient, les données suivantes ont été collectées dans un tableur Excel :

- numération formule sanguine (leucocytes, hémoglobine, VGM, plaquettes, polynucléaires neutrophiles, réticulocytes, pourcentage de blastes circulants),
- numération médullaire (érythrocytes, leucocytes, pourcentage de blastes médullaires),
- indication, commentaires et résultat du myélogramme,
- résultat du caryotype si réalisé,

- résultat de la coloration de Perls si réalisée,
- clairance de la créatinine,
- ferritine,
- folates,
- vitamine B12,
- haptoglobine,
- signes biologiques de cytolyse et/ou cholestase,
- dépendance à la transfusion,
- traitement éventuel par érythropoïétine,
- renseignements cliniques pertinents: antécédents d'hémopathies, notion de traitement potentiellement cytotoxique, mention de pathologies pouvant être à l'origine de cytopénies, etc.

Ces données ont été extraites du Système d'Informatique de Laboratoire (SIL) d'hématologie (logiciel GLIMS®), ainsi que des logiciels de gestion des patients du CHU : Crossway® (CLM version 7.1.6.1) et Cyberlabs® (MIPS France, version 9.2).

A l'aide de ces informations, les patients ont pu être classés en 3 groupes distincts :

- les témoins normaux non cytopéniques, réunissant les critères suivants :
 - hémoglobine >15g/dl,
 - plaquettes >150G/l,
 - polynucléaires neutrophiles >1,5G/l,
- les témoins cytopéniques, pour lesquels le diagnostic de SMD a pu être exclu et la cause des cytopénies identifiée,
- les patients atteints de SMD.

Les patients pour lesquels les informations recueillies se sont avérées insuffisantes n'ont pas été classés et ont été exclus de l'étude.

Dans le groupe SMD, nous avons distingué les 3 catégories suivantes :

- SMD de bas grade non prouvés,
- SMD de bas grade prouvés,
- SMD de haut grade (AREB-1 et AREB-2),
- LMMC et autres SMP/SMD.

Les SMD de bas grade regroupent les pathologies suivantes : Anémie réfractaire (AR), Anémie Réfractaire avec Sidérobastes (ARS), Cytopénie(s) Réfractaire(s) avec dysplasie multilignée (CRDM) et syndrome 5q-.

On parle de SMD de bas grade prouvé chez les patients pour lesquels le diagnostic a été confirmé par une cytogénétique clonale et/ou une coloration de Perls positive. A l'inverse, les SMD de bas grade non prouvés se caractérisent par un caryotype normal et un Perls négatif. Pour ces derniers, seul le suivi clinico-biologique sur plusieurs mois a permis d'affirmer le diagnostic. Ils représentent donc les patients les plus difficiles à diagnostiquer.

Les critères de diagnostic et de classification des syndromes myélodysplasiques ont été ceux de la classification OMS de 2008, actuellement en vigueur (5).

Les patients ont été suivis jusqu'au mois de mars 2015, afin d'avoir un recul suffisant pour classer leur pathologie éventuelle, et ils ont fait l'objet d'une anonymisation basée sur leur numéro d'inclusion au sein de l'étude.

Le protocole a obtenu un avis favorable du comité d'éthique du CHU de Limoges (N°157-2014-24).

3.2. Analyse par Cytométrie en flux

3.2.1. Choix des anticorps

Chaque échantillon a fait l'objet de deux marquages distincts, à l'aide d'anticorps monoclonaux fournis par la société Beckman Coulter™ :

- un premier marquage 6 couleurs permettant de calculer le score d'Ogata (Tableau 21),
- un second marquage 9 couleurs (Tableau 22).

Tube 1 « Ogata »						
Fluorochrome	FITC	PE	PE Cy7	APC	APC A700	PB
Marquage	45	10	34	56	7	19
Quantité (µl)	10	10	5	5	5	5
Clone	J.33	ALB1	581	N901	8H8.1	J4.119
Réf. fournisseur	A07782	A07760	A21691	IM2474	A70201	A86355

Tableau 21 : Préparation du mix d'anticorps pour le tube « Ogata »

Tube 2 « Flaer »									
Fluorochrome	Flaer	PE	ECD	PE CY5,5	PE Cy7	APC	APC A750	PB	KO
Marquage		24	13	33	16	14	11b	15	45
Quantité (µl)	5	10	5	5	5	5	5	5	5
Clone		ALB9	SJ1D1	D3HL60.251	3G8	RMO52	Bear1	80H5	J.33
Réf. fournisseur		IM1428U	B24026	A70198	6607118	IM2580	A97052	A74775	A96416

Tableau 22 : Préparation du mix d'anticorps pour le tube « Flaer »

3.2.2. Protocole de traitement des échantillons

Les échantillons de moelles osseuses ont été recueillis sur tube héparinate de sodium sans gel séparateur BD Vacutainer® (BD Becton Dickinson and Compagny, Franklin Lakes, NJ, EU) puis traités selon le protocole suivant :

- dilution au ½ dans du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) : 150 µl de moelle + 150 µl de RPMI ;

- numération des leucocytes sur le compte globule CELL-DYN Emerald® (Abbott Diagnostics), l'objectif étant d'avoir environ 10 000 GB/ μ l. En cas de numération supérieure à 19 000 GB/ μ l, refaire une dilution supplémentaire en ajustant la quantité de RPMI; et en cas de concentration inférieure à 7 000 GB/ μ l, utiliser directement une fraction pure de l'échantillon médullaire ;
- préparation des mix d'anticorps dans 2 tubes à hémolyse (Cf Tableau 21 et Tableau 22) ;
- ajout, dans chaque tube, de 50 μ l de suspension cellulaire. Vortexer le mélange et le laisser incuber à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15 minutes ;
- ajout de 500 μ l de Versalyse dans chaque tube, puis laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10 minutes ;
- lavage de la préparation en complétant chaque tube avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline* = tampon phosphate salin) puis centrifuger à 880 g pendant 5 minutes ;
- élimination du surnageant par retournement, reprise du culot en ajoutant 350 μ l de PBS, agiter ;
- passage des tubes sur le cytomètre.

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

Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données 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.

3.2.3. Standardisation de la quantification antigénique

La standardisation a été obtenue à l'aide de billes SPHERO™ Rainbow Calibration Particles (Spherotech, Inc.) selon les principes suivants (63): premièrement, chaque particule contient un mélange de fluorophores en quantité connue, pouvant être excités par des longueurs d'onde de 365 à 650 nm. Deuxièmement, le réactif est constitué d'un mélange de 8 types différents de billes, renfermant une quantité croissante de fluorochromes. Ainsi, lors du passage sur le cytomètre, on obtient, pour chaque canal, 8 pics différents d'intensité de fluorescence (Figure 21). Chaque pic correspondant à une quantité donnée de molécules d'équivalent fluorochrome, communiquée par le fabricant, il est donc possible de déterminer une courbe d'étalonnage permettant de convertir les intensités de fluorescences mesurées

en molécules d'équivalent fluorochrome. Cette unité peut être considérée comme normalisée et indépendante des réglages du cytomètre.

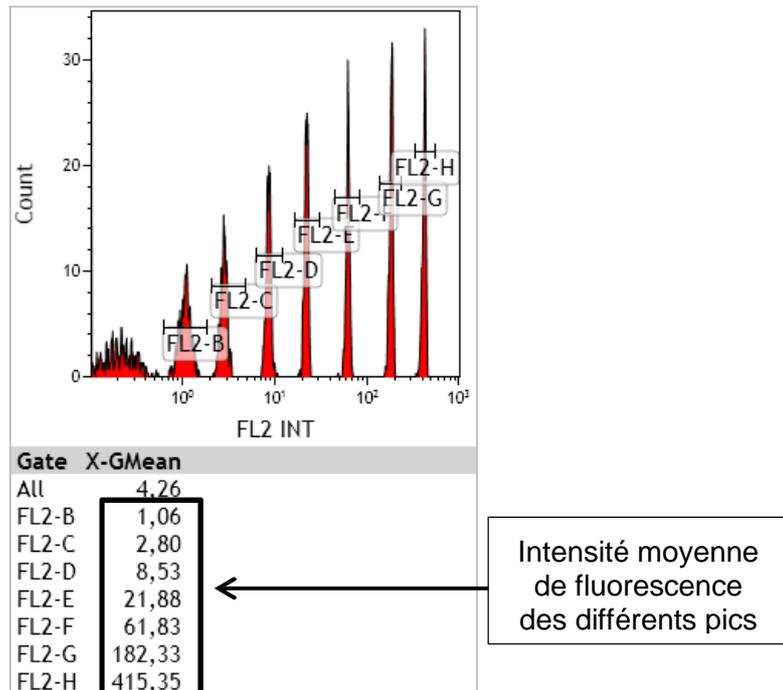


Figure 21 : Les 8 différents pics d'intensité de fluorescence obtenus avec les billes Rainbow, un exemple sur le canal FL2 du cytomètre

Une courbe d'étalonnage a donc été établie, quotidiennement, selon le protocole suivant :

- introduire dans un tube une goutte de la solution SPHERO™ Rainbow 8 peaks puis ajouter 400µl de PBS. Vortexer le mélange ;
- passer le tube sur le cytomètre avec les mêmes réglages que pour le tube « Flaer » des patients, mais sans compensations ;
- pour chaque canal de lecture, récupérer à l'aide du logiciel Kaluza® les moyennes d'intensité de fluorescence (Gmean) des différents pics, puis déterminer l'équation de la droite d'étalonnage (Figure 22) :

$$\text{Log}(G\text{mean}) = f(\text{Log}(\text{Molécules d'équivalent fluorochrome}))$$

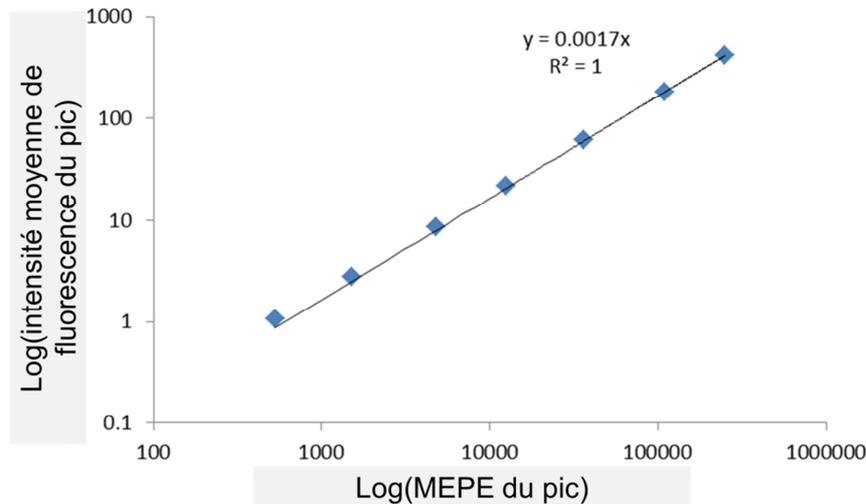


Figure 22 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenue avec les billes Rainbow, ici sur le canal FL2 du cytomètre

A l'aide d'un tableur Excel, il a donc été possible de convertir facilement, et pour chaque canal de lecture, toutes les intensités de fluorescences mesurées en molécules d'équivalent fluorochrome (par exemple MEPE pour les molécules d'équivalents phycoérythrine sur le canal FL2).

3.2.4. Stratégie de fenêtrage

3.2.4.1. Tube « Ogata »

La stratégie de fenêtrage (gating en anglais) utilisée pour établir le score d'Ogata est celle utilisée en routine au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges. Elle ne sera pas développée ici (Cf. Annexe 2).

3.2.4.2. Tube « Flaer »

La stratégie de fenêtrage mise en œuvre a eu pour but d'atteindre de la manière la plus spécifique, la plus standardisée et la plus reproductible possible les deux objectifs suivants :

- isoler les granuleux parmi l'ensemble des éléments cellulaires contenus dans la moelle osseuse,
- séparer les granuleux en 3 stades de maturation.

Des histogrammes bi-paramétriques de type « density plot » ont été utilisés. En effet, si chaque élément est représenté par un point dont les coordonnées dépendent de l'intensité d'expression de chacun des 2 marqueurs étudiés, lorsqu'un très grand nombre de cellules sont analysées, plusieurs vont de fait présenter les mêmes coordonnées, sans que cela ne soit visible sur un histogramme standard. Il est ainsi possible de se retrouver devant une image légèrement biaisée de la population, d'où l'intérêt des représentations de type « density-plot ». Sur ce type d'histogramme, plus le nombre d'événements ayant des coordonnées identiques est important, plus le point correspondant va être représenté par une couleur chaude et inversement. Cela permet donc une meilleure discrimination des populations d'intérêt.

Le schéma d'analyse retenu a ensuite été le suivant :

- Un 1^{er} histogramme (Figure 23) permet de sélectionner les « singles » et donc d'exclure les « doublets » formés par 2 cellules accolées qui n'ont pas été séparées lors du processus de focalisation hydrodynamique et qui sont donc passées simultanément devant le laser.

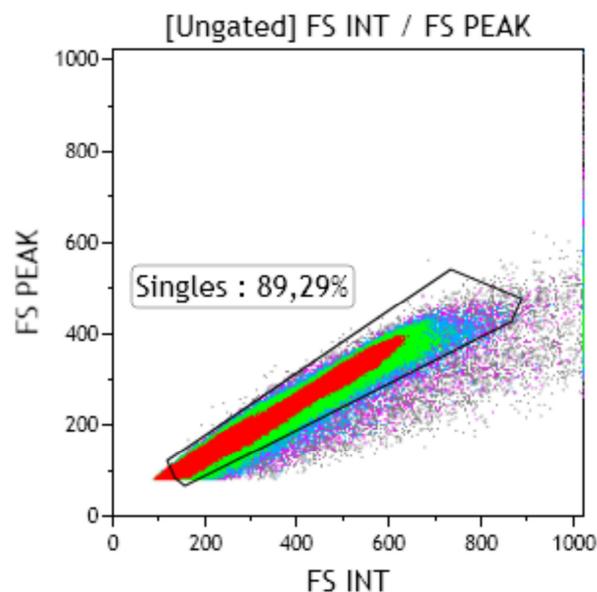


Figure 23 : histogramme FS INT/FS Peak permettant l'élimination des « doublets »

- Un 2^{ème} histogramme (Figure 24) fenêtré sur les « singles » et intégrant les signaux FS et SS a pour but de sélectionner uniquement les cellules vivantes.

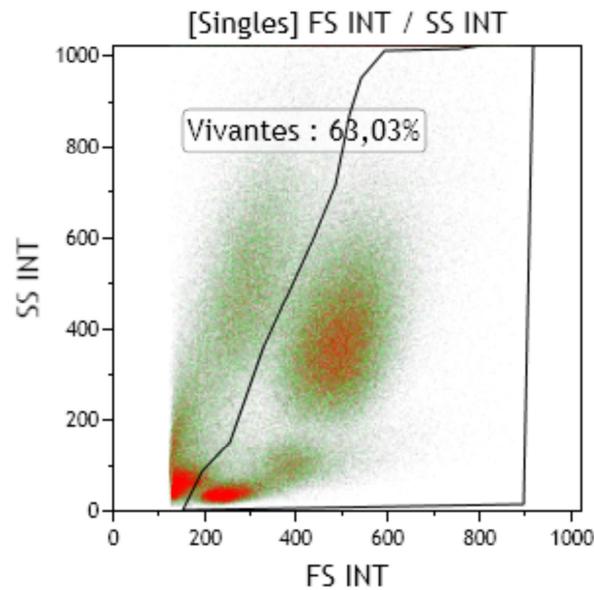


Figure 24 : Histogramme FS/SS permettant l'élimination des débris cellulaires

- Un 3^{ème} histogramme (Figure 25) ciblé sur les cellules vivantes et associant le SS et le CD45 permet à la fois :
 - d'éliminer les cellules non leucocytaires qui ont une faible intensité d'expression du marqueur CD45,
 - de fenêtrer les lymphocytes qui expriment fortement CD45 et ont une faible granulométrie (SS faible).

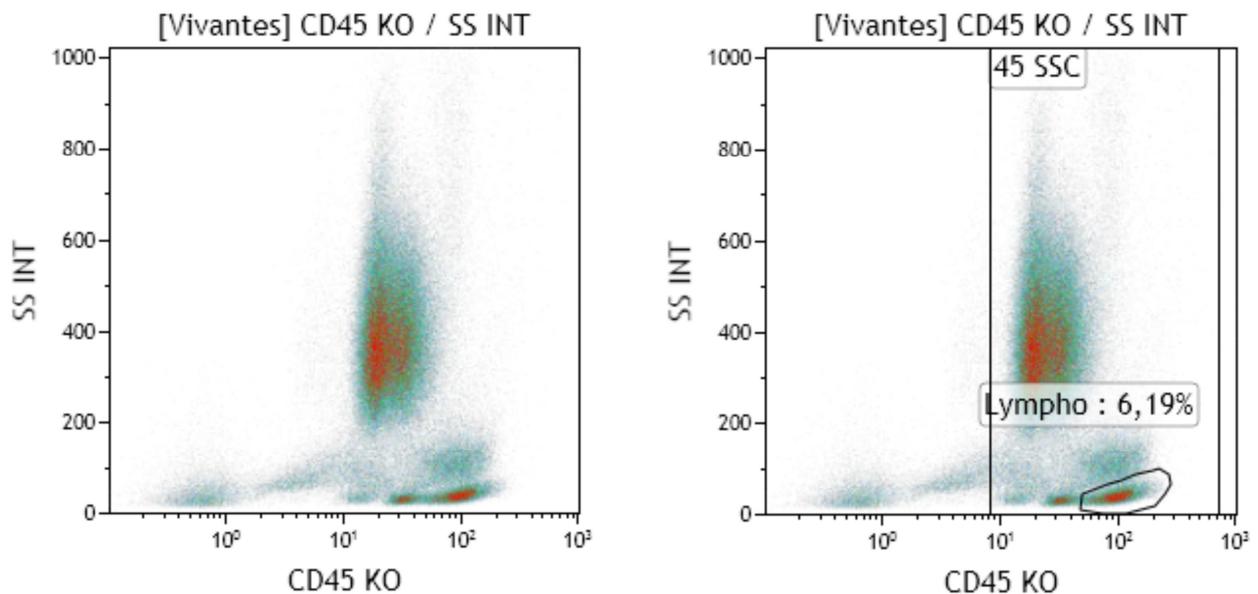


Figure 25 : Histogramme CD45/SS permettant l'élimination des cellules non hématopoïétiques et le ciblage des lymphocytes

- On sélectionne ensuite, par simple traitement informatique, les leucocytes (fenêtre « 45 SSC » sur l'histogramme précédent) qui ne sont pas des lymphocytes. Cette population a été désignée « Gate mono 1 ».
- Un 4^{ème} histogramme (Figure 26) ciblé sur cette population renseigne sur l'intensité d'expression du CD14 et du signal SS. Il est ainsi possible d'identifier les monocytes matures qui expriment fortement le marqueur CD14.

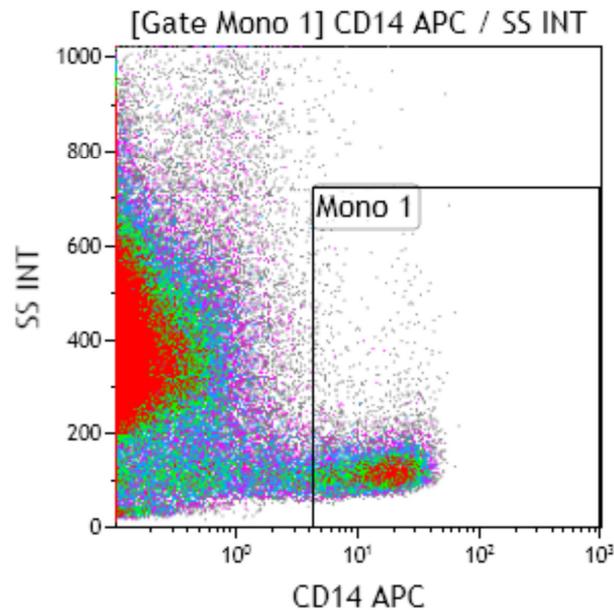


Figure 26 : Histogramme CD14/SS permettant le ciblage des monocytes matures (fenêtre Mono1)

- Un nouveau traitement informatique isole une population que nous avons appelée « Gate mono 2 », correspondant aux cellules présentes dans l'ensemble « Gate mono 1 » et qui ne sont pas des monocytes matures.
- Un 5^{ème} histogramme (Figure 27) fenêtré sur ce nouveau groupe cellulaire présente les intensités d'expression des marqueurs CD33 et CD15. On peut ainsi mettre en exergue les précurseurs monocytaires.

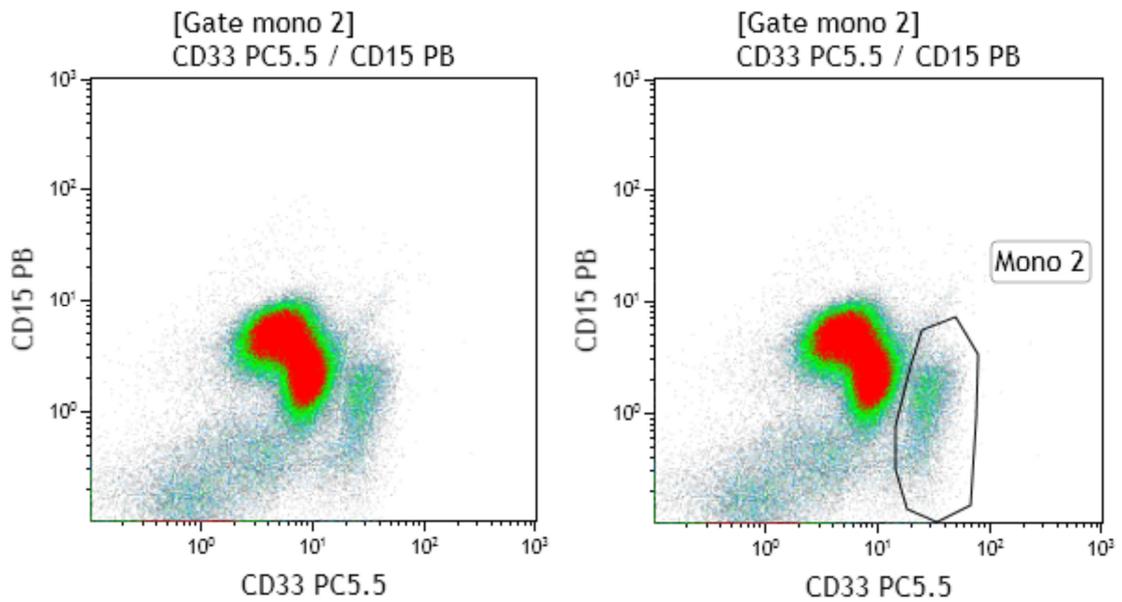


Figure 27 : Histogramme CD33/CD15 permettant le ciblage des précurseurs monocytaires (fenêtre Mono 2)

- Ainsi on peut définir, grâce au logiciel, une population que nous avons baptisée « Gate hématogones », correspondant aux cellules du groupe « Gate mono 2 » qui ne sont pas des précurseurs monocytaires.
- Un 6^{ème} histogramme (Figure 28) prenant en compte cette population et détaillant l'intensité d'expression des marqueurs CD24 et SS permet d'isoler les précurseurs lymphoïdes, que l'on appelle aussi hématogones.

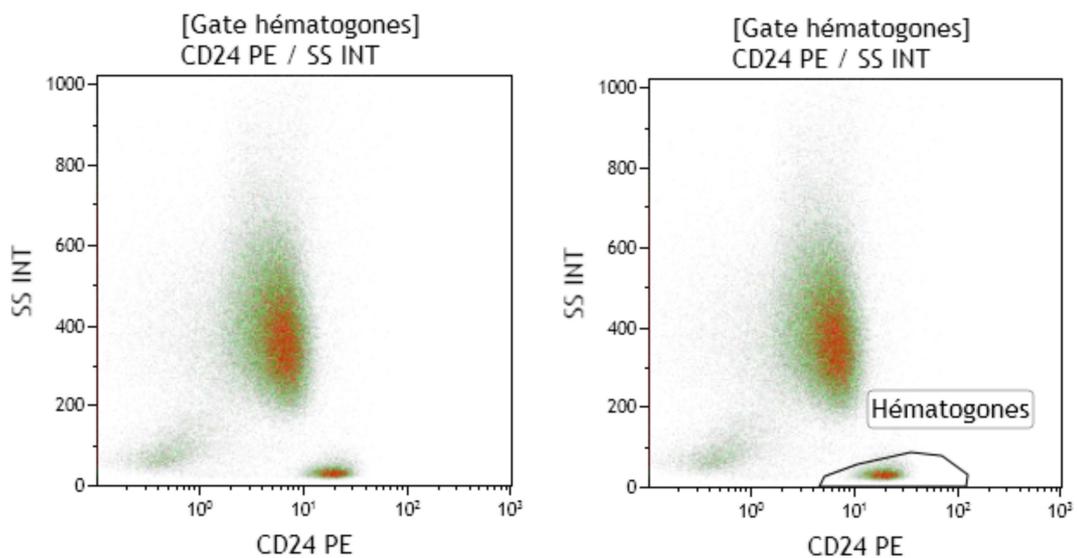


Figure 28 : Histogramme CD24/SS permettant le ciblage des précurseurs lymphoïdes (fenêtre Hématogones)

- En retirant informatiquement les précurseurs lymphoïdes, ainsi définis, de l'ensemble « Gate hématogones » on obtient une population que nous avons désignée « Gate granuleux ». Celle-ci correspond donc aux cellules associant les caractéristiques suivantes :
 - cellules uniques, sans « doublets »,
 - vivantes,
 - leucocytaires,
 - qui ne sont pas des lymphocytes,
 - qui ne sont pas des monocytes matures,
 - qui ne sont pas des précurseurs monocytaires,
 - qui ne sont pas des hématogones,
- Un 7^{ème} histogramme (Figure 29) fenêtré sur cette population et associant l'intensité d'expression des marqueurs CD11b et CD16 permet de fragmenter la maturation granuleuse en 3 stades distincts :
 - les granuleux les plus immatures, que nous avons baptisés IG1 : CD11b-/CD16-,
 - les granuleux intermédiaires, que nous avons baptisés IG2 : CD11b+/CD16-,
 - les granuleux matures : CD11b+/CD16+.
- Les granuleux totaux sont définis comme les cellules appartenant à l'une ou l'autre de ces 3 sous populations

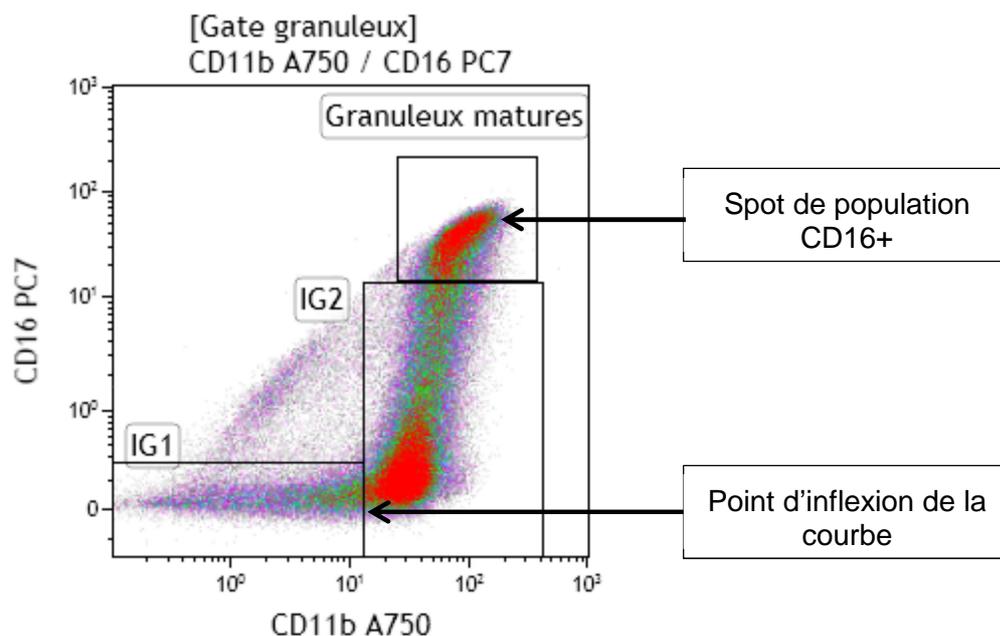


Figure 29 : Histogramme CD11b/CD16 permettant de définir 3 stades de maturation granuleuse

Après attribution d'une couleur à chacune des populations précédemment définies, on obtient l'histogramme suivant (Figure 30), fenêtré sur les cellules vivantes :

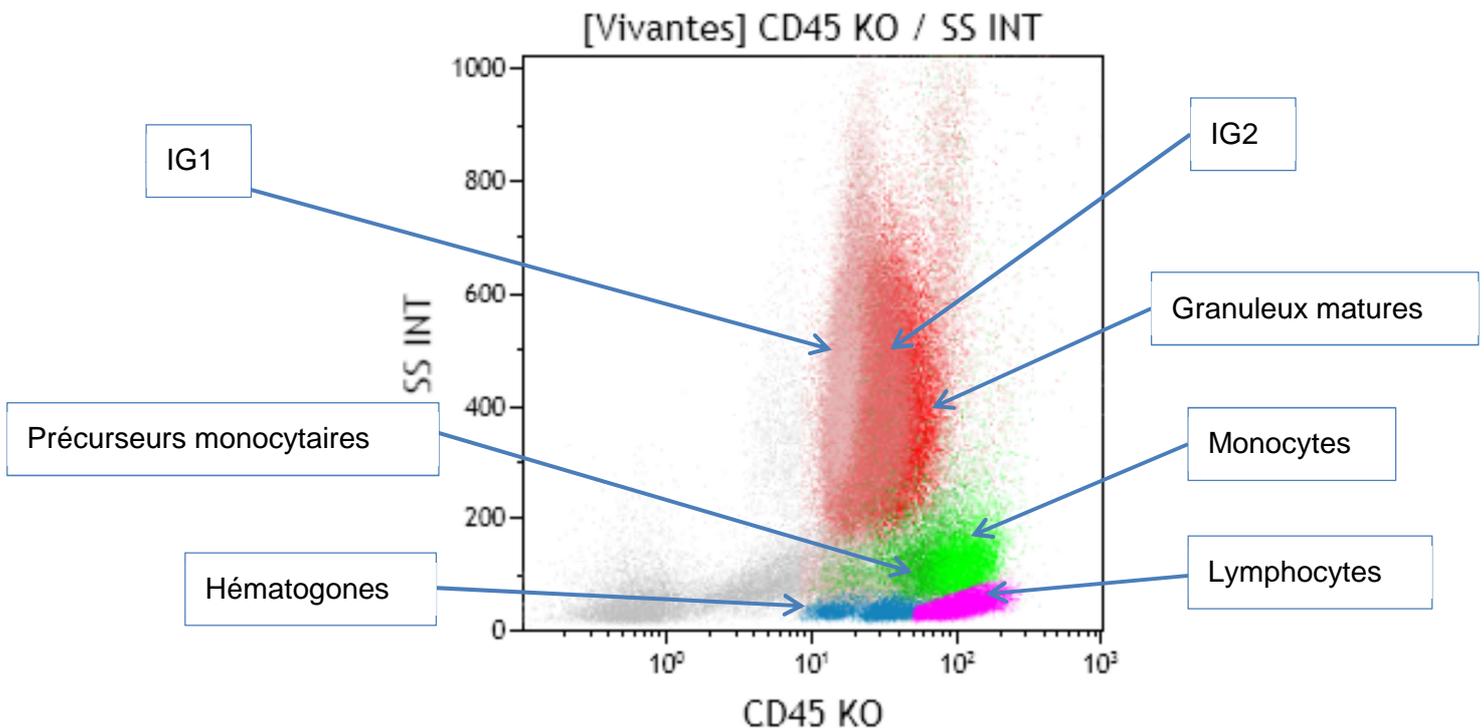


Figure 30 : Histogramme récapitulant la stratégie de fenêtrage sur le tube « Flaer »

3.2.5. Collecte et traitement des données

3.2.5.1. Calcul du score Ogata

Le score d'Ogata est basé sur l'évaluation des 4 paramètres suivants :

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

Chaque paramètre anormal contribue à hauteur d'un point et le score est considéré comme positif s'il est supérieur ou égal à 2.

La stratégie utilisée pour calculer ce score est celle utilisée en routine au sein du laboratoire du CHU de Limoges. Elle ne sera pas développée ici (Cf. Annexe 2).

3.2.5.2. Etude des anomalies de la maturation granuleuse

3.2.5.2.1. Principes

L'objectif est de mettre en évidence des anomalies de la maturation granuleuse - telles que décrites dans la littérature - de manière quantitative et reproductible. Pour cela les 3 approches suivantes ont été explorées (Figure 31) :

- A : Les cellules des patients malades voient-elles varier leur intensité d'expression des différents marqueurs ? Pour étudier cet aspect, nous avons choisi de collecter les moyennes géométriques de fluorescence ;
- B : Les anomalies de maturation sont-elles à l'origine d'une modification de l'homogénéité d'expression des différents marqueurs au sein de la population cellulaire ? Pour considérer cette hypothèse, nous nous sommes intéressés aux coefficients de variation (CV) ;
- C : La différenciation anormale se traduit-elle par des différences relatives d'intensité d'expression des marqueurs, entre les différents stades de maturation ? Pour explorer cette approche nous avons calculé, pour chaque marqueur, les rapports des moyennes géométriques de fluorescence des différents stades de maturation.

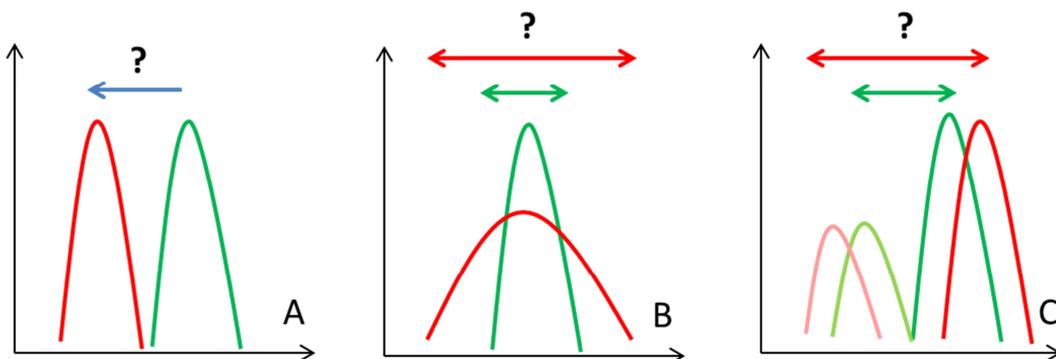


Figure 31 : Trois approches de travail sur la maturation granuleuse : en vert les patients normaux, en rouge l'hypothèse étudiée pour les patients atteints de SMD

3.2.5.2.2. Collecte des données

Les marqueurs suivants ont été étudiés :

- CD11b,
- CD16,
- CD13,
- CD15,
- CD33,
- CD45.

Pour chacun d'eux les informations suivantes ont été collectées :

- coefficient de variation (CV) de l'intensité de fluorescence des granuleux dans leur ensemble. Ces données ont été obtenues à l'aide d'histogrammes biparamétriques (Figure 32) ;
- moyenne géométrique (Gmean) et coefficient de variation (CV) de l'intensité de fluorescence pour les 3 sous-populations de granuleux précédemment définies : IG1, IG2 et granuleux matures. Ces données ont été obtenues à l'aide d'histogrammes monoparamétriques de type « overlay » (Figure 32).

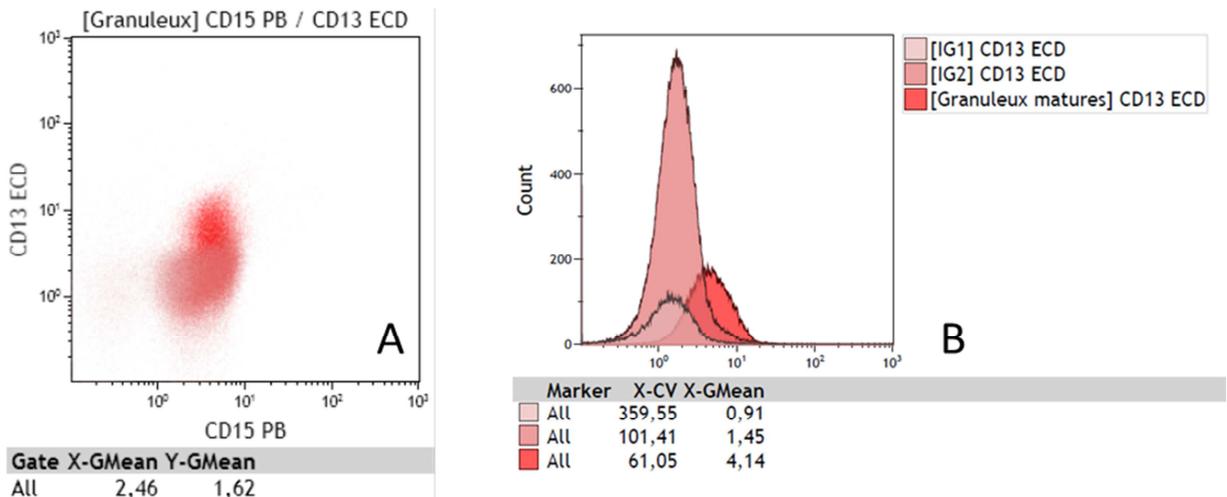


Figure 32 : Exemples d'histogramme biparamétrique CD15/CD13 (A) et monoparamétrique CD13 de type « overlay » (B) permettant de récupérer la moyenne Gmean et le CV

3.2.5.2.3. Traitement des données

Les moyennes géométriques de fluorescences (Gmean) ont d'abord fait l'objet d'une standardisation, avec conversion en molécules d'équivalent fluorochrome (MEF), selon le protocole décrit plus haut.

Pour chacun des marqueurs les rapports suivants ont ensuite été calculés :

- $R1 = \frac{MEF(\text{granuleux matures})}{MEF(IG1)}$
- $R2 = \frac{MEF(\text{granuleux matures})}{MEF(IG2)}$

Pour chaque marqueur et pour chacun des éléments collectés (rapport, molécules d'équivalent fluorochrome, CV ...) des « intervalles de normalité » ont ensuite été déterminés de la façon suivante (Tableau 23) :

- les informations issues des témoins non cytopéniques ont été regroupées,
- pour chaque paramètre la moyenne et l'écart type ont été calculés au sein de cette population normale,
- « L'intervalle de normalité » a été défini comme étant cette moyenne +/- 3 écarts types.

Numéro interne	Diagnostic codé	CV(%) CD15 IG1	CV(%) CD15 IG2	CV(%) CD15 Gr matures
140707-3	10	115,73	50,2	36,66
140709-1	10	57,91	50,2	37,41
140709-3	10	263,88	45,93	38,67
140710-2	10	85,82	42,36	37,65
140717-1	10	107,5	44,66	40,03
140806-1	10	164,66	51,69	35,05
140806-2	10	77,46	48,03	33,74
140814-1	10	110,93	39,64	35,83
140819-1	10	101,3	43,37	43,43
140820-1	10	121,73	53,37	40,41
140820-2	10	129,58	41,68	39,02
140826-1	10	83,81	46,3	42,04
140827-1	10	79,14	40,8	38,66
Moyenne		115,34	46,02	38,35
Ecart type		52,38	4,42	2,74
Nombre d'écart types tolérés		3	3	3
Valeur minimale tolérée		-41,81	32,76	30,14
Valeur maximale tolérée		272,49	59,27	46,56

« Intervalle de normalité » du CV pour le marqueur CD15 chez les granuleux matures

Tableau 23 : Exemple de calcul d'un « intervalle de normalité »

Les données issues des patients ont ensuite été comparées à ces intervalles de normalité, et toute valeur hors bornes a été considérée comme une expression anormale du marqueur.

3.2.5.2.4. Interprétation des données

Les différents marqueurs ont ensuite été étudiés séparément, selon chacune des 4 approches suivantes, afin de sélectionner ceux pour lesquels les anomalies détectées se sont révélées suffisamment spécifiques des SMD :

- anomalie de l'intensité de fluorescences au sein d'au moins une des 3 sous-populations de granuleux,
- anomalie de CV affectant les granuleux dans leur ensemble,
- anomalie de CV concernant au minimum l'un de ces sous-groupes,
- anomalie d'au moins un des deux rapports de fluorescence.

Pour chacun de ces 4 angles d'étude, un score global a ensuite été défini en utilisant les marqueurs ayant une spécificité supérieure à un seuil arbitraire de 80%. Le score a été considéré comme positif pour toute valeur supérieure ou égale à 2, chaque marqueur anormal contribuant à hauteur d'un point. Nous avons ainsi pu calculer la sensibilité et la spécificité de chacune des 4 approches.

3.2.5.3. Etude du marqueur Flaer

3.2.5.3.1. Etude quantitative

Les moyennes géométriques d'intensité de fluorescence (Gmean) du marqueur Flaer ont été récupérées, pour chacun des 3 stades de maturation granuleuse (IG1, IG2 et granuleux matures), à l'aide d'histogrammes monoparamétriques de types « overlay » (Cf. Figure 32). Elles ont ensuite fait l'objet d'une standardisation et ont été converties en molécules d'équivalent FITC (MEFL), selon le protocole décrit plus haut.

Ensuite l'étude s'est orientée selon 2 axes :

- comparaison de l'intensité d'expression entre les 3 sous-populations de granuleux en ne considérant que les témoins normaux non cytopéniques. L'objectif étant de voir les variations au cours de la maturation normale.

L'analyse a été à la fois visuelle, en représentant les données issues des patients sous forme de nuages de points, et statistique, en comparant les moyennes des 3 groupes ;

- comparaison des intensités entre tous les groupes de patients pour chacun des différents stades. Le but étant de rechercher d'éventuelles différences et de voir à quel(s) stade(s) de maturation celle(s)-ci serait(ent) détectée(s). L'étude a été visuelle, en représentant les données issues des patients sous forme de nuages de points, un pour chaque groupe de patients.

3.2.5.3.2. Etude qualitative

Cette approche a eu pour objectif de rechercher la présence de patterns anormaux, c'est-à-dire d'anomalies qualitatives de l'expression du Flaer, au cours de la maturation granuleuse. Pour ce faire, 2 types d'histogrammes présentant l'ensemble des 3 sous populations de granuleux ont été utilisés :

- un histogramme monoparamétrique Flaer de type « overlay »,
- un histogramme biparamétrique CD11b/Flaer.

Les histogrammes issus des témoins normaux non cytopéniques ont été regroupés afin de constituer une banque d'images normales. Les histogrammes des patients issus des deux autres groupes ont ensuite été comparés un par un à cet ensemble de référence afin de détecter les éventuels patterns anormaux. Au sein de ceux-ci, les ensembles cellulaires incriminés ont été fenêtrés, puis étudiés sur un histogramme CD45/SS, afin de vérifier qu'il s'agissait bien de granuleux atypiques et non pas de débris résiduels – comme par exemple des amas plaquettaires – qui auraient été imparfaitement éliminés au cours de notre stratégie de gating, et qui seraient venus créer des images parasites au sein des patterns étudiés.

4. Résultats

4.1. Cohorte de patients

Au total 79 patients ont été inclus dans notre étude, 8 ont ensuite été exclus pour les raisons suivantes :

- 1 en raison d'une hémopathie lymphoïde associée,
- 3 du fait de prélèvements dilués ou d'échecs analytiques,
- 4 pour lesquels les renseignements clinico-biologiques étaient insuffisants pour affirmer ou infirmer un diagnostic au moment de la clôture de l'étude.

La cohorte étudiée regroupe donc 71 patients, 37 hommes (52%) pour 33 femmes (48%) et la moyenne d'âge est de 71,5 ans +/- 10 ans. Les effectifs des 3 différents groupes sont les suivants :

- 13 témoins non cytopéniques,
- 49 témoins cytopéniques,
- 22 patients atteints de SMD.

La Figure 33 montre la répartition des différentes catégories de SMD. On note :

- 11 SMD de bas grade : 2 AR, 1 ARS, 8 CRDM,
- 7 SMD de haut grade : 4 AREB-1, 3 AREB-2,
- 4 SMP/SMD : 2 LMMC-1, 2 LMMC-2.

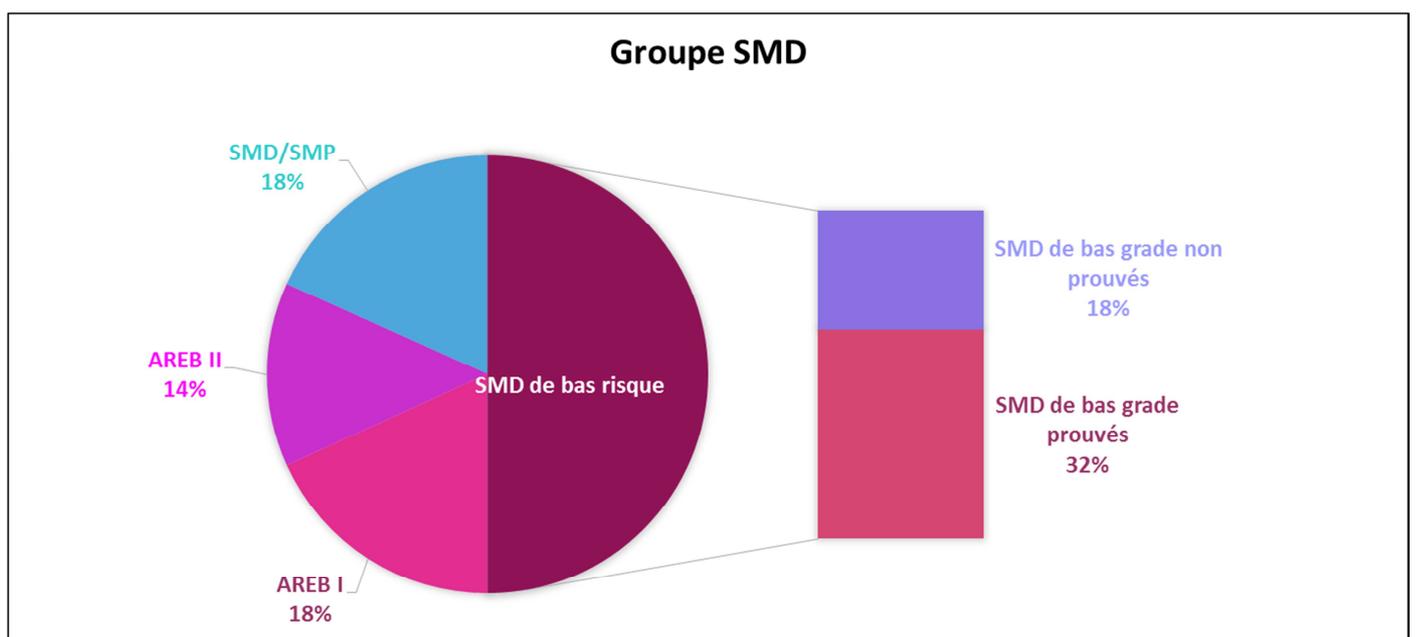


Figure 33 : Répartition des patients dans le groupe SMD

La Figure 34 illustre, quant à elle, la distribution des témoins cytopéniques. On note une grande variété d'étiologies pour ces cytopénies représentant relativement bien le panel des diagnostics différentiels de SMD.

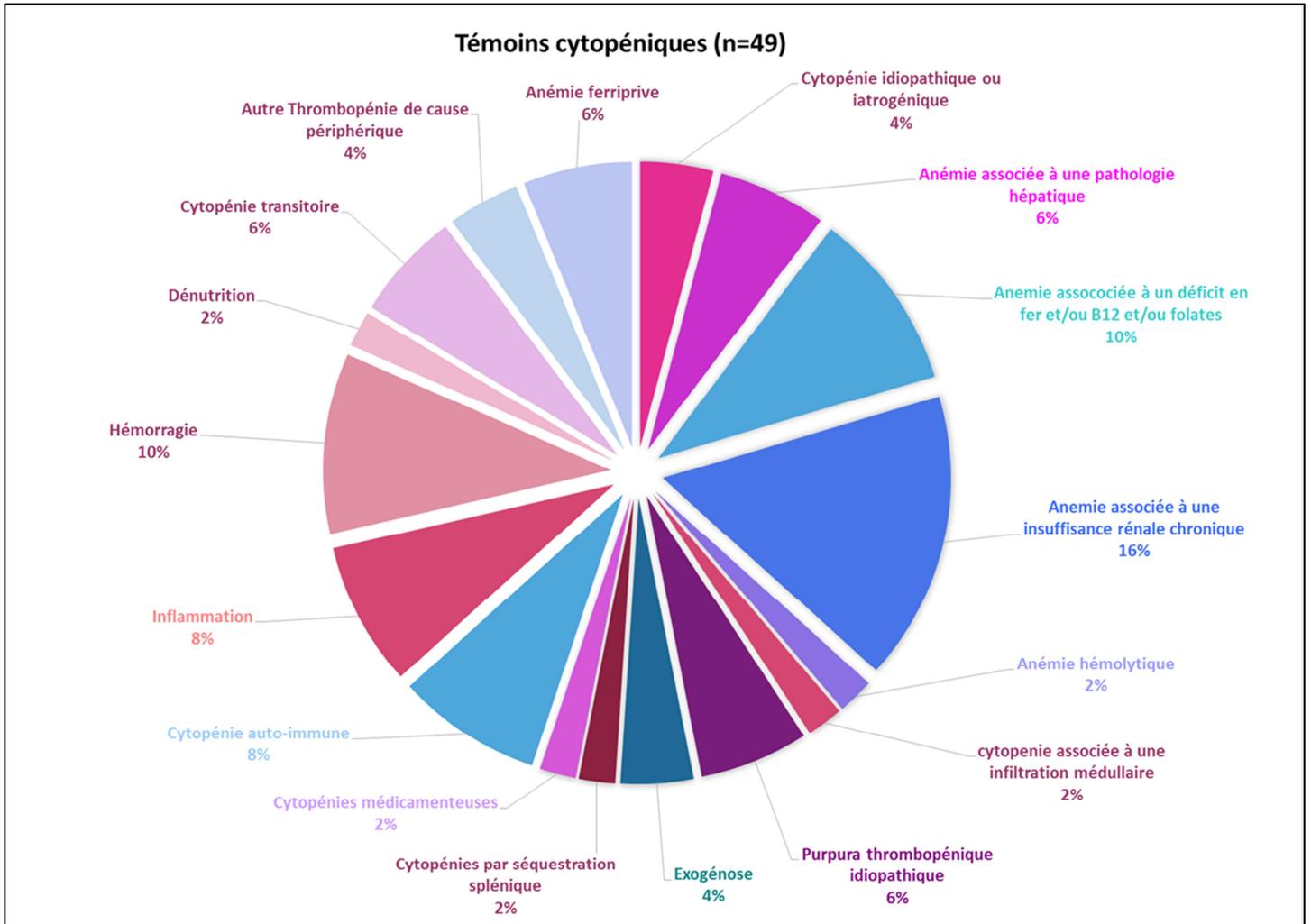


Figure 34 : Répartition des patients dans le groupe témoins cytopéniques

4.2. Score d'Ogata

Le score d'Ogata est considéré comme 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 en l'absence de SMD. Dans notre cohorte de 71 patients nous avons obtenu les résultats suivants :

	Groupe SMD	Groupe témoins (Cytopéniques ou non)
Score Ogata positif	13	9
Score Ogata négatif	9	40

Tableau 24 : Résultats du score d'Ogata

Nous avons donc retrouvé une sensibilité globale de 59% et une spécificité de 82%. La Figure 35 représente le score au sein des différents sous-groupes.

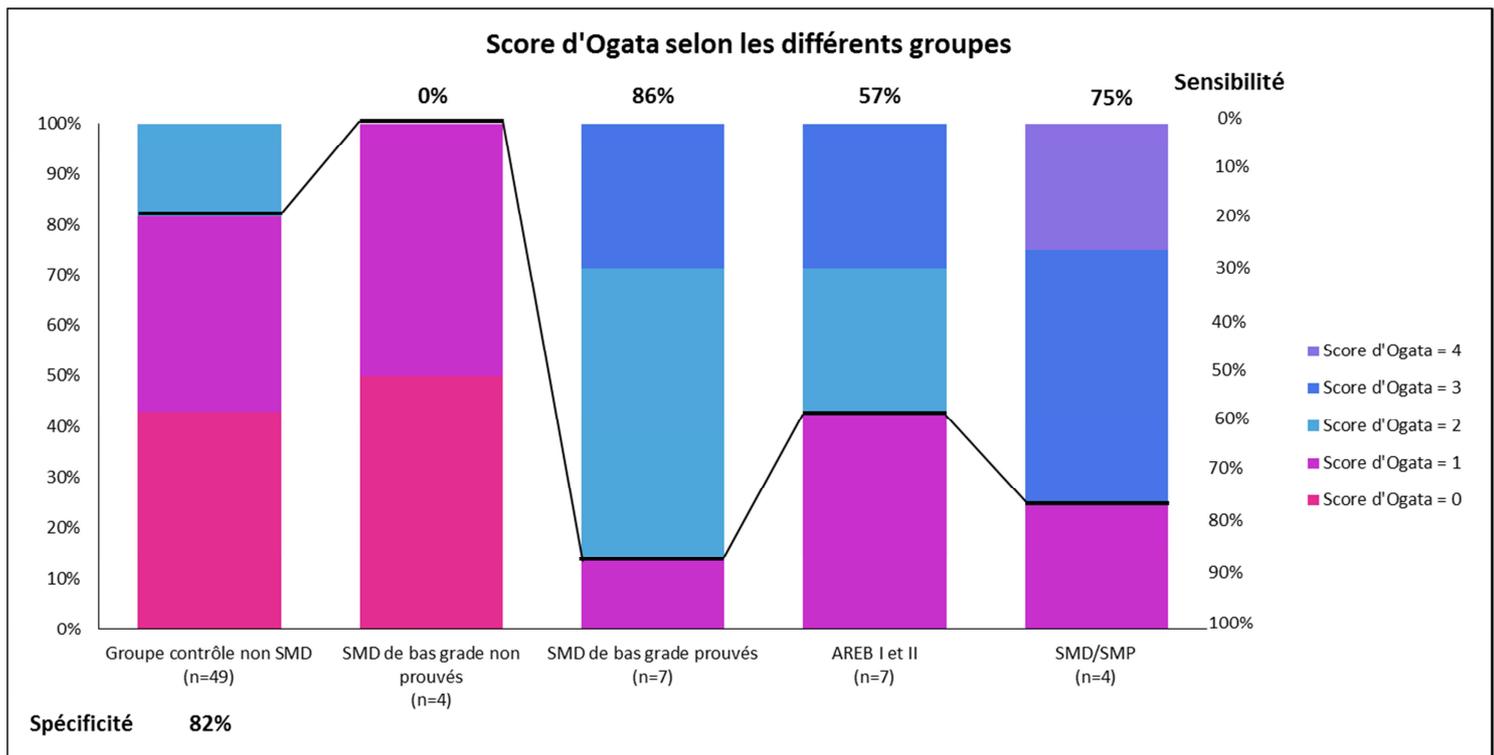


Figure 35 : Score d'Ogata au sein des différents sous-groupes

4.3. Etude de la maturation granuleuse

Dans notre cohorte, et en utilisant les approches détaillées plus haut, nous avons déterminé la sensibilité et la spécificité des différents marqueurs de maturation granuleuse en utilisant les critères de positivité suivants :

- Approche A : le marqueur est considéré comme positif si au moins une des intensités moyennes de fluorescence - c'est-à-dire celle des IG1 et/ou celle des IG2 et/ou celle des granuleux matures - est en dehors de l'intervalle de normalité correspondant ;
- Approche B₁ : le marqueur est considéré comme positif si le CV de la population granuleuse totale – formée par addition des IG1, des IG2 et des granuleux matures – n'est pas compris dans l'intervalle de normalité ;
- Approche B₂ : le marqueur est considéré comme positif si l'un au moins des 3 coefficients de variation - c'est-à-dire celui des IG1 et/ou celui des IG2 et/ou celui des granuleux matures – sort des bornes que nous avons déterminées ;
- Approche C : le marqueur est considéré comme positif si l'un au moins des 2 rapports d'intensités de fluorescence – R1 ou R2 tels que définis plus haut - est en dehors de son intervalle de normalité.

L'ensemble des critères de positivité des marqueurs étudiés est résumé dans le Tableau 25.

Critères de positivité des différents marqueurs				
Approche Marqueur	A : modification d'intensité (Sensibilité/Spécificité)	B ₁ : Modification de CV (%) des granuleux totaux (Sensibilité/Spécificité)	B ₂ : Modification de CV (%) au sein des sous populations (Sensibilité/Spécificité)	C : modification des rapports d'intensités (Sensibilité/Spécificité)
CD11b	MEF _{IG1} € [0;9195] Et/ou MEF _{IG2} € [59890;211472] Et/ou MEF _{Gmat} € [106534;434349]	CV _{Grtotaux} € [48;93]	CV _{IG1} € [68;127] Et/ou CV _{IG2} € [28;64] Et/ou CV _{Gmat} € [26;53]	R1 € [0;161] Et/ou R2 € [1,39;2,61]
CD16	MEF _{IG1} € [15605;18635] Et/ou MEF _{IG2} € [0;198898] Et/ou MEF _{Gmat} € [2453240;8748053]	CV _{Grtotaux} € [102;196]	CV _{IG1} € [2;244] Et/ou CV _{IG2} € [98;164] Et/ou CV _{Gmat} € [26;55]	R1 € [148;505] Et/ou R2 € [0;126]
CD13	MEF _{IG1} € [0;777] Et/ou MEF _{IG2} € [295;848] Et/ou MEF _{Gmat} € [0;5208]	CV _{Grtotaux} € [0;477]	CV _{IG1} € [0;1028] Et/ou CV _{IG2} € [0;371] Et/ou CV _{Gmat} € [0;129]	R1 € [0;15,5] Et/ou R2 € [1,4;7]
CD15	MEF _{IG1} € [0;39] Et/ou MEF _{IG2} € [0;370] Et/ou MEF _{Gmat} € [0;408]	CV _{Grtotaux} € [39;67]	CV _{IG1} € [0;272] Et/ou CV _{IG2} € [33;59] Et/ou CV _{Gmat} € [30;47]	R1 € [0;45] Et/ou R2 € [0,6;1,7]
CD33	MEF _{IG1} € [0;37401] Et/ou MEF _{IG2} € [7089;59116] Et/ou MEF _{Gmat} € [5385;36314]	CV _{Grtotaux} € [0;176]	CV _{IG1} € [3;164] Et/ou CV _{IG2} € [0;191] Et/ou CV _{Gmat} € [0;151]	R1 € [0;3,9] Et/ou R2 € [0,33;0,95]
CD45	MEF _{IG1} € [961;2936] Et/ou MEF _{IG2} € [1158;4096] Et/ou MEF _{Gmat} € [1667;5557]		CV _{IG1} € [37;124] Et/ou CV _{IG2} € [23;71] Et/ou CV _{Gmat} € [17;47]	R1 € [0,9;2,9] Et/ou R2 € [0,9;1,9]

Tableau 25 : Critères de positivité retenus pour les différents marqueurs de maturation granuleuse

En appliquant ces critères de positivité, nous avons donc obtenu les résultats suivants, présentés dans le Tableau 26 :

Approche Marqueur	A : modification d'intensité (Sensibilité/Spécificité)	B₁ : Modification de CV des granuleux totaux (Sensibilité/Spécificité)	B₂ : Modification de CV au sein des sous populations (Sensibilité/Spécificité)	C : modification des rapports d'intensités (Sensibilité/Spécificité)
CD11b	0,23 / 0,94	0,18 / 1,00	0,50 / 0,90	0,45 / 0,96
CD16	0,32 / 0,82	0,18 / 0,90	0,32 / 0,82	0,23 / 0,94
CD13	0,32 / 0,88	0,41 / 0,69	0,32 / 0,65	0,14 / 0,92
CD15	0,14 / 0,94	0,45 / 0,79	0,59 / 0,84	0,41 / 0,88
CD33	0,14 / 0,94	0,36 / 0,90	0,45 / 0,73	0,27 / 0,86
CD45	0,18 / 0,92		0,14 / 0,94	0,05 / 0,96

Tableau 26 : Sensibilité/spécificité des différents marqueurs de maturation granuleuse

Nous avons ensuite cherché à déterminer laquelle des 4 approches ci-dessus présente globalement le meilleur rapport sensibilité/spécificité. Pour cela nous avons donc calculé pour chacune un score.

Pour chaque approche, seuls les marqueurs présentant une spécificité $\geq 80\%$ ont été retenus pour le calcul. Il faut également noter que le marqueur CD 45 a été systématiquement exclu, en raison d'une sensibilité toujours très faible. Les scores ont ensuite été établis selon les principes suivants :

- chaque marqueur anormal (Cf. Tableau 25) retenu a contribué à hauteur d'un point,
- les scores ont été considérés comme positifs pour toute valeur supérieure ou égale à 2.

Ainsi, si l'on prend l'exemple de l'approche B₁, le CD45 a d'abord été exclu – comme pour toutes les autres – puis les marqueurs CD13 et CD15 ont également été éliminés en raison d'une spécificité inférieure à 80%. Nous avons donc calculé, dans ce cas, un score basé sur 3 paramètres : CD11b, CD16 et CD33. Sa valeur pouvant donc être comprise entre 0 et 3, il a été considéré comme positif lorsqu'il était égal à 2 ou 3.

Nous avons ensuite regardé la sensibilité et la spécificité du score obtenu pour chacune des 4 approches et nous avons obtenu les résultats suivants, les cases grisées illustrant les marqueurs non retenus :

Approche Marqueur	A : modification d'intensité (Sensibilité/Spécificité)	B₁ : Modification de CV des granuleux totaux (Sensibilité/Spécificité)	B₂ : Modification de CV au sein des sous populations (Sensibilité/Spécificité)	C : modification des rapports d'intensités (Sensibilité/Spécificité)
CD11b	0,23 / 0,94	0,18 / 1,00	0,50 / 0,90	0,45 / 0,96
CD16	0,32 / 0,82	0,18 / 0,90	0,32 / 0,82	0,23 / 0,94
CD13	0,32 / 0,88			0,14 / 0,92
CD15	0,14 / 0,94		0,59 / 0,84	0,41 / 0,88
CD33	0,14 / 0,94	0,36 / 0,90		0,27 / 0,86
CD45				
Score global	0,32 / 0,92	0,09 / 1,00	0,50 / 0,90	0,41 / 0,88

Tableau 27 : Sensibilité/spécificité des différentes approches d'étude de la maturation granuleuse

C'est donc l'étude des coefficients de variation qui semble présenter le meilleur ratio sensibilité/spécificité au sein de notre cohorte. Les 3 marqueurs d'intérêts sont dans ce cas CD11b, CD16, CD15.

4.4. Etude du marqueur Flaer

4.4.1. Etude quantitative

4.4.1.1. Au cours de la maturation granuleuse normale

En ne considérant que les témoins normaux non cytopéniques, nous avons étudié les intensités d'expression du marqueur Flaer au sein des 3 sous populations de granuleux. Nous avons obtenu les résultats suivants, présentés dans la Figure 36, chaque point représentant une valeur patient.

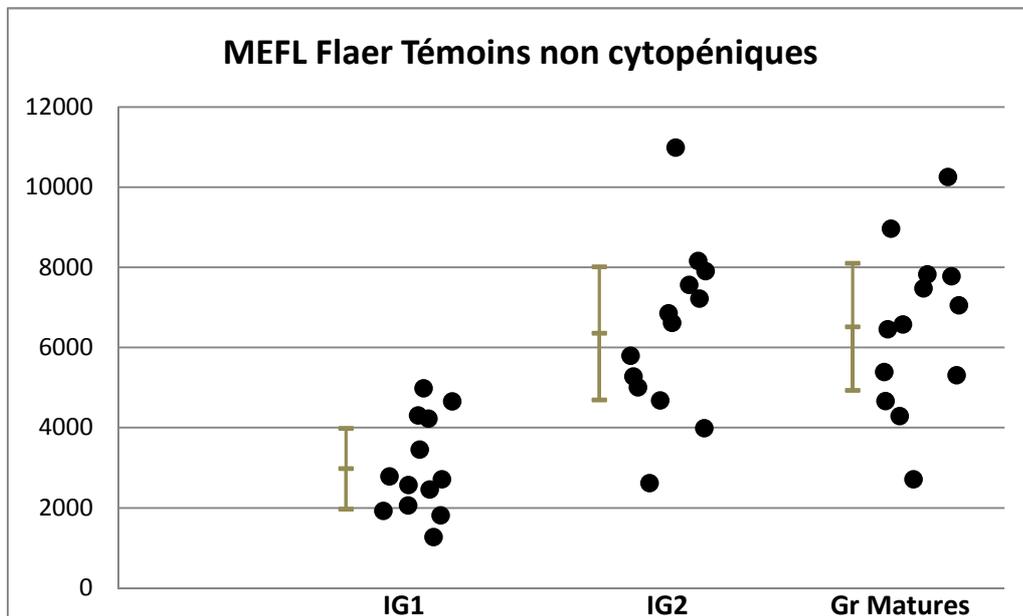


Figure 36 : Expression du marqueur Flaer au cours de la maturation granuleuse normale

Nous avons ensuite calculé les intensités moyennes d'expression au sein des 3 sous-groupes et nous avons obtenus les données suivantes :

- IG1 : 3013 +/- 1006 MEFL,
- IG2 : 6355 +/- 1661 MEFL,
- Granuleux matures : 6316 +/- 1582 MEFL.

Les granuleux les plus immatures semblent donc exprimer plus faiblement le marqueur Flaer, mais l'intensité maximale semble être atteinte dès le stade « IG2 », pour ne plus varier ensuite.

4.4.1.2. Entre les différents groupes de patients

Nous avons comparé les intensités d'expression du marqueur Flaer entre les 3 différents groupes de patients, et ce pour chacune des 3 sous-populations de granuleux. Nous avons obtenu les résultats suivants (Figure 37, Figure 38, Figure 39), chaque point représentant une valeur patient.

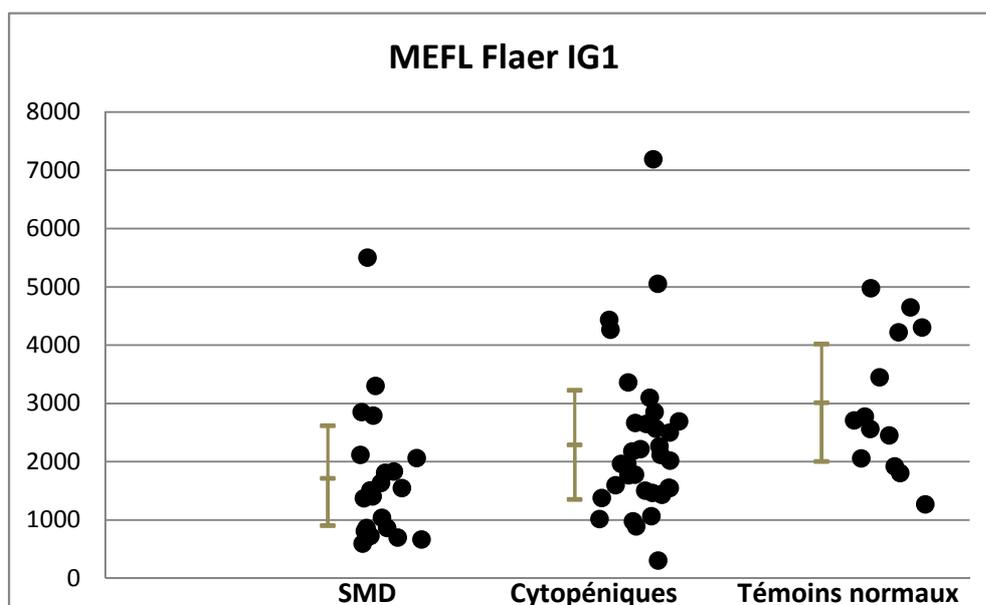


Figure 37 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux les plus immatures (IG1)

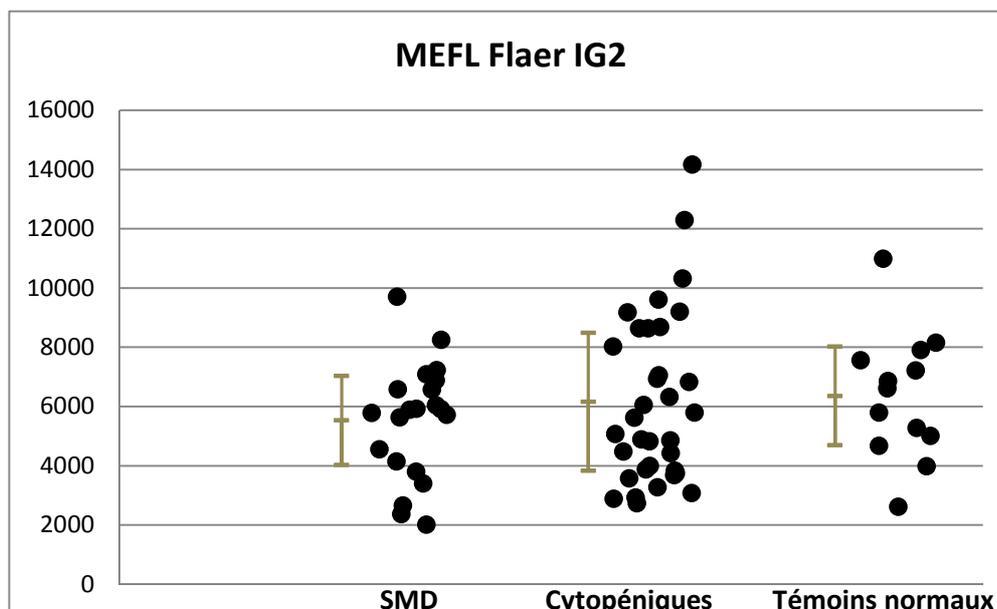


Figure 38 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux intermédiaires (IG2)

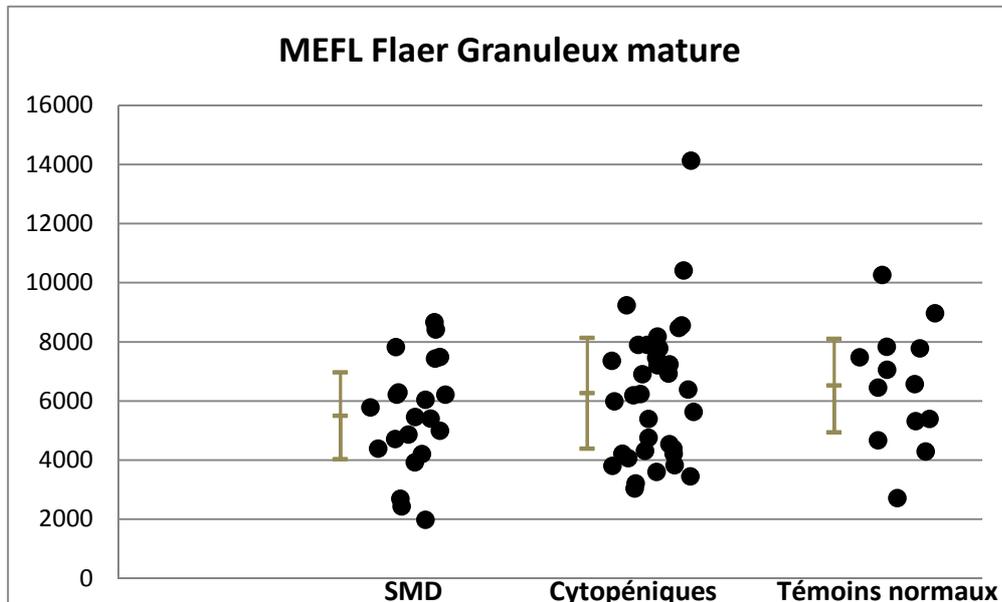


Figure 39 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux matures

Visuellement, l'intensité d'expression semble être diminuée pour les granuleux immatures des patients atteints de syndromes myélodysplasiques. En revanche, il ne semble pas y avoir de différences significatives en ce qui concerne les granuleux matures et intermédiaires.

Afin d'objectiver cette impression au niveau des IG1, nous avons comparé, entre les différents groupes, le nombre de patients présentant, au niveau de cette population cellulaire, une intensité moyenne de fluorescence inférieure à un seuil arbitraire de 1100 MEFL (Figure 40). Nous avons obtenu les résultats suivants, présentés dans le Tableau 28.

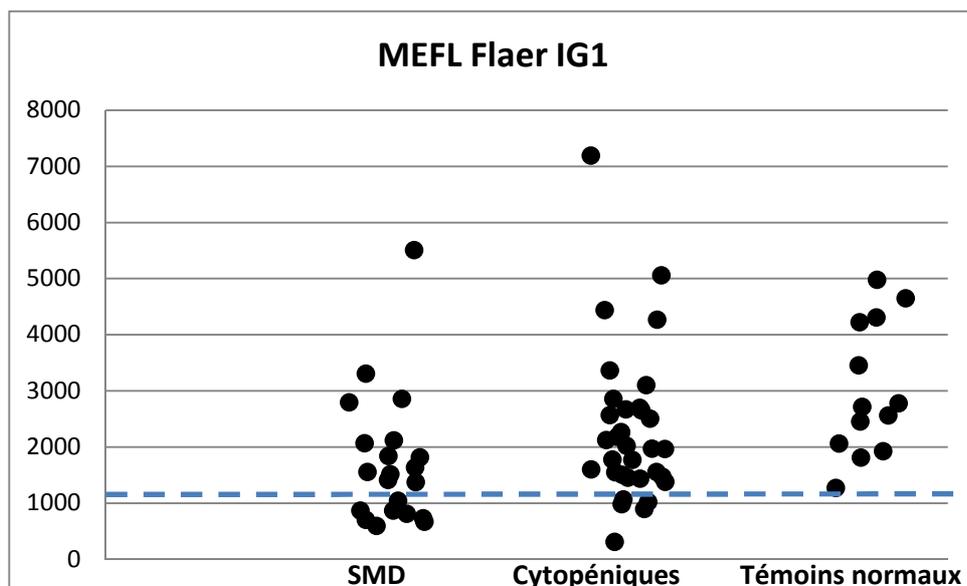


Figure 40 : IG1 ayant une intensité d'expression du marqueur Flaer inférieure à 1100 MEFL

	Groupe SMD	Témoins cytopéniques	Témoins non cytopéniques
Flaer < 1100 MEFL	8	5	0
Flaer ≥ 1100 MEFL	13	29	13

Tableau 28 : Répartition des patients en fonction de l'intensité moyenne d'expression du marqueur Flaer sur leurs granuleux immatures

En ne prenant en compte, que le groupe SMD d'une part, et le groupe témoins cytopéniques d'autre part, ce seuil arbitraire de 1100 MEFL présente une sensibilité de 38% et une spécificité de 85% au sein de notre cohorte. Il semble donc bien y avoir une diminution plus fréquente de l'intensité d'expression du marqueur Flaer pour les granuleux immatures des patients atteints de syndromes myélodysplasiques. Le test Chi² est significatif (p=0,01).

4.4.2. Etude qualitative

A partir du groupe des témoins non cytopéniques, nous avons constitué une banque d'histogrammes normaux dont la Figure 41 est un exemple.

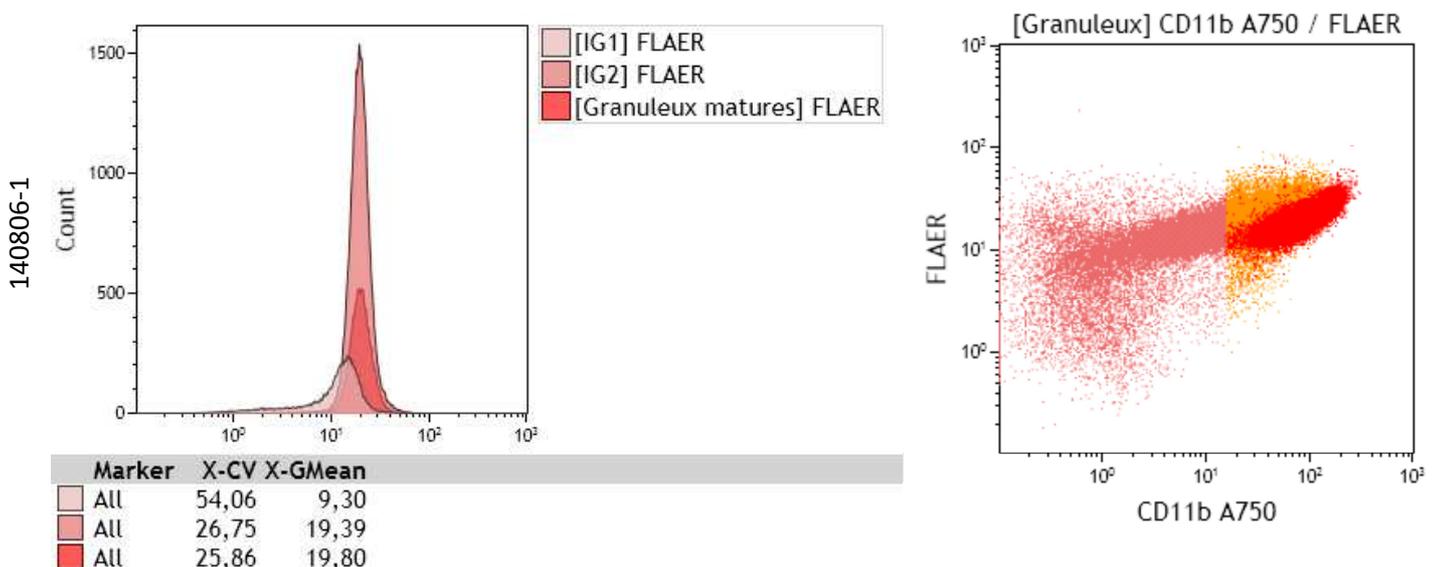


Figure 41 : Exemple d'histogrammes obtenus avec un témoin normal non cytopénique

Les histogrammes des patients issus des 2 autres groupes ont ensuite été comparés un par un à cet ensemble de référence, afin de détecter les éventuels patterns anormaux. Au sein de ces derniers, les ensembles cellulaires incriminés ont été étudiés, afin de vérifier qu'il

s'agissait bien de granuleux atypiques et non pas de débris résiduels. Nous avons ainsi pu mettre en évidence les authentiques patterns anormaux, présentés dans la Figure 42.

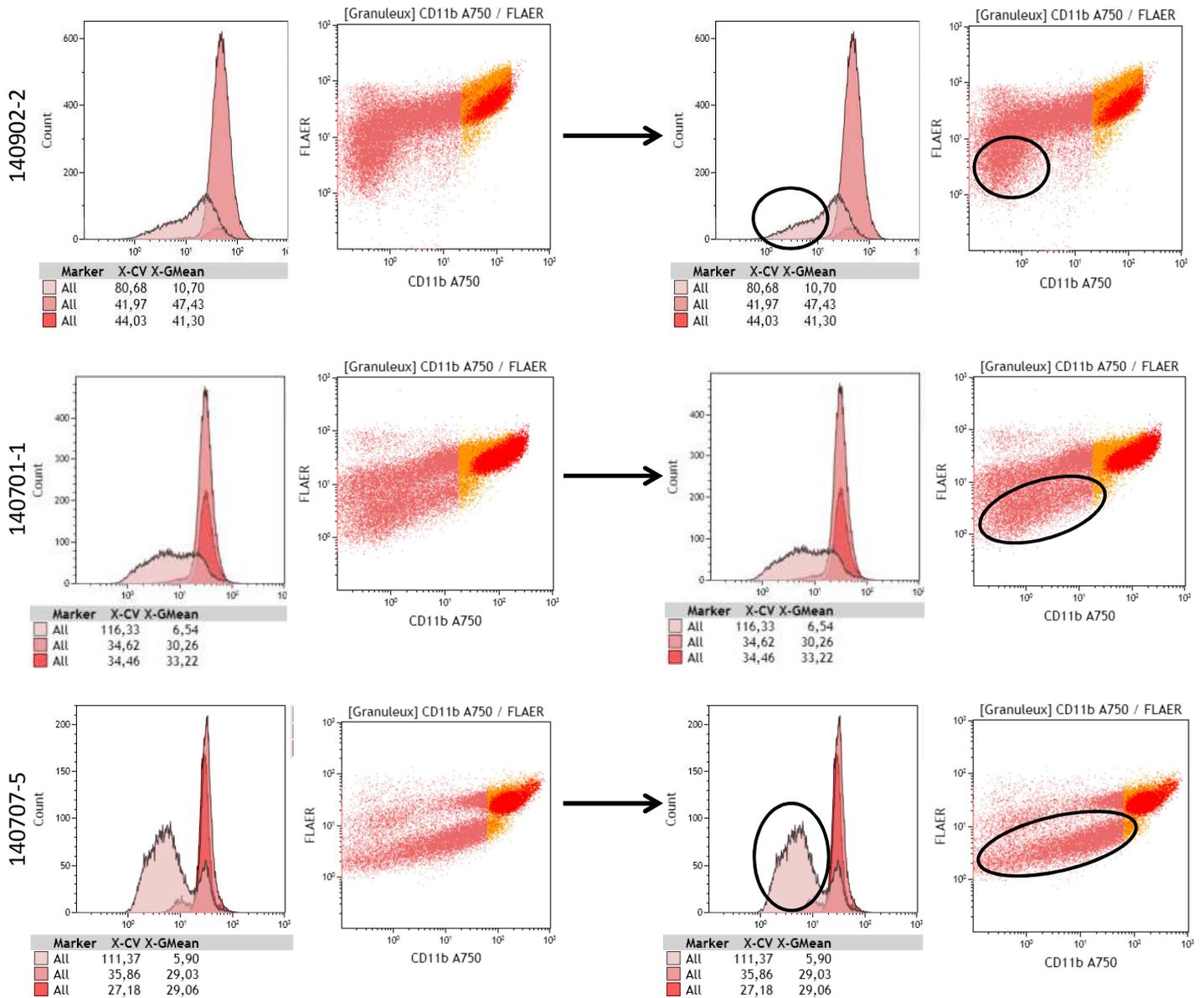


Figure 42 : Patterns Flaer anormaux retrouvés au sein de notre cohorte

Des patterns anormaux ont donc été retrouvés chez 3 patients atteints de SMD (14%). Dans le détail, ils ont été mis en évidence chez les 2 patients souffrant de LMMC-2 et chez l'un des 8 patients pour lesquels le diagnostic de CRDM a été retenu. Aucun pattern anormal n'a été identifié dans le groupe des témoins cytopéniques.

Il semble donc bien y avoir une altération du marqueur Flaer chez un petit contingent de patients atteints de SMD, essentiellement dans les LMMC de haut grade.

Devant ces résultats, nous avons ensuite tenté de trouver une stratégie de fenêtrage objective permettant de cibler les patterns normaux, afin de pouvoir caractériser, par exclusion, les anomalies observées. Malgré de nombreux essais, en utilisant des histogrammes bi-, voir tri-paramétriques (Figure 43), nous avons échoué dans cette tentative et nous avons donc dû nous cantonner à l'appréciation subjective des patterns telle que décrite plus haut.

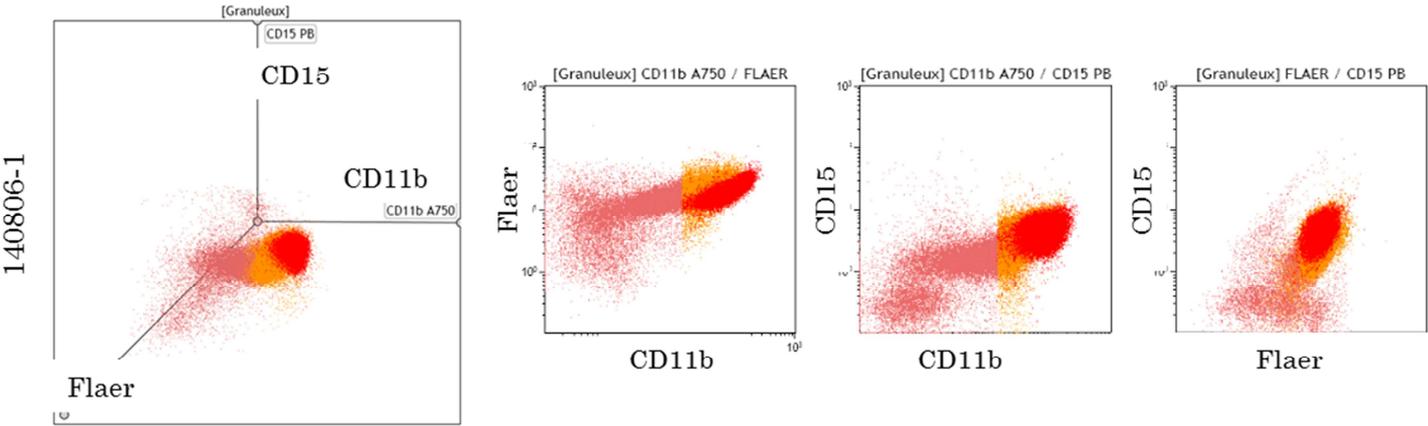


Figure 43 : Différents types d'histogrammes utilisés pour tenter de fenêtrer les patterns Flaer normaux

4.5. Score global

Enfin, nous avons cherché à déterminer un score global, présentant le meilleur rapport sensibilité/spécificité, en regroupant l'ensemble des informations pouvant être extraites de notre « tube Flaer », à savoir :

- les données issues des différentes approches d'étude de la maturation granuleuse (cf.4.3),
- les anomalies qualitatives au niveau des patterns de différenciation du marqueur Flaer (Cf.4.4.2),
- le rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes. En effet, ce paramètre – recommandé par l'ELN et qui constitue l'un des éléments clés du score d'Ogata - peut aussi être calculé à partir de notre « tube Flaer », directement à partir des populations déjà ciblées (Cf.3.2.4.2 et Annexe 2).

Concernant les marqueurs de maturation granuleuse :

- les critères de positivité utilisés sont les mêmes que ceux précédemment décrits (Cf. Tableau 25),
- pour chacune des approches, seuls les marqueurs présentant une spécificité $\geq 80\%$ ont été retenus pour le calcul, les cases grisées illustrant les marqueurs exclus. Il faut également noter que le marqueur CD 45 a été systématiquement éliminé en raison d'une sensibilité toujours très faible.

Le marqueur Flaer est, pour sa part, considéré comme positif lorsqu'un pattern anormal a été identifié lors de l'analyse qualitative.

Enfin, le Rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes est compté comme anormal si sa valeur est ≤ 6 , cette norme étant issue des travaux de l'ELN (49).

Les différents scores ont ensuite été établis selon les principes suivants

- chaque marqueur anormal a contribué à hauteur d'un point,
- les scores ont été considérés comme positifs pour toute valeur supérieure ou égale à 2.

Nous avons ensuite regardé la sensibilité et la spécificité de chacun d'eux et nous avons obtenu les résultats suivants, présentés dans le Tableau 29 :

Approche Marqueur	A : modification d'intensité (Se/Sp)	B : Modification de CV des granuleux totaux (Se/Sp)	B : Modification de CV au sein des sous populations (Se/Sp)	C : modification des rapports d'intensités (Se/Sp)
CD11b	0,23 / 0,94	0,18 / 1,00	0,50 / 0,90	0,45 / 0,96
CD16	0,32 / 0,82	0,18 / 0,90	0,32 / 0,82	0,23 / 0,94
CD13	0,32 / 0,88			0,14 / 0,92
CD15	0,14 / 0,94		0,59 / 0,84	0,41 / 0,88
CD33	0,14 / 0,94	0,36 / 0,90		0,27 / 0,86
Score Maturation	0,32 / 0,92	0,09 / 1,00	0,50 / 0,90	0,41 / 0,88
Pattern Flaer anormal	0,14 / 1,00			
SS mode des granuleux	0,68 / 0,78			
Score 1 comprenant : Marqueurs Maturation + Pattern Flaer	0,41 / 0,92	0,18 / 1,00	0,50 / 0,90	0,50 / 0,88
Score 2 comprenant: Marqueurs Maturation + SS granuleux	0,55 / 0,90	0,41 / 0,90	0,68 / 0,84	0,68 / 0,84
Score 3 comprenant: Marqueurs Maturation + Pattern Flaer + SS granuleux	0,55 / 0,90	0,41 / 0,90	0,68 / 0,84	0,68 / 0,84

Tableau 29 : Sensibilité et spécificité des scores globaux pouvant être calculés à partir de l'ensemble des données du « tube Flaer »

Ce sont donc les deux scores suivants qui semblent présenter le meilleur ratio sensibilité/spécificité au sein de notre cohorte :

- D'une part, le score associant l'étude des coefficients de variation au sein des sous-populations de granuleux et le rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes. Sa valeur peut donc être comprise entre 0 et 4 et les marqueurs d'intérêts sont dans ce cas CD11b, CD16 et CD15 ;

- D'autre part, le score intégrant les rapports d'intensités de fluorescence et le rapport du SS mode des granuleux sur celui des lymphocytes. Il peut donc varier entre 0 et 6 et les marqueurs considérés sont dans ce cas CD11b, CD16, CD15 et CD33.

L'adjonction de l'étude des patterns de différenciation du marqueur Flaer ne semble pas apporter d'amélioration au niveau des performances de ces deux scores.

5. Discussion

5.1. Protocole mis au point

Le premier objectif de notre travail était de mettre au point un protocole de CMF standardisé et utilisable en routine, permettant l'étude des anomalies de la maturation granuleuse.

Pour cela, nous avons commencé par nous conformer aux recommandations émises en 2012 par l'ELN (39), que ce soit au niveau de l'anticoagulant, du pré-traitement ou encore des anticorps utilisés pour le marquage.

Notre stratégie de fenêtrage a ensuite été guidée par deux objectifs successifs : isoler les granuleux dans leur ensemble, puis individualiser différents stades de maturation. Nous avons donc mis en œuvre le cheminement suivant :

- premièrement, éliminer les doublets qui peuvent être sources d'interférences. Nous avons pour cela utilisé un histogramme biparamétrique FSC hauteur/ FSC aire sous la courbe, suivant ainsi les recommandations de l'ELN ;
- deuxièmement, éliminer les cellules lysées. Nous avons choisi pour cela un histogramme FS/SS sur lequel il est facile d'isoler les cellules vivantes ;
- troisièmement, individualiser les lymphocytes. Pour cela, nous nous sommes basés sur un diagramme CD45/SS car le fenêtrage de cette population y est relativement aisé et il est surtout utilisé quotidiennement, en routine, par tous les laboratoires de CMF. On peut donc considérer ce ciblage comme robuste et reproductible ;
- quatrièmement, soustraire les monocytes. Il est d'usage de fenêtrer cette population sur une représentation CD45/SS, comme pour les lymphocytes. Cependant, dans le cas des SMD, on observe fréquemment une hypogranulation des granuleux se traduisant par une diminution de leur signal SS. Ce dernier va alors se rapprocher de celui de la population monocyttaire ce qui peut rendre délicate la discrimination entre ces deux types cellulaires. Pour s'affranchir de ce problème nous avons appliqué une autre stratégie de fenêtrage, en deux temps. Nous avons choisi, tout d'abord, d'utiliser un histogramme biparamétrique CD14/SS: en effet, les monocytes matures expriment fortement le CD14, contrairement aux granuleux. Néanmoins, les

précurseurs monocytaires n'expriment pas ce marqueur et il est donc impossible - avec cette représentation - de les distinguer des granuleux. Nous nous sommes donc ensuite appuyés sur un histogramme CD33/CD15 sur lequel ces 2 populations sont bien individualisées. En théorie, il serait possible de cibler directement l'ensemble des monocytes – matures et immatures – sur cette dernière représentation, cependant, dans certains SMD, on observe des anomalies d'expression du CD33 sur cette population, ce qui peut rendre difficile l'isolement d'une partie d'entre eux, confondue avec les granuleux. Ainsi, en associant ces deux stratégies de fenêtrage, nous sommes en mesure de limiter cette interférence potentielle à une fraction des précurseurs monocytaires, normalement très minoritaires au sein des monocytes totaux. Les ciblage sont d'autre part relativement aisés et sont donc bien en accord avec notre cahier des charges initial ;

- cinquièmement, éliminer les précurseurs lymphocytaires aussi appelés hémotogones. Pour les cytométristes expérimentés il est relativement facile de fenêtrer cette population sur un histogramme CD45/SS. Cependant, afin de faciliter la manœuvre, nous avons choisi d'utiliser une représentation CD24/SS ;
- sixièmement, cibler trois stades de maturation granuleuse. Au cours de leur différenciation les granuleux vont voir varier l'expression de leurs antigènes de surface. Ainsi, comme l'illustre la Figure 18, le passage au stade myélocyte est marqué par l'apparition du marqueur CD11b ; et l'expression la plus forte du marqueur CD16 est associée aux polynucléaires (47). Nous avons donc choisi de cibler 3 populations à l'aide d'un histogramme CD11b/CD16: la population CD11b-/CD16- - que nous avons baptisée IG1 - correspondant à peu près aux stades blastes et promyélocytes, les cellules CD11b+/CD16- - que nous avons appelées IG2 – correspondant aux myélocytes et métamyélocytes et enfin le contingent CD11b+/CD16+ - que nous avons considéré comme étant les granuleux matures - aux polynucléaires. Les cellules non fenêtrées ont été considérées comme des éléments non granuleux qui n'ont pas été pris en compte pour la suite des analyses. Afin de standardiser au maximum le fenêtrage, le seuil du CD11b a été défini arbitrairement comme étant le point d'inflexion de l'expression du marqueur CD16 et les granuleux matures ont été définis comme étant l'ensemble des éléments exprimant fortement le CD16 de manière homogène (grande densité de points sur l'histogramme). Cette

stratégie apparaît suffisamment simple et objective pour permettre une bonne reproductibilité inter-opérateur.

Troisième aspect dans la mise au point de notre protocole : la standardisation de la quantification antigénique. Notre stratégie - en utilisant les billes SPHERO™ Rainbow Calibration Particles (Spherotech, Inc.) pour convertir les intensités de fluorescence mesurées en MEF – permet de s'affranchir à la fois des variations inhérentes aux différentes machines mais aussi de celles liées aux habitudes de réglages des différentes équipes. Elle nous est donc apparue tout à fait pertinente et très intéressante. Ainsi, même s'il reste préférable de calibrer en amont les appareils entre les différents centres, notre approche de standardisation permet de s'affranchir des écarts résiduels. Néanmoins, elle repose sur le postulat que les différents signaux ont été parfaitement compensés lors de la mise en place du protocole. En effet, la courbe d'étalonnage est établie en passant les billes sur le cytomètre avec les réglages du protocole patient, mais sans les compensations. Ainsi, si cette démarche semble pouvoir être adoptée sans soucis pour des marquages avec peu de couleurs - ne nécessitant pas de compensations - il faut être particulièrement vigilant dans le cas de protocoles complexes, tels que le nôtre, mettant en jeu 9 fluorochromes.

5.2. Cohorte de patients

Nous avons choisi de réaliser une étude prospective sur 5 mois avec inclusion, au fil de l'eau, de tous les patients faisant l'objet d'un myélogramme au CHU de Limoges pour suspicion de SMD. Nous souhaitons ainsi réaliser notre travail avec le minimum de biais de sélection, à partir d'une cohorte de patients issue de « la vraie vie » au sein du laboratoire. Avec cette démarche sans a priori, nous avons au final inclus un nombre satisfaisant de témoins mais relativement peu de patients atteints de SMD (n=22). Ceci confère donc un évident manque de puissance à nos résultats et ne permet pas d'étudier individuellement et de manière fiable les différents sous-groupes de SMD, du fait de leurs effectifs trop restreints.

5.3. Score d'Ogata

Nous avons choisi d'établir le score d'Ogata, pour chacun des patients inclus, et ce pour deux raisons principales. Tout d'abord, vérifier que nous obtenions des performances conformes à celles issues de la littérature - validant ainsi notre cohorte de patients ainsi

qu'une partie de nos étapes pré-analytiques et analytiques - tout ceci venant abonder la pertinence des résultats obtenus dans les études de la maturation granuleuse et du marqueur Flaer. D'autre part, nous souhaitons comparer, au sein même de notre cohorte, les performances de notre protocole standardisé à celles du score d'Ogata qui constitue l'approche de CMF la plus utilisée aujourd'hui dans les SMD.

Nous avons retrouvé une sensibilité globale de 59% et une spécificité de 82%, résultats relativement similaires à ceux issus de la littérature et présentés dans le Tableau 30 (48,49,64). On peut également noter qu'ils sont tout particulièrement proches d'une autre étude réalisée au laboratoire du CHU de Limoges sur 225 patients - dans le cadre d'une thèse d'exercice et non encore publiée à ce jour – qui retrouvait une sensibilité de 61% et une spécificité de 83%. Ces résultats ne pourraient-ils suggérer que des petites variations dans les protocoles utilisés dans les différents centres seraient à l'origine d'écarts de performances du score d'Ogata? Ou alors, cela pourrait-il signer des différences dans le recrutement des patients ?

Etude	Effectif	Sensibilité	Spécificité
CHU de Limoges D'après Morvan <i>et al.</i>	225	61%	83%
Bardet <i>et al.</i> 2015 (64)	652	37 à 84% en fonction du type de SMD	89%
Ogata <i>et al.</i> 2009 (48)	89	44%	92%
	151	71%	92%
Della Porta <i>et al.</i> 2012 (49)	259	69%	92%
	538	70%	93%

Tableau 30 : Performances du score d'Ogata au sein de différentes études

5.4. Etude de la maturation granuleuse

Afin d'étudier la maturation granuleuse de la manière la plus simple et la plus objective possible, nous avons choisi de nous baser sur les 2 grands types d'informations pouvant être directement extraits du logiciel de retraitement Kaluza®, à savoir:

- des paramètres d'intensité : moyenne arithmétique, moyenne géométrique, mode et médiane. Nous avons choisi de nous baser sur la moyenne géométrique, comme il est d'usage dans notre laboratoire. En effet, celle-ci est moins sensible que la moyenne arithmétique aux valeurs les plus extrêmes et reflète donc mieux la tendance centrale d'une série de données ;
- un paramètre de dispersion : le coefficient de variation.

Notre protocole ayant été mis au point pour les besoins de l'étude, nous n'avons pas pu utiliser des valeurs de normalité issues de la littérature. Nous avons donc établi nos propres intervalles, en nous basant sur des statistiques simples et en partant des deux postulats suivants:

- les patients non cytopéniques peuvent être considérés comme un échantillon à peu près représentatif de la population normale ;
- la répartition des différents marqueurs (moyenne de fluorescence, CV, rapports d'intensités) suit une distribution normale - ou gaussienne - au sein de la population générale. Partant de cette hypothèse, nous avons donc considéré que les valeurs situées en dehors des intervalles « moyenne \pm 3 écarts types » étaient « anormales ». En effet, dans une distribution gaussienne 99,7% des valeurs doivent être comprises au sein de cet ensemble.

En nous basant sur les intervalles susmentionnés, nous avons ensuite cherché à savoir, premièrement, si nous retrouvions des anomalies des marqueurs CD11b, CD16, CD13, CD15, CD33 et CD45 – telles que décrites dans la littérature (39) – et deuxièmement laquelle des 5 approches A, B₁, B₂, C ou D étudiées semblait la plus pertinente.

Pour le CD11b nous avons retrouvé des anomalies dans tous les cas et avec de très bonnes spécificités – toutes supérieures ou égales à 90% - mais des sensibilités variables : plutôt satisfaisantes avec l'étude des CV au sein des différentes sous populations ou encore celle des rapports d'intensités, mais plutôt médiocres dans les 2 autres cas. Dans le cas du CD16, on observe là encore des spécificités très correctes – toutes supérieures ou égales à 82% - mais des sensibilités plutôt moyennes comprises entre 18 et 32%. En ce qui concerne le CD13, seule l'étude des intensités présente une spécificité et une sensibilité satisfaisante, respectivement 88 et 32%. Pour le CD15, on constate que ce sont uniquement les approches basées, pour l'une sur les modifications de CV au sein des différentes sous populations, et, pour l'autre, sur les rapports d'intensités, qui présentent de bonnes performances avec des spécificités de 84 et 88% et des sensibilités de 59 et 41%. Enfin, pour le CD33, ce sont premièrement l'étude du CV de la population granuleuse globale et deuxièmement les modifications des rapports d'intensités qui montrent des spécificités intéressantes – supérieures ou égales à 86% - avec des sensibilités relativement moyennes de 26 et 27%.

On peut donc déduire de tout ceci que les quatre hypothèses que nous avons testées sont valides, et que les anomalies observées dans les SMD se traduisent bien, au niveau de la

maturation granuleuse, à la fois par des modifications d'intensité d'expression de différents marqueurs, par des variations de CV et par des changements de rapport d'intensités des sous-populations les unes par rapport aux autres. Aucune de ces approches ne semble néanmoins se détacher, chacune donnant des performances variables selon les marqueurs. On peut également constater que le protocole d'étude standardisé que nous avons mis au point retrouve bien des anomalies affectant les marqueurs CD11b, CD16, CD13, CD15 et CD33, telles que décrites dans la littérature (39). Les protocoles et les modes d'étude étant différents il nous est apparu peu pertinent de comparer les résultats chiffrés obtenus dans ces différentes études à ceux que nous avons obtenus.

Concernant le CD45 les résultats sont plus décevants. En effet, l'approche qui présente le meilleur rendement est celle qui s'intéresse aux modifications d'intensité et elle atteint péniblement une sensibilité de 18% avec une spécificité de 92%. Des variations d'intensité d'expression du CD45 sont pourtant décrites dans la littérature, et c'est même l'un des 4 paramètres utilisés dans le calcul du score d'Ogata. Il faut néanmoins avoir à l'esprit que dans tous ces travaux, les anomalies identifiées ne se rapportent pas à l'expression du CD45 au cours de la maturation granuleuse – telle que nous l'avons étudiée au cours de ce travail - mais uniquement à son intensité d'expression sur les myéloblastes (39,48,49,64).

Après avoir constaté que chacune de nos quatre approches permet de retrouver des anomalies au cours de la maturation granuleuse dans les SMD, nous avons cherché à savoir laquelle présente, a priori, le meilleur rendement. En combinant les données issues des différents marqueurs, nous avons obtenu d'excellentes spécificités - toutes supérieures ou égales à 88% - mais les sensibilités se sont en revanche révélées décevantes, la meilleure atteignant seulement les 50%. Ainsi, si nous avons bien mis en évidence la pertinence de notre protocole, ses performances se révèlent inférieures au score d'Ogata au sein de notre cohorte. Nous aurions certainement pu obtenir de meilleurs résultats en choisissant, pour chacun des 5 marqueurs individuellement, l'approche la plus efficiente. Néanmoins, en procédant ainsi, nous nous serions écartés de l'un de nos objectifs principaux : la simplicité du protocole, c'est la raison pour laquelle nous n'avons pas opéré de la sorte. En effet, nous n'aurions alors fait que reproduire des résultats déjà largement décrits dans de multiples scores présents dans la littérature (39).

5.5. Etude du marqueur Flaer

Pour l'étude du marqueur Flaer nous avons choisi d'utiliser les mêmes stratégies de fenêtrage et de standardisation de la quantification antigénique que celles déployées pour la maturation granuleuse. En effet, bien qu'aucune étude ne se soit encore intéressée, de cette façon, aux anomalies de l'ancre GPI dans les SMD, cet objectif de reproductibilité nous est apparu comme une démarche vertueuse. Nous avons donc choisi de nous appliquer les mêmes contraintes.

Au sein de notre cohorte, nous avons mis en évidence de manière spécifique ($p= 0,01$) une diminution plus fréquente de l'intensité d'expression du marqueur Flaer pour les granuleux immatures des patients atteints de SMD. Cependant, nous avons également constaté - chez les témoins - que les formes granuleuses les plus immatures montraient physiologiquement une expression moindre. Ainsi, les SMD étant associés à une augmentation du taux de blastes myéloïdes, celle-ci aurait pu expliquer nos résultats.

Pour cette raison, nous avons choisi de pousser plus avant nos investigations en nous intéressant aux patterns de différenciation. En effet, un excès de formes granuleuses jeunes devrait se traduire par un plus grand nombre de cellules dans la partie la plus immature des IG1, mais sans remettre en cause le schéma global de différenciation. Des anomalies au niveau de ces patterns devraient donc suggérer la présence d'un contingent de cellules « anormales ». Or, au sein de notre cohorte, nous n'avons retrouvé des patterns anormaux que chez des patients atteints de SMD. Ceci est donc bien en faveur d'anomalies affectant l'ancre GPI lors des stades précoces de maturation granuleuse au cours des syndromes myélodysplasiques. Celles-ci apparaissent peu fréquentes, concernant seulement 14% des patients de notre cohorte, essentiellement ceux atteints de LMMC de haut grade.

5.6. Score global

Pour terminer nous avons souhaité combiner dans différents scores l'ensemble des informations pouvant être extraites de notre tube « Flaer » afin d'améliorer les résultats – plutôt moyens – que nous avons obtenus avec l'étude isolée de la maturation granuleuse. Pour cela, nous avons adjoint à ces derniers, à la fois les données issues de notre étude du marqueur Flaer, mais également l'évaluation de la granulosité des neutrophiles obtenue en comparant leur signal SS à celui des lymphocytes. En effet, ce dernier paramètre, recommandé par l'ELN, peut être aisément calculé avec notre protocole et il est en outre bien connu des équipes ayant déjà utilisé le score d'Ogata.

En combinant le signal SS à nos marqueurs de maturation granuleuse nous avons vu deux approches se détacher : celle étudiant les CV au sein des sous-populations de granuleux et celle s'intéressant aux rapports d'intensités. Avec leur sensibilité de 68% et leur spécificité de 84% ces 2 modes d'étude affichent des performances légèrement supérieures au score d'Ogata au sein de notre cohorte. En effet, nous avons retrouvé pour celui-ci une sensibilité de 59% et une spécificité de 82%. Ces résultats sont néanmoins à relativiser compte tenu à la fois de nos faibles effectifs, mais aussi des meilleurs rendements décrits dans la littérature pour ce score (Cf. Tableau 30).

L'adjonction des informations issues du Flaer ne permet pas d'améliorer les performances, ce qui apparaît peu surprenant compte tenu de sa faible sensibilité de 14% au sein de notre cohorte. De plus, l'étude de ce marqueur étant basée sur une analyse de patterns de différenciation, elle est subjective et ne répond donc pas à nos impératifs de standardisation.

Pour finir, il faut noter que c'est certainement l'approche basée sur l'étude des rapports d'intensités qui serait la plus facile à mettre en œuvre par d'autres laboratoires.

Conclusion

Au cours de ce travail nous avons donc mis au point un protocole standardisé pour l'étude des syndromes myélodysplasiques en CMF. Les résultats que nous avons obtenus semblent comparables à ceux du score d'Ogata ce qui illustre bien la viabilité de ce type d'approche, parmi d'autres, qui permettent d'utiliser la puissance quantitative de l'outil CMF en routine et à grande échelle de manière reproductible. Ainsi, même si les performances du score que nous avons mis au point sont dans la moyenne de ceux déjà développés et si son évaluation à plus grande échelle ne semble dès lors pas réellement pertinente, le cahier des charges que nous nous sommes imposé et les moyens mis en œuvre pour y répondre constituent le réel intérêt de cette partie du travail. Il faut par exemple noter que la technique de standardisation de la quantification antigénique, mise au point ici, est désormais utilisée dans un autre protocole de recherche piloté par le laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges, protocole sans rapport avec les SMD.

Concernant le marqueur Flaer, il semble donc bien réellement y avoir des altérations de l'ancre GPI dans les SMD au cours des stades précoces de la maturation granuleuse, indépendamment de la présence éventuelle de petits clones HPN telle que décrite dans la littérature. Compte tenu de nos faibles effectifs, il apparaît donc intéressant de poursuivre les recherches afin de vérifier et compléter ces premiers résultats, voire, le cas échéant, d'éclaircir la place dans les SMD d'éventuelles altérations de cette ancre indispensable pour de nombreuses protéines membranaires.

Références bibliographiques

1. 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. *Leukemia Research*. juin 2007;31(6):727-36.
2. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. Les Syndromes Myélodysplasiques [Internet]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/117-les-syndromes-myelodysplasiques>
3. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. juill 2012;125(7 Suppl):S2-5.
4. Adés L, Fenaux P, Dreyfus F. Les syndromes myélodysplasiques de l'adulte. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2012. 213 p.
5. Cancer TIA for R on. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 4 edition. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., éditeurs. Lyon, France: World Health Organization; 2008. 441 p.
6. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998;83(1):71-86.
7. Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. déc 2013;26(4):319-26.
8. Foran JM, Shammo JM. Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *The American Journal of Medicine*. juill 2012;125(7):S6-13.
9. Fontenay M, Raynaud S, Rose C, Gardin C, Varet B, Baumelou E. Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD): diagnostic, classification, traitement [Internet]. Groupe Francophone des Myélodysplasies; 2008. Disponible sur: www.gfmgroup.org;
10. Haute Autorité de Santé (HAS). GUIDE - AFFECTION DE LONGUE DURÉE INSUFFISANCES MÉDULLAIRES ET AUTRES CYTOPÉNIES CHRONIQUES Syndromes myélodysplasiques. 2008.
11. Valent P, Horny H-P. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *European Journal of Clinical Investigation*. juill 2009;39(7):548-53.
12. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Ades L, Cermak J, del Canizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 24 oct 2013;122(17):2943-64.
13. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/197-dysmyelopoiese-et-sa-quantification-au-cours-des-syndromes-myelodysplasiques>

14. Killick SB, Carter C, Culligan D, Dalley C, Das-Gupta E, Drummond M, et al., British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2014;164(4):503-25.
15. Vardiman J. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. *Leukemia Research.* déc 2012;36(12):1453-8.
16. Steensma DP. The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? *ASH Education Program Book.* 2009;2009(1):645-55.
17. Cluzeau T, Fenaux P. Nouveaux outils et traitements pour les syndromes myélodysplasiques. *La Revue de Médecine Interne.* mars 2013;34(3):159-67.
18. 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. *Leukemia Research.* janv 2014;38(1):57-64.
19. Bejar R, Tiu RV, Sekeres MA, Komrokji RS. Myelodysplastic Syndromes: Recent Advancements in Risk Stratification and Unmet Therapeutic Challenges. *American Society of Clinical Oncology*; 2013. Disponible sur: <http://meetinglibrary.asco.org/content/220-132>
20. Germing U, Kündgen A. Prognostic scoring systems in MDS. *Leukemia Research.* déc 2012;36(12):1463-9.
21. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 20 sept 2012;120(12):2454-65.
22. Malcovati L, Porta MGD, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 20 oct 2005;23(30):7594-603.
23. Kochenderfer JN, Kobayashi S, Wieder ED, Su C, Molldrem JJ. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood.* 15 nov 2002;100(10):3639-45.
24. Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, et al. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 1 août 2007;110(3):847-50.
25. Flow Cytometry - A Survey and the Basics [Internet]. Disponible sur: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
26. Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Maynadié M, Martet G. *La cytométrie en flux.* Paris: Editions Tec & Doc; 2006.
27. Jouault H, Imbert M. *La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie.* *Revue Française des Laboratoires.* avr 1995;1995(275):29-35.
28. Givan AL. *Flow cytometry: first principles.* New York: Wiley-Liss; 1992. 202 p.

29. Ogata K, Yoshida Y. Clinical implications of blast immunophenotypes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. sept 2005;46(9):1269-74.
30. 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):3887-96.
31. 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):1037-44.
32. 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):979-87.
33. 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. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 août 2005;124(2):170-81.
34. Del Cañizo MC, Fernández ME, López A, Vidriales B, Villarón E, Arroyo JL, et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. avr 2003;88(4):402-7.
35. Karmon Y, Manaster J, Chezar J. Immunophenotypic characterization of myelopoiesis in early and late myelodysplastic syndromes: Use of CD44 as an aid in early diagnosis. *Cytometry*. 15 août 2002;50(4):225-30.
36. 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):2349-56.
37. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. mars 2004;58A(1):62-71.
38. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, Fernandez I, Corrado CS, Giere I, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. mars 2006;70B(2):63-70.
39. 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):1730-41.
40. Van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VHJ, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 25 oct 2007;111(3):1067-77.
41. 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. *Leukemia & Lymphoma*. mars 2013;54(3):472-5.

42. Wells DA. 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*. 20 mars 2003;102(1):394-403.
43. 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*. 19 août 2010;116(19):4549-63.
44. Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager 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*. 1 août 2009;94(8):1124-34.
45. Westers TM, Alhan C, Chamuleau MED, van der Vorst MJDL, Eeltink C, Ossenkoppele GJ, et al. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood*. 4 mars 2010;115(9):1779-84.
46. 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 Part B: Clinical Cytometry*. juill 2011;80B(4):201-11.
47. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leukemia Research*. janv 2008;32(1):5-17.
48. 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*. 1 août 2009;94(8):1066-74.
49. 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*. 1 août 2012;97(8):1209-17.
50. Peffault de Latour R, Amoura Z, Socié G. L'hémoglobininurie paroxystique nocturne. *La Revue de Médecine Interne*. mars 2010;31(3):200-7.
51. Hernández-Campo PM, Almeida J, Matarráz S, de Santiago M, Sánchez ML, Orfao A. Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom*. 15 janv 2007;72(1):34-42.
52. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 30 oct 2014;124(18):2804-11.
53. Longo L, Bessler M, Beris P, Swirsky D, Luzzatto L. Myelodysplasia in a patient with pre-existing paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a clonal disease originating from within a clonal disease. *Br J Haematol*. juin 1994;87(2):401-3.
54. Van Kamp H, Smit JW, van den Berg E, Ruud Halie M, Vellenga E. Myelodysplasia following paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: evidence for the emergence of a separate clone. *Br J Haematol*. juin 1994;87(2):399-400.

55. Segel GB, Lichtman MA. Aplastic anemia: acquired and inherited. Williams Hematology 8th ed New York: McGraw-Hill Medical. 2010;569-90.
56. Iwanaga M, Furukawa K, Amenomori T, Mori H, Nakamura H, Fuchigami K, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. British Journal of Haematology. 1998;102(2):465-74.
57. Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. Blood. 1 déc 2002;100(12):3897-902.
58. Kaiafa G, Papadopoulos A, Ntaios G, Saouli Z, Savopoulos C, Tsesmeli N, et al. Detection of CD55- and CD59-deficient granulocytic populations in patients with myelodysplastic syndrome. Ann Hematol. avr 2008;87(4):257-62.
59. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, Medeiros LJ, Stachurski D, Anderson M, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. Haematologica. 1 janv 2009;94(1):29-37.
60. Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL, Lawrence TS, Jones RJ, Buckley JT. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. Blood. 1999;93(5):1749-56.
61. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. American journal of clinical pathology. 2000;114(3):459-66.
62. Guide_Bonnes_Pratiques.pdf [Internet]. Disponible sur: http://sfh.hematologie.net/fr/telechargements/Pratiques_Professionnelles/Guide_Bonnes_Pratiques.pdf
63. FLOW CYTOMETRY CALIBRATION PARTICLES - Spherotech [Internet]. Disponible sur: <http://www.spherotech.com/CalibrationParticles.htm>
64. Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, Morvan C, Debord C, Trimoreau F, et al., On behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM) and the Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Haematologica. 1 avr 2015;100(4):472-8.

Table des annexes

Annexe 1. Molécules d'équivalent fluorochrome des billes SPHERO™ Rainbow Calibration Particles	109
Annexe 2. Protocole de calcul du score Ogata au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges.....	106
Annexe 3. Images obtenues en CMF	108
Annexe 3.1 Marqueurs CD11b/CD16	108
Annexe 3.2 Marqueurs CD13/CD15	115
Annexe 3.3 Marqueurs CD33/CD45	120
Annexe 3.4 Histogrammes d'étude du marqueur Flaer	126

Annexe 1. Molécules d'équivalent fluorochrome des billes SPHERO™ Rainbow Calibration Particles

FITC	
Pic	MEFL
1	
2	792
3	2079
4	6588
5	16471
6	47497
7	137049
8	271647

PE CY5,5	
Pic	MECY
1	
2	1614
3	4035
4	12025
5	31896
6	95682
7	353225
8	1077421

APC A700	
Pic	MEAPCA700
1	
2	129
3	367
4	1120
5	2864
6	7644
7	19081
8	37258

PE	
Pic	MEPE
1	
2	531
3	1504
4	4819
5	12506
6	36159
7	109588
8	250892

PE CY7	
Pic	MEPCY7
1	
2	
3	
4	
5	14916
6	42336
7	153840
8	494263

APC A750	
Pic	MEAF750
1	
2	2065
3	4985
4	14459
5	35972
6	91534
7	249168
8	485507

ECD	
Pic	MEPTR
1	
2	233
3	669
4	2179
5	5929
6	18219
7	63944
8	188785

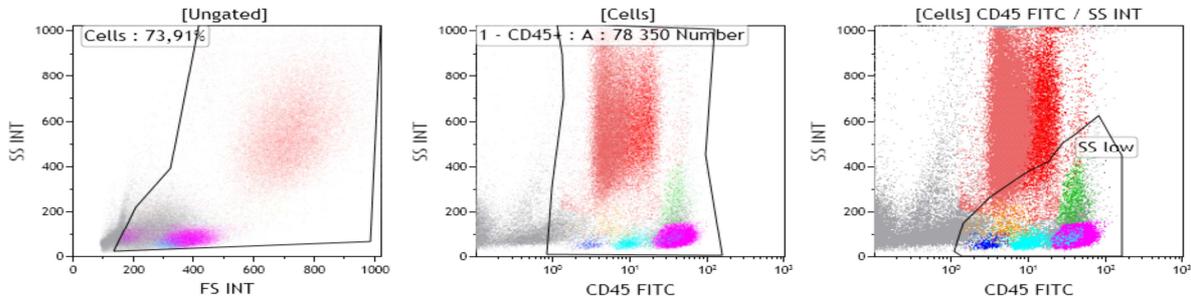
APC	
Pic	MEAP
1	
2	373
3	1079
4	3633
5	9896
6	28189
7	79831
8	151008

Pacific Blue (PB)	
Pic	MEPB
1	
2	150
3	332
4	903
5	2543
6	7577
7	19902
8	35490

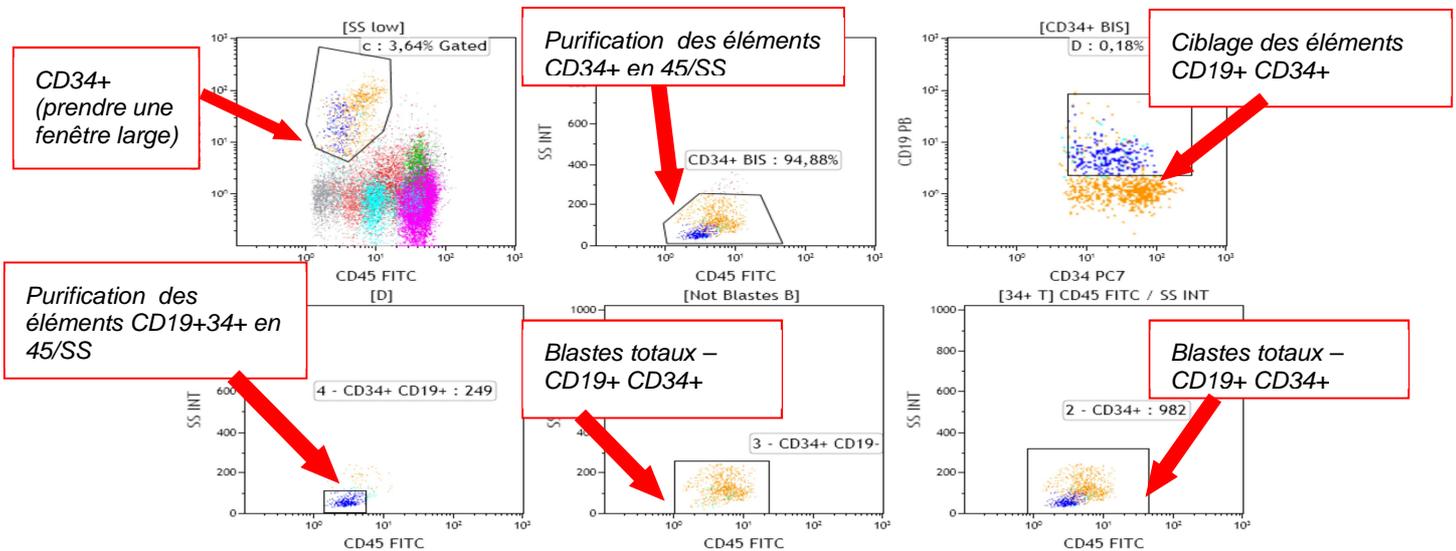
Krome Orange (KO)	
Pic	MEKO
1	
2	310
3	712
4	2050
5	5552
6	16474
7	57084
8	151864

Annexe 2. Protocole de calcul du score Ogata au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges

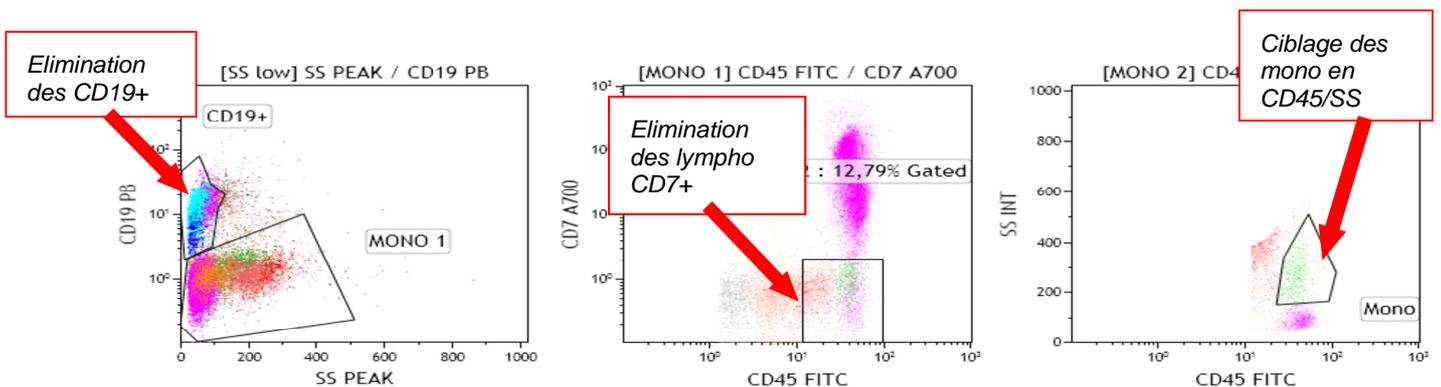
Etape 1 : Elimination des débris et fenêtrage des éléments « SS low »



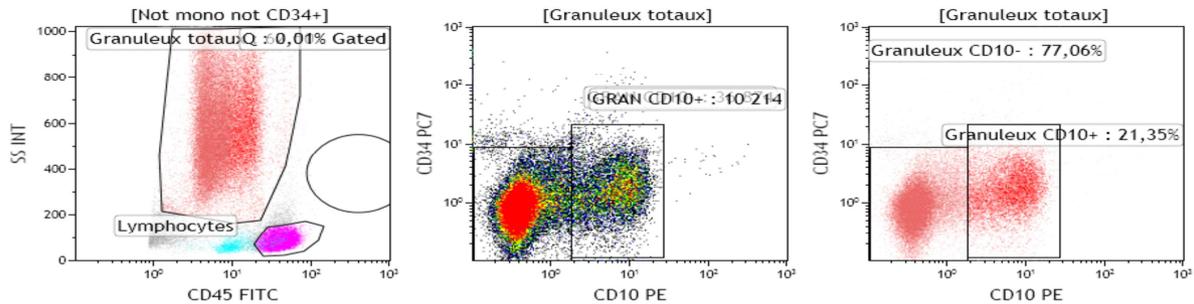
Etape 2 : Fenêtrage des éléments blastiques



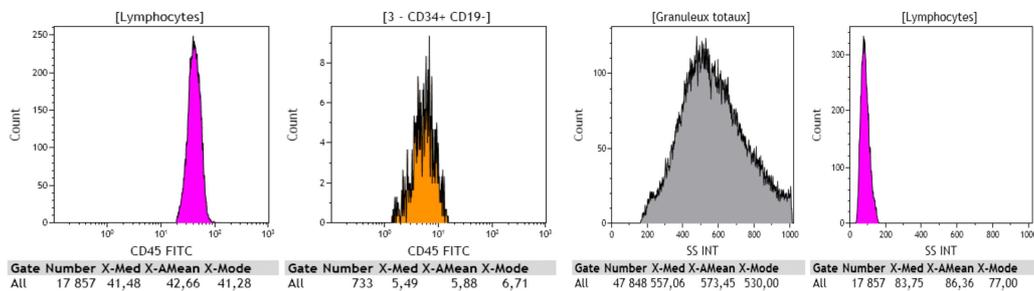
Etape 3 : Fenêtrage des éléments monocytes



Etape 4: Fenêtrage des lymphocytes, granuleux totaux, granuleux CD10- (les plus immatures) et granuleux CD10+



Etape 5 : Récupération des données pour le score Ogata



Etape 6 : Calcul du score Ogata

Gate	Number
All	178 276
1 - CD45+ : A	78 350
2 - CD34+	982
3 - CD34+ CD19-	733
4 - CD34+ CD19+	249

[Lymphocytes] CD45 FITC Geometric Mean	40,89
[3 - CD34+ CD19-] CD45 FITC Geometric Mean	5,14
[Lymphocytes] SS INT Mode	77,00
[Granuleux totaux] SS INT Mode	530,00
[Myéloblastes CD7+] % Gated	19,24
[Monocytes CD56+] % Gated	11,76

Paramètre 1 : Progéniteur myéloïde parmi les cellules totales $N < 2\%$
 $CD34+CD19- (number) / CD45+ (number) = 982/78350 * 100 = 1.25\%$

Paramètre 2 : Progéniteur B CD19+ parmi les CD34 totaux $N > 5$
 $CD34+CD19+ (number) / CD34+ (number) = 249/982 * 100 = 25\%$

Paramètre 3 : Ratio entre la moyenne de fluorescence du CD45 des progéniteurs myéloïdes
 $4-7.5$

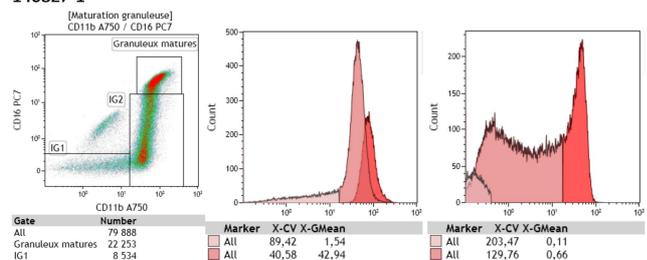
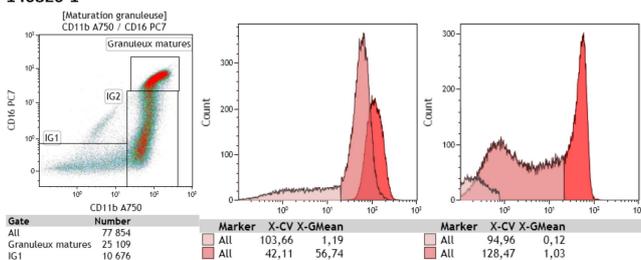
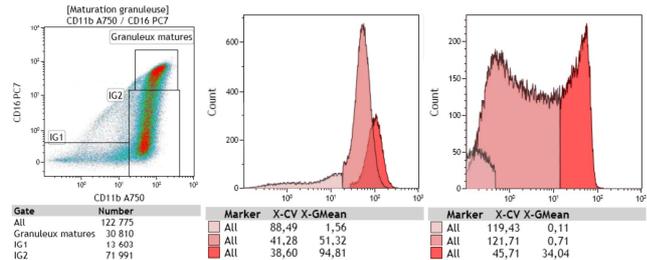
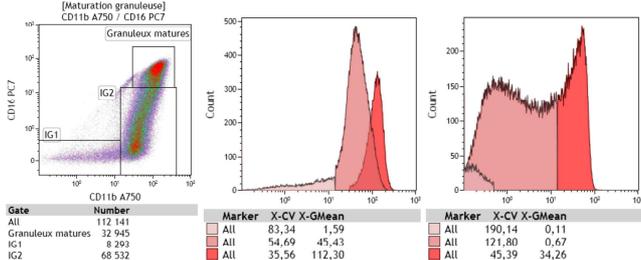
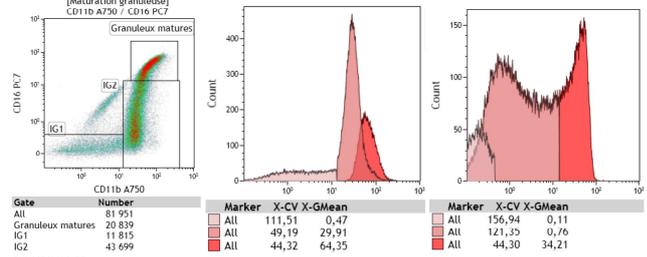
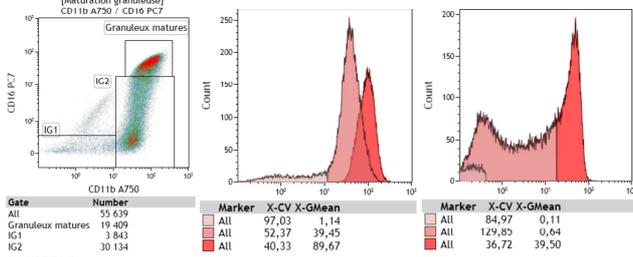
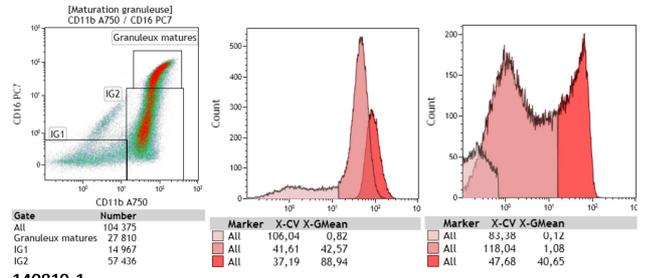
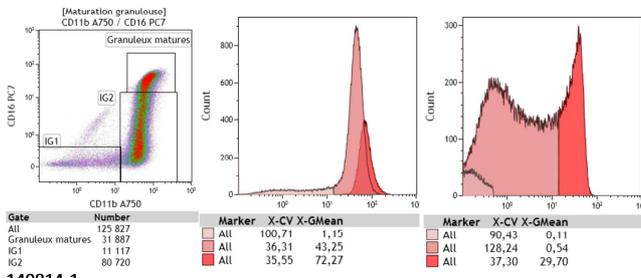
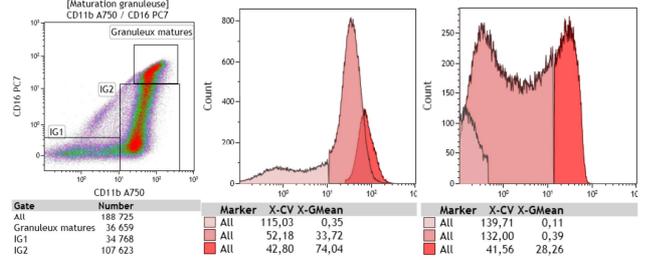
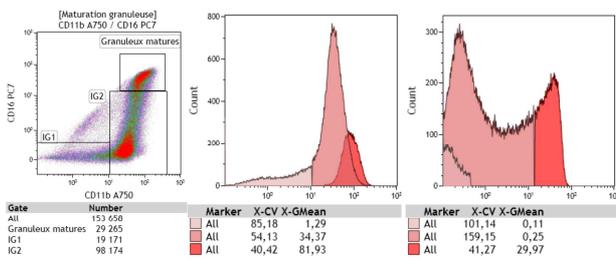
Mean CD45 lymphocytes/ mean blastes myéloïdes = $40.89/5.14 = 7.95$

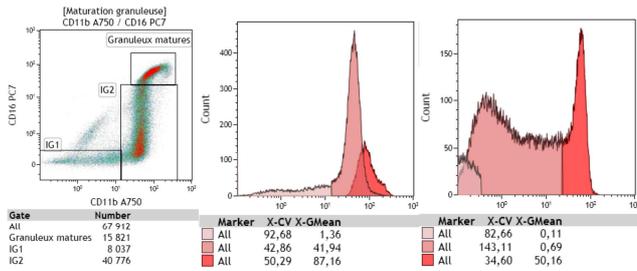
Paramètre 4 : Ratio entre le SS mode des granuleux et lymphocytes $N > 6$
 $SS mode granuleux totaux / SS mode lymphocytes = 530/77 = 6.88$

Annexe 3. Images obtenues en CMF

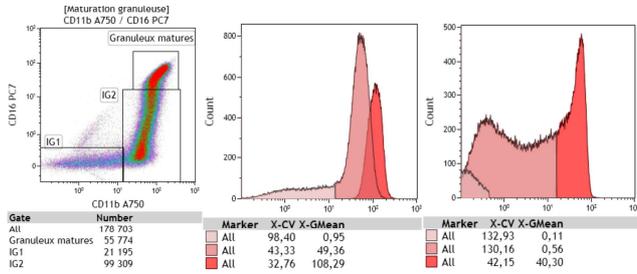
Annexe 3.1 Marqueurs CD11b/CD16

Annexe 3.1.1 Témoins non cytopéniques



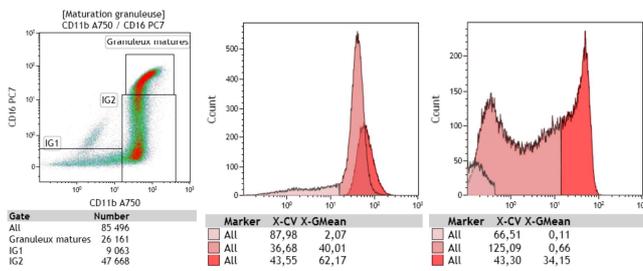


140707-3

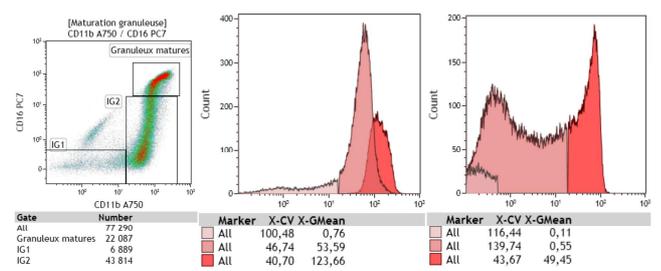


140717-1

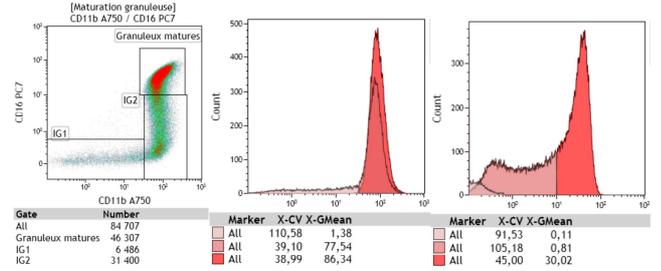
Annexe 3.1.2 Anémies réfractaires



140707-1

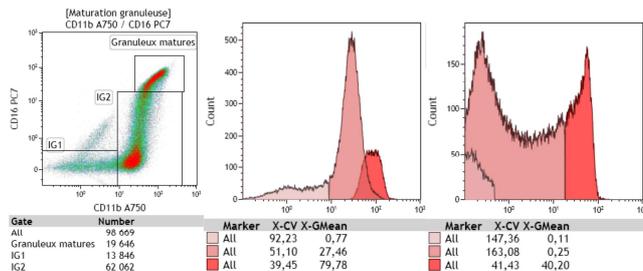


140710-2



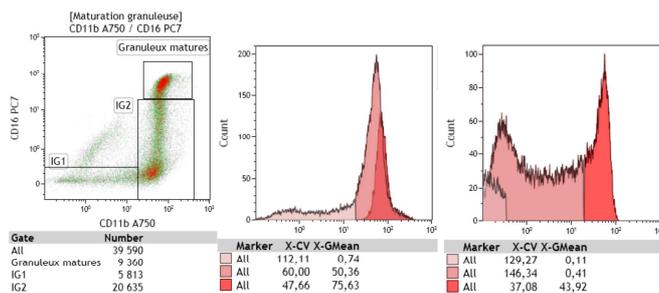
140716-2

Annexe 3.1.3 ARSIA

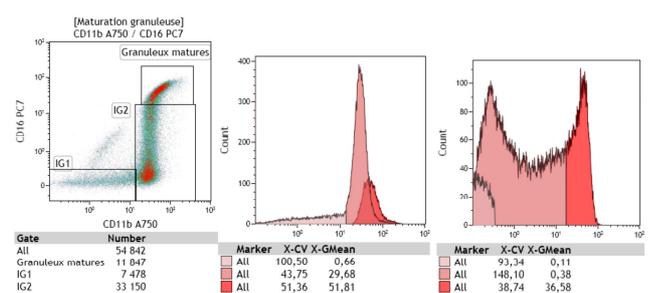


140916-1

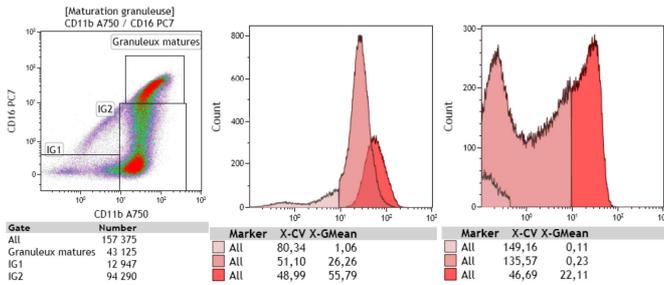
Annexe 3.1.4 CRDM



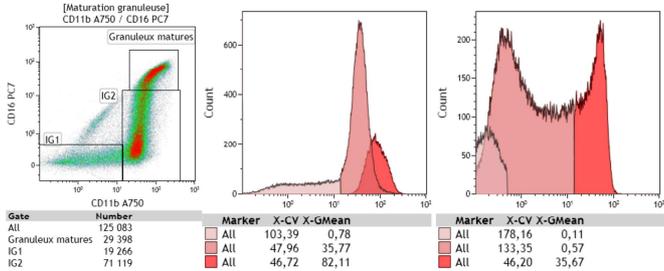
140626-1



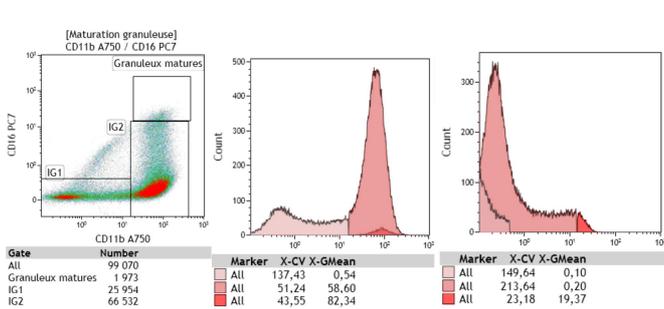
140626-2



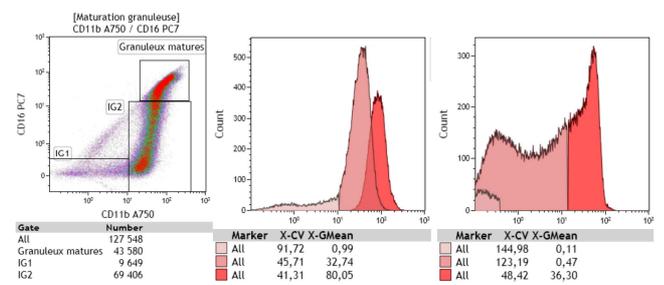
140823-3



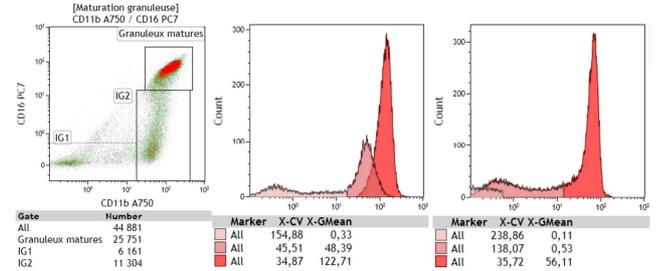
140825-2



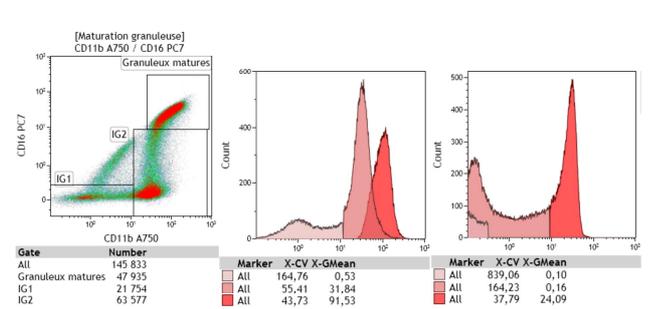
140902-2



140807-2

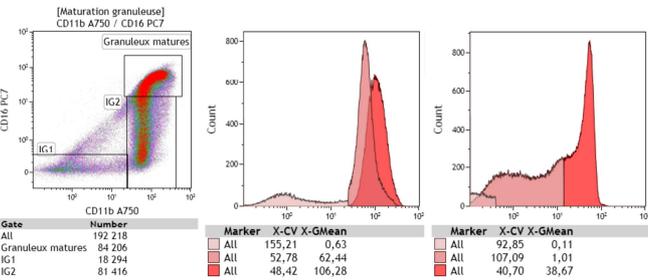


140826-2

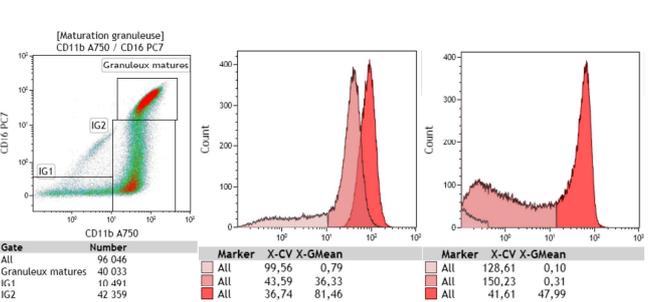


141029-2

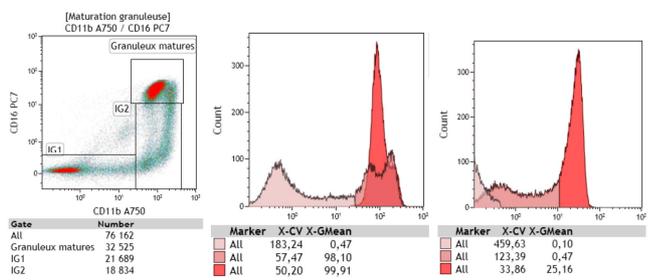
Annexe 3.1.5 AREB-I



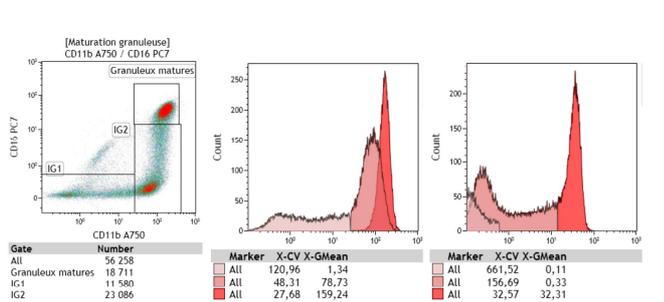
140813-1



141007-1

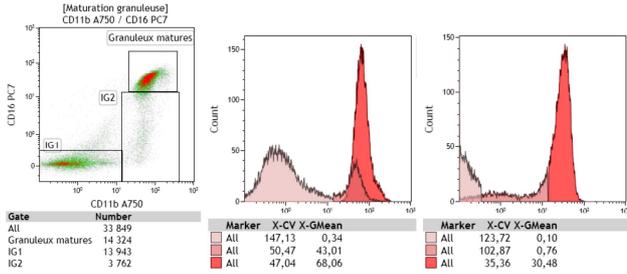


140825-1

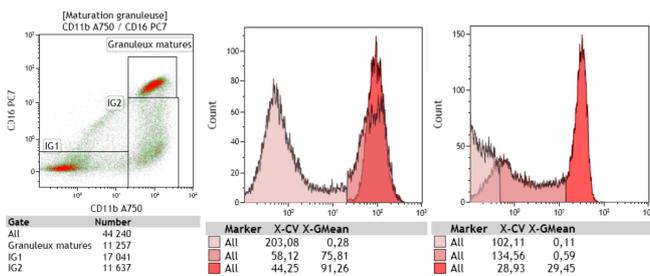


140728-1

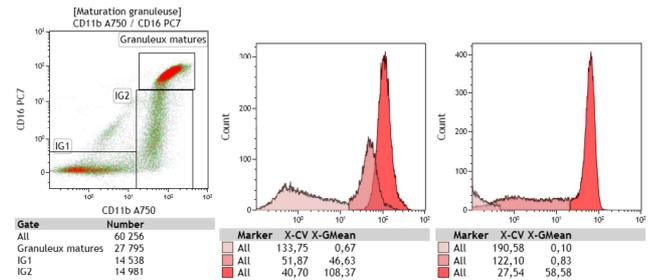
Annexe 3.1.6 AREB-II



140804-1

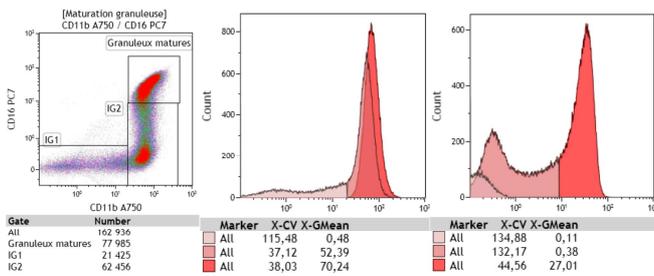


140807-1

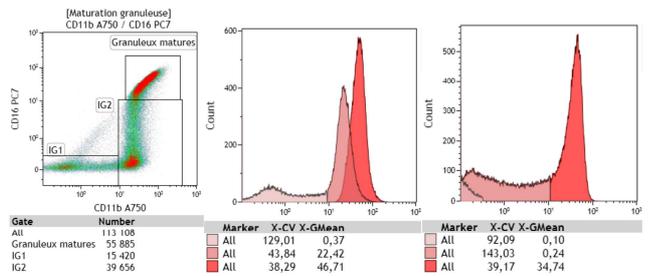


140902-1

Annexe 3.1.7 LMMC-I

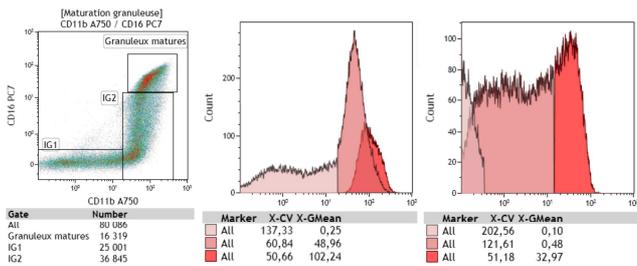


140919-1

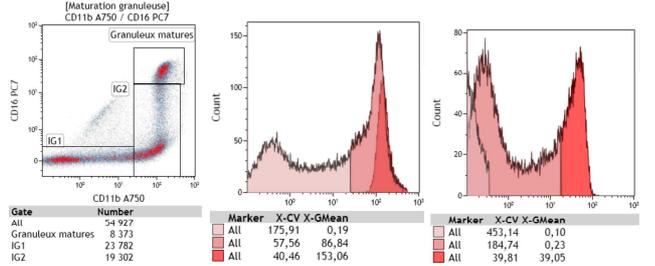


140908-2

Annexe 3.1.8 LMMC-II

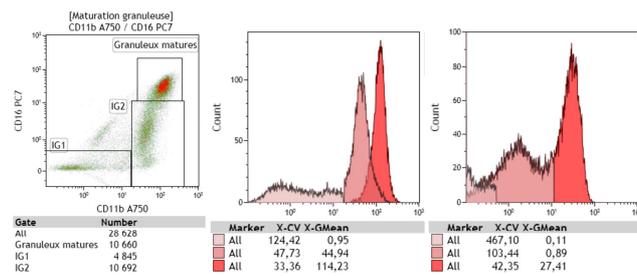


140701-1

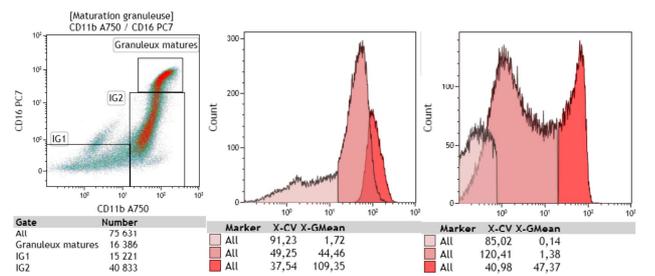


140707-5

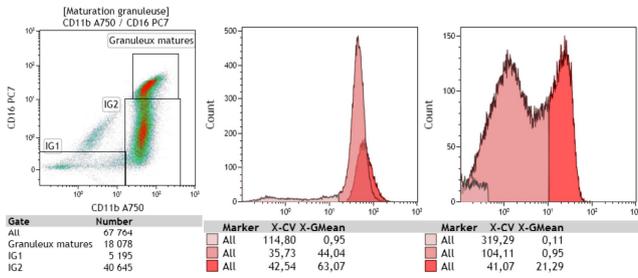
Annexe 3.1.9 Témoins cytopéniques



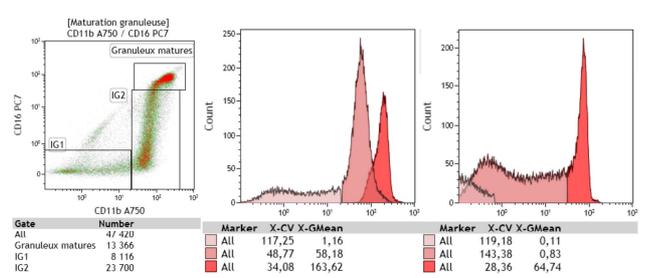
140707-4



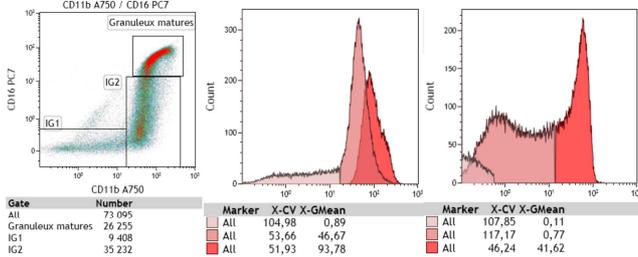
140708-2



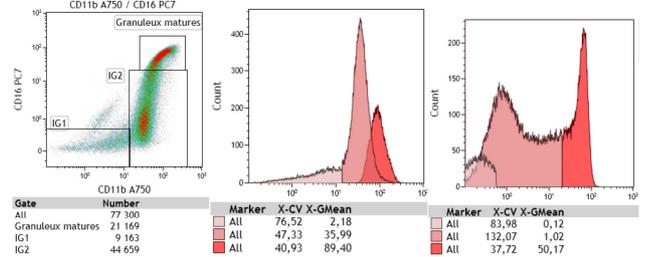
140708-3



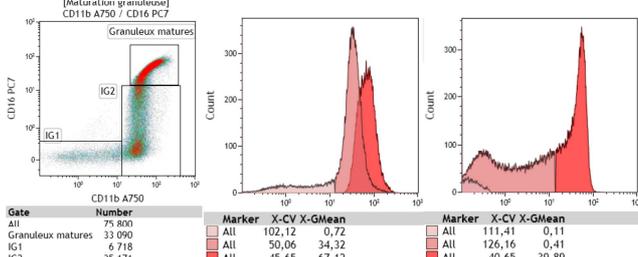
140709-2



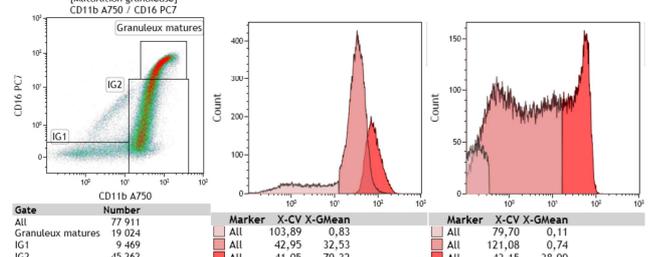
140710-1



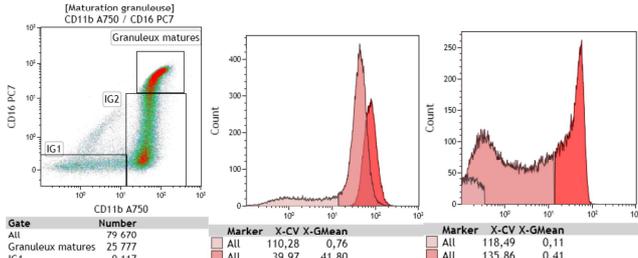
140710-3



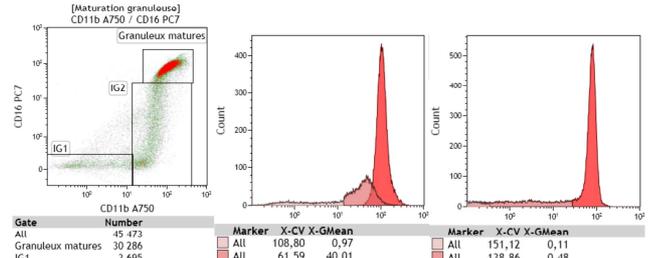
140715-1



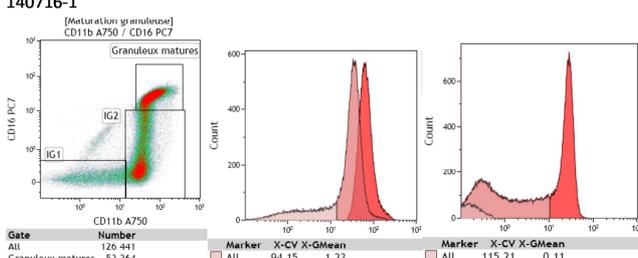
140715-2



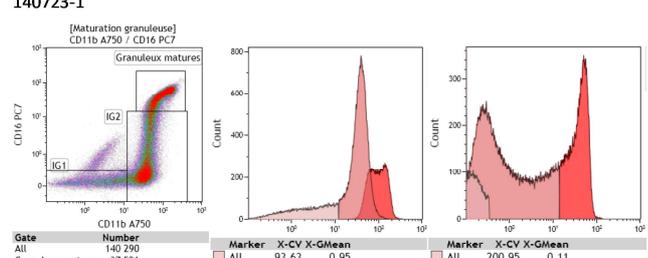
140716-1



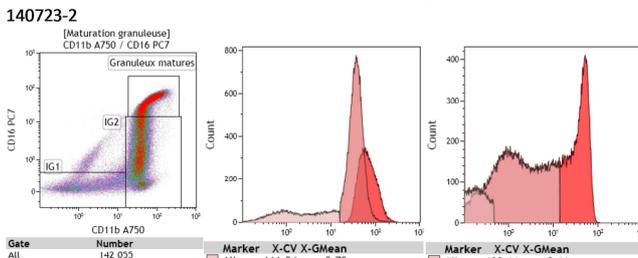
140723-1



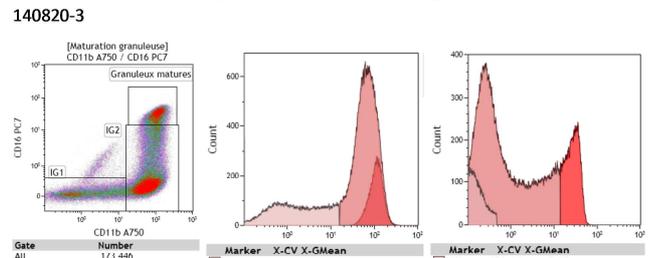
140723-2



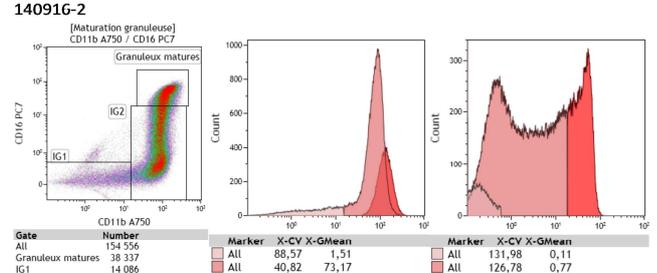
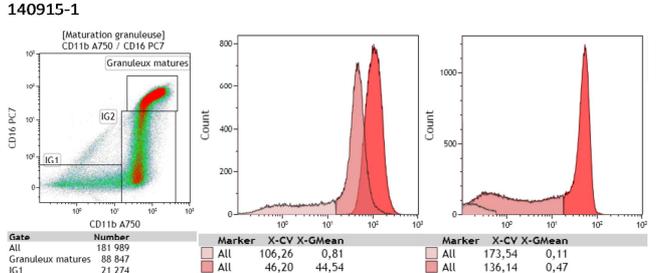
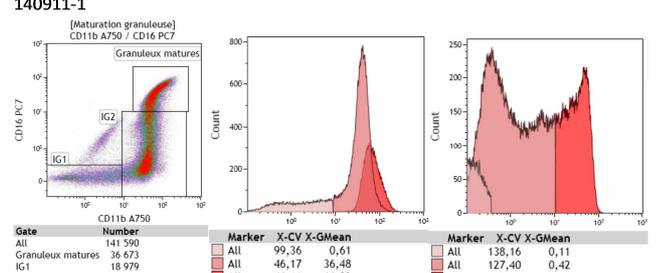
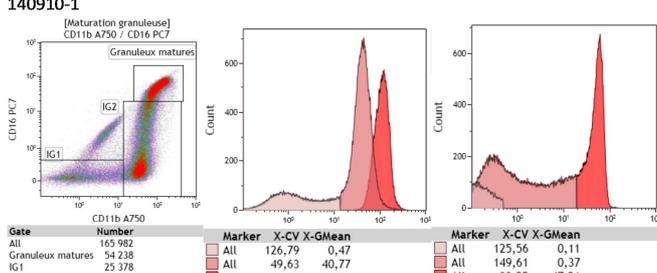
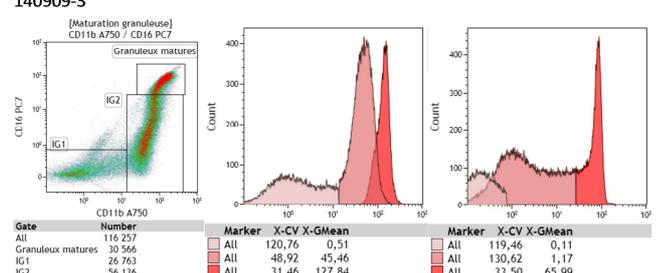
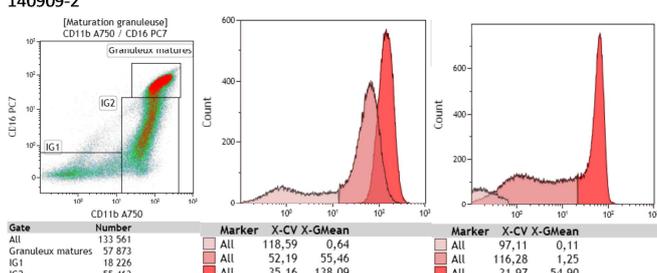
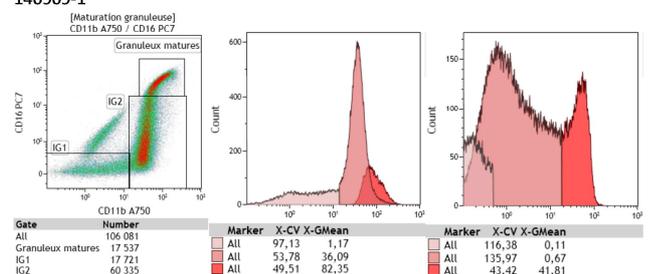
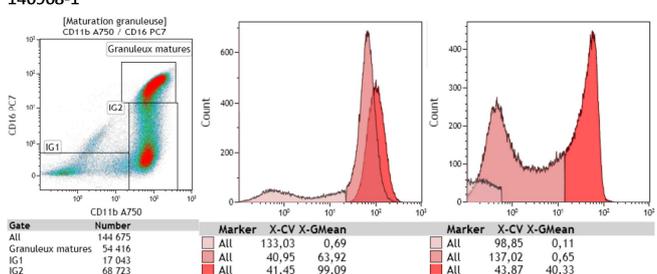
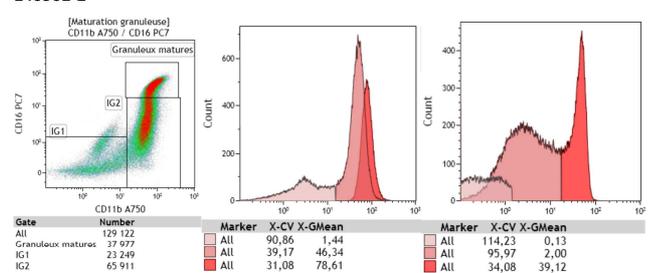
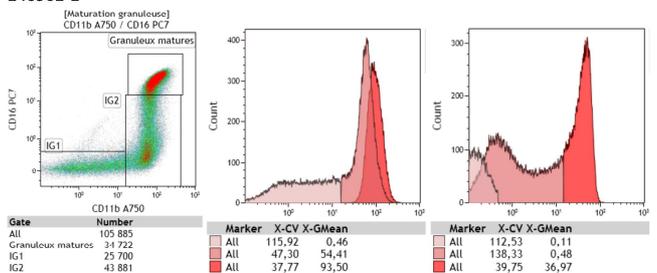
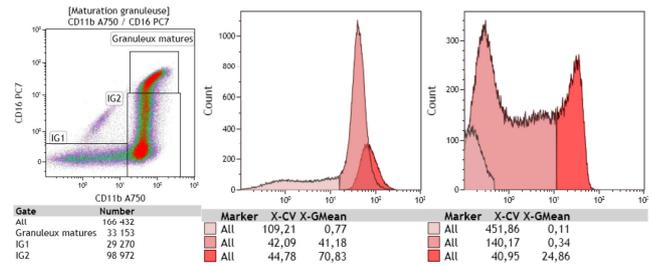
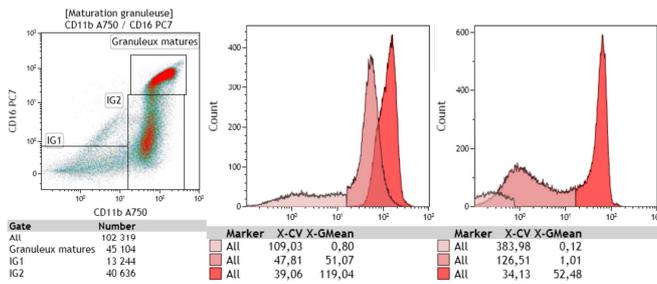
140820-3

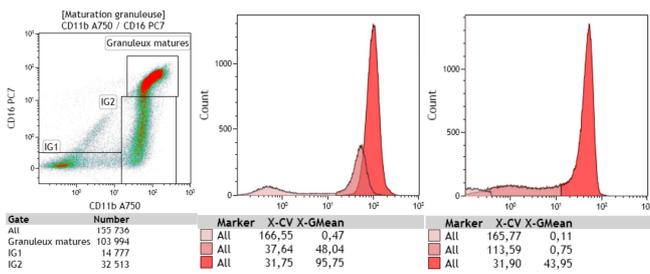


140827-2

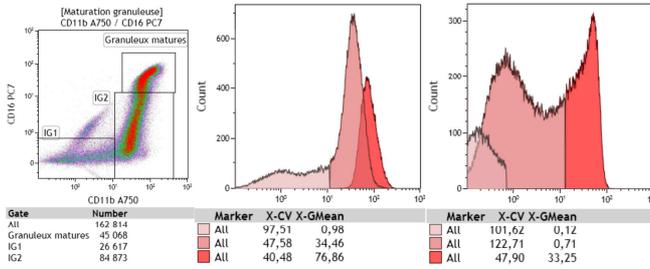


140828-1

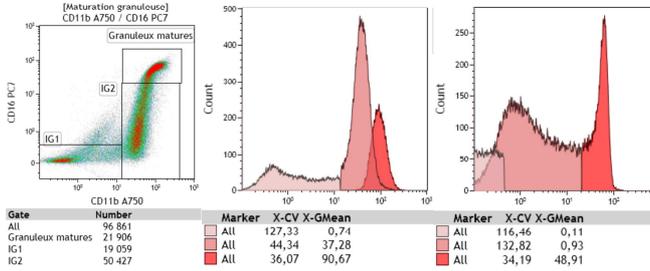




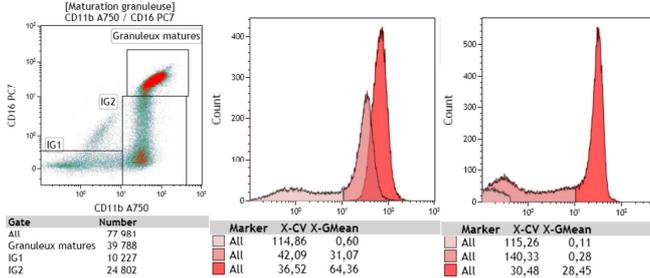
140922-1



140929-1

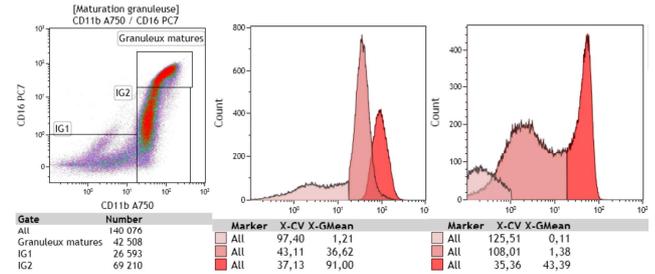


140930-1

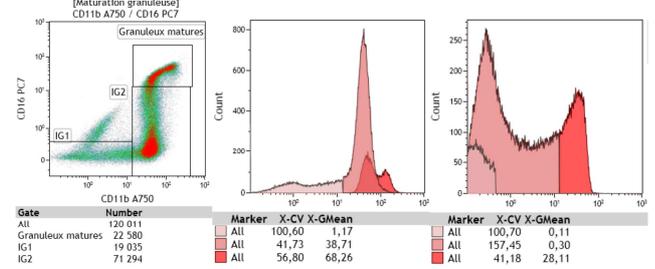


141002-2

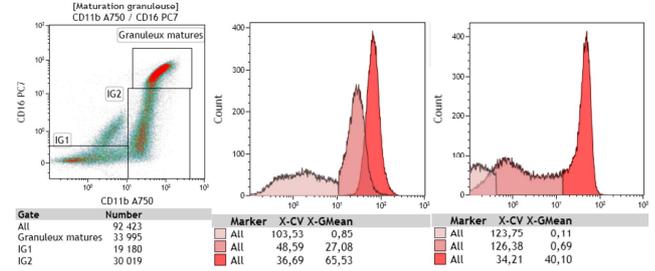
141017-1



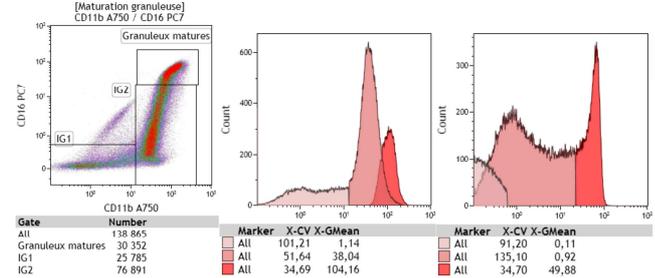
140929-1



141002-1



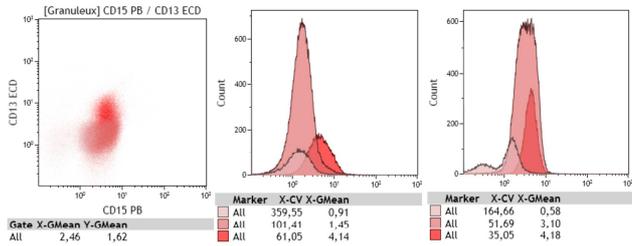
141006-1



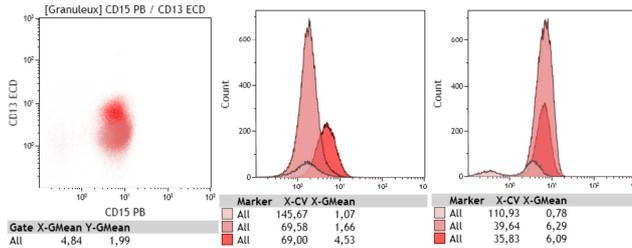
141017-2

Annexe 3.2 Marqueurs CD13/CD15

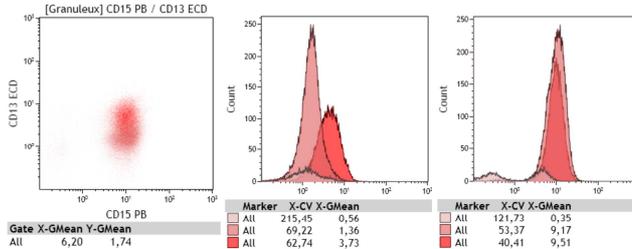
Annexe 3.2.1 Témoins non cytopéniques



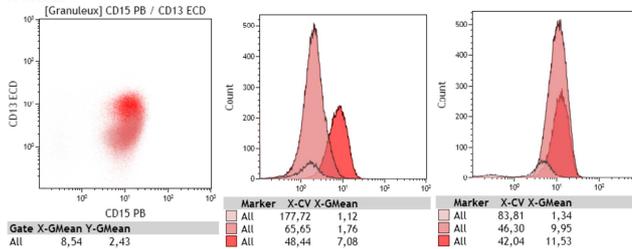
140806-1



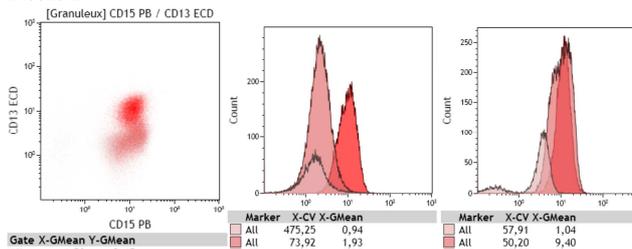
140814-1



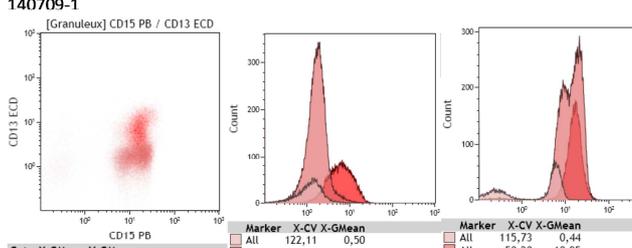
140820-1



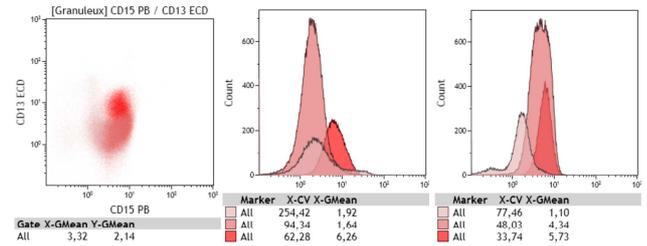
140826-1



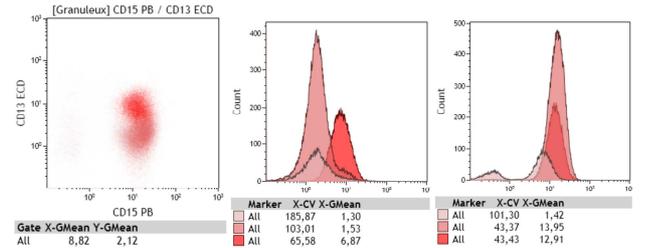
140709-1



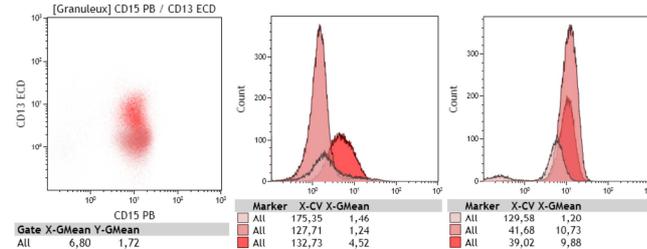
140707-3



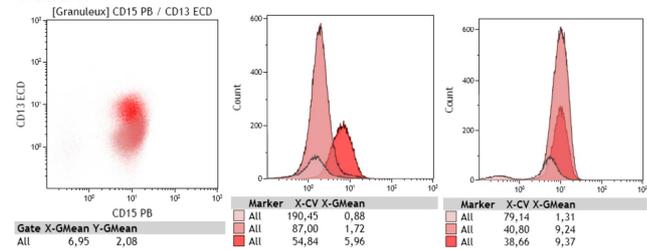
140806-2



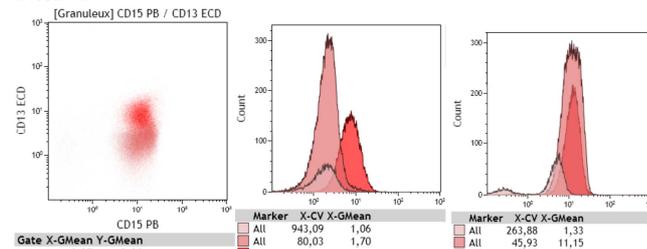
140819-1



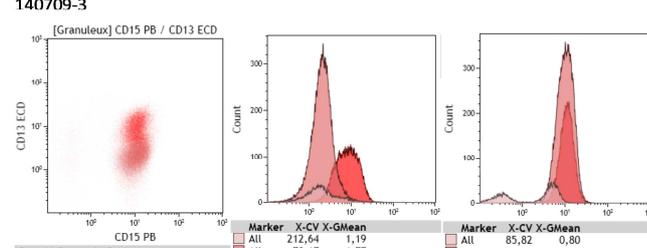
140820-2



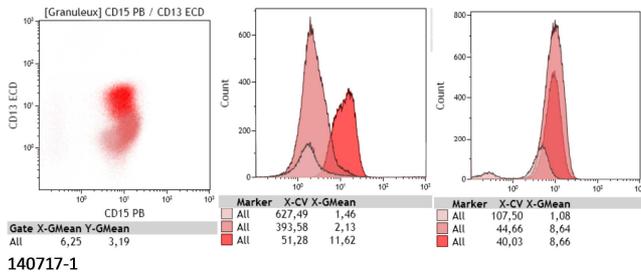
140827-1



140709-3

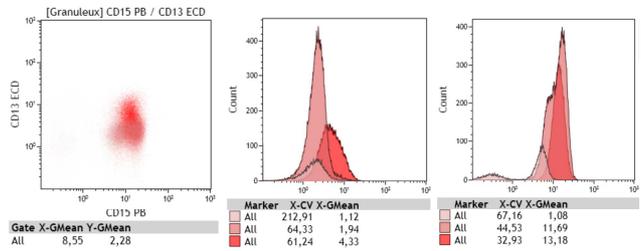


140710-2

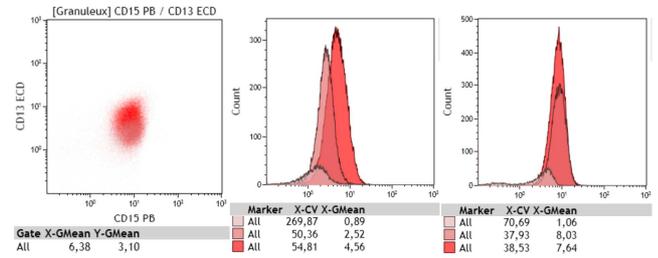


140717-1

Annexe 3.2.2 Anémies réfractaires

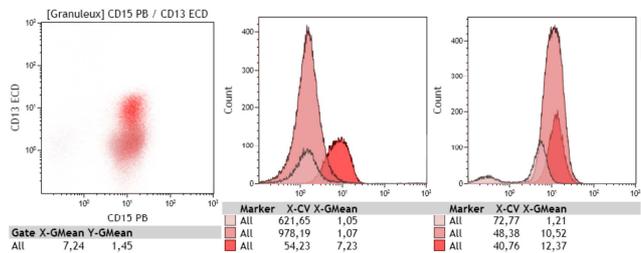


140707-1



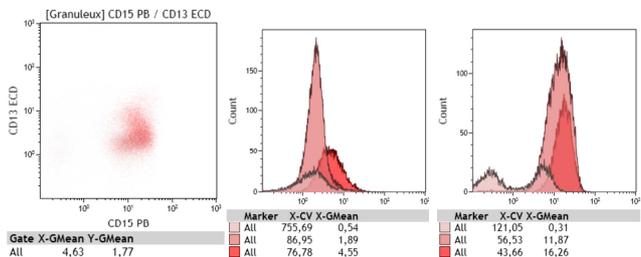
140716-2

Annexe 3.2.3 ARSIA

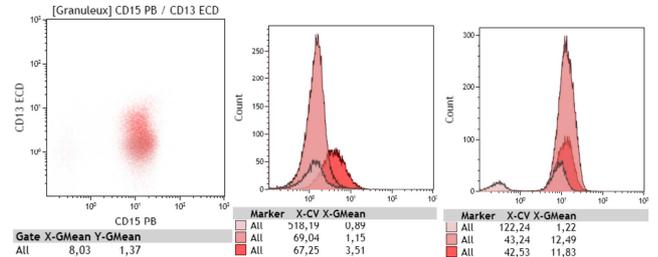


140916-1

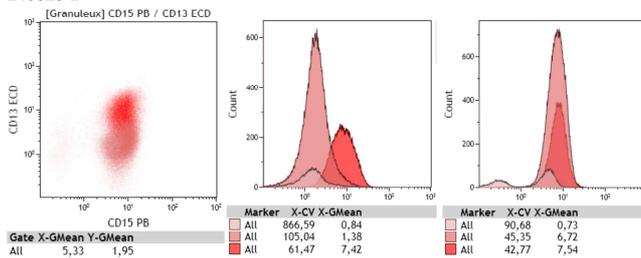
Annexe 3.2.4 CRDM



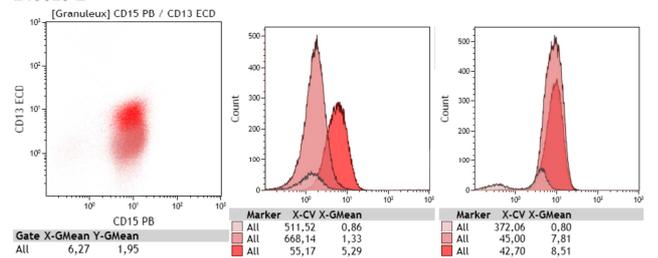
140626-1



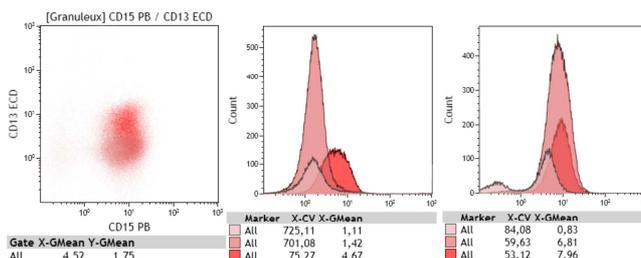
140626-2



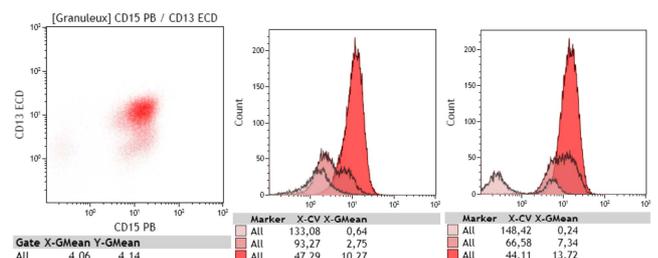
140723-3



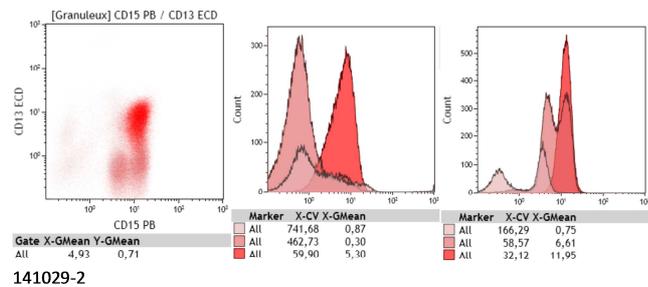
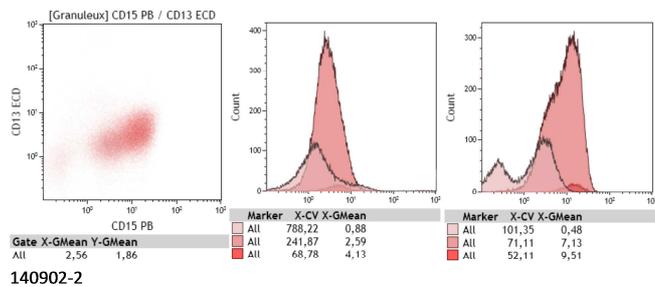
140807-2



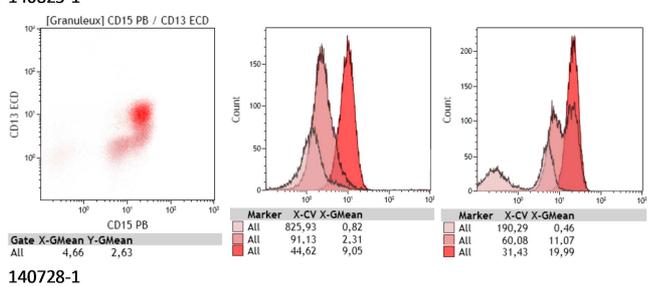
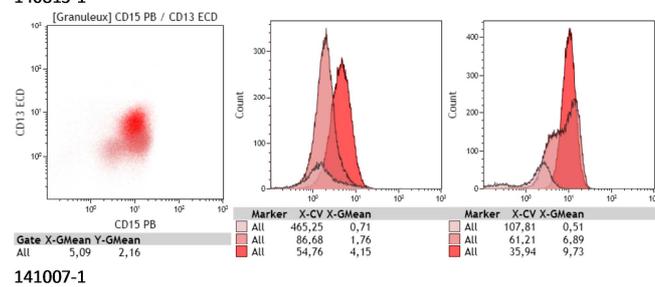
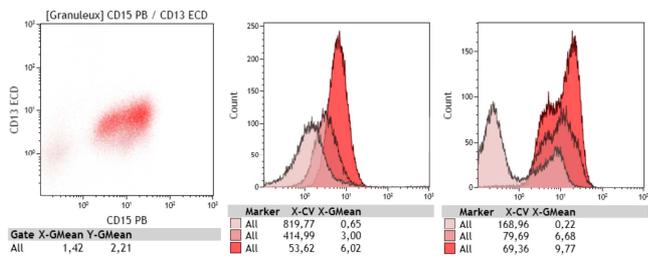
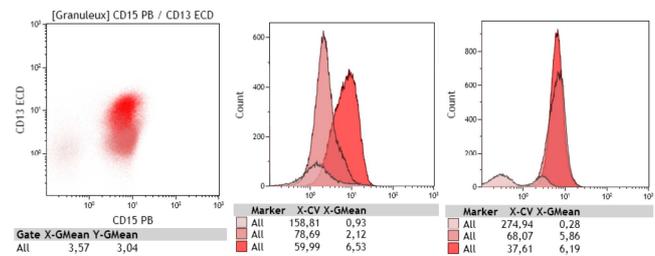
140825-2



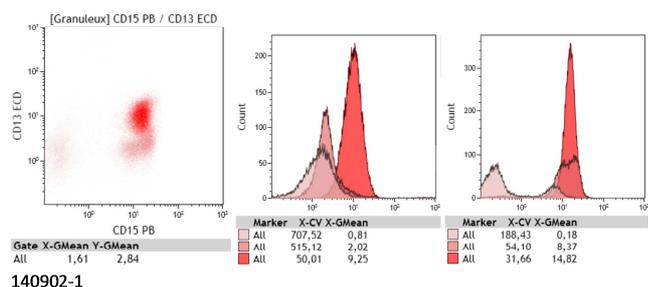
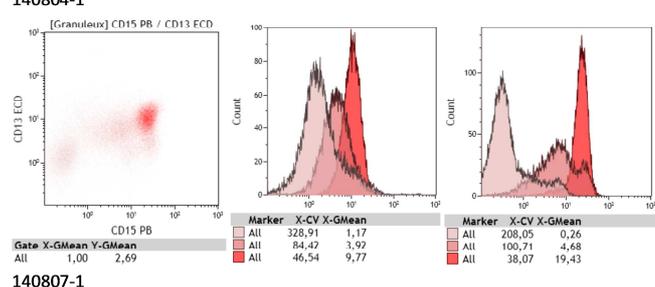
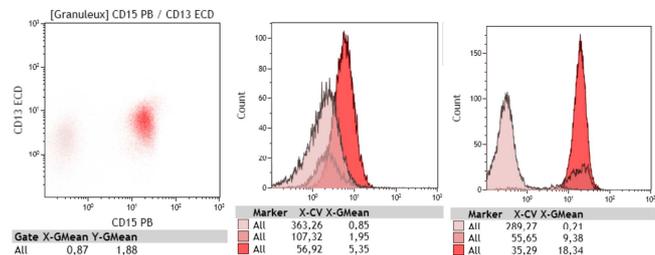
140826-2



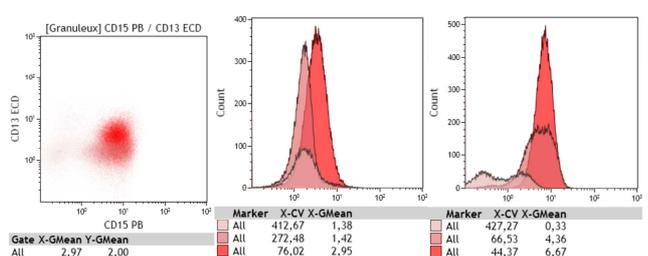
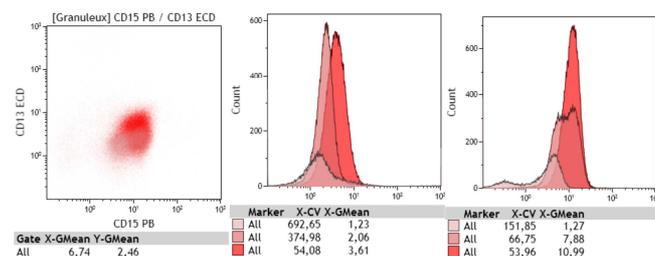
Annexe 3.2.5 AREB-I



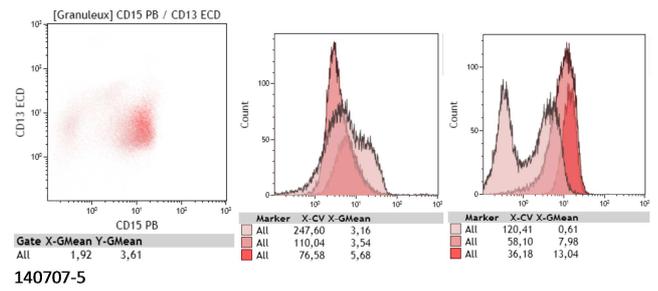
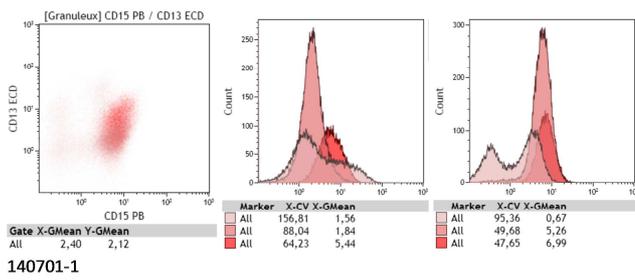
Annexe 3.2.6 AREB-II



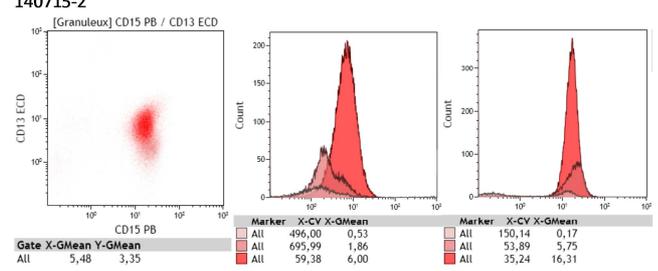
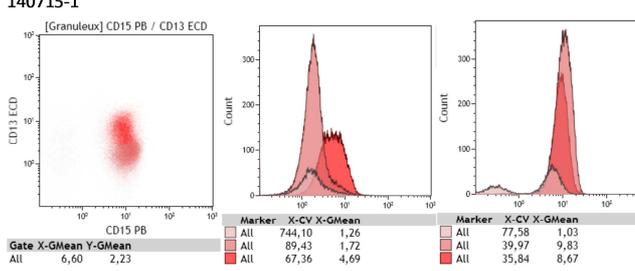
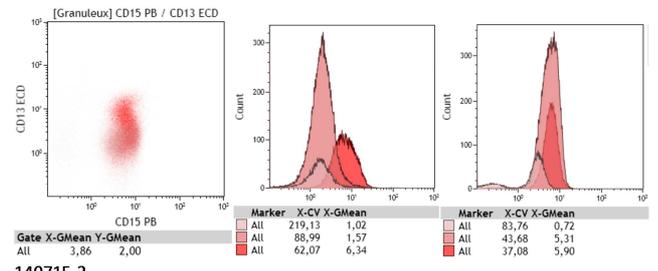
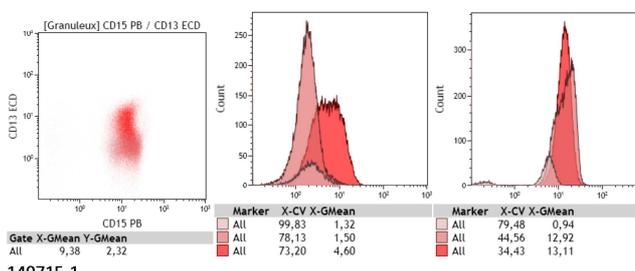
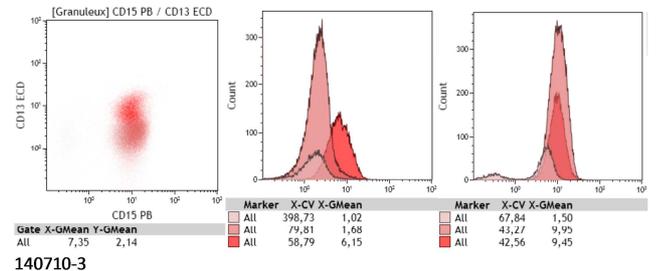
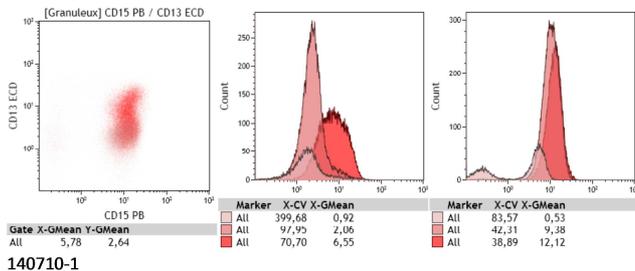
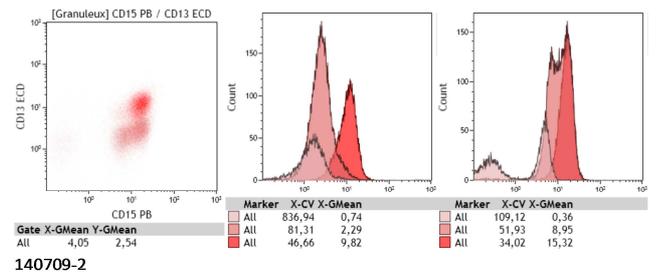
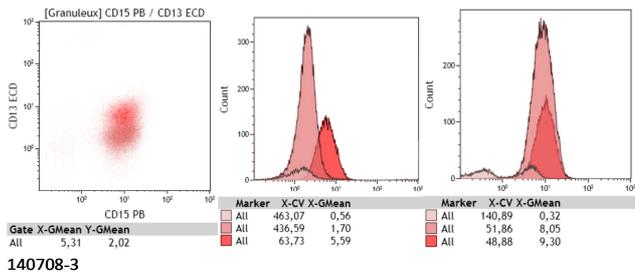
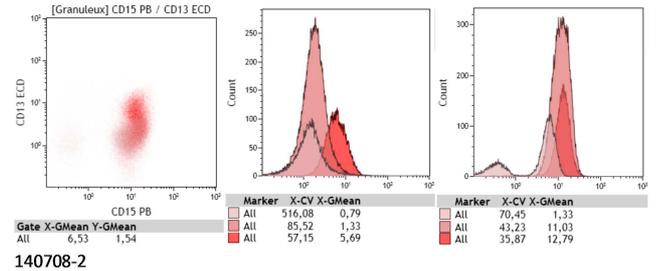
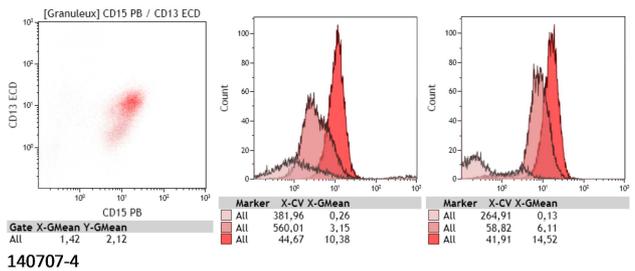
Annexe 3.2.7 LMCC-I

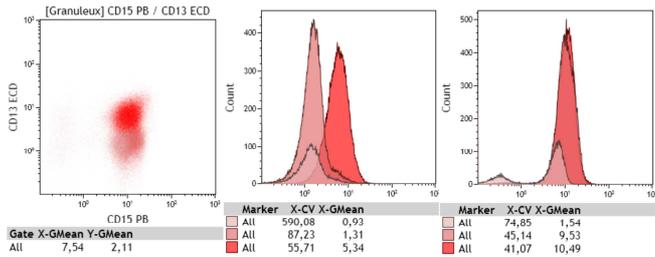


Annexe 3.2.8 LMMC-II

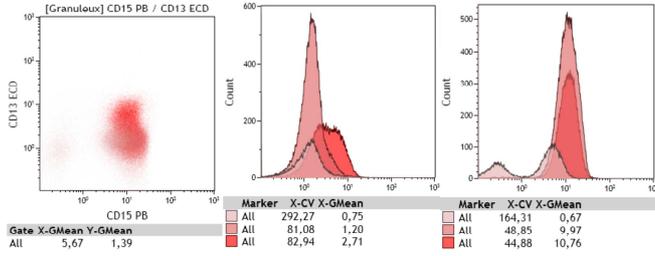


Annexe 3.2.9 Témoins cytopéniques

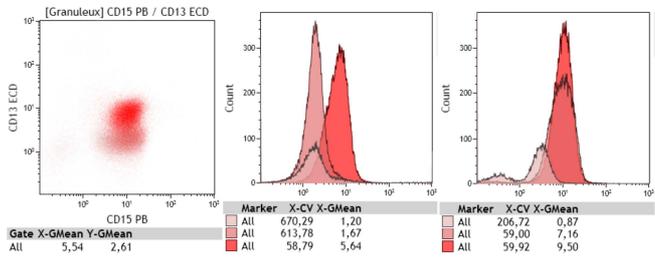




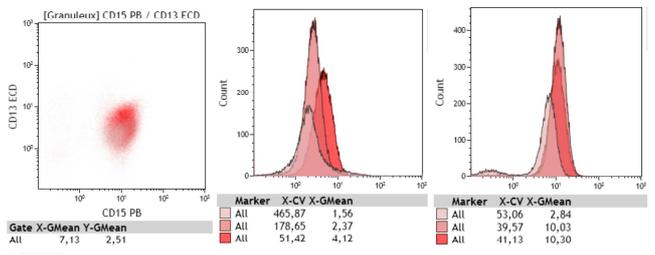
140723-2



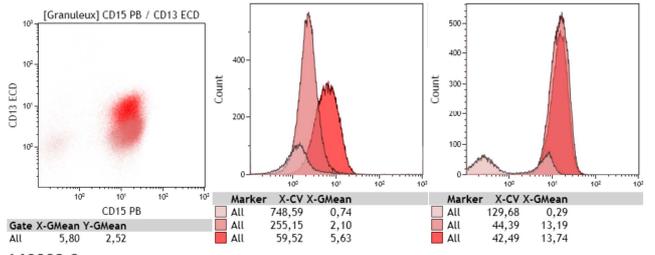
140827-2



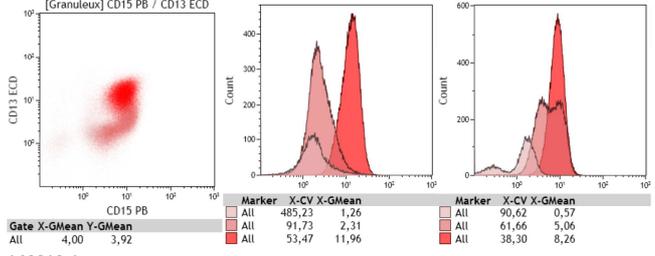
140901-1



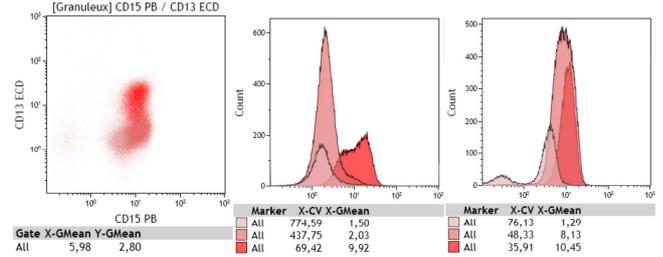
140908-1



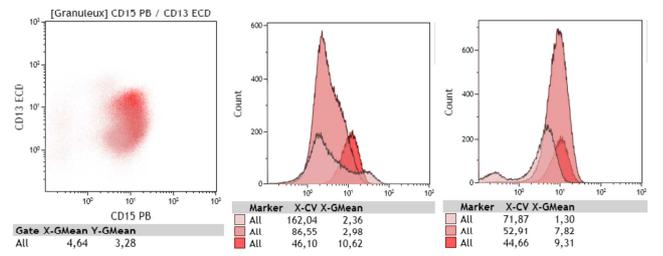
140909-2



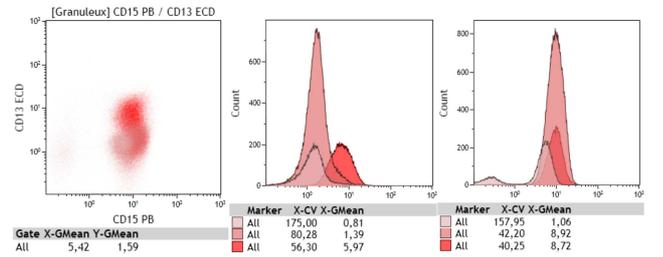
140910-1



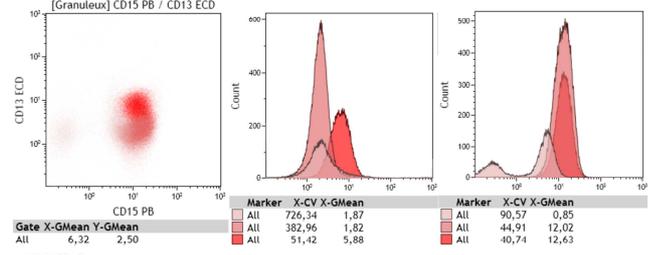
14020-3



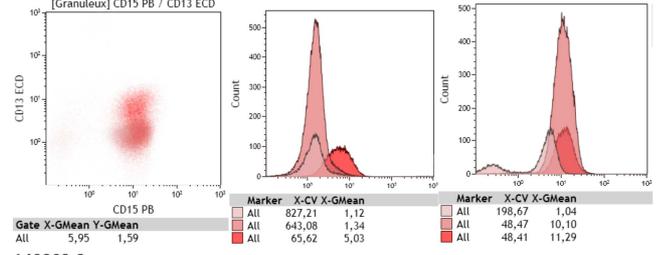
140828-1



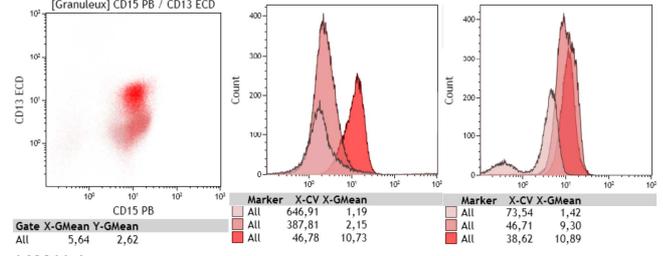
140901-2



140909-1



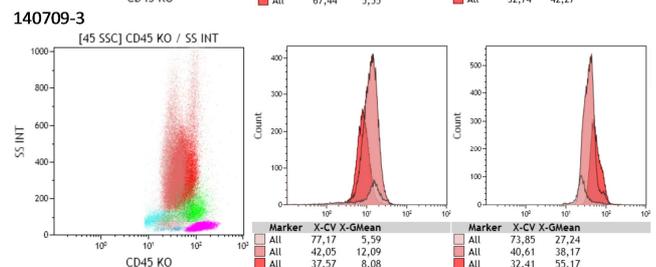
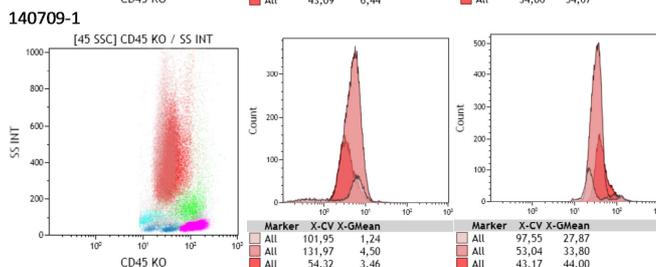
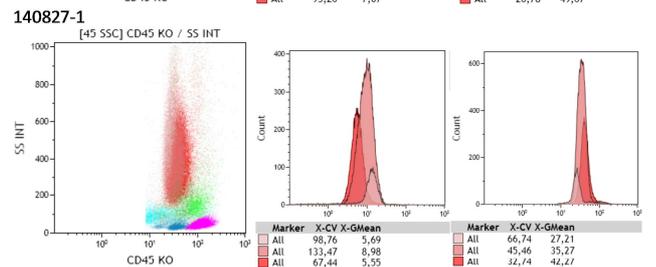
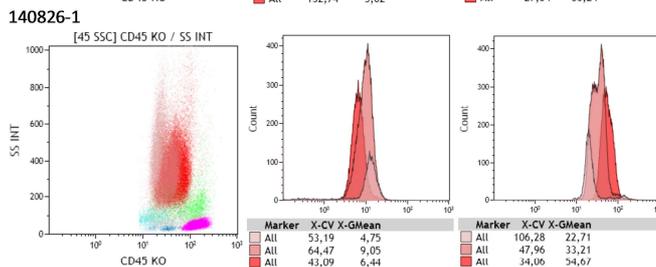
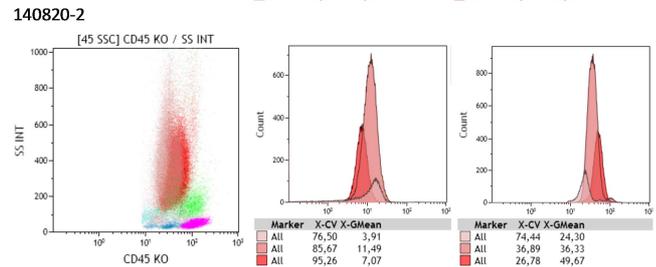
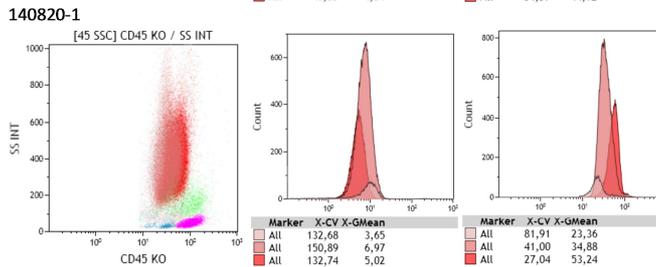
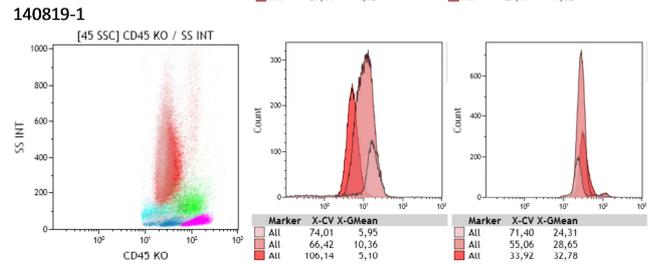
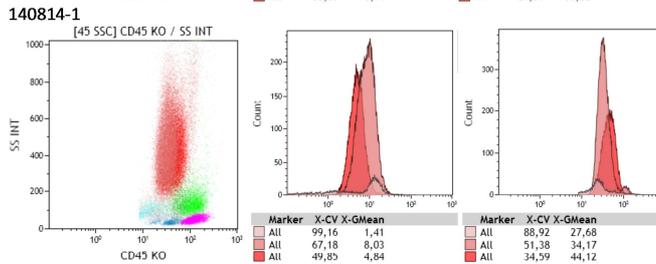
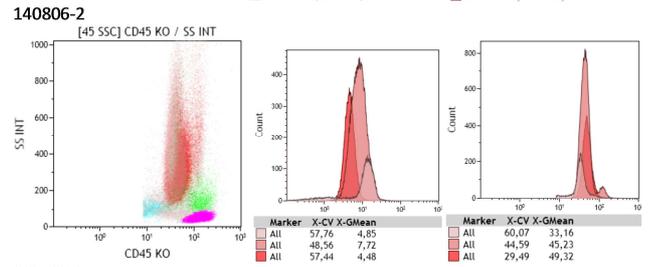
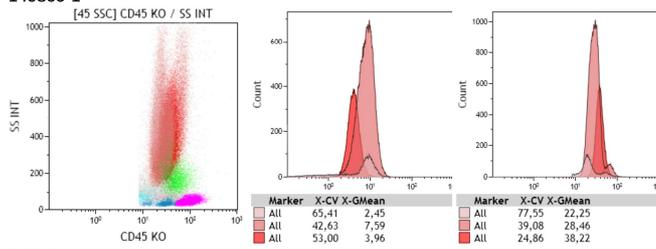
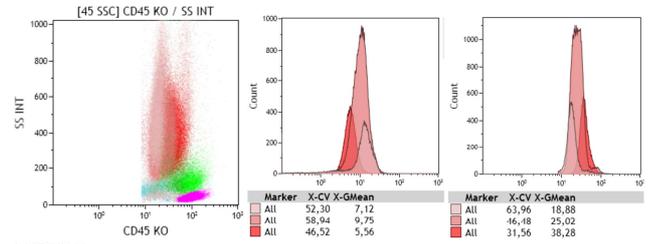
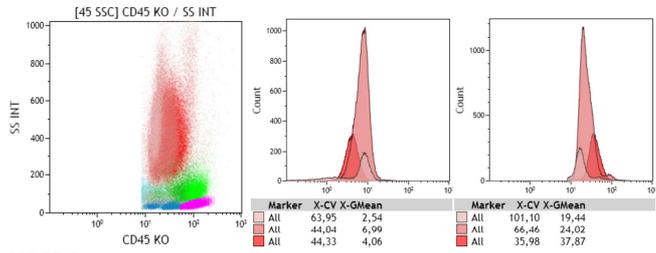
140909-3



140911-1

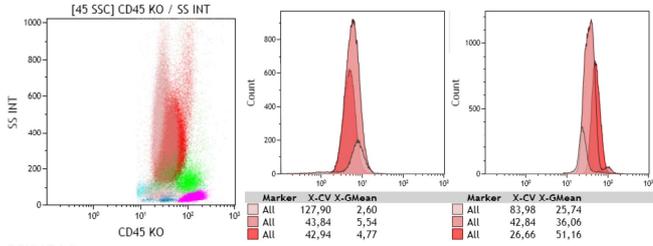
Annexe 3.3 Marqueurs CD33/CD45

Annexe 3.3.1 Témoins non cytopéniques



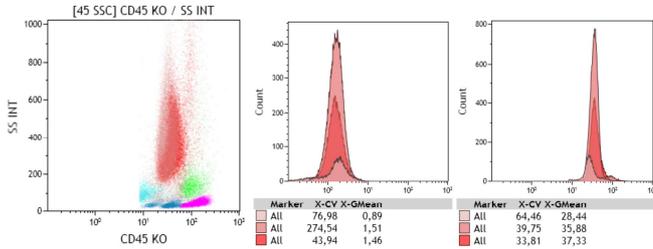
140707-3

140710-2

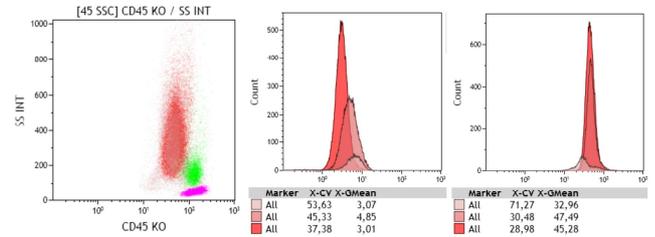


140717-1

Annexe 3.3.2 Anémies réfractaires

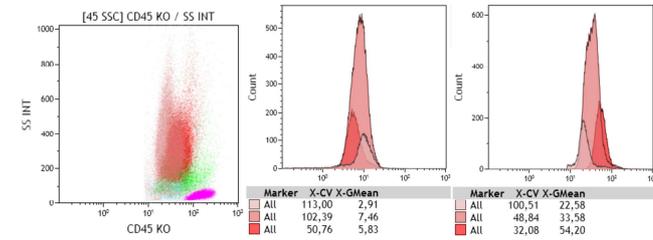


140707-1



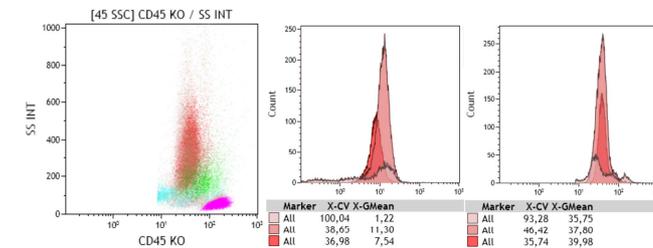
140716-2

Annexe 3.3.3 ARSIA

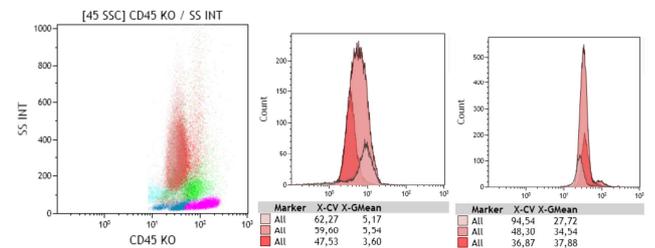


140616-1

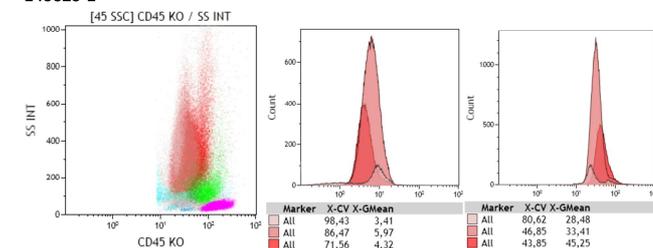
Annexe 3.3.4 CRDM



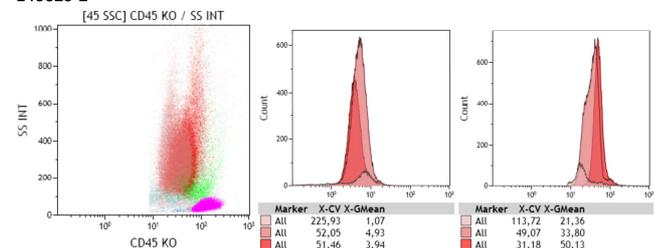
140626-1



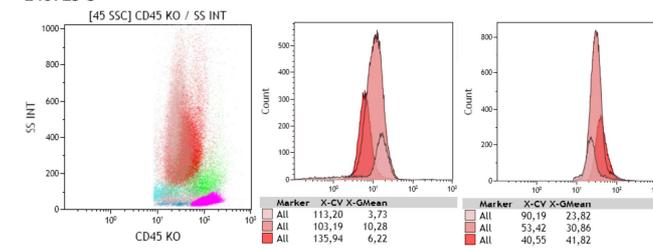
140626-2



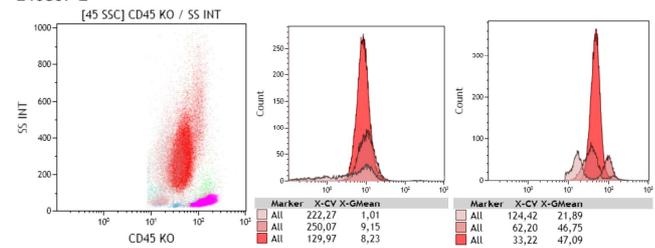
140723-3



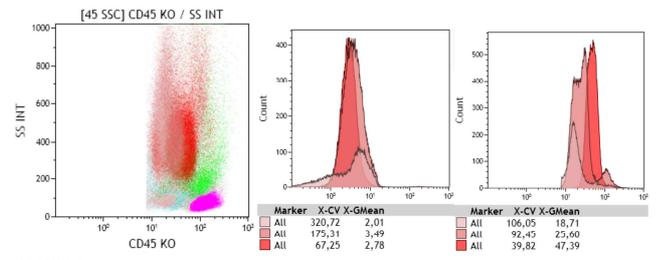
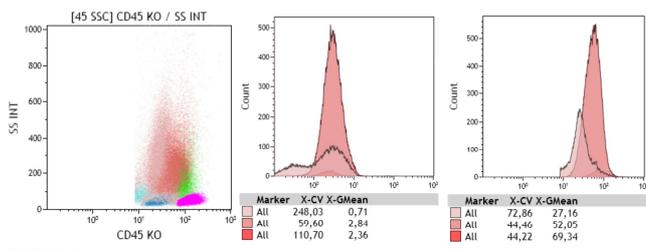
140807-2



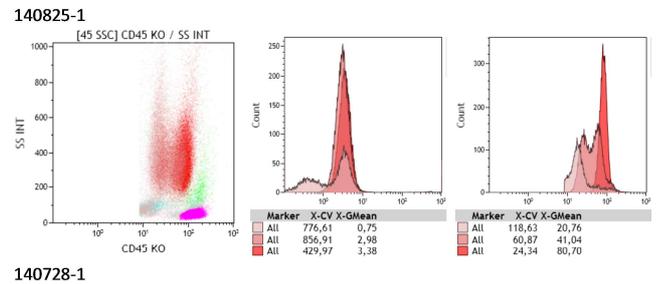
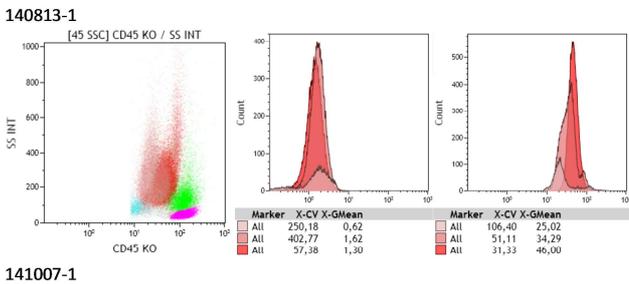
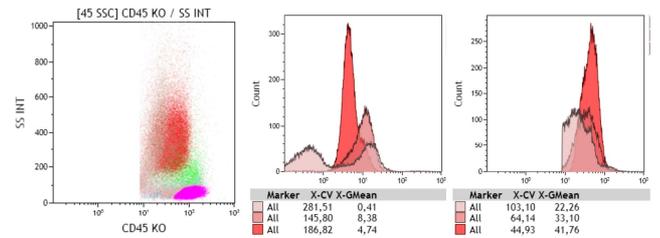
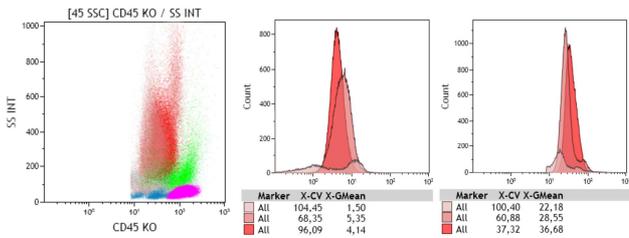
140825-2



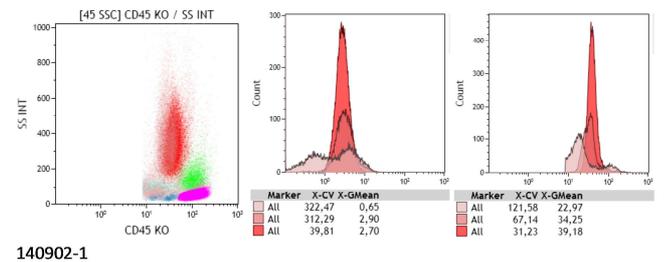
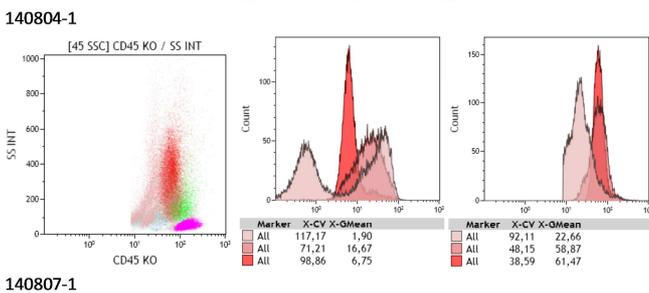
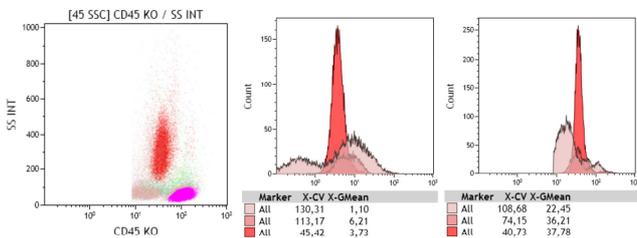
140826-2



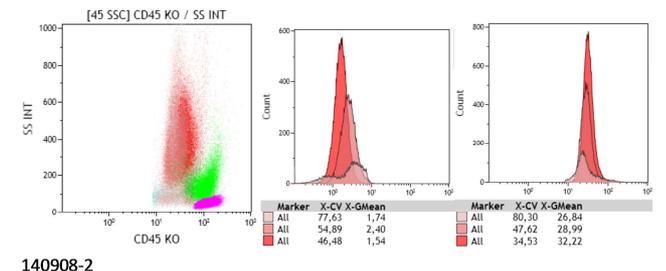
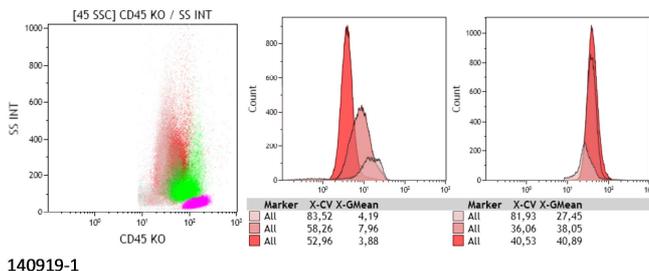
Annexe 3.3.5 AREB-I



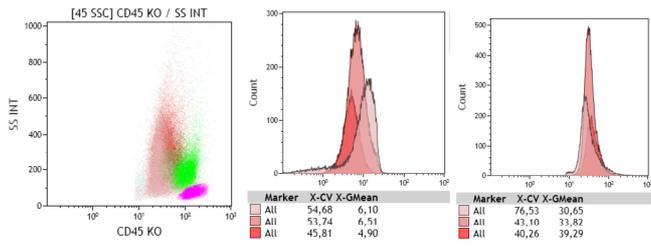
Annexe 3.3.6 AREB-II



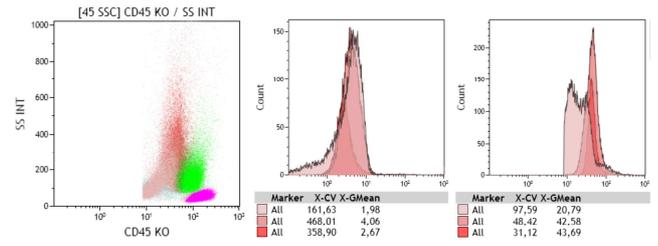
Annexe 3.3.7 LMMC-I



Annexe 3.3.8 LMMC-II

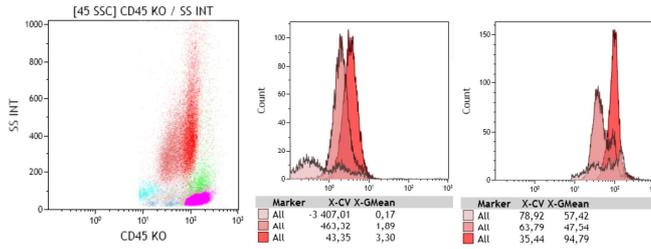


140701-1

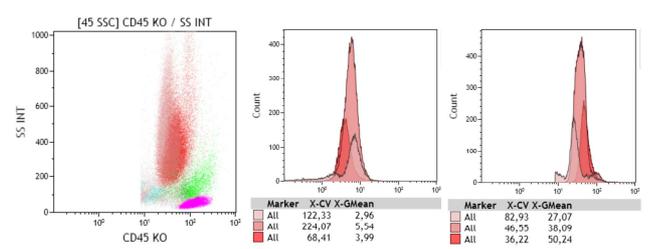


140707-5

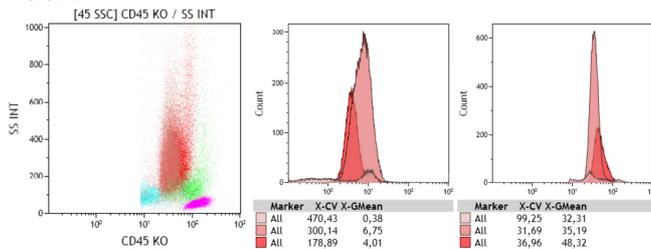
Annexe 3.3.9 Témoins cytopéniques



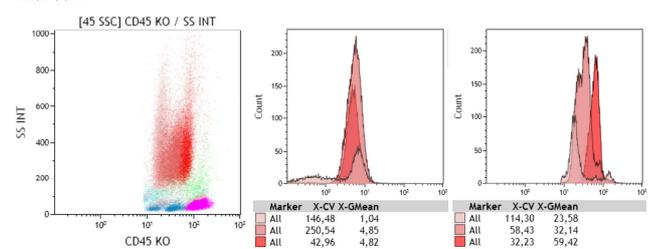
140707-4



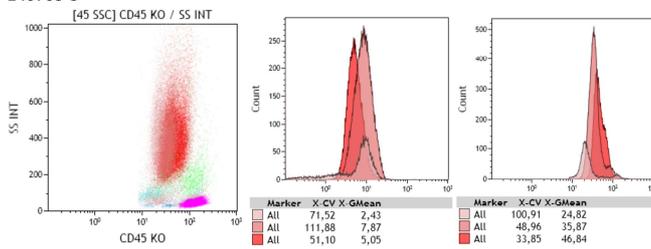
140708-2



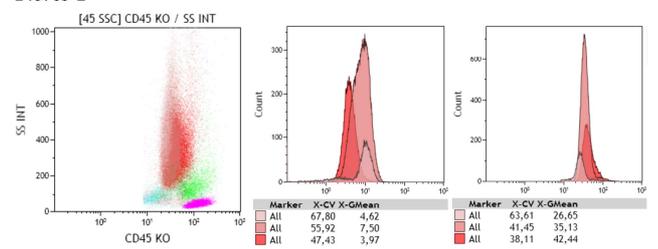
140708-3



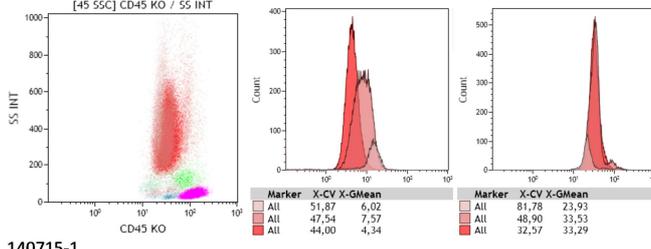
140709-2



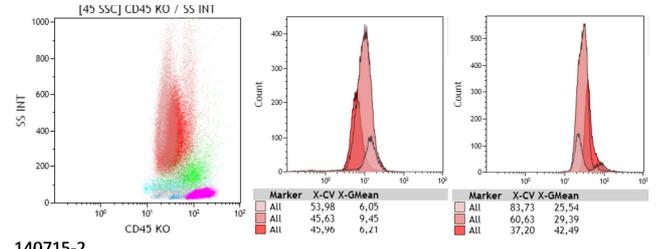
140710-1



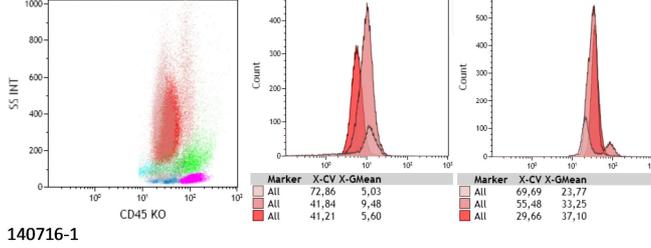
140710-3



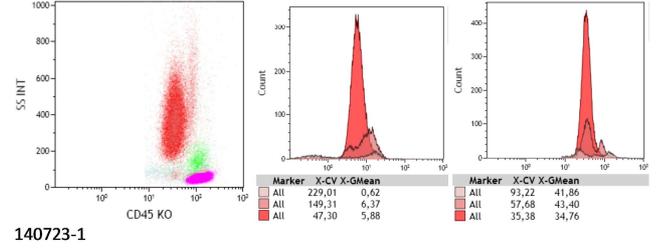
140715-1



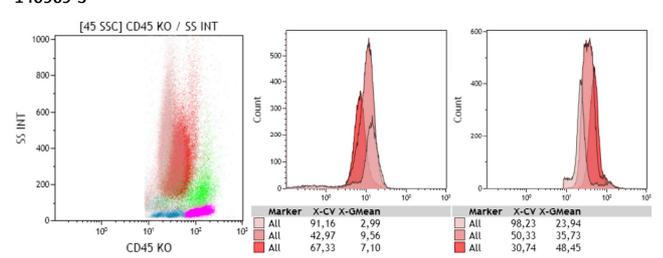
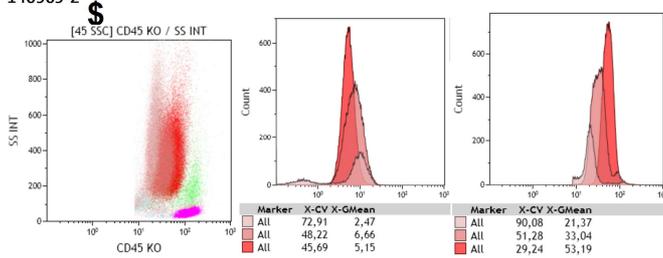
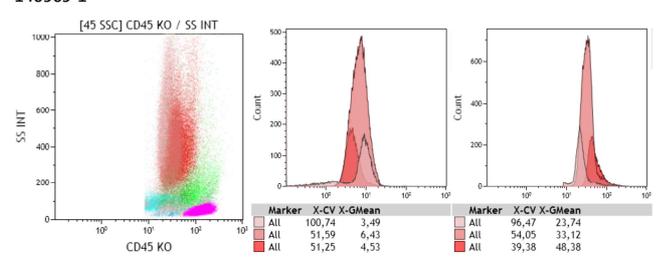
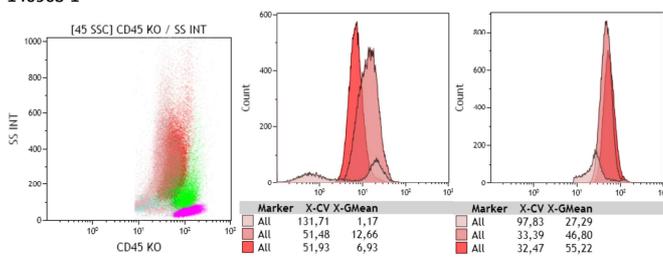
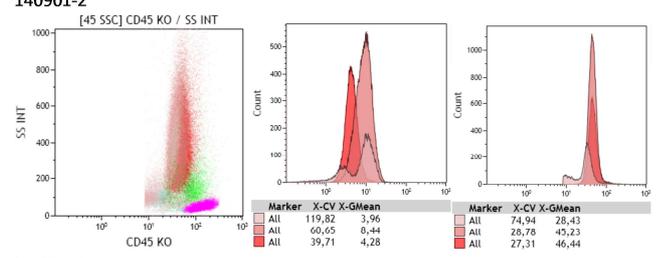
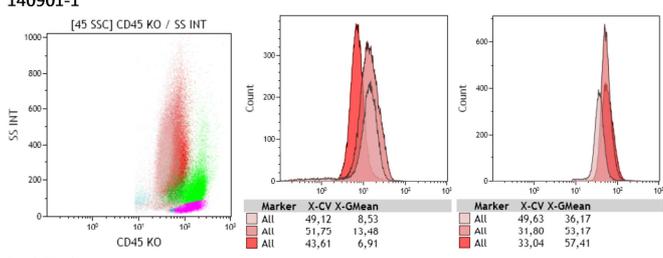
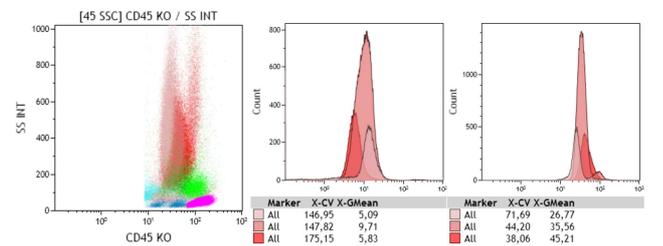
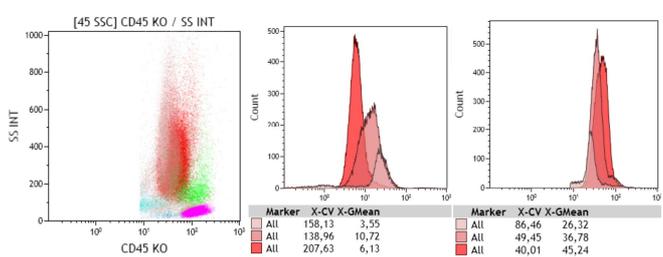
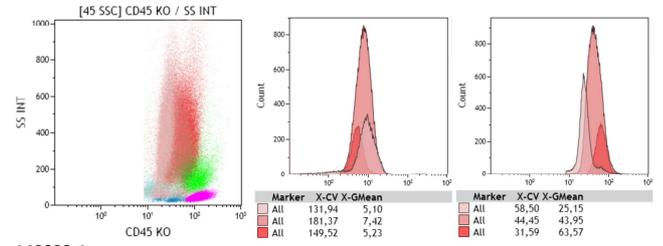
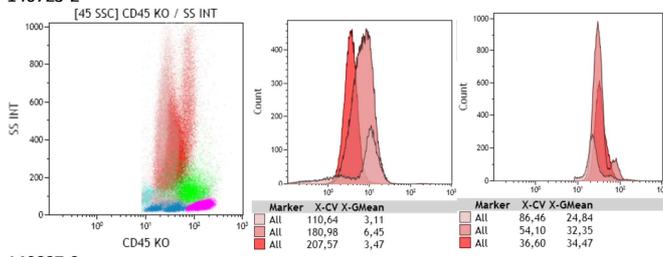
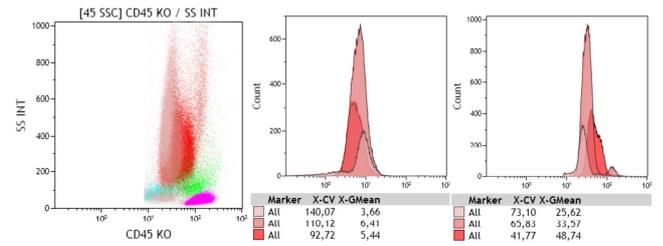
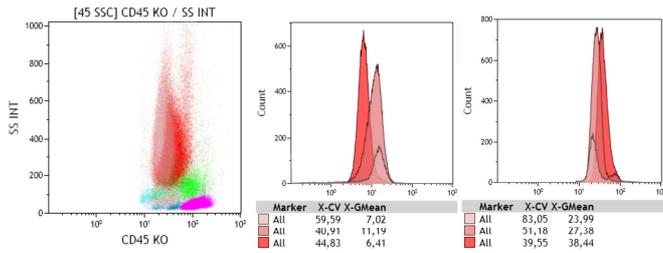
140715-2

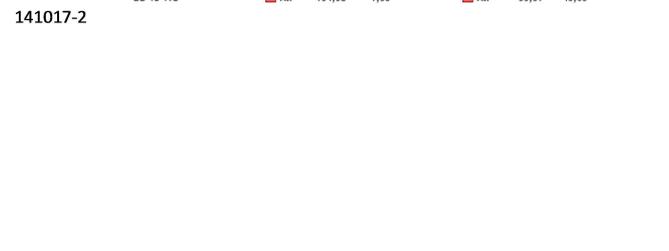
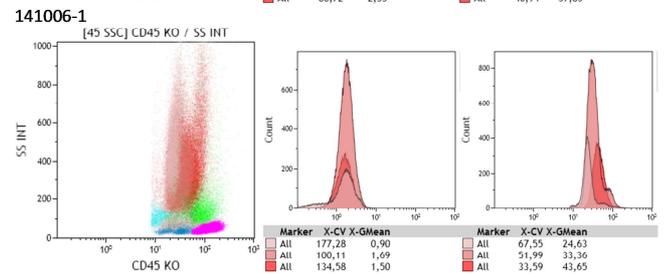
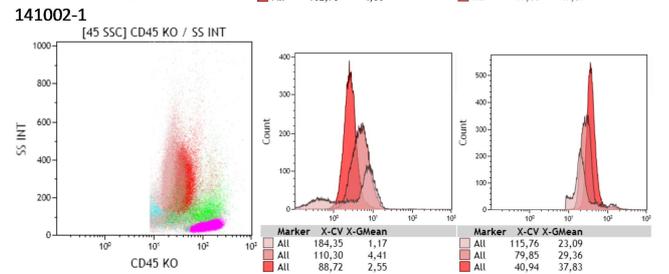
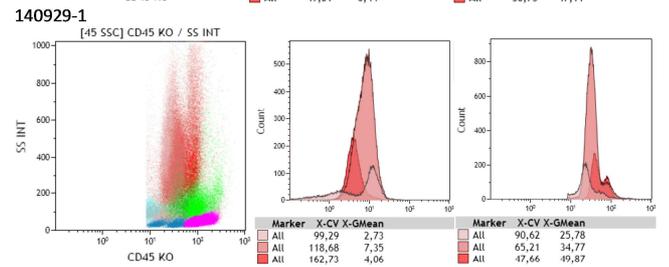
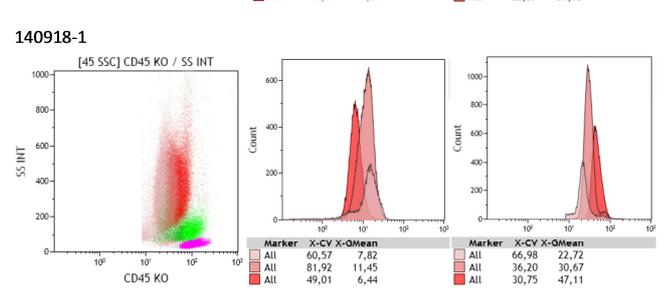
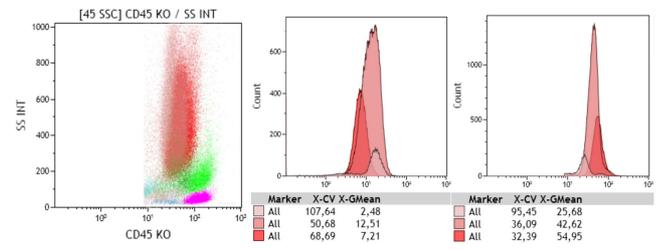
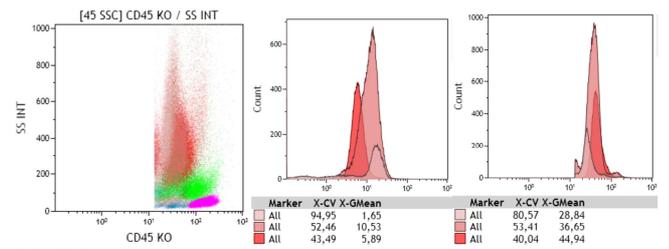
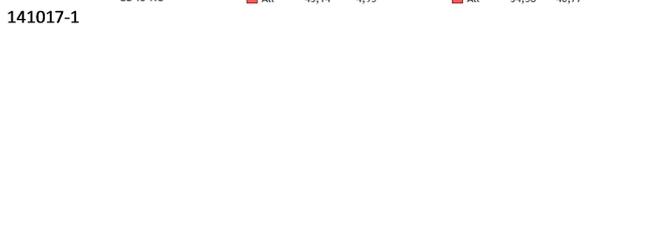
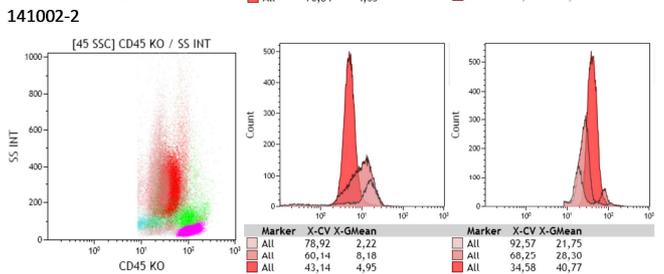
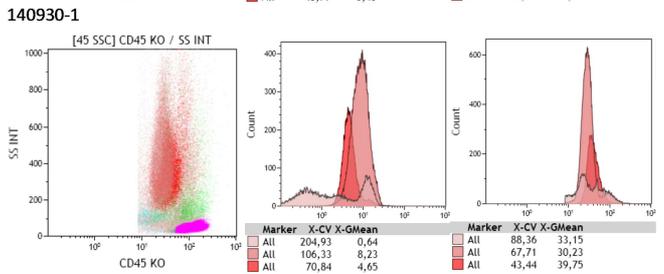
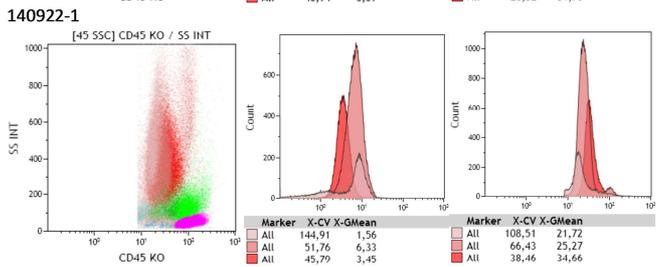
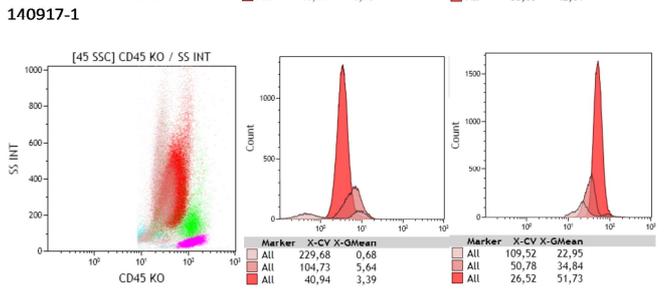
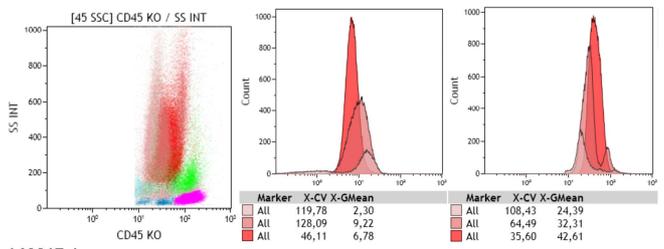
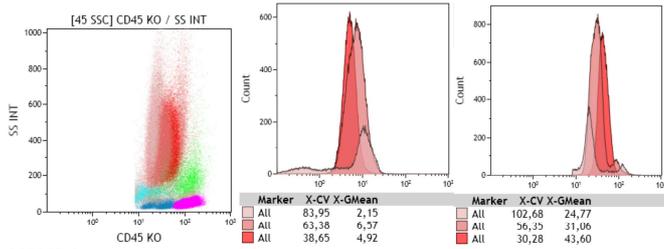


140716-1



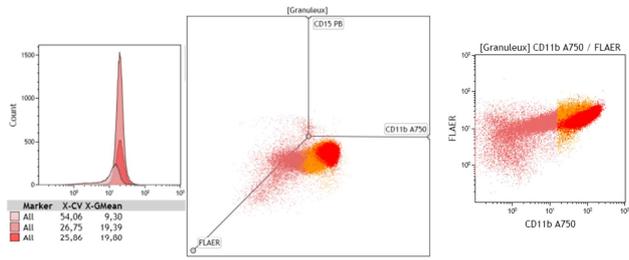
140723-1



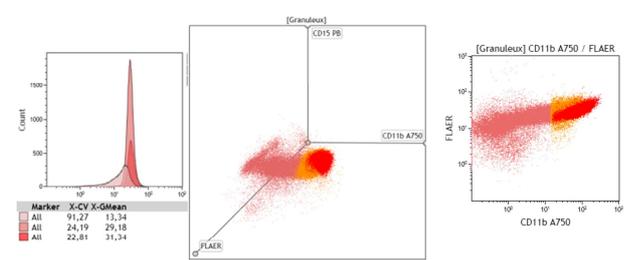


Annexe 3.4 Histogrammes d'étude du marqueur Flaer

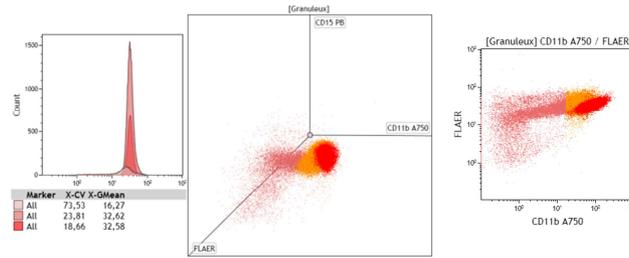
Annexe 3.4.1 Témoins non cytopéniques



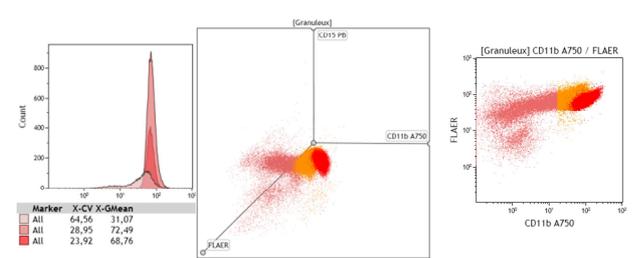
140806-1



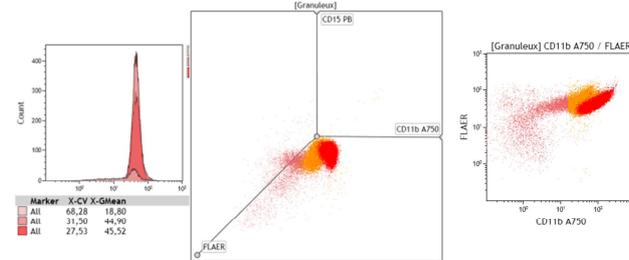
140806-2



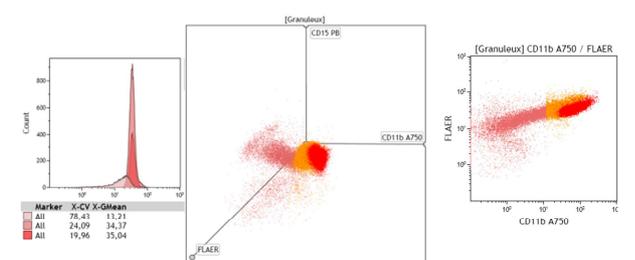
140814-1



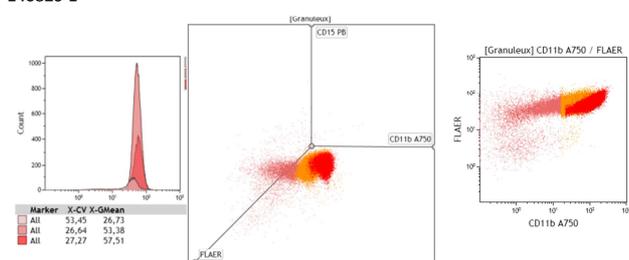
140819-1



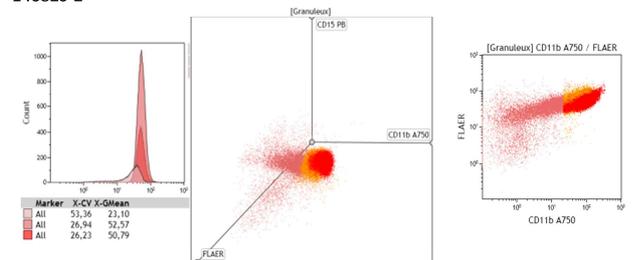
140820-1



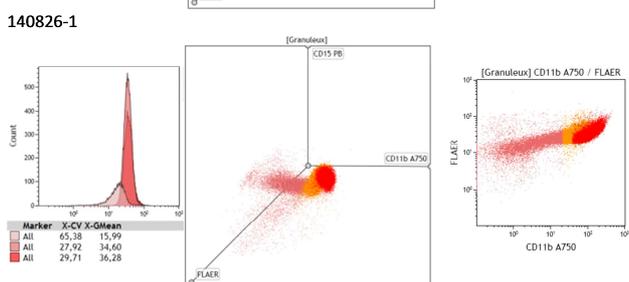
140820-2



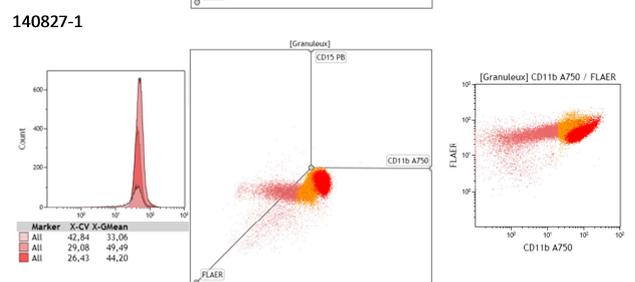
140826-1



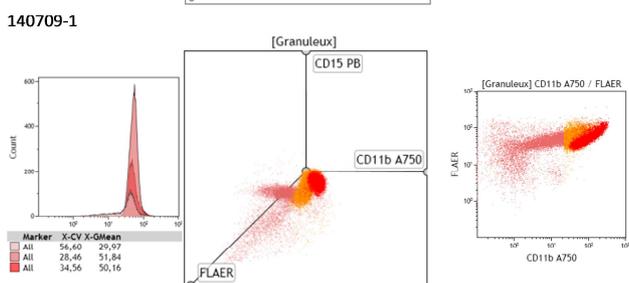
140827-1



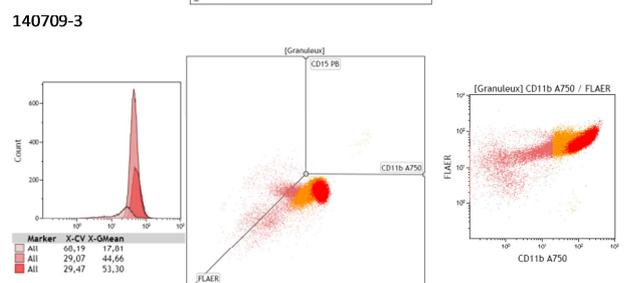
140709-1



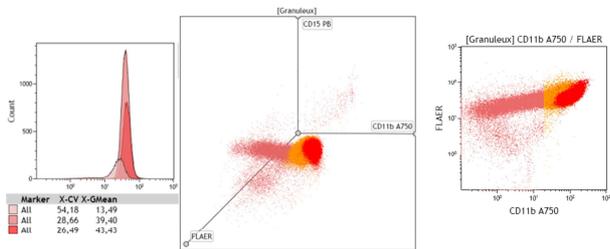
140709-3



140707-3

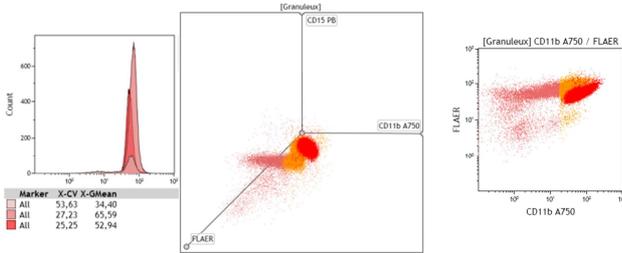


140710-2

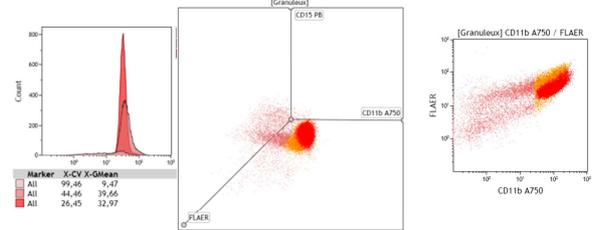


140717-1

Annexe 3.4.2 Anémies réfractaires

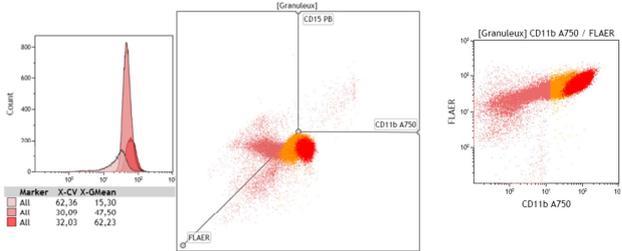


140707-1



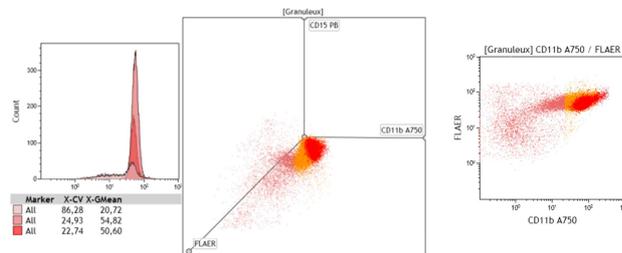
140716-2

Annexe 3.4.3 ARSIA

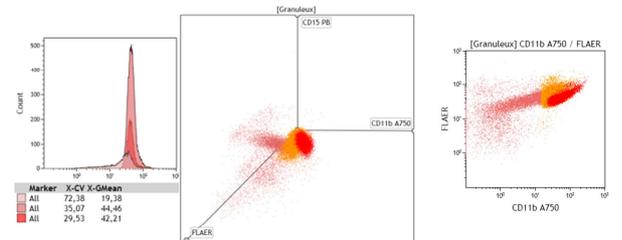


140916-1

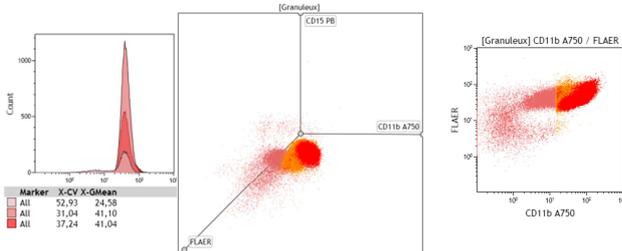
Annexe 3.4.4 CRDM



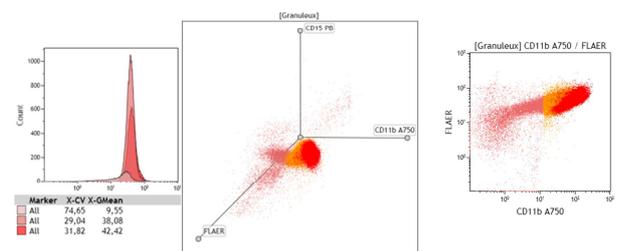
140626-1



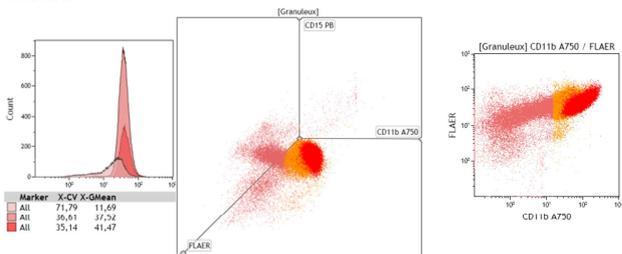
140626-2



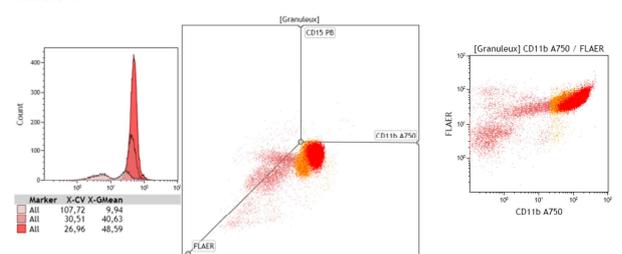
140723-3



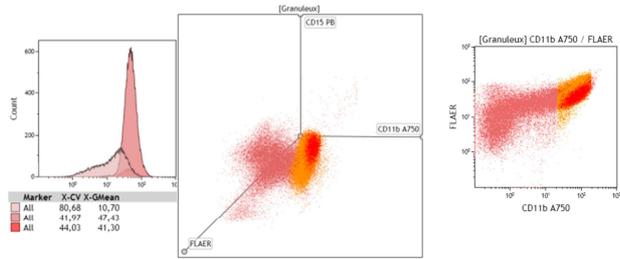
140807-2



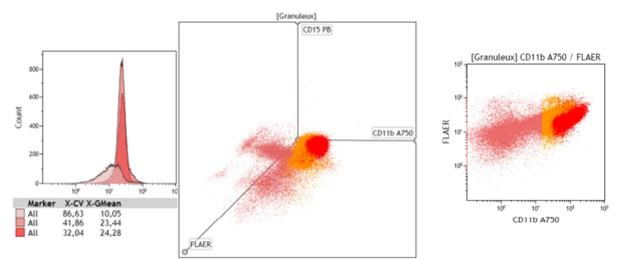
140825-2



140826-2

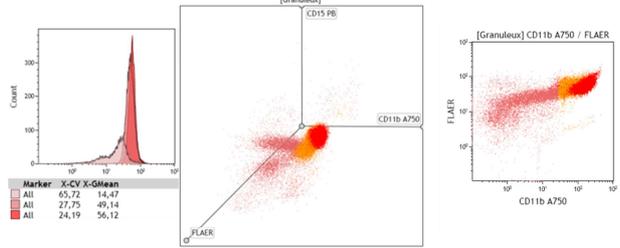


140902-2

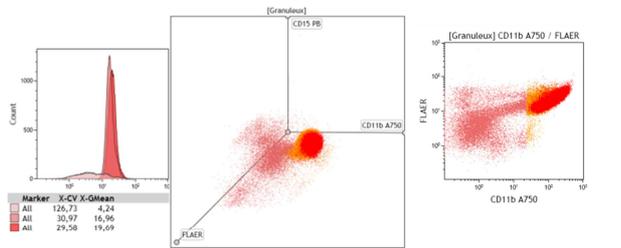


141029-2

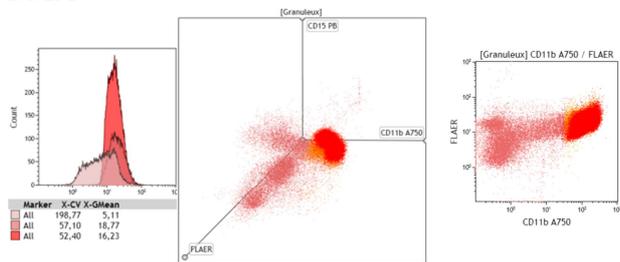
Annexe 3.4.5 AREB-I



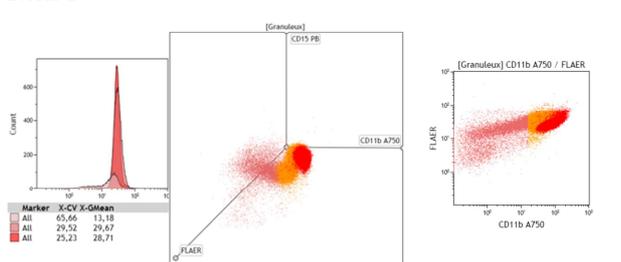
140728-1



140813-1

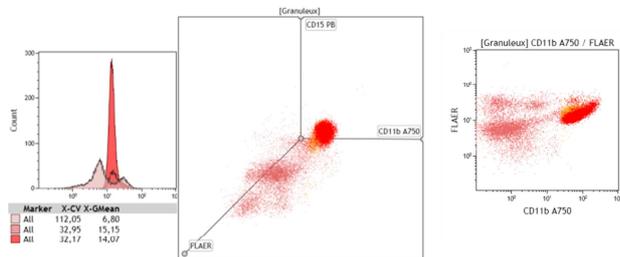


140825-1

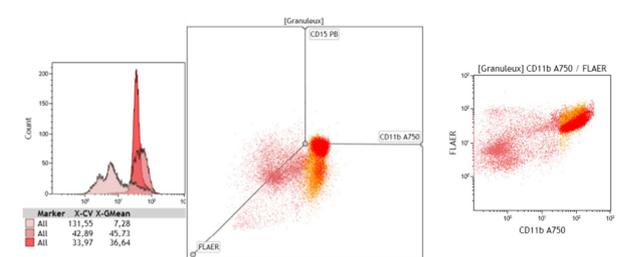


141007-1

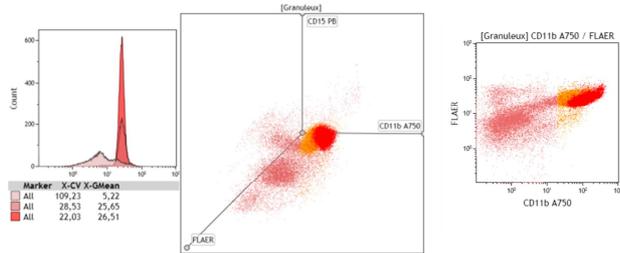
Annexe 3.4.6 AREB-II



140804-1

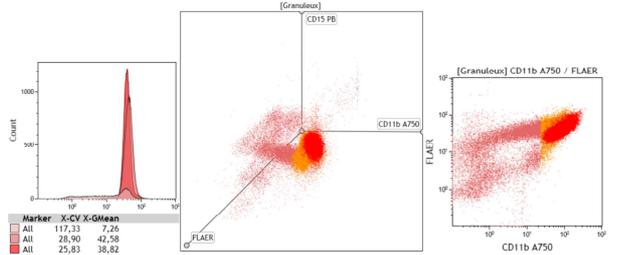


140807-1

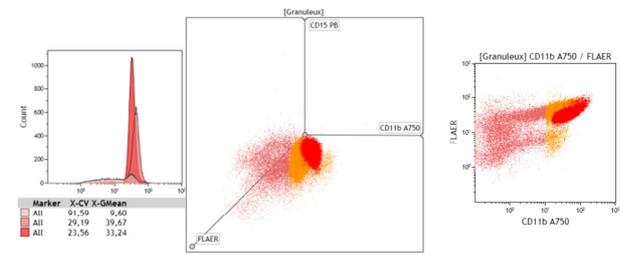


140902-1

Annexe 3.4.7 LMCC-I



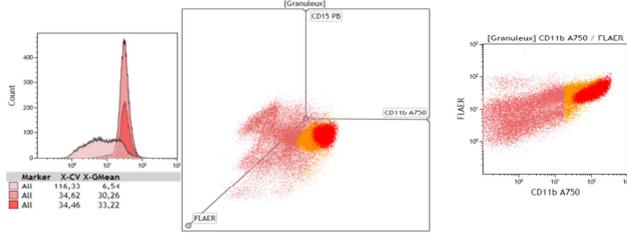
140919-1



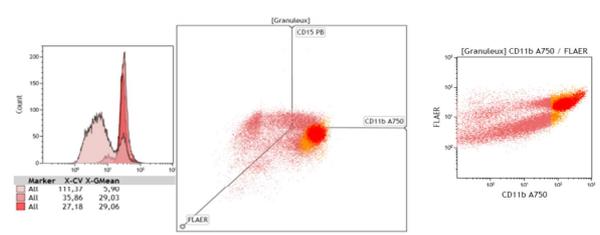
140908-2

Annexe 3.4.8 LMMC-II

1.

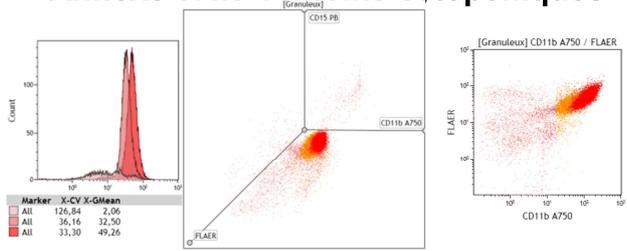


140701-1

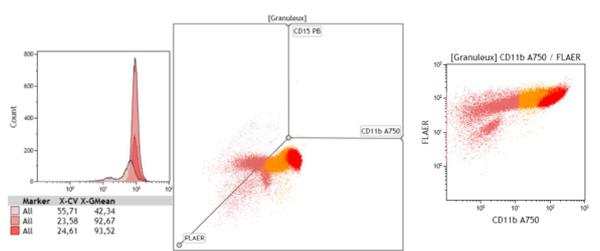


140707-5

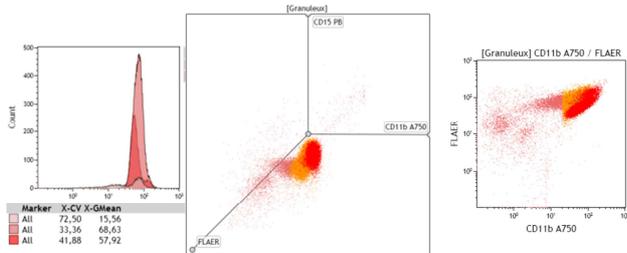
Annexe 3.4.9 Témoins cytopéniques



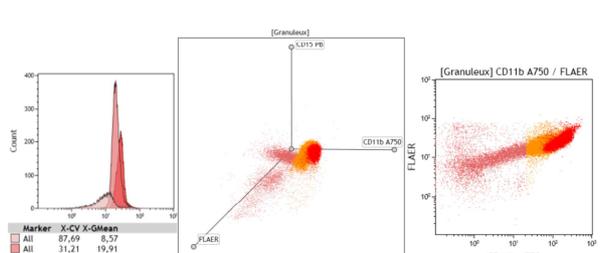
140707-4



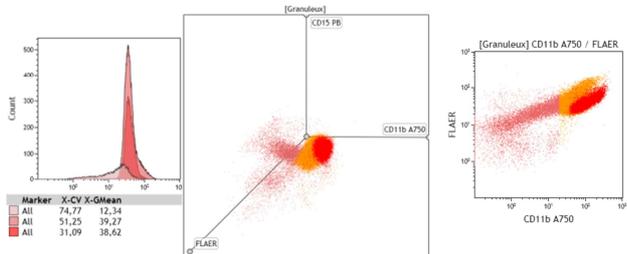
140708-2



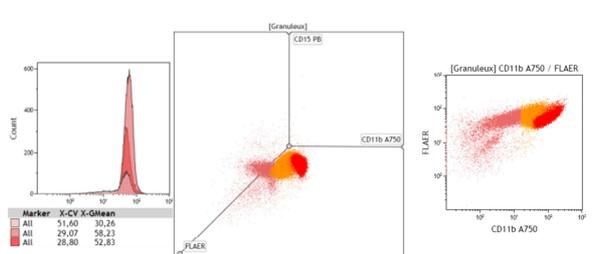
140708-3



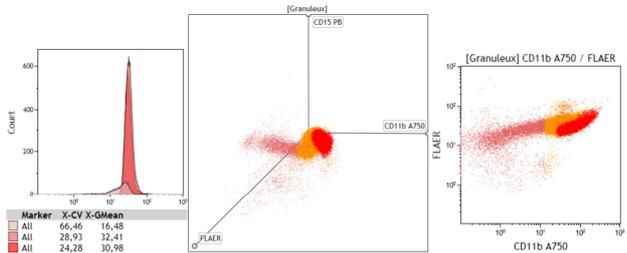
140709-2



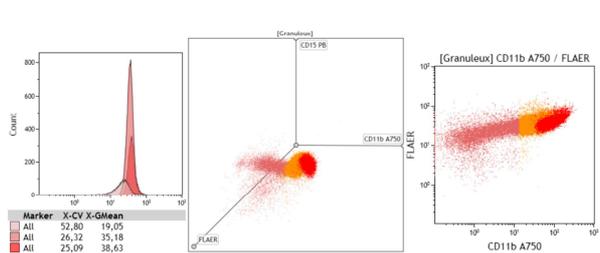
140710-1



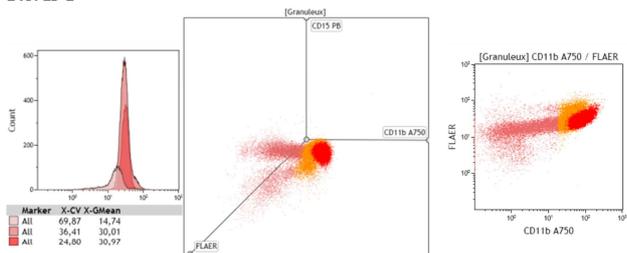
140710-3



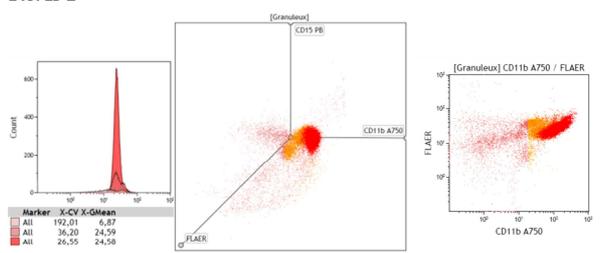
140715-1



140715-2



140716-1



140723-1

Table des figures

Figure 1 : Incidence des SMD dans les différentes classes d'âge aux Etats-Unis (3)	15
Figure 2 : Quelques images de dysmégacaryopoïèse: monolobulation (A), mégacaryocyte en sac de billes (B), micromégacaryocyte (C) (13)	18
Figure 3: Quelques images de dysérythroïèse: cytoplasmes feuilletés et vacuolisés (A), bourgeonnements nucléaires (B), érythroblastes géants binucléés (C) (13)	19
Figure 4 : exemple de dysgranulopoïèse (13).....	20
Figure 5 : Coloration de Perls avec présence de sidéroblastes de type III (13).....	22
Figure 6 : Place de l'allogreffe dans les SMD (4)	37
Figure 7 : Protocole de traitement des patients atteints de SMD de faible risque (4)	38
Figure 8 : Protocole de traitement des patients atteints de SMD de risque élevé (4)	38
Figure 9 : Schéma général d'un cytomètre en flux (25).....	39
Figure 10 : Focalisation hydrodynamique (27)	40
Figure 11 : Différents modes de dispersion de la lumière par la cellule (28)	41
Figure 12 : Schéma général d'un banc optique (25)	41
Figure 13 : Différents types de filtres pouvant être utilisés (28).....	42
Figure 14 : Comparaison des spectres d'émission du FITC et de la PE (27)	43
Figure 15 : Exemple de compensation entre les fluorochromes FITC et PE (d'après Beckman Coulter®).....	44
Figure 16 : Exemple de chevauchement des spectres d'émission de plusieurs fluorochromes (d'après Beckman Coulter®)	44
Figure 17 : Exemple d'un histogramme bi-paramétrique (A) et d'un histogramme mono-paramétrique (B)	45
Figure 18 : Intensité d'expression de différents marqueurs myéloïdes au cours de la maturation granuleuse (47)	50
Figure 19 : Ancre GPI. Elle associe un phosphatidylinositol dont les acides gras pénètrent dans le feuillet lipidique de la membrane. La partie inositol est liée à une molécule de glucosamine, puis à trois molécules de mannose dont le troisième porte un éthanol-aminephosphate (52)	54
Figure 20 : Régulation du système du complément par les protéines CD55 et CD59 (52)....	55
Figure 21 : Les 8 différents pics d'intensité de fluorescence obtenus avec les billes Rainbow, un exemple sur le canal FL2 du cytomètre	65
Figure 22 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenue avec les billes Rainbow, ici sur le canal FL2 du cytomètre	66
Figure 23 : histogramme FS INT/FS Peak permettant l'élimination des « doublets »	67
Figure 24 : Histogramme FS/SS permettant l'élimination des débris cellulaires.....	68
Figure 25 : Histogramme CD45/SS permettant l'élimination des cellules non hématopoïétiques et le ciblage des lymphocytes.....	68
Figure 26 : Histogramme CD14/SS permettant le ciblage des monocytes matures (fenêtre Mono1).....	69
Figure 27 : Histogramme CD33/CD15 permettant le ciblage des précurseurs monocytaires (fenêtre Mono 2).....	70
Figure 28 : Histogramme CD24/SS permettant le ciblage des précurseurs lymphoïdes (fenêtre Hématogones).....	70
Figure 29 : Histogramme CD11b/CD16 permettant de définir 3 stades de maturation granuleuse	71
Figure 30 : Histogramme récapitulant la stratégie de fenêtrage sur le tube « Flaer »	72

Figure 31 : Trois approches de travail sur la maturation granuleuse : en vert les patients normaux, en rouge l'hypothèse étudiée pour les patients atteints de SMD	73
Figure 32 : Exemples d'histogramme biparamétrique CD15/CD13 (A) et monoparamétrique CD13 de type « overlay » (B) permettant de récupérer la moyenne Gmean et le CV	74
Figure 33 : Répartition des patients dans le groupe SMD	78
Figure 34 : Répartition des patients dans le groupe témoins cytopéniques.....	79
Figure 35 : Score d'Ogata au sein des différents sous-groupes.....	80
Figure 36 : Expression du marqueur Flaer au cours de la maturation granuleuse normale...	85
Figure 37 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux les plus immatures (IG1).....	86
Figure 38 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux intermédiaires (IG2).....	86
Figure 39 : Comparaison entre les 3 groupes de patients de l'expression du marqueur Flaer sur les granuleux matures	87
Figure 40 : IG1 ayant une intensité d'expression du marqueur Flaer inférieure à 1100 MEFL	87
Figure 41 : Exemples d'histogrammes obtenus avec un témoin normal non cytopénique.....	88
Figure 42 : Patterns Flaer anormaux retrouvés au sein de notre cohorte	89
Figure 44 : Différents types d'histogrammes utilisés pour tenter de fenêtrer les patterns Flaer normaux	90

Table des tableaux

Tableau 1 : Anomalies chromosomiques récurrentes dans les SMD (5)	23
Tableau 2 : Examens biologiques complémentaires à réaliser dans les SMD (10)	25
Tableau 3 : Critères diagnostic dans les SMD	26
Tableau 4 : Classification FAB des SMD(15).....	27
Tableau 5 : Classification OMS des SMD (5).....	29
Tableau 6 : Classification OMS des syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (4,5).....	30
Tableau 7 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS (5).....	31
Tableau 8 : Calcul du score IPSS (5,17).....	31
Tableau 9 : Groupes de risque issus du score IPSS et médiane de survie (18,19).....	32
Tableau 10 : Calcul du score WPSS (17)	32
Tableau 11 : Groupes de risque issus du score WPSS et médiane de survie (19)	33
Tableau 12 : Classification des anomalies génétiques pour le calcul du score IPSS-R (21)	33
Tableau 13 : Calcul du score IPSS-R (17,21)	34
Tableau 14 : Groupes de risque issus du score IPSS-R et médiane de survie (21).....	34
Tableau 15 : Anomalies identifiées par CMF au cours des SMD (39).....	46
Tableau 16 : Résumés des scores de CMF développés dans les SMD (39).....	47
Tableau 17 : Recommandations générales de l'ELN pour l'étude des SMD par CMF	49
Tableau 18 : Anticorps de base recommandés par l'ELN pour l'étude des différentes lignées par CMF (39).....	51
Tableau 19 : Calcul du score d'Ogata pour le diagnostic des SMD de bas grade (49).....	53
Tableau 20 : Recherche par CMF de clones HPN dans les SMD (56–59)	56
Tableau 21 : Préparation du mix d'anticorps pour le tube « Ogata ».....	63
Tableau 22 : Préparation du mix d'anticorps pour le tube « Flaer »	63
Tableau 23 : Exemple de calcul d'un « intervalle de normalité ».....	75
Tableau 24 : Résultats du score d'Ogata.....	80
Tableau 25 : Critères de positivité retenus pour les différents marqueurs de maturation granuleuse	82
Tableau 26 : Sensibilité/spécificité des différents marqueurs de maturation granuleuse.....	83
Tableau 27 : Sensibilité/spécificité des différentes approches d'étude de la maturation granuleuse	84
Tableau 28 : Répartition des patients en fonction de l'intensité moyenne d'expression du marqueur Flaer sur leurs granuleux immatures	88
Tableau 29 : Sensibilité et spécificité des scores globaux pouvant être calculés à partir de l'ensemble des données du « tube Flaer »	92
Tableau 30 : Performances du score d'Ogata au sein de différentes études	97

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.

Cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques : nouvelle approche standardisée et étude des altérations de l'ancre GPI au cours de la maturation granuleuse

Résumé :

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) constituent, encore aujourd'hui, un groupe d'hémopathies de diagnostic délicat. La cytométrie en flux (CMF) semble présenter un intérêt dans ce contexte. Néanmoins, à ce jour, aucun protocole n'associe une sensibilité, une spécificité, et une facilité d'utilisation pleinement satisfaisantes, d'où l'intérêt de poursuivre les recherches. Partant de ces constats, ce travail de thèse s'est attaché, premièrement, à mettre au point un protocole simple et standardisé utilisant des marqueurs déjà décrits dans la littérature. Au sein de notre cohorte (n=71), les performances se sont révélées voisines de celles du score d'Ogata, qui est aujourd'hui l'approche de CMF la plus utilisée dans ces pathologies. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux anomalies de l'ancre glycoposphatidyl-inositol (GPI), mais selon une approche non explorée jusqu'ici. En effet, plutôt que d'étudier la présence d'authentiques petits clones d'hémoglobinurie paroxystique nocturne, nous avons recherché des anomalies d'expression des molécules GPI, au cours de la maturation granuleuse, en utilisant la nouvelle technique de référence à l'aérolysine fluorescente (Flaer). Nous avons mis en évidence d'authentiques altérations dans un petit nombre de SMD (14%), principalement des LMMC de haut grade.

Mots-clés : Syndromes myélodysplasiques – Cytométrie en flux – Standardisation - Ancre glycoposphatidylinositol (GPI) - Flaer