

Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 10 septembre 2018

Par

Anthony COLLARD

Né le **10 janvier 1988** à Muret

Caractérisation phénotypique des monocytes de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique.

Thèse dirigée par le Dr François VERGEZ

Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie Rogez
Madame le Professeur Odile Beyne-Rauzy
Madame le Professeur Veronique De-Mas
Monsieur le Docteur François Vergez

Présidente
Juge
Juge
Juge



Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 10 septembre 2018

Par

Anthony COLLARD

Né le 10 janvier 1988 à Muret

Caractérisation phénotypique des monocytes des patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique.

Thèse dirigée par le Dr François VERGEZ

Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie Rogez
Madame le Professeur Odile Beyne-Rauzy
Madame le Professeur Veronique De-Mas
Monsieur le Docteur François Vergez

Présidente
Juge
Juge
Juge



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2017

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE (Renouvelé jusqu'au 1 ^{er} novembre 2018)
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (1 ^{er} novembre 2016 pour 2 ans)

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
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
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

Remerciements

A Madame le professeur Sylvie Rogez, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Soyez assurée de mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame le professeur Odile Beyne-Rauzy, je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail et d'y apporter votre regard de clinicien. Je vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

A Madame le professeur Veronique De-Mas, je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Je vous suis reconnaissant pour vos précieux conseils, veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A monsieur le Docteur François Vergez, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir guidé tout au long de ce travail. Ton humour, ta rigueur et ta disponibilité m'ont été d'un très grand soutien. La pudeur m'interdit de recopier ici nos nombreux échanges de mails ou conversations surréalistes.

A celles et ceux qui ont permis la réalisation de ce travail, Marie-Laure qui aura su retrouver les (trop nombreux) fichiers manquants et toutes les techniciennes du laboratoire qui auront passé de longs moments à travailler sur ces dossiers... Merci de votre implication et de votre gentillesse.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de mon internat, biologistes et techniciens. A Limoges durant mes premiers semestres, ou à Toulouse par la suite, vous m'avez tous permis d'acquérir les compétences nécessaires pour devenir à mon tour biologiste.

Merci à tous pour votre gentillesse, votre disponibilité et surtout... votre patience.

Je garderai le souvenir de nombreuses anecdotes avec chacun d'entre vous. J'espère que les futures générations d'internes auront autant de chance que moi et pourront continuer d'apprendre à vos côtés dans le sérieux, mais surtout dans la bonne humeur.

A ma famille, qui a toujours été là pour moi, surtout toi maman. Même si personne n'a jamais vraiment compris grand-chose à mes études, vous m'avez toujours soutenu même quand les révisions me prenaient un peu trop de temps...

A mon père, parti trop tôt et avec qui je ne pourrai pas trinquer ce soir. Je ne t'oublie pas papa.

Il est temps de passer aux choses sérieuses...

Avant tout, je tiens à remercier particulièrement Louis-Thomas, si je n'avais pas passé des heures à lire Naruto en P1 quand j'ai doublé, je n'en serais probablement pas là aujourd'hui. Toutes ces années de fac m'auraient paru bien longues si tu n'avais pas été mon binôme en TP. Jamais je n'aurais pu extraire de l'eau à l'aide d'une solution aqueuse sans ton aide :D Merci de m'avoir donné l'envie de travailler et d'en apprendre toujours plus.

Un autre petit paragraphe pour remercier Etienne, un grand merci à toi pour m'avoir donné envie de réviser chaque jour, même quand il fallait se farcir 2h d'exercices par jour. Sans toi je n'aurais jamais réussi l'internat. Il me restera de ces mois de révisions de nombreuses anecdotes : EDU sur PES, les révisions en caleçons, les choccos JP, les pâtes combinò, les cervelas, le phénate en chimie, Abdel mon voisin du dessus en lev***** et l'arrestation de mon voisin schizophrène... Je suis ravi d'avoir partagé tous ces moments avec toi et j'espère en vivre bien d'autres encore avec Claire (qui aura dû nous supporter elle aussi...) Hugo et Juliette.

Bientôt la fin des études, à 30 barreaux il était temps !

Puis un grand merci à tous mes co-internes, qui auront eu le courage de me supporter durant ces 4 longues années... Je vais essayer de n'oublier personne, mais si vous ne vous retrouvez pas dans ce qui suit je m'en excuse par avance...

Merci à tous ceux que j'ai rencontrés à Limoges (Tiphaine, Isabelle, Laurie, Pierre, Samuel, Marc, Marie-Fleur, Audrey, Jérémy, Martial et j'en passe...). Cette année passée à l'internat fut assez mémorable et je garde un souvenir ému du CBRS et de ses biologistes, dont certains me manquent (Kiki). Je me rappellerai aussi (pour peu qu'il m'en reste des souvenirs...) de nos soirées chez Michard, des AG ou encore des soirées internat.

Puis arriva le moment du retour à Toulouse... l'hiver fut rude en bactériologie mais mes nouveaux co-internes ont su réchauffer l'atmosphère. Ceux que je connaissais déjà (Gregoire, tu râlais bien moins à l'époque :D), les autres niveaux 1 (Agnès et Cédric) et les niveaux 2 (Chef Alice-Anne, Manu, Camille, Sherazade, Catherine, Sarah, Aurélie...).

Pour passer l'été plus sagement, la biochimie m'ouvrait ses portes, là encore des visages connus m'attendaient (Isabelle, Etienne, Karen) ainsi que des petits nouveaux (Hélène et Hadrien).

Enfin mes deux semestres d'hématologie m'ont permis de retrouver de vieilles connaissances (Louis-Thomas, Julien, Romain) et de découvrir encore de nouveaux internes (Pierre-Yves, Inès, Barnabé, Vuthy, Bastien, Alizée). D'ailleurs, petite mention spéciale pour Julien, tu te reconnaîtras sûrement dans ce travail (tu es le responsable de 50% des données :D), j'espère qu'on va pouvoir manger du flan à la noix de coco « pas transportable » enfin... si tu restes pas bloqué !

Vient ensuite le temps de l'éloignement et mon semestre à Cahors. Merci à Nathalie, Claire, Lucile et Barnabé ainsi qu'à toute l'équipe du CH de Cahors, pour votre confiance et pour tout ce que vous m'avez appris durant ces 6 mois.

Pas merci à Barnabé pour m'avoir emmené courir sur le mont St Cyr :D

Et enfin le retour, en biochimie encore une fois, et avec des têtes déjà connues. Mais quelques petits nouveaux quand même, merci à Aude, Hugo, Nicolas, Caroline, Eulalie et Imane pour m'avoir fait passer un bon dernier semestre (j'anticipe un peu ;). Désolé de ne pas avoir été plus disponible pour vous.

Pour tous les « vieux » qui ont maintenant terminés : merci pour tout ce que vous avez pu m'apprendre. Et pour tous les jeunes qui sont loin d'avoir fini : retenez bien tout ce qu'on vous a dit !

Après avoir fait le tour de mes différents stages, je me rends compte qu'il manque encore quelques personnes avec qui je n'ai jamais travaillé alors je vous remercie « pèle-mèle ». Un grand merci à Jules, Elodie, Arnaud, Marion, Morgane, Sarah, Thomas, Thibaut, Thibaut petit suisse, Claudia et Damien !

Je sais que j'ai dû oublier du monde, ne vous vexez pas, c'est hyper dur d'écrire des remerciements sans oublier personne, vous verrez quand vous y serez ~~

Pour tous ceux que j'ai cités, j'aurai aimé partager ici une petite anecdote vous concernant, un petit mot plus personnel mais malheureusement je n'en ai pas le temps/la place. J'espère tous vous recroiser rapidement pour pouvoir en rire un bon coup ;)

Au fait, j'allais oublier la plus importante...

Merci à toi mon amour, mon petit rayon de soleil breton, de m'apporter tant de joie au quotidien. Chaque jour passé à tes côtés est un bonheur et me fait prendre conscience de la chance que j'ai de t'avoir près de moi.

Je t'aime

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

Liste des abréviations.....	18
Introduction	20
I. Généralités sur la leucémie myélomonocytaire chronique	22
I.1. Définition.....	22
I.2. Épidémiologie	22
I.3. Critères OMS 2016	22
I.4. Signes cliniques.....	23
I.5. Signes biologiques.....	24
I.5.1. Cytologie	25
I.5.1.1. Hémogramme	25
I.5.2. Myélogramme.....	25
I.5.3. Cytogénétique	26
I.5.4. Biologie moléculaire	27
I.5.5. Immunophénotypage des monocytes circulants	29
I.5.5.1. Les monocytes sanguins : origine, fonction et morphologie.....	29
I.5.5.2. Situations physiologiques.....	31
I.5.5.3. Situations réactionnelles	32
I.5.5.3.1. Contextes infectieux	33
I.5.5.3.2. Pathologies auto-immunes	33
I.5.5.3.3. Cancers et néoplasies	34
I.5.5.3.4. Pathologies cardiovasculaires	34
I.5.5.4. Cas de la LMMC	34
I.6. Prise en charge.....	36
I.6.1. Pronostic	36
I.6.2. Traitement	39
I.6.2.1. Traitement symptomatique.....	39
I.6.2.1.1. Traitement de l'anémie	40
I.6.2.1.2. Traitement de la thrombopénie	40
I.6.2.1.3. Traitement de la neutropénie	40
I.6.2.2. Traitement spécifique.....	40
I.6.2.3. Traitement curatif	42
II. Matériel et méthode.....	43
II.1. Objectifs.....	43
II.2. Échantillons de patients	43
II.2.1. Définition des seuils décisionnels	43
II.2.2. Étude des nouveaux marqueurs	43
II.3. Méthode.....	43
II.3.1. Cytométrie en flux multiparamétrique	43
II.3.2. Cytologie	45
II.3.3. Stratégie de fenêtrage	45
II.3.3.1. Expression du CD14 et du CD16 par les monocytes.....	45
II.3.3.2. Expression des nouveaux marqueurs par les monocytes.....	47
II.4. Tests statistiques	50
III. Résultats	51

III.1. Définition de nouveaux seuils décisionnels des populations monocytaires.....	51
III.1.1. Caractéristiques des patients inclut dans la cohorte	51
III.1.2. Définition d'un seuil pour l'ensemble de la cohorte	53
III.1.2.1. Monocytes classiques CD14 ⁺ /CD16 ⁻	54
III.1.2.2. Monocytes intermédiaires CD14 ⁺ /CD16 ⁺	55
III.1.2.3. Monocytes non classiques CD14 ⁻ /CD16 ⁺	56
III.1.3. Définition des seuils selon les formes de LMMC.....	57
III.1.3.1. Dans le groupe SMD	58
III.1.3.2. Dans le groupe SMP	59
III.2. Expression de nouveaux marqueurs pour l'étude des monocytes	62
III.2.1. Dans le groupe contrôle.....	63
III.2.2. Dans le groupe LMMC.....	64
III.3. Intensité moyenne de fluorescence et nouveaux marqueurs.....	65
III.4. Mise en place d'un CMML-Score biologique	67
III.4.1. Paramètres biologiques et détermination des seuils	67
IV. Discussion	72
IV.1. Validation du seuil de monocytes classiques	72
IV.2. Expression des nouveaux marqueurs	73
IV.3. Mise en place d'un CMML-Score biologique.....	74
Références bibliographiques	76
Annexes	81
Serment De Galien.....	90

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de lésion cutanée chez un patient atteint de LMMC (12).....	24
Figure 2 : Les différentes familles d'oncogènes dans la LMMC d'après Itzykson <i>et al</i> (17) ..	28
Figure 3 : Origine et développement des monocytes chez l'adulte.	30
Figure 4 : Caractérisations des différentes sous-populations monocytaires chez l'Homme et la souris.....	31
Figure 5 : Répartition des trois sous-populations de monocytes chez un individu sain (31) ..	32
Figure 6 : Groupes de risque en fonction de l'âge du patient et du score IPSS-R (50).....	39
Figure 7 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations de monocytes à partir de sang total. Après avoir éliminé les doublets (A) et à partir du fenêtrage des monocytes (B), sont exclues les cellules exprimant le CD24 (C), le CD56 (D), le CD2 (E), ainsi que les doubles négatifs 14 ⁻ /16 ⁻ (F et G).	46
Figure 8 : Graphique représentant les trois sous-populations de monocytes. Expression du CD14 en abscisse et expression du CD16 en ordonnée. Les seuils d'expression sont déterminés par le niveau d'expression du CD16 par les lymphocytes et le niveau d'expression du CD14 par les monocytes « classiques ».	47
Figure 9 : Graphiques représentant l'expression des nouveaux marqueurs sélectionnés pour chaque sous-population monocyttaire. En A, expression du CD64 en abscisse et du CD184 en ordonnée. En B expression du CD36 en abscisse et du CD9 en ordonnée. En C expression du CD99 en abscisse et du CD123 en ordonnée. En 1 la population de monocytes « classiques », en 2 la population de monocytes « intermédiaires » et en 3 la population de monocytes « non classiques ».	49
Figure 10 : Répartition des cas de non-LMMC de la cohorte d'étude selon les différentes pathologies.....	52
Figure 11 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Withney.....	53
Figure 12 : Courbe ROC et distribution des MO1 sur la cohorte globale.....	54
Figure 13 : Courbe ROC et distribution des MO2 sur la cohorte globale.....	55
Figure 14 : Distribution des MO3 sur la cohorte globale.	56
Figure 15 : Répartition des cas LMMC (0,1 et 2) et du groupe contrôle (en orange) dans les deux formes de la maladie. Forme SMD si leucocytes <13 G/L et forme SMP si leucocytes ≥13 G/L.	57
Figure 16 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle dans la cohorte SMD. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Withney.....	58
Figure 17 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle dans la cohorte SMP. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Withney.....	59

Figure 18 : Courbes et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte SMD.....	60
Figure 19 : Courbes et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte SMP.....	61
Figure 20 : Pourcentages d'expression des différents marqueurs testés dans les sous-populations monocytaires chez les patients du groupe contrôle.	63
Figure 21 : Pourcentages d'expression des différents marqueurs testés dans les sous-populations monocytaires chez les patients du groupe LMMC.	64
Figure 22 : MFI des nouveaux marqueurs en fonction des sous-populations MO1, MO2 et MO3. Comparaison entre les patients LMMC et non-LMMC. Test de Mann-Withney.	66
Figure 23 : Courbes ROC des différents paramètres de la NFS testés, AUC et seuils correspondants. Ces courbes ont été construites en utilisant la totalité de la cohorte (n=170).	68
Figure 24 : Pourcentage de patients LMMC/non-LMMC en fonction du résultat du CMML-score biologique. En noir les patients du groupe malade, en blanc ceux du groupe non-malade.	70
Figure 25 : CMML-score classement en sous-groupes. En noir les patients du groupe malade, en blanc ceux du groupe non-malade.	70
Figure 26 : Calcul du CMML-score et conduite à tenir.	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des différentes formes de LMMC et survie/pourcentage d'évolution en LAM à 5 ans.	23
Tableau 2 : Classification du risque cytogénétique spécifique à la LMMC selon Wassie <i>et al</i> (15).....	27
Tableau 3 : Variables et scores associés d'après Such <i>et al</i> (6).	37
Tableau 4 : Groupes de risque associés au score CPSS ; probabilité de transformation en LAM à 2 ans et médiane de survie, d'après Such <i>et al</i> (8).	37
Tableau 5 : Système de calcul du score IPSS-R (23).	38
Tableau 6 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés dans le panel 1.	44
Tableau 7 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés dans le panel 2.	44
Tableau 8 : Principales caractéristiques des sujets inclut dans l'étude.	51
Tableau 9 : Valeurs de VPP et de VPN dans la population MO1 au seuil de 92,7%.	54
Tableau 10 : Valeurs de VPP et de VPN dans la population MO2 au seuil de 3,7%.	55
Tableau 11 : Valeurs de VPP et de VPN dans les populations de MO3 au seuil de 1,9%.	56
Tableau 12 : Comparaison des pourcentages d'expression des différents marqueurs par les sous-populations MO1, MO2 et MO3.	65
Tableau 13 : Système de score	69
Tableau 14 : VPP et VPN du CMML-score	71
Tableau 15 : Principales caractéristiques des patients inclut en 2017 et 2018.....	84

Liste des abréviations

5-hmC : H-hydroxymethylcytosine	GMP : Granulocyte-monocyte precursor
5-mC = 5-methylcytosine	GPI :Glycosyl-phosphatidyl inositol
AA750 : Allophycocyanine alexa fluor 750	HAS : Haute autorité de santé
ADN : Acide désoxyribonucléique	HLA : Antigène leucocytaire humain
AMM : Autorisation de mise sur le marché	IFNγ : interféron gamma
APC : Allophycocyanine	IL : interleukine
ARN : Acide ribonucléique	JAK2 : Janus kinase 2
ASE : Agent stimulant de l'érythropoïèse.	LAM : Leucémie aiguë myéloïde
ASXL1 : Additional sex combs like 1	LES : Lupus érythémateux systémique
AUC : Aire sous la courbe	LMC : Leucémie myéloïde chronique
BCR-ABL : B-cell receptor-Abelson	LMCa : Leucémie myéloïde chronique atypique
BV510 : Brillant Violet 510	LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique
CALR : Calréticuline	LMMCj : Leucémie myelomonocytaire chronique juvénile
CD : Cluster de différenciation	LPS : Lipolysaccharide
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	M-CSF : Monocyte colony stimulating factor
CPSS : CMML-specific Prognosis Scoring System	MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence
CSH : Cellule souche hématopoïétique	MGG : May Grünwald Giemsa
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique	MO1 : Monocyte classique
EPO = Erythropoietine	MO2 : Monocyte non classique
FAB : Franco-Americano-Britannique	MO3 : Monocyte intermédiaire
FGFR1 : Fibroblast growth factor receptor 1	MPO : Myéloperoxidase
FISH : Fluorescence in situ hybridization	NK : Natural killer
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine	OMS : Organisation mondiale de la santé
FN : Faux négatif	PC : Phycocyanine
FP : Faux positif	PDGFR : Platelet derived growth factor receptor α
FSC : Forward scatter	PE : Phycoérythrine
G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor	PECF594 : Phycoerythrin-cyaninfluor 594
GFM : Groupe Français des myélodysplasies	PerCP : Peridinin chlorophyll protein

PNN : Polynucléaire neutrophile
PRR : Pattern recognition receptor
PV : Polyglobulie de Vaquez
RFC γ : Récepteur à la fraction Fc gamma
ROC : Receiver operating characteristic
RUNX1 : Run related transcription factor 1
SMC : Splénomégalie myéloïde chronique
SMD : Syndrome myélodysplasique
SMD/SMP : Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif
SMD/SMP-RS-T : Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif avec sideroblastes en couronnes et thrombocytose.
SMP : syndrome myéloprolifératif
SRSF2 : Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2

SSC : Side scatter
TCR : T Cell récepteur
TE : Thrombocytémie essentielle
TET2 : Ten eleven translocation 2
TLR : Toll like receptor
TNF : Tumor necrosis factor
TP53 : Tumor protein 53
TSH : Thyréostimuline
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VN : Vrai négatif
VP : Vrai positif
VPN : Valeur prédictive négative
VPP : Valeur prédictive positive

Introduction

Le diagnostic des hémopathies malignes s'est considérablement amélioré ces dernières années. En partie grâce au développement de nouvelles techniques de cytométrie en flux, de cytogénétique ou encore de biologie moléculaire. Certaines pathologies restent malgré tout difficiles à objectiver. C'est le cas des syndromes frontières, myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/SMP).

Cette entité fut individualisée dans la troisième édition (2008) de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des hémopathies . Elle représente un groupe frontière entre les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et les syndromes myélodysplasiques (SMD).

Elle est composée de cinq pathologies distinctes, selon la révision 2016 de la classification OMS (1) :

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

Une monocytose chronique associée à des signes de dysplasies (dysgranulopoïese tout particulièrement) permet d'évoquer le diagnostic de LMMC. Cependant, la distinction entre une LMMC, une monocytose réactionnelle et un SMD avec monocytose associée, chronique, ou fluctuante, est parfois délicate. De nombreuses analyses complémentaires doivent être réalisées, à commencer par la recherche des principales mutations qui définissent les SMP les plus fréquents, à savoir, les mutations touchant les gènes *JAK2*, *MPL* et *CALR*, qui devront être absentes. Il est important de noter que l'appréciation de la dysmyélopoïese, laissée à l'évaluation de l'hémato-cytologiste et donc difficile à standardiser, conserve une place prépondérante dans le diagnostic.

Les nouvelles techniques de diagnostic biologique, parmi lesquelles la biologie moléculaire, ont permis d'affiner le diagnostic de certains SMD/SMP. De nombreuses mutations ont été décrites dans la LMMC, mais celles-ci sont souvent communes à d'autres SMD (2). Elles ne sont donc pas spécifiques de cette pathologie et ne permettent pas d'en poser le diagnostic à elles seules.

Les principales difficultés rencontrées lors du diagnostic de la LMMC restent alors :

- Les nombreuses causes de monocytose réactionnelle, qui sont à écarter.
- La chronicité de la monocytose, qui doit être observée durant au moins trois mois.

Le diagnostic de LMMC n'est donc pas chose aisée. A cause du pronostic sombre associé à cette pathologie, une prise en charge précoce et adaptée des patients paraît indispensable. C'est donc dans ce contexte que l'utilisation de la cytométrie en flux semble pertinente. En effet il s'agit d'une technique rapide, peu couteuse et pouvant être réalisée sur un prélèvement de sang périphérique.

Deux marqueurs sont classiquement utilisés pour différencier 3 sous-populations de monocytes, le CD14 et le CD16. Il apparaît que la distribution relative des populations de monocytes « classiques » (CD14⁺CD16⁻, MO1), « intermédiaires » (CD14⁺CD16⁺, MO2) et



« non classiques » (CD14⁻CD16⁺, MO3) est modifiée chez les patients atteints de LMMC. La mise en place d'un seuil établi à 93.6% de monocytes « classiques » permet d'obtenir une sensibilité et une spécificité optimales, sans pour autant permettre au clinicien de s'affranchir des autres examens disponibles (3).

Après avoir validé ce seuil, issu de la littérature, à partir d'une cohorte de patients du CHU de Toulouse, nous avons réalisé l'étude de l'expression de 6 marqueurs membranaires retrouvés à la surface de monocytes de patients sains et de patients atteints de LMMC. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence une expression aberrante de marqueurs par les monocytes clonaux autorisant ainsi la discrimination entre les monocytes sains et malades.

Dans une première partie, nous ferons quelques rappels concernant la pathologie, puis, dans une seconde partie, nous détaillerons les caractéristiques de l'étude et ses différents objectifs.

Enfin, une présentation des résultats et une discussion concernant l'apport de la cytométrie en flux, ainsi que l'intérêt des nouveaux marqueurs testés viendra conclure ce travail.

I. Généralités sur la leucémie myélomonocytaire chronique

I.1. Définition

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie maligne clonale de la cellule souche hématopoïétique médullaire. Il s'agit d'une pathologie rare atteignant préférentiellement les sujets âgés. La LMMC possède deux composantes distinctes :

- (i) D'une part la composante myéloproliférative (LMMC-MP), qui entraîne la prolifération maligne de la lignée monocytaire, sans blocage de maturation ;
- (ii) D'autre part la composante myélodysplasique (LMMC-MD), avec prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale.

L'hématopoïèse est rendue inefficace du fait de l'apoptose précoce des progéniteurs myéloïdes dysplasiques. Il en résulte un défaut de production médullaire et par conséquent une à plusieurs cytopénies périphériques (4).

I.2. Épidémiologie

La LMMC est une pathologie rare. Son incidence estimée est comprise entre 0,35 et 0,41 cas pour 100 000 habitants par an. L'âge médian du diagnostic est de 72 ans. Il s'agit d'une pathologie qui touche préférentiellement les hommes, avec un sex-ratio d'environ deux hommes atteints pour une femme (5). La LMMC représente environ 10% de l'ensemble des syndromes myélodysplasiques diagnostiqués (6). Il est à noter qu'il existe des formes secondaires, qui font suite à des traitements. Ces formes représentent environ 10% des cas de LMMC et sont associés à un pronostic très sombre (7).

I.3. Critères OMS 2016

La révision 2016 de la classification OMS des hémopathies malignes myéloïdes (1) place la LMMC dans la catégorie des syndromes frontières, qui possèdent à la fois des caractéristiques propres aux syndromes myélodysplasiques et aux syndromes myéloprolifératifs.

Cinq critères permettent de définir la LMMC :

- Monocytose persistante supérieure à 1 G/L en valeur absolue et représentant au moins 10% des leucocytes
- Absence de critère OMS permettant d'évoquer une leucémie myéloïde chronique (LMC) BCR-ABL1 positive, une polyglobulie de Vaquez (PV), une splénomégalie myéloïde chronique (ou myélofibrose primitive MFP) ou une thrombocythémie essentielle (TE)
- Absence de réarrangement des gènes *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* ou de fusion de *PCM1-JAK2* (essentiellement dans les cas d'hyperéosinophilie)
- Pourcentages de blastes médullaires et sanguins inférieurs à 20% (sont intégrés dans le compte les blastes, les myéloblastes, les monoblastes et les promonocytes)

- Au moins un des critères suivants :
 - Présence de signes de dysplasie significatifs (>10%) sur au moins une des lignées myéloïdes au myélogramme et/ou présence d'anomalie clonale acquise cytogénétique ou moléculaire des cellules hématopoïétiques (*TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *SETBP1*, etc...)
 - Persistance d'une monocytose sanguine pendant au moins 3 mois, après exclusion des autres causes de monocytose

D'autre part, l'OMS a édité une classification composée de 3 groupes distincts de LMMC, à partir des pourcentages de blastes sanguins et médullaires. Au-delà de 20% de blastes la maladie est directement considérée comme une leucémie aiguë myéloïde (LAM). Cette classification est justifiée par le fait que la survie et le risque d'évolution en LAM sont corrélés à l'importance de l'infiltration blastique (8) (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des différentes formes de LMMC et survie/pourcentage d'évolution en LAM à 5 ans.

	Blastes sanguins	Blastes médullaires	Survie à 5 ans	Evolution en LAM à 5 ans
LMMC 0	<2%	<5%	>50%	-
LMMC 1	2-4%	5-9%	34%	25%
LMMC 2	5-19%	10-19% ou présence de corps d'Auer	12%	54%

I.4. Signes cliniques

Les présentations cliniques de la LMMC peuvent être très variables. Cela est notamment dû au fait que cette maladie peut se présenter sous deux formes :

-LMMC-MP : forme proliférative : leucocytes circulants >13 G/L et présentation clinique proche des SMP.

-LMMC-MD : forme dysplasique : leucocytes circulants <13 G/L et présentation clinique proche des SMD (forme majoritaire).

En règle générale, comme dans la plupart des SMD, on retrouve un contraste entre les différentes cytopénies périphériques et l'importance de la densité cellulaire médullaire. Cela s'explique par une hématopoïèse inefficace. Il en résulte un défaut à la fois quantitatif et qualitatif de production de cellules matures, avec un avortement intramédullaire accru, à l'origine des cytopénies périphériques.

Les symptômes, lorsqu'ils existent, sont donc la conséquence des cytopénies (2) :

- Une anémie plus ou moins profonde, pourra provoquer : asthénie, pâleur, dyspnée d'effort, tachycardie, etc... Sa tolérance sera fonction de l'état général du malade.

- Une leuco-neutropénie sera responsable d'infections plus ou moins graves et répétées, et ce d'autant plus que la neutropénie sera importante.
- Une thrombopénie plus ou moins sévère sera responsable de signes hémorragiques variés, allant de l'hémorragie cutanéomuqueuse (pétéchies) à des hémorragies profondes/viscérales. Il n'existe pas de corrélation entre le taux de plaquettes et l'importance éventuelle des signes hémorragiques car on peut retrouver, dans certains cas, une thrombopathie associée, liée à la myelodysplasie.

Dans le cas où la maladie est à composante myéloproliférative, on peut retrouver des symptômes communs aux SMP, comme un état hyper catabolique (asthénie, fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement), une splénomégalie ou plus rarement une hépatomégalie, voire des adénopathies (6) (9).

Des maladies inflammatoires ou auto-immunes sont fréquemment associées aux SMD ainsi qu'à la LMMC. Elles sont observées chez 15 à 25% des patients. La plupart du temps le diagnostic de LMMC est fait avant celui de ces différentes pathologies. Les plus fréquemment retrouvées sont les vascularites systémiques (périartérites noueuses essentiellement), des thrombopénies auto-immunes, ou encore des rhumatismes inflammatoires. Dans la majorité des cas, ces affections répondent très bien à un traitement par corticostéroïdes (10).

Une atteinte cutanée survient parfois, mais souvent de manière tardive. Elle prend l'aspect d'une leucémie cutanée ou leucémide. Différents types de lésions peuvent être observés, comme des nodules plus ou moins pigmentés ou une éruption érythémateuse. Cette atteinte est considérée comme un signe de progression de la maladie voire même comme un signe de transformation en LAM. Une biopsie cutanée des lésions est donc indispensable afin d'établir un diagnostic précis (11).



Figure 1 : Exemple de lésion cutanée chez un patient atteint de LMMC (12).

I.5. Signes biologiques

Les signes cliniques que l'on peut retrouver au cours d'une LMMC sont nombreux et très hétérogènes. Ils peuvent fréquemment être retrouvés au cours des SMD ou des SMP. Il n'existe pas de signe clinique pathognomonique de la LMMC. La biologie occupe donc une place prépondérante dans le diagnostic. C'est ce que nous allons détailler ci-après, des examens les plus courants au plus spécialisés.

I.5.1. Cytologie

I.5.1.1. Hémogramme

Lors de la réalisation d'une numération, une anémie peut être retrouvée. Elle sera le plus souvent normocytaire et normochrome. Les plaquettes sont classiquement en nombre normal, mais une thrombopénie peut aussi être présente. La leucocytose est quant à elle variable, elle permet néanmoins de distinguer les formes myéloprolifératives (>13G/L) des formes myélodysplasiques (<13G/L) de la maladie. La réalisation de la formule sanguine doit mettre en évidence une monocytose supérieure à 1G/L, avec une population monocytaire représentant plus de 10% des leucocytes totaux (1,13).

Ces différentes anomalies de la NFS, notamment la présence d'une monocytose chronique, doivent entraîner la réalisation d'un frottis sanguin, qui permettra au biologiste de mettre en évidence d'éventuelles anomalies cytologiques. Une aniso-poïkilocytose peut être présente, signant une dysplasie de la lignée érythrocytaire. Des anomalies plaquettaires (macroplaquettes par exemple), elles aussi, peuvent être observées. Dans la grande majorité des cas, les signes de dysplasie ne seront cependant visibles que sur la lignée granuleuse. On pourra retrouver des polynucléaires neutrophiles hyposegmentés, pelgerisés ou bien encore dégranulés. Les monocytes ne sont habituellement pas différents morphologiquement de ceux de patients sains ou de ceux dont la monocytose est réactionnelle. On peut toutefois observer des monocytes hyperlobulés ou plus immatures, avec notamment un cytoplasme plus basophile ou des granulations cytoplasmiques de grande taille.

Enfin, une blastose sanguine peut être retrouvée. Celle-ci est calculée en additionnant les pourcentages de blastes, de myéloblastes, de monoblastes et de promonocytes. Elle permet de classer la maladie en 3 stades :

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

La présence d'une blastose $\geq 20\%$ classe automatiquement la maladie en leucémie aiguë (1).

Tous ces éléments doivent être étudiés par le cytologiste afin qu'il puisse orienter le clinicien sur l'intérêt de réaliser un myélogramme afin de confirmer le diagnostic et valider la classification.

I.5.2. Myélogramme

Lorsque celui-ci est réalisé, on retrouve dans la majorité des cas une hypercellularité médullaire, avec notamment une hyperplasie des lignées granuleuse ou érythroïde. On ne retrouve pas de manière systématique un excès de monocytes ou de promonocytes. A l'instar de ce que l'on peut observer sur le frottis sanguin, des signes de dysplasie vont être présents. Parmi les anomalies morphologiques décrites, les plus fréquentes concernent la lignée granuleuse. Les éléments matures et immatures peuvent présenter des signes d'hyposegmentation, de dégranulation ou encore de pelgérisation. La lignée érythroïde peut aussi être atteinte. On retrouvera notamment des anomalies de dénucléation, la présence de lacunes ou de ponctuations basophiles dans le cytoplasme. Des sidéroblastes en couronne

peuvent être observés après coloration de Perls. Enfin, les mégacaryocytes ne sont pas épargnés. On pourra noter la présence de micromégacaryocytes ou d'anomalies nucléaires.

Ces différents signes de dysplasie seront considérés comme significatifs si au moins 10% des éléments d'une lignée sont atteints (1).

De la même manière que dans le sang, le pourcentage de blaste médullaire (addition des blastes, des myéloblastes, des monoblastes et des promonocytes) permet de définir 3 stades de la maladie :

- LMMC 0 : <5% de blastes
- LMMC 1 : 5-9% de blastes
- LMMC 2 : 10-19% de blastes ou présence de corps d'Auer

La présence d'une blastose $\geq 20\%$ entraîne le classement de la maladie en leucémie aiguë (1).

I.5.3. Cytogénétique

Des anomalies cytogénétiques clonales sont seulement retrouvées chez environ 30% des patients atteints de LMMC, contre 50% des patients atteints d'un SMD. Comme l'indique le groupe français des myélodysplasies (GFM), le caryotype fait partie des analyses biologiques à visée diagnostique ou pronostique considérées comme indispensables (9).

Les anomalies les plus couramment décrites sont : la trisomie 8, la délétion Y, une atteinte du chromosome 7 (monosomie 7 ou del(7q)), la trisomie 21 ou un caryotype complexe (présence de 3 anomalies ou plus). La del(5q) et les monosomies diverses sont très rarement observées chez les patients atteints de LMMC, contrairement à ce que l'on peut voir chez ceux atteints d'un SMD (14).

Ces découvertes ont permis d'établir des groupes homogènes de malades, afin d'estimer le risque d'évolution de leur maladie en LAM et leur médiane de survie. Une récente étude collaborative, réalisée par la Mayo clinic et le GFM a montré des résultats intéressants et significatifs, permettant de classer les patients par groupe de risque en fonction de leur caryotype (Tableau 2). Il existe d'autres modèles pronostics utilisant le caryotype et adaptés à la LMMC comme celui de Such *et al* (8) par exemple. Leur objectif est de permettre au clinicien d'estimer le risque d'évolution en LAM des patients afin de pouvoir adapter leur traitement.

Tableau 2 : Classification du risque cytogénétique spécifique à la LMMC selon Wassie *et al* (15).

	Anomalies cytogénétiques	Risque d'évolution en LAM à 2 ans	Médiane de survie
Faible risque	Caryotype normal -Y der(3q)	10%	41 mois
Risque intermédiaire	Autres anomalies	25%	21 mois
Haut	Caryotypes complexes Monosomies	40%	3 mois

I.5.4. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire peut être utilisée dès l'étape du diagnostic afin d'exclure les différents SMP, qui font office de diagnostics différentiels de la LMMC. Chez près de 90% des patients, on peut retrouver une ou plusieurs mutations génétiques. En moyenne, on observe 10 à 15 anomalies moléculaires toutes les kilobases d'ADN codant, ce qui est comparable avec ce que l'on observe chez les patients atteints de LAM, mais bien moindre que dans le cas de certains cancers solides (mélanome ou cancer des poumons) (7). D'autres part, ces mutations sont recherchées car elles ont un intérêt pronostique (16).

Différentes voies de signalisation cellulaire peuvent être atteintes (Figure 2) (17).

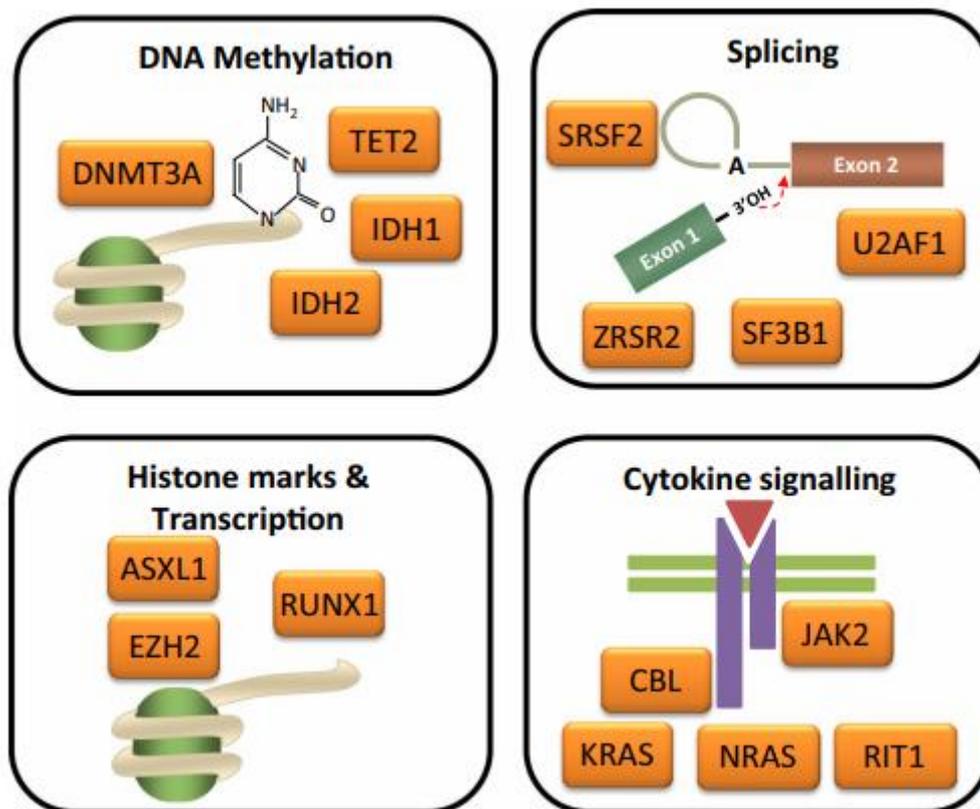


Figure 2 : Les différentes familles d'oncogènes dans la LMMC d'après Itzykson *et al* (17).

En haut à gauche les différents gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN.

En haut à droite, les différents gènes impliqués dans l'épissage alternatif de l'ARN.

En bas à gauche les gènes impliqués dans la méthylation des histones.

Enfin en bas à droite les différents gènes codant pour des facteurs de transcription ou des voies de signalisation. Tous les gènes représentés ici sont susceptibles d'être mutés chez un patient atteint de LMMC.

Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont celles impliquant *TET2* (58%), *SRSF2* (46%), *ASXL1* (40%) ou encore *RUNX1* (15%) (18) (19). Certaines mutations touchent les gènes régulateurs épigénétiques et donc la synthèse d'ADN.

Il peut s'agir de gènes régulant la méthylation de l'ADN comme *TET2* (Ten-Eleven-Translocation 2) qui est un membre de la famille des oncogènes *TET* (*TET1-TET3*). Il code pour une dioxygénase qui catalyse la transformation de 5-methyl-cytosine (5-MC) en 5-hydroxy-methyl-cytosine (5-HMC). Cette 5-HMC est un nucléotide intermédiaire qui joue un rôle en épigénétique, dans la transcription et la méthylation de l'ADN (20). Chez les patients présentant une mutation de *TET2*, on observe une diminution du taux de méthylation de l'ADN. Cette anomalie moléculaire a pour caractéristiques de promouvoir l'expansion du compartiment des progéniteurs myéloïdes et l'auto-renouveaulement des cellules souches hématopoïétiques, ce qui participe à la tumorigénèse myéloïde (21).

Des mutations du spliceosome peuvent aussi être retrouvées, notamment celles touchants *SRSF2* (Serine/arginine-Rich Splicing Factor 2). Il s'agit d'un gène codant pour une protéine contribuant à l'épissage alternatif et constitutif de l'ARN et qui permet la maturation des ARNm. Son altération entraîne une instabilité génomique et une dérégulation de la machinerie épigénétique. *In vitro*, *SRSF2* semble indispensable à la viabilité des cellules hématologiques, notamment les cellules hématopoïétiques médullaires mais ne semble pas

avoir d'impact sur les différentes étapes de la différenciation myéloïde (22). Cependant, à l'heure actuelle, peu de choses sont connues quant aux conséquences *in vivo* de ces modifications (18).

ASXL1 (Additional SeX combs-Like 1) est un gène qui régule la méthylation des histones. Lorsqu'il est muté, on observe une diminution de la triméthylation des histones, avec pour conséquence une dérégulation de la transcription entraînant une survie accrue des cellules souches hématopoïétiques et une augmentation du risque d'évolution vers un clone leucémique, en cas d'acquisition de mutations additionnelles (de *RUNX1* par exemple) (23).

Enfin, d'autres mutations affectant les gènes codant pour des facteurs de transcription ou des voies de signalisations liées à des récepteurs tyrosine kinase sont parfois retrouvées. Elles touchent les gènes comme *RUNX1*, *JAK2*, *KRAS*, *NRAS*, etc...

RUNX1 (runt-related transcription factor 1) est essentiel pour garantir une hématopoïèse et une différenciation myéloïde normales. Il permet la régulation de l'expression de gènes codant pour le G-CSF, l'interleukine 3, le TCR ou encore la myéloperoxydase. Différentes mutations de *RUNX1* existent (non-sens, faux-sens, silencieuses, décalages du cadre de lecture). Elles sont associées à un risque accru d'évolution en LAM, notamment lors d'acquisition de mutations additionnelles (24).

Ces mutations ne sont pas spécifiques de la LMMC et peuvent être retrouvées dans d'autres hémopathies (SMD, SMP, LAM, etc...). Il est évidemment possible de retrouver plusieurs anomalies moléculaires (jusqu'à 4 ou 5) pour un même clone chez certains patients (25).

I.5.5. Immunophénotypage des monocytes circulants

Depuis quelques dizaines d'années, une nouvelle technique permettant de séparer et dénombrer les différentes populations cellulaires présentes dans un échantillon sanguin ou médullaire est disponible : la cytométrie en flux. En utilisant différentes combinaisons d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes et spécifiques d'antigènes membranaires ou cytoplasmiques, il est possible de caractériser différents types cellulaires ainsi que de les dénombrer. Cette technique, appliquée aux monocytes du sang circulant a permis d'en définir trois sous-types. Au cours de leur maturation, les monocytes acquièrent différentes fonctions et gagnent ou perdent certains de leurs marqueurs de surface. Dans certaines situations pathologiques, on observe une expansion de certaines sous-populations monocytaires. C'est le cas notamment chez les patients atteints de LMMC, chez lesquels on retrouvera une augmentation des monocytes classiques.

I.5.5.1. Les monocytes sanguins : origine, fonction et morphologie

Depuis la première description des macrophages en 1892, le questionnement sur leur origine et leur développement n'a jamais cessé. On sait aujourd'hui qu'ils dérivent des monocytes qui eux ont plusieurs origines, notamment la vésicule vitelline, le foie au stade fœtal et enfin la moelle osseuse. Les monocytes appartiennent à la lignée myéloïde. Chez l'adulte, ils sont issus de la moelle osseuse et proviennent de différents précurseurs (CSH, CMP, GMP, etc...) comme indiqué sur la figure 3. La durée de maturation, permettant à la CSH (Cellule Souche Hématopoïétique) d'atteindre le stade de monocyte est de 5 à 7 jours. Le monocyte va ensuite quitter la moelle osseuse pour atteindre le compartiment sanguin. Il aura alors deux destinées distinctes, circuler dans le sang ou gagner un tissu (colon, rate, foie, etc...) et se transformer en macrophage (ou histiocyte) ou en cellule dendritique (26).

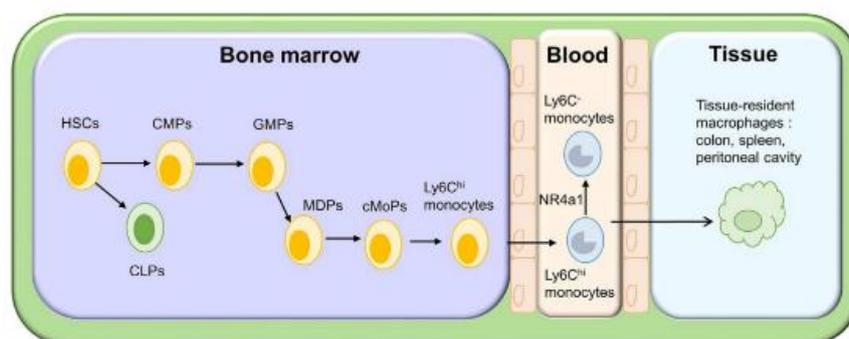


Figure 3 : Origine et développement des monocytes chez l'adulte.

Les monocytes sont des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative. Ils ont comme particularités de pouvoir phagocyter les débris cellulaires ainsi que certains agents pathogènes grâce à leurs récepteurs, les PRR (Pattern Recognition Receptor). Ils font partie de la famille des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : ce qui leur permet de présenter certains épitopes d'agents pathogènes phagocytés aux cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T CD4+ et CD8+) dans le but de déclencher une réaction immunitaire. Les monocytes ont également une importante fonction de sécrétion de cytokines. Enfin, c'est une cellule qui peut rapidement migrer dans les tissus en réponse à des agents chimiotactiques (26).

Les premières caractérisations des monocytes ont mis en évidence deux populations distinctes. Elles ont été isolées par centrifugation puis élutriation, chez des donneurs de sang sains. La population majoritaire est composée de monocytes de grande taille, avec des activités myéloperoxydase (MPO) et phosphatase acide plus importantes. Elle est aussi caractérisée par une fonction de phagocytose plus importante. La seconde population, minoritaire et de petite taille, a une fonction de sécrétion de cytokines, essentiellement après stimulation, et serait préférentiellement mobilisée à partir du réservoir extracellulaire (27,28).

Depuis, la cytométrie en flux a permis de caractériser les sous-populations de monocytes au plan immunophénotypique, les simples critères morphologiques étant peu spécifiques. Ils expriment ainsi les marqueurs de surface suivants (29) :

- CD45 : antigène panleucocytaire
- CD13, CD33, CD11b : marqueurs myéloïdes
- CD16, CD32 et CD64 : récepteurs pour la fraction Fc des IgG (RFc γ)
- Récepteurs du complément
- CD14 : récepteur du lipopolysaccharide (LPS) qui possède une ancre GPI.
- Autres : HLA-DR, CD15, CD16, CD38, CD163, etc...

C'est d'abord l'expression du CD14 qui a permis de définir les monocytes. Dans un second temps, ceux-ci ont été différenciés en trois sous-populations, selon leur expression du CD16 (30).

Les monocytes « classiques » (MO1) expriment le CD14 mais pas le CD16 (CD14⁺/CD16⁻). Morphologiquement, ils correspondent aux grands monocytes décrits précédemment.

Les monocytes « intermédiaires » (MO2) expriment à la fois le CD14 et le CD16 (CD14⁺/CD16⁺).

Les monocytes « non-classiques » (MO3) expriment le CD16 et faiblement le CD14 (CD14^{low}/CD16⁺). Ils correspondent aux petits monocytes.

Les marqueurs membranaires associés, les différentes cytokines qu'ils sécrètent ainsi que leur fonction sont résumés dans la figure 4.

Monocyte subtypes	Species	Phenotypes	Secretion of cytokines	Functions
Classical monocyte	Human	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CCR2 ⁺	TNF- α , IL-6, IL-1 β , INOS, ROS, MMPs, Cathepsin	Inflammation, phagocytosis, scavenging
	Mouse	Ly6C ^{high} /CD43 ⁺ CX3CR1 ^{low}		
Intermediate monocyte	Human	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CCR2 ⁺	Lower cytokines production compared with other subtypes	Phagocytosis, angiogenesis, anti-inflammation, wound healing, fibrosis
	Mouse	Ly6C ^{high} /CD43 ^{high}		
Nonclassical monocyte	Human	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CCR2 ⁺	IL-10, TGF β , VEGF	Anti-inflammation, tissue repair, collagen deposition, patrolling
	Mouse	Ly6C ^{low} /CD43 ^{high} /CX3CR1 ^{high}		

Figure 4 : Caractérisations des différentes sous-populations monocytaires chez l'Homme et la souris.

Chez l'adulte sain, les monocytes représentent 5 à 10% des éléments de la formule leucocytaire, ce qui correspond en valeur absolue à 0,2-1,0 G/L.

Les monocytes sont les plus grandes cellules du compartiment sanguin, avec un diamètre de 20 à 25 μ m. Ils ont une forme arrondie ou quadrangulaire. Leur noyau a une forme allongée, réniforme ou cérébriforme et des contours irréguliers. La chromatine est de couleur violacée, plus fine que celle du polynucléaire neutrophile et sans nucléole visible. Leur cytoplasme est de couleur grise. On peut y voir quelques granulations azurophiles très fines, difficiles à individualiser. L'aspect ressemble à de la « fine poussière de granulations ». On peut parfois observer des vacuoles cytoplasmiques.

1.5.5.2. Situations physiologiques

En dehors de toutes pathologies, et comme décrit précédemment, on retrouve trois populations de monocytes définies par cytométrie en flux (28) :

-les monocytes « classiques » CD14⁺/CD16⁻ (ou MO1). Ils représentent environ 85% des monocytes. Ils ont d'importantes fonctions de phagocytose et montrent un haut niveau de sécrétion de cytokines. Ils expriment fortement CCR2 (récepteur de chimiokines) et faiblement CX3CR1.

-Les monocytes « intermédiaires » CD14⁺/CD16⁺ (ou MO2). Ils représentent environ 5% des monocytes. Ils expriment faiblement le CCR2 et fortement le CX3CR1. Ils présentent des capacités de migration et de présentation de l'antigène plus importantes que les autres sous-populations.

-Les monocytes « non classiques » CD14^{low}/CD16⁺ (ou MO3). Ils représentent environ 10% des monocytes. Ils participent activement au processus inflammatoire avec comme principale fonction la sécrétion de cytokines. Ils expriment fortement le CX3CR1.

Ces 3 populations sont observables par cytométrie en flux (figure 5).

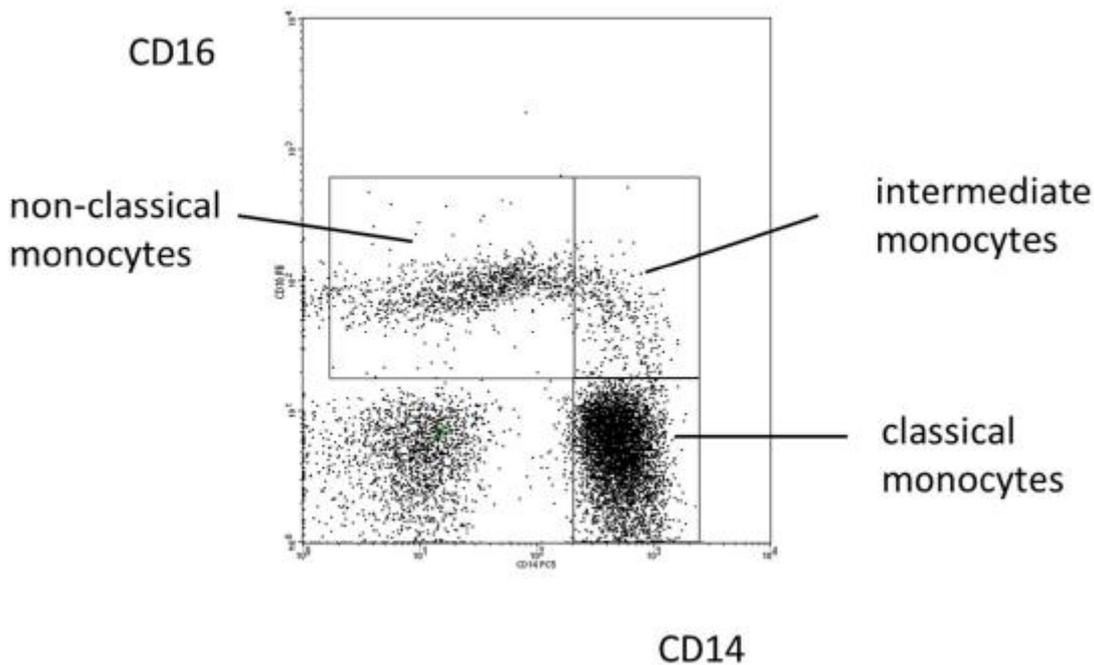


Figure 5 : Répartition des trois sous-populations de monocytes chez un individu sain (31).

Une étude menée par Wong *et al* en 2011 a tenté de définir plus précisément les marqueurs membranaires présents à la surface des différentes sous-population de monocytes obtenues à partir de donneurs sains. Tout d'abord, ils ont défini les 50 gènes les plus exprimés par les monocytes classiques, intermédiaires et non classiques. Ils ont ensuite déterminé les marqueurs membranaires correspondants. Enfin, ils ont analysé par cytométrie en flux l'expression de ces différents marqueurs par chacune des sous-populations étudiées. Les monocytes intermédiaires et non classiques étant très proche, il n'a pas été retrouvé de marqueurs spécifiques permettant de différencier ces 2 sous-populations. (32).

Dans leur étude, Wong *et al* montrent que les monocytes intermédiaires expriment de nombreux gènes et marqueurs de surface à un niveau « intermédiaire », entre les monocytes classiques et non classiques. Ce résultat conforte leur hypothèse selon laquelle les monocytes intermédiaires semblent être un état de transition entre les monocytes classiques et non classiques. Chaque sous-population appartiendrait donc à la même lignée mais à différents stades de différenciation (32). La liste des gènes les plus exprimés par les monocytes ainsi que les différents marqueurs correspondants est disponible en annexe 5

Selon l'état physiologique d'un patient, l'une ou l'autre des sous-populations pourrait être augmentée ou diminuée.

1.5.5.3. Situations réactionnelles

De nombreuses situations sont susceptibles d'engendrer une monocytose supérieure à 1 G/L. Cette monocytose est le plus souvent transitoire et liée à la pathologie sous-jacente. Plusieurs études ont été menées afin d'observer l'évolution des différentes sous-populations de monocytes chez des patients souffrant de pathologies inflammatoires chroniques. Parmi les pathologies entraînant une monocytose réactionnelle, on peut citer les états septiques (infections, bactériémie, etc, ...) qui sont le plus souvent associée à une neutrophilie, les

pathologies auto-immunes (Lupus Erythémateux Disséminé, Polyarthrite rhumatoïde, connectivites, etc...), les cancers (solides, lymphomes, etc...), les pathologies cardiovasculaires, la régénération en sortie d'aplasie ou encore les hépatopathies chroniques.

I.5.5.3.1. Contextes infectieux

La cytométrie en flux a été utilisée pour étudier l'évolution des sous-populations monocytaires au cours de sepsis ou d'infection localisée par exemple. Elle a aussi permis de mettre en évidence certaines propriétés de ces cellules.

En effet, au cours de sepsis sévères, on observe une augmentation des monocytes classiques et intermédiaires circulants, qui a lieu le plus souvent juste après la fièvre et l'orage cytokinique. Ce phénomène est d'ailleurs probablement responsable de la mobilisation de ces cellules. Les monocytes non classiques sont augmentés en cas de SHU (Syndrome hémolytique et urémique) ou de tuberculose par exemple. Ils ont des propriétés pro-inflammatoires. Ils sécrètent de grandes quantités de TNF- α et peu d'IL10. De plus, ils ont des capacités de présentation de l'antigène bien supérieures aux sous-populations monocytaires classiques et intermédiaires. puisqu'ils expriment fortement les molécules du HLA-DR et ont des capacités de migration et de transformation en CPA accrues (33,34). Les monocytes intermédiaires eux, ont montrés des capacités de phagocytose plus importantes, notamment vis-à-vis des hématies infectées par des trophozoïtes de *P.falciparum* (35).

I.5.5.3.2. Pathologies auto-immunes

La répartition des sous-populations de monocytes a été étudiée au cours de nombreuses pathologies auto-immunes.

Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, on observe une augmentation des monocytes « non classiques » CD14^{low}/CD16⁺ par rapport aux patients sains. Cette élévation est corrélée aux scores d'érosion US7 et DAS28 qui permettent d'évaluer la progression de la maladie. Une diminution de cette population est observée en cas de traitement par glucocorticoïdes. De la même manière, un traitement par méthotrexate engendrera une diminution du nombre de monocytes « non classiques » qui suivra la même cinétique que l'atténuation des symptômes (36,37).

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, on observe là aussi une augmentation des monocytes « non classiques ». Ils sont associés à une activité pro-inflammatoire. En cas de rémission, lorsque la maladie est asymptomatique, leur taux diminue et retourne à des valeurs équivalentes à celles des patients sains. Leur augmentation est de nouveau observée lorsque la maladie redevient symptomatique. Il semblerait que, dans ces deux pathologies, le taux de monocytes « non classiques » puisse être utilisé comme marqueur d'activité de la maladie (38).

Chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES), les monocytes « non classiques » et « intermédiaires » sont en nombre diminués. Leur capacité de phagocytose ainsi que leur expression du HLA-DR sont très diminuées. Ils ont pour fonction de réguler l'expansion des lymphocytes T en limitant la propagation de clones auto-réactifs activés en réponse à des antigènes du soi (39). Il semblerait donc que leur diminution soit en rapport avec les symptômes observés dans la maladie.

I.5.5.3.3. Cancers et néoplasies

La proportion de monocytes « intermédiaires » est augmentée dans de nombreuses pathologies cancéreuses.

Ce phénomène a été mis en évidence dans les carcinomes épidermoïdes oraux, avec un taux significativement plus élevé que chez les sujets sains. De la même manière, une diminution des monocytes « classiques » est observée chez les patients malades (40).

Dans les cas de cancers du sein, les monocytes « non classiques » sont là aussi augmentés. Leur taux est d'autant plus important que le stade du cancer est précoce. L'augmentation est en effet plus modérée chez les patients ayant une tumeur de taille importante ou un cancer plus évolué (métastases) (41).

Concernant les cancers liquides, les monocytes « intermédiaires » voient aussi leur nombre augmenter chez les patients atteints de leucémie aiguë, comparativement aux patients sains et à ceux en rémissions (42).

Ces différentes observations semblent montrer un lien entre les monocytes, notamment les monocytes « non classiques » et les pathologies cancéreuses.

I.5.5.3.4. Pathologies cardiovasculaires

L'étude des populations monocytaires a aussi été réalisée chez des patients souffrant de diverses pathologies cardio-vasculaires. Une augmentation des monocytes « non classiques » a été mise en évidence en cas de fibrillation auriculaire ainsi que lors de sténose aortique sévère (43).

Le taux de monocytes « intermédiaires » est un facteur pronostique de la présence d'une plaque d'athérome extensive au niveau coronaire. Ce taux est significativement plus élevé que chez les patients sains. L'immunophénotypage monocyttaire pourrait éventuellement être intéressant car il s'agit d'un acte moins invasif qu'une angiographie ou une coronarographie (44,45).

Enfin chez les femmes enceintes atteintes de pré-éclampsie, il y a une augmentation des monocytes « non classiques » et « intermédiaires ». Ce taux est corrélé à la sévérité des signes cliniques. De la même manière que le taux d'acide urique urinaire, le pourcentage de monocytes « non classiques » pourraient être un marqueur pronostique de l'apparition de la pré-éclampsie chez les femmes enceintes (46).

I.5.5.4. Cas de la LMMC

En 2015, l'équipe de Selimoglu *et al* a comparé la répartition des sous-populations de monocytes chez les patients atteints de LMMC. Il en ressort que la fraction des monocytes « classiques » CD14⁺/CD16⁻ est augmentée, aux dépens des monocytes « intermédiaires » et « non classiques ». Cette augmentation n'est pas dépendante du compte absolu des monocytes circulants. Leur but a été d'établir un seuil décisionnel à partir d'une analyse de courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). Un taux de monocytes « classiques » supérieur à 94% est dans cette étude en faveur d'un diagnostic de LMMC. Ce pourcentage est associé à une spécificité de 94.5% et une sensibilité de 91.7%. D'autre part, chez les patients traités par agents hypométhylants, on observe une diminution de ces monocytes « classiques » parallèlement à la diminution du compte absolu de monocyte.

Afin de déterminer si la cytométrie en flux pouvait être utilisée comme examen de première intention, les auteurs ont ensuite comparés le critère OMS « compte absolu de monocytes supérieur à 1 G/L » et « pourcentage de monocytes classiques supérieur à 94% ». Ils ont observé une spécificité équivalente pour ces deux critères (94.1% et 95.3% respectivement), mais une sensibilité supérieure pour la cytométrie en flux (95.3% contre 62%). En effet, de nombreux patients sont diagnostiqués SMD avec monocytose fluctuante (aux alentours des 1 G/L) mais seraient en réalité d'authentique cas de LMMC.

D'après cette étude, il semble donc que le pourcentage de monocytes « classiques » obtenu par cytométrie en flux peut être un marqueur diagnostique de la LMMC. Il semble aussi être un marqueur de suivi des patients traités par agents hypométhylants. Sa probable supériorité par rapport au compte absolu des monocytes permettrait de diagnostiquer plus rapidement les patients en s'affranchissant du délai de 3 mois, nécessaire pour qualifier la chronicité de la monocytose (3).

Une étude plus récente (47) confirme ces résultats après utilisation néanmoins d'une valeur seuil différente (95% pour les monocytes « classiques »). Cette étude donne également une piste pour distinguer les monocytoses réactionnelles de la LMMC. Il semblerait en effet qu'en cas de monocytose réactionnelle, la fraction des monocytes « intermédiaires » soit augmentée (>2%) alors qu'elle reste inférieure à 2% dans les cas de LMMC. Enfin, un retour à la normale du taux de monocytes « classiques » est bien observé chez les patients répondeurs aux traitements par agents hypométhylants.

Enfin, une très récente étude d'Hudson *et al* (48) montre qu'en utilisant le seuil de monocytes « classiques » défini par Selimoglu *et al* en pratique clinique, les performances sont moins bonnes que décrites dans l'article: sensibilité de 77% et spécificité de 94%. D'autre part, cette étude montre aussi que la quantification des monocytes « non classiques » peut être un marqueur diagnostique plus performant pour séparer les patients LMMC des patients non-LMMC. Avec un seuil fixé à 1,13%, la sensibilité atteint 100% pour une spécificité de 96%.

Ces différents résultats confirment la valeur mais aussi les limites de la seule utilisation du CD14 et du CD16 pour différencier un patient avec une monocytose réactionnelle d'un patient atteint de LMMC.

Harrington *et al* ont tenté en 2016 de mettre en évidence l'expression de marqueurs aberrants sur les monocytes de patients atteints de LMMC (49). Leur étude a été menée à partir d'échantillons de moelle osseuse et non de sang périphérique. Pour ce faire, ils ont utilisé 11 marqueurs (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD38, CD45, CD56, CD64, et HLA-DR) et ont décrit leur expression à la surface des différentes sous-populations monocytaires

Dans cette étude, La seule différence entre le groupe LMMC et le groupe contrôle est une diminution de l'expression du CD14 et du CD15. Parmi les marqueurs testés, aucun ne permet de différencier les sous-groupes LMMC 0, LMMC 1 ou LMMC 2. De même, aucun marqueur ne permet de distinguer les formes myélodysplasiques et myéloprolifératives.

Il semble que les monocytes réactionnels, ou ceux de la LMMC, montrent une importante hétérogénéité en ce qui concerne l'expression de marqueurs de surface (49).

Le seuil de 94% de monocytes « classiques » pour diagnostiquer une LMMC est donc très intéressant pour une pathologie pour laquelle il n'existe pas d'examen idéal, mais semble

cependant dépendre du contexte ou de la population contrôle. L'utilisation d'un panel de marqueurs (restant à définir) est une piste qui reste largement à explorer et pourrait être une solution pour améliorer les performances de la cytométrie en flux dans le diagnostic de la LMMC (comme dans d'autres hémopathies comme les lymphomes, le myélome ou les leucémies aiguës lymphoblastiques).

I.6. Prise en charge

Comme nous avons pu le voir précédemment, confirmer le diagnostic de LMMC n'est pas simple et nécessite de réaliser de nombreux examens. Un certain nombre d'entre eux ne sont pas effectués en routine et demandent du temps afin d'être menés à bien. Néanmoins, ces examens restent indispensables afin de pouvoir estimer différents paramètres (médiane de survie, risque de transformation en LAM à court ou moyen terme...) permettant d'adapter la prise en charge à chaque patient.

Les objectifs ne sont pas spécifiques de la LMMC et ont en général pour but de :

- corriger les cytopénies, ou réduire leurs conséquences.
- retarder la transformation en LAM.
- prolonger la survie.
- améliorer la qualité de vie.

Afin d'évaluer au mieux les moyens à mettre en place pour chaque patient, il est indispensable de calculer leur score pronostique, en tenant compte de différents paramètres.

I.6.1. Pronostic

Différents scores pronostiques sont à disposition. Il n'existe pas de consensus concernant leur utilisation, contrairement aux SMD. Le score IPSS (International Prognosis Scoring System), utilisé pour ces derniers, ne semble pas adapté, notamment à cause de la variante myéloproliférative de la LMMC. D'autres scores ont donc été créés, notamment le score CPSS (CMML-specific Prognosis Scoring System).

Ce dernier a été élaboré en 2013 par Such *et al* et prend en compte 4 paramètres, auxquels sont associés différentes valeurs (Tableau 3).

La classification OMS tient compte du nombre de blastes médullaires et sanguins, comme déjà vu précédemment (Tableau 1).

La classification FAB tient uniquement compte du nombre de leucocytes circulants, à savoir :

- LMMC-MD si leucocytose < 13 G/L
- LMMC-MP si leucocytose > 13G/L.

La valeur pronostique des caryotypes est classée de la manière suivante :

- favorable : normal, délétion du Y
- défavorable : trisomie 8, anomalies du 7, caryotype complexe (>3 anomalies)
- intermédiaire : autres anomalies

La dépendance à la transfusion est définie par la nécessité d'une transfusion toutes les 8 semaines, sur au moins 4 mois.

Tableau 3 : Variables et scores associés d'après Such *et al* (6).

Paramètres	Points		
	0	1	2
Classification OMS 2008	LMMC-1	LMMC-2	-
Classification FAB	LMMC-MD	LMMC-MP	-
Caryotype	Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Dépendance transfusionnelle	Non	Oui	-

La combinaison de ces 4 paramètres permet d'obtenir un score compris entre 0 et 5. Ce qui permet ensuite de classer les patients en 4 groupes de risque (Tableau 4).

Tableau 4 : Groupes de risque associés au score CPSS ; probabilité de transformation en LAM à 2 ans et médiane de survie, d'après Such *et al* (8).

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

Malgré sa supériorité en termes d'estimation de la survie globale et d'évaluation de la transformation en LAM, le score CPSS n'est pas le plus utilisé en pratique courante. En effet, les scores IPPS et IPPS-R (révisé) demeurent indispensables bien qu'ils ne soient pas spécifiques de la LMMC. Ils permettent d'élaborer l'approche thérapeutique, notamment dans le cadre d'essais cliniques, où l'AMM de nombreux médicaments reste basée sur ces scores.

Le score IPSS-R tient compte de 5 variables qui sont :

- le pourcentage de blastes médullaires
- l'hémoglobine
- le taux de plaquettes
- le taux de polynucléaires neutrophiles
- le caryotype

La prise en compte du caryotype est la nouveauté apportée par l'IPSS-R par rapport à l'IPSS classique. Ce dernier est considéré de la manière suivante :

-très favorable : -Y, del(11q).

-favorable : normal, del(5q), del(12p), 2 anomalies dont del(5q).

-intermédiaire : del(7q), trisomie 8, trisomie 19, autres anomalies.

-défavorable : monosomie 7, inv(3)/t(3q)/del(3q), 2 anomalies dont -7 ou del(7q), 3 anomalies.

-très défavorable : plus de 3 anomalies.

En tenant compte de ces différentes variables, on calcule ensuite un score IPSS-R selon le tableau 5. Ce score s'étend de 0 à 10. Il doit ensuite être associé à l'âge du patient (Figure 6) pour permettre de le classer dans le groupe de risque correspondant.

Tableau 5 : Système de calcul du score IPSS-R (23).

Variable \ Points	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Caryotype	Très favorable	-	Favorable	-	Intermédiaire	Défavorable	Très défavorable
Pourcentage de blastes médullaire	≤ 2	-	3-4	5-10	5-10	> 10	-
Hémoglobine	≥ 10	-	8-10	< 8		-	-
Plaquettes	≥ 100	50-100	< 50	-	-	-	-
PNN	≥ 0.8	< 0.8	-	-	-	-	-

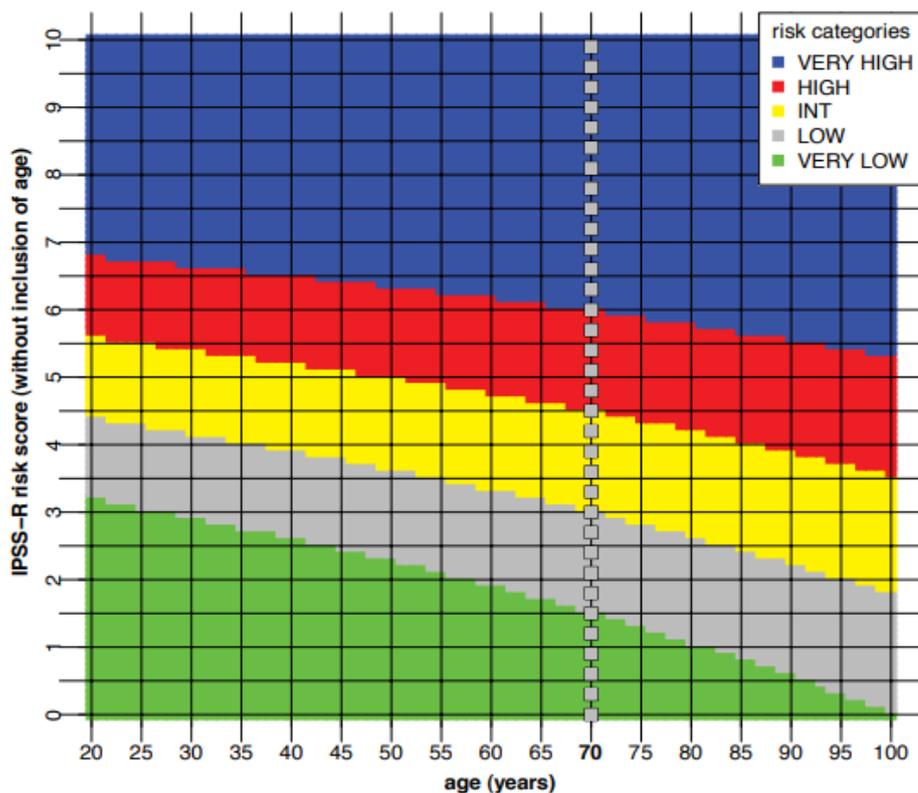


Figure 6 : Groupes de risque en fonction de l'âge du patient et du score IPSS-R (50).

La classification IPSS-R est indispensable car elle permet d'ajuster au mieux le traitement du patient. En effet, selon leur groupe de risque, tous ne recevront pas nécessairement un traitement, une simple surveillance ou un traitement symptomatique sera parfois mis en place.

I.6.2. Traitement

A l'heure actuelle le seul traitement curatif existant pour la LMMC est la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Elle est cependant réservée à peu de patients, du fait des nombreux critères à respecter. Les autres traitements, essentiellement médicamenteux, n'ont pour but que de retarder l'évolution de la maladie, notamment la transformation en LAM.

Classiquement on distinguera deux grands groupes de patients, ceux ayant un score CPSS faible ou intermédiaire 1, qui seront classés en « faible risque » et ceux ayant un score intermédiaire 2 ou élevé, qui seront classés en « haut risque ». De manière générale, chez les patients à faible risque, le but sera essentiellement de corriger les effets des cytopénies. Chez les patients à risque élevé, l'objectif sera de ralentir la progression globale et l'évolution de la maladie, à l'aide de traitements cytotoxiques le plus souvent.

I.6.2.1. Traitement symptomatique

Ces traitements concernent essentiellement les patients de faible risque. Leur prise en charge sera sensiblement identique à celle mise en place pour ceux atteints de SMD. En effet le risque de transformation en LAM étant faible, l'objectif principal est de corriger les

effets des différentes cytopénies, en particulier l'anémie retrouvée chez environ 80% des patients. Ces soins de support, non toxiques, pourront aussi être utilisés chez les patients à haut risque, d'autant plus que les chimiothérapies cytotoxiques vont accentuer les cytopénies.

I.6.2.1.1. Traitement de l'anémie

Il s'agit le plus souvent d'un programme de transfusion de culots globulaires. Il est recommandé par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) de réaliser des transfusions pour des taux d'hémoglobine inférieurs à 8g/dL, ou à un seuil plus élevé, en cas de comorbidités ou de retentissement clinique. Ces transfusions répétées ne sont pas sans conséquences. De nombreux effets indésirables peuvent être observés : une surcharge en fer, un risque infectieux (faible mais non nul), un risque d'hémolyse, un risque d'allo-immunisation et enfin un risque de surcharge volémique (notamment chez les personnes âgées) (9). Afin d'éviter l'apparition de ces différents effets indésirables, le recours à des Agents Stimulants de l'Erythropoïèse (ASE) est de plus en plus fréquents. L'EPO (Érythropoïétine) ainsi qu'un de ses dérivés synthétiques, la darbépoétine alpha, qui possède une action plus prolongée, n'ont pas d'AMM pour les SMD en Europe, mais en France, ils font l'objet d'une recommandation d'utilisation par la HAS (utilisation hors AMM) (51).

I.6.2.1.2. Traitement de la thrombopénie

On retrouve une thrombopénie chez environ 20% des patients au moment du diagnostic. En plus de la diminution de la numération plaquettaire, dans la LMMC comme dans les SMD, on peut observer une thrombopathie associée, conséquence de la dysmyélopoïèse. Le traitement par androgènes (danazol ou DANATROL®) permet d'améliorer la thrombopénie chez environ 30% des patients. D'autres traitements comme le ROMIPLOSTIM® ou l'eltrombopag sont en cours d'essais. Le ROMIPLOSTIM® est un peptidomimétique qui active le récepteur de la thrombopoïétine. Il a montré un taux de réponse d'environ 55% mais semble augmenter le pourcentage de blastes médullaires chez environ 15% des patients (9). Ces nouvelles molécules n'ont actuellement pas d'AMM en France dans le cadre des SMD ou de la LMMC.

I.6.2.1.3. Traitement de la neutropénie

Les facteurs de croissance granulocytaire (G-CSF) n'ont pas d'AMM en France pour le traitement au long cours de la neutropénie dans les SMD. Même si cela n'est pas démontré, ils pourraient induire une augmentation de la blastose médullaire. Cependant le G-CSF peut être utilisé dans quelques cas ciblés, comme un épisode infectieux grave chez un patient très neutropénique d'un groupe de risque faible, ou dans le cas d'un patient d'un groupe de haut risque traité par azacytidine. Le plus souvent, une antibiothérapie prophylactique à large spectre sera mise en place lors d'apparition de signes infectieux chez un patient neutropénique (9).

I.6.2.2. Traitement spécifique

En dehors des soins de support décrit précédemment, des traitements spécifiques visant à retarder la progression de la maladie sont à disposition des cliniciens.

A l'heure actuelle, deux principaux agents hypométhylants sont utilisés dans le traitement de la LMMC : la 5-azacytidine et la decitabine. L'azacytidine est un analogue de la pyrimidine dont le mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé. Elle possède l'AMM en France pour être utilisée dans le cas de LMMC dont le taux de blastes médullaires est compris entre 10 et 29%, sans syndromes myéloprolifératifs, en pratique, lorsque le taux de leucocytes est inférieur à 13G/L. L'azacytidine exerce ses effets antinéoplasiques par divers mécanismes, notamment une cytotoxicité directe à l'encontre des cellules anormales de la moelle osseuse, ainsi qu'une hypométhylation de l'ADN. Son incorporation dans l'ADN entraîne une inactivation des ADN méthyltransférases. Il en résulte alors une hypométhylation de l'ADN, notamment des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, dans la différenciation cellulaire et dans les voies de l'apoptose. En conséquence, on observerait une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et une restauration de leur fonction (52). D'après différentes études, le taux de réponse globale (réponse complète, réponse partielle et réponse hématologique) est compris entre 25 et 70%, avec une médiane de survie de 12 à 37 mois (2). Le schéma d'administration est d'une injection par voie sous cutanée de 75mg/m²/j pendant un cycle de 7 jours, suivi d'une période de repos de 21 jours, pour un cycle total de 28 jours. L'azacytidine agit lentement, les réponses n'étant observées qu'au bout de 3 à 4 cycles. On respectera donc un minimum de 6 cycles avant de conclure à un échec, sauf progression franche ou transformation en LAM. Il est recommandé de traiter les répondeurs jusqu'à réévolution. Les principaux effets indésirables sont ceux liés aux cytopénies (anémie, saignements, infections) et ils pourront entraîner un décalage des cycles ou une diminution des doses administrées (9).

La décitabine, un autre agent hypométhylant, n'a pas l'AMM en Europe pour le traitement des SMD. Elle n'a pas démontré d'avantages significatifs en termes de survie contre des traitements symptomatiques.

Des essais sont en cours pour tester de nouvelles molécules, seules ou en association avec les agents hypométhylants. Parmi celles-ci, on peut citer les inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) comme le panobinostat, le vorinostat ou l'entinostat. Elles entraîneraient un arrêt du cycle cellulaire en G1/S ou G2 et activeraient les voies d'apoptoses. On peut également citer les inhibiteurs des farnésyl-transférases, qui ciblent la voie de signalisation RAS, comme le tipifarnib ou du lonafarnib et certains immunomodulateurs comme le lenalidomide.

Si des signes de myéloprolifération sont observés, le traitement de référence reste l'hydroxyurée (ou hydroxycarbamide, HYDREA®). Son action myélosuppressive est rapide, même si le mécanisme est peu connu. Elle entraîne d'abord une inhibition de la granulopoïèse, puis de la thrombocytopoïèse et en dernier lieu de l'érythropoïèse. Ces effets sont rapidement réversibles à l'arrêt du traitement, ce qui impose dans la plupart des cas un traitement d'entretien continu, déterminé par l'évolution de l'hémogramme (52). Son principal intérêt est de réduire rapidement la leucocytose et éventuellement la splénomégalie.

La chimiothérapie intensive a vu son champ de prescription se restreindre, notamment pour les formes à blastose médullaire élevée (>10%) à caryotype non défavorable et survenant chez les sujets jeunes (moins de 60-65 ans), en particulier lorsque le but est de réduire rapidement la blastose avant une allogreffe. L'utilisation de molécules comme les inhibiteurs de topo-isomérases, les anthracyclines ou la cytarabine est donc en nette diminution au profit de l'azacytidine.

I.6.2.3. Traitement curatif

A l'heure actuelle, pour la LMMC comme pour les SMD, le seul traitement curatif existant est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Elle est réservée aux patients jeunes (moins de 65 ans), de mauvais pronostic, avec un risque élevé d'évolution en LAM et si possible, peu ou pas de comorbidités. Peu de patients sont donc éligibles dans le cadre de la LMMC, du fait de l'âge avancé (médiane de 70 ans) auquel la maladie apparaît ainsi que des comorbidités associées. Il s'agit d'une procédure à risque, notamment en raison de la myéloablation qui précède la greffe. Deux études ont retrouvé un taux de survie globale entre 3 et 10 ans de 40% et 42% respectivement avec un taux de réponse qui varie de 17 à 50% et un taux de mortalité liée à la greffe variant de 12 à 52% (53), (54). Le rapport bénéfice-risque est donc discuté pour chaque patient en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Afin de prendre en charge tous les patients de manière uniforme, en fonction de leur pronostic, des algorithmes décisionnels ont été élaborés par différentes équipes. Basés sur le score CPSS, une étude suisse menée par Hafraoui *et al* a permis la mise en place d'un de ces algorithmes en 2013 (55) (Annexe 1). L'année d'après, ils étaient rejoint par Patnaik *et al* qui proposait leur algorithme dans le British Journal of Haematology (2) (Annexe 1).

Enfin, pour évaluer l'efficacité des traitements, il reste indispensable de se fixer des critères de réponse objectifs. Les critères datant de 2006, émis par l'International Working Group, ne sont pas spécifiquement adaptés à la LMMC, mais plus aux SMD. Une étude internationale, menée en 2015, a proposé des critères de réponse aux traitements adaptés aux syndromes myéloprolifératifs/myéلودysplasiques (56) (Annexe 2).

II. Matériel et méthode

II.1. Objectifs

L'objectif principal de cette étude est d'établir une méthode de diagnostic de la LMMC par cytométrie en flux. Dans ce but, nous avons procédé par étapes.

Le premier objectif est de vérifier les seuils décisionnels pour les différentes sous-populations monocytaires tels que déjà publiés.

Le second objectif est d'étudier la distribution de marqueurs membranaires à la surface des différentes sous-populations monocytaires afin de mettre en évidence des marqueurs phénotypiques de clonalité des monocytes.

Enfin, dans une troisième partie, nous essaierons d'établir un score diagnostique à partir de différents paramètres biologiques.

II.2. Échantillons de patients

Les échantillons sanguins des patients ont été prélevés sur tube EDTA. Les critères d'inclusion des patients dans le groupe LMMC sont ceux de la classification OMS 2016, déjà rappelés précédemment. Les patients présentant une monocytose $< 0,8$ G/L au moment de la réalisation de l'immunophénotypage ont été exclu de l'étude.

II.2.1. Définition des seuils décisionnels

170 patients ont été inclus dans l'étude : 75 cas de LMMC et 95 cas de non-LMMC. Ils ont été inclus d'août 2015 à juin 2018. Leur âge est compris entre 27 et 93 ans pour une moyenne de 69,2 ans.

II.2.2. Étude des nouveaux marqueurs

71 patients ont été inclus dans cette étude : 41 cas de LMMC et 30 cas de non-LMMC. Les patients ont été inclus d'avril 2017 à juin 2018. Leur âge est compris entre 29 et 93 ans, pour une moyenne de 69,8 ans.

II.3. Méthode

II.3.1. Cytométrie en flux multiparamétrique

Le cytomètre utilisé est le NAVIOS® (BECKMAN COULTER®). Un volume de 100µL de sang total EDTA est mis en contact avec un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes (Tableau 7) pendant 30 minutes à l'abri de la lumière puis centrifugé 5 minutes à 1500 tours/minutes. Les globules rouges sont ensuite lysés par ajout de 2 mL de tampon de lyse au culot cellulaire. Ce tampon est obtenu en diluant au 1/10^{ème} la solution BD FACS lysing solution 10X. Ils sont ensuite incubés 10 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante, puis centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minutes. Le culot contenant les cellules nucléées est ensuite mis en contact avec 2 mL de Cell Wash, puis de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions. Enfin les cellules restantes du culot sont mises en suspension dans 250 µL de Cell Wash. L'acquisition a été effectuée sur au moins 40 000 événements. L'analyse des données obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel Kaluza®.

Tableau 6 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés dans le panel 1.

Fluorochrome	Cible	Volume (μL)	Canal
FITC	CD2	10	FL1
PE	CD184	10	FL2
PECF594	CD56	5	FL3
PC7/PECy7	CD16	5	FL5
APC	CD14	2	FL6
AA750	CD24	5	FL8
V450	CD64	5	FL9
BV510	CD45	5	FL10

Tableau 7 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés dans le panel 2.

Fluorochrome	Cible	Volume (μL)	Canal
FITC	CD9	10	FL1
PE	CD99	10	FL2
PECF594	CD56	5	FL3
PerCP 5.5	CD123	10	FL4
PC7/PECy7	CD16	5	FL5
APC	CD14	2	FL6
AA750	CD24	5	FL8
V450	CD36	5	FL9
BV510	CD45	5	FL10

II.3.2. Cytologie

Les numérations et formules sanguines ont été réalisées au CHU de Toulouse sur l'automate XN 2000 de Sysmex®, à partir de prélèvement sur tube EDTA. L'analyse morphologique des frottis sanguins a été réalisée après étalement et coloration au MGG d'une goutte de sang par l'automate SP-10 de Sysmex®. De la même manière, les frottis médullaires ont été obtenus après étalement manuel d'une goutte de moelle osseuse et coloration au MGG.

II.3.3. Stratégie de fenêtrage

II.3.3.1. Expression du CD14 et du CD16 par les monocytes

Les doublets sont d'abord éliminés selon les pratiques usuelles du laboratoire (Figure 7A), puis les monocytes sont ciblés sur le graphe bi-paramétrique CD45⁺/SSC. Ils expriment de manière intermédiaire le CD45 (nuage vert, Figure 7B). De cette population sont exclus les granulocytes et les lymphocytes B exprimant le CD24 (Figure 7C), ainsi que les cellules NK exprimant le CD56 (Figure 7D) et les lymphocytes T exprimant le CD2 (Figure 7E). Le graphe « monocytes + lymphocytes » permet d'établir le contrôle interne du niveau d'expression du CD16. En effet, il existe deux populations de lymphocytes séparées selon leur expression du CD16. La frontière entre ces deux populations permet de déterminer le seuil d'expression du CD16 (Figure 7F). De la même manière, les monocytes exprimant majoritairement le CD14, le nuage de monocytes « classiques » permet d'établir le seuil d'expression du CD14 (Figure 7G). Une fois ces seuils délimités, trois sous-populations de monocytes sont identifiées. Elles sont alors quantifiées en pourcentage de l'ensemble des monocytes. Enfin sur le graphe CD14⁺/CD16⁺, les populations double négatifs sont exclues (Figure 8). Cette procédure de retraitement des données brutes est ensuite répétée pour chacun des patients.

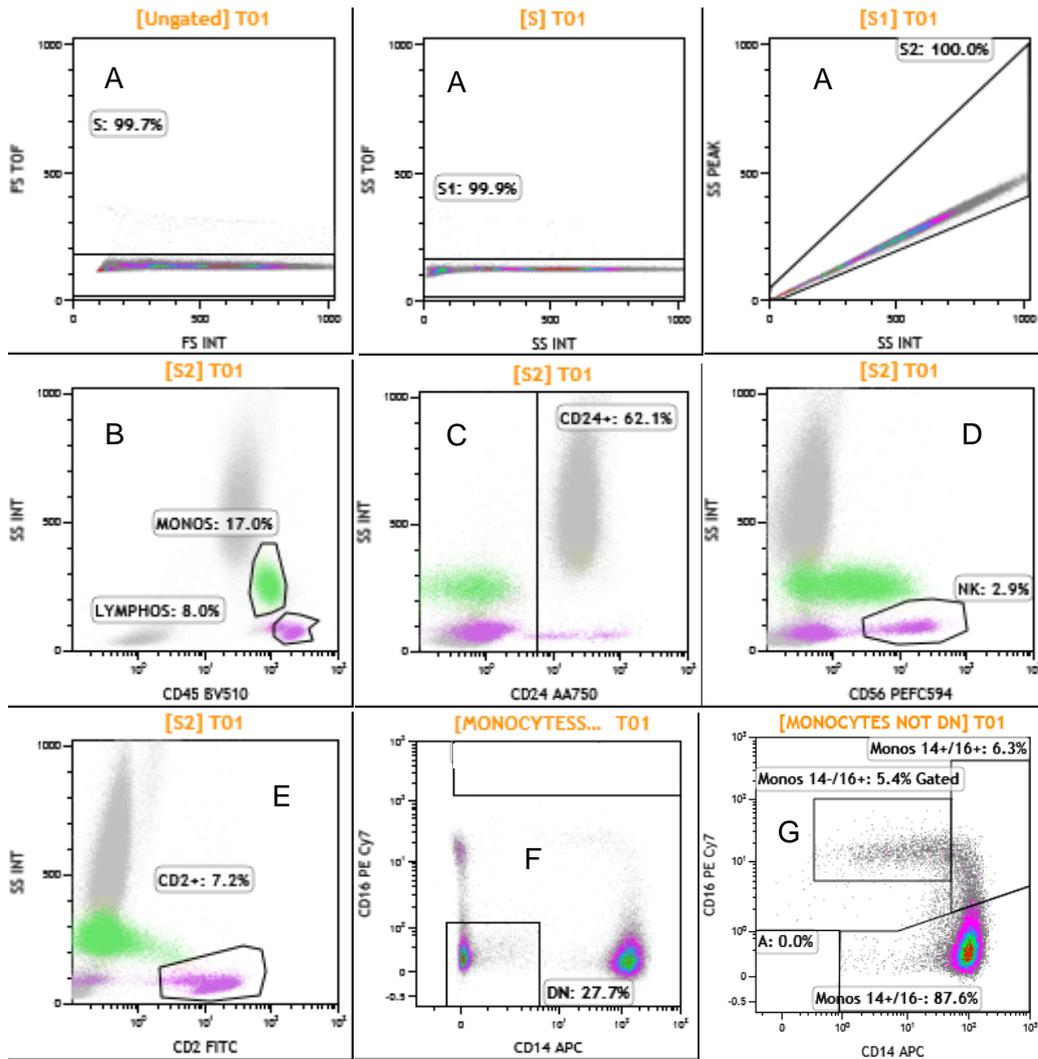


Figure 7 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations de monocytes à partir de sang total. Après avoir éliminé les doublets (A) et à partir du fenêtrage des monocytes (B), sont exclues les cellules exprimant le CD24 (C), le CD56 (D), le CD2 (E), ainsi que les doubles négatifs 14⁻/16⁻ (F et G).

Ci-dessous un exemple de graphe obtenu chez un patient non-LMMC. On y retrouve les trois sous-populations monocytaires.

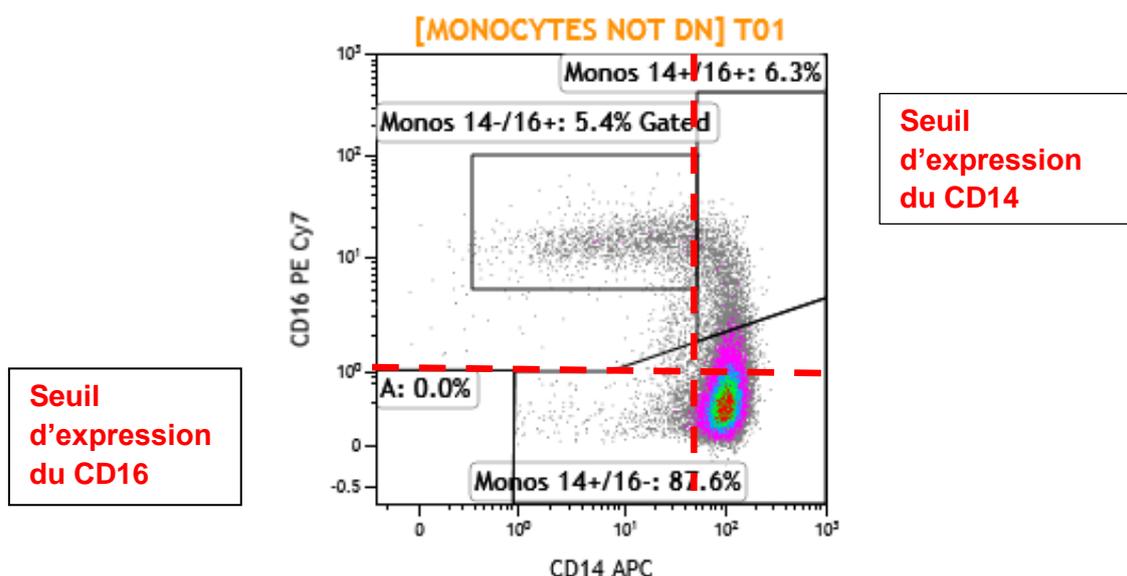


Figure 8 : Graphique représentant les trois sous-populations de monocytes. Expression du CD14 en abscisse et expression du CD16 en ordonnée. Les seuils d'expression sont déterminés par le niveau d'expression du CD16 par les lymphocytes et le niveau d'expression du CD14 par les monocytes « classiques ».

II.3.3.2. Expression des nouveaux marqueurs par les monocytes

Suite aux résultats publiés par Wong *et al* (32), nous avons choisi d'étudier l'expression de certains marqueurs membranaires exprimés par les monocytes de patients sains. Nous avons sélectionné 6 d'entre eux.

Le CD64 est une glycoprotéine membranaire correspondant au Récepteur de haute affinité du fragment Fc des immunoglobulines G. Il est naturellement présent à la surface des monocytes. L'IFN γ ou le G-CSF peuvent induire une expression plus importante de ce marqueur (57).

Le CD184 ou CXCR4 est un récepteur membranaire qui a pour ligand le CXCL12 et le MIF (facteur d'inhibition de migration des macrophages). Il intervient essentiellement dans le cadre de la mobilisation des cellules souches progénitrices de la moelle osseuse vers les tissus périphériques (58).

Le CD9 est une protéine transmembranaire qui fait partie de la famille des tetraspanines. Cette protéine joue un rôle dans l'activation, l'adhésion et la migration cellulaire. Elle est impliquée notamment dans la dissémination métastatique des cancers(59).

Le CD36 ou FAT (Fatty Acid Translocase) ou SCARB3 (SCAvenger Receptor class B member 3) ou GpIV est une protéine transmembranaire qui permet le passage intracellulaire d'acide gras depuis le milieu extérieur. Il est lié à diverses pathologies : diabète, athérosclérose, etc... (60)

Le CD123 correspond à la chaîne alpha du récepteur membranaire à l'interleukine 3. Il est fréquemment retrouvé à la surface de cellules responsables de diverses maladies hématologiques : LAL, LAM, etc... Il serait une cible potentielle pour les nouveaux traitements de ces maladies (61).

Le CD99 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface de nombreux leucocytes, mais plus particulièrement des thymocytes. Elle a pour fonction d'augmenter l'adhésion des cellules lymphocytaires T et d'induire l'apoptose des cellules T double positives. Elle joue un rôle dans le phénomène de migration et de diapédèse des monocytes à travers les jonctions endothéliales (62).

L'expression de ces différents marqueurs a été analysée par cytométrie en flux multiparamétrique à l'aide du logiciel Kaluza[®]. Nous avons choisi de représenter l'expression du CD184 en fonction du CD64 (Figure 9A), celle du CD9 en fonction du CD36 (Figure 9B) et enfin celle du CD123 en fonction de CD99 (Figure 9C), et ce, pour chaque sous-population monocyttaire.

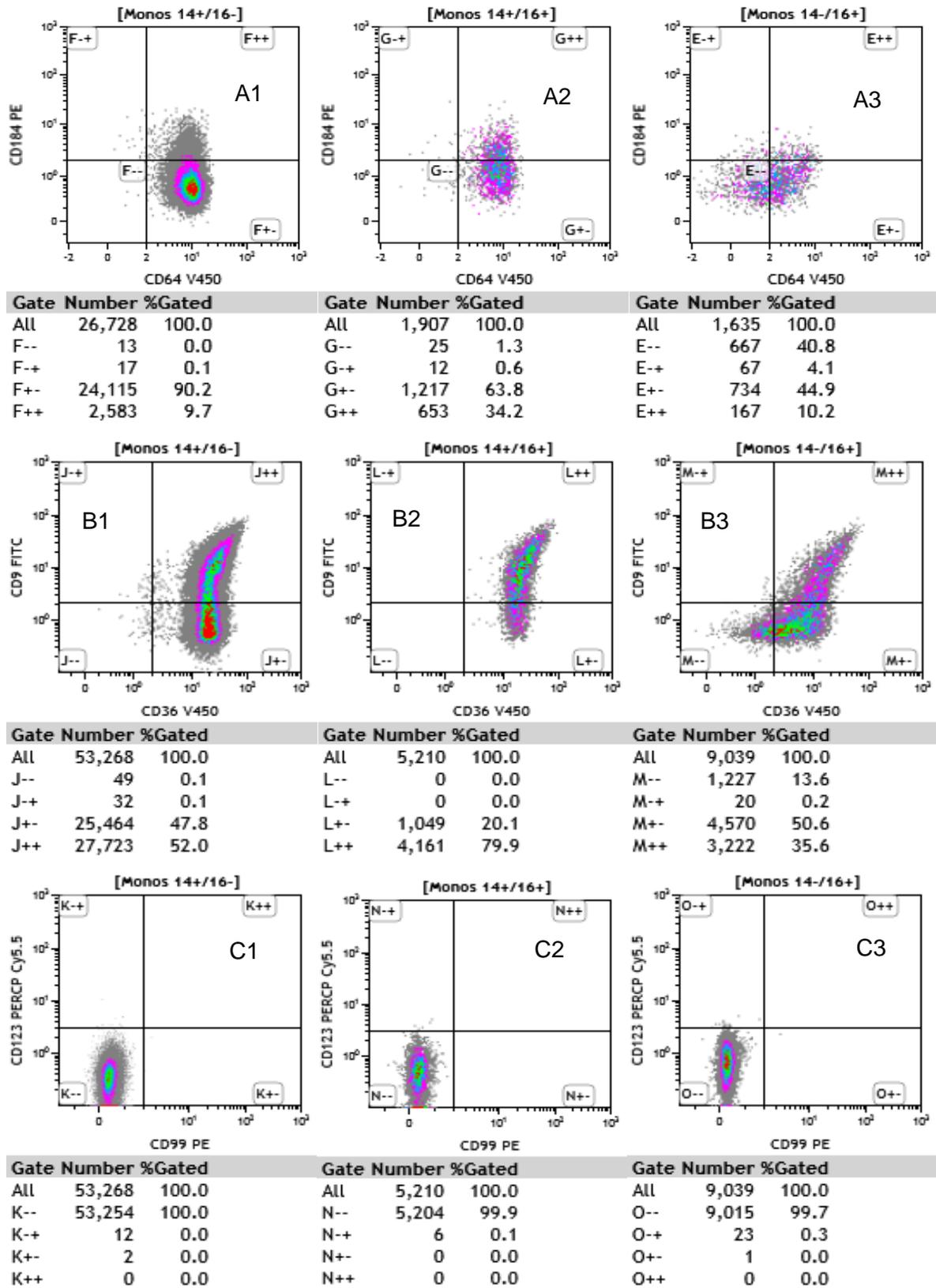


Figure 9 : Graphiques représentant l'expression des nouveaux marqueurs sélectionnés pour chaque sous-population monocytaire. En A, expression du CD64 en abscisse et du CD184 en ordonnée. En B expression du CD36 en abscisse et du CD9 en ordonnée. En C expression du CD99 en abscisse et du CD123 en ordonnée. En 1 la population de monocytes « classiques », en 2 la population de monocytes « intermédiaires » et en 3 la population de monocytes « non classiques ».

II.4. Tests statistiques

Les courbes ROC (*receiver operating characteristic*) ont été construites à l'aide du logiciel Medcalc pour chaque sous-population de monocytes, pour l'ensemble de la cohorte et également pour les deux sous-cohortes : les formes dysplasiques (leucocytose inférieure à 13 G/L) et les formes prolifératives (leucocytose supérieure ou égale à 13 G/L). Le point d'inflexion de ces courbes a permis de définir le seuil de chaque population, correspondant au meilleur compromis statistique entre la valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN). L'AUC (area under the curve) calculée est également spécifiée. Les différents groupes étudiés ont été présentés sous forme de graphe à l'aide du logiciel GraphPad Prism avec les seuils ainsi définis. Sur chaque graphe, les patients faux positifs et faux négatifs sont précisés.

La comparaison des pourcentages d'expression de chaque marqueur par les différentes sous-populations monocytaires a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Les pourcentages d'expression des nouveaux marqueurs par les monocytes « intermédiaires » et « non classiques » a été comparé à celui des monocytes classiques à l'aide d'un test de Student apparié.

III. Résultats

III.1. Définition de nouveaux seuils décisionnels des populations monocytaires

L'utilisation de la cytométrie en flux pour le diagnostic de la LMMC est relativement récente. Elle fait suite à l'étude de Selimoglu *et al* parue en 2015 (3) qui montre qu'un taux de monocytes « classiques » supérieur à 94% est en faveur d'un diagnostic de LMMC. Une étude rétrospective plus récente montre des résultats similaires en utilisant un seuil de 95% de monocytes « classiques » (47). Enfin, une première analyse des résultats obtenus à l'oncopole en 2017 a établi qu'un taux de monocytes « classiques » supérieur à 93.6% est en faveur d'une LMMC. Il a aussi été établi une distinction entre les formes SMP et SMD. Concernant la forme SMP, le seuil de 96% de monocytes « classiques » a été retenu. Le diagnostic de la forme SMD est lui plus performant en utilisant le seuil de 1,64% appliqué aux monocytes « non classiques ».

III.1.1. Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte

Tableau 8 : Principales caractéristiques des sujets inclus dans l'étude.

	LMMC (n=75)	Non-LMMC (n=95)
Age médian en années (min-max)	72 (42-91)	72 (27-93)
Masculin/Féminin	50/25	62/33
Leucocytes en G/L (min-max)	12,51 (3,35-97,44)	12,47 (2,55-718,9)
Leucocytes <13/>13 G/L	50/25	39/56
Hb en g/dL (min-max)	10,9 (5,7-16,9)	10,9 (3,9-17,2)
Taux plaquettaire en G/L (min-max)	158 (9-352)	159,5 (5-1744)
Taux de monocytes en G/L (min-max)	1,9 (0,6-18,2)	1,9 (0,8-104,4)
Taux de monocytes en % (min-max)	15,8 (2-61,8)	15,70 (2-93)
LMMC 0/1/2	37/26/12	
Réactionnel/Hémopathie		55/40

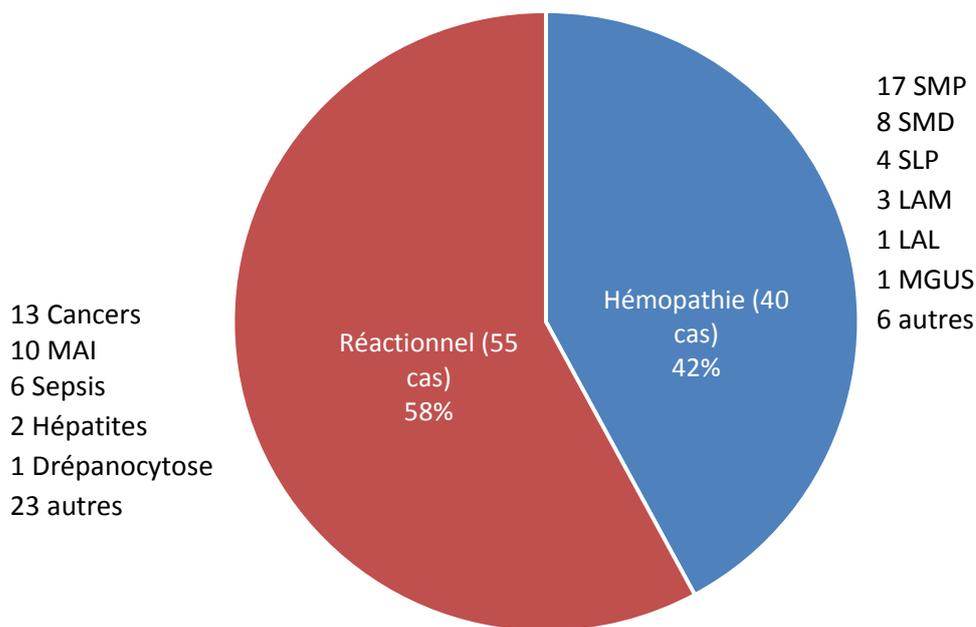


Figure 10 : Répartition des cas de non-LMMC de la cohorte d'étude selon les différentes pathologies.

75 patients font partie du groupe LMMC et 95 du groupe contrôle.

Dans le groupe LMMC on retrouve 37 cas de LMMC 0 (49%), 26 cas de LMMC 1 (35%) et 12 cas de LMMC 2 (16%). Le ratio homme/femme est de 2, ce qui est sensiblement identique à ce que l'on retrouve dans la littérature. Il en est de même pour l'âge médian qui est de 72 ans. La répartition entre les formes myélodysplasiques et myéloprolifératives est en faveur de la forme SMD. Cette dernière représente 66% des cas contre 34% pour la forme SMP. Ce ratio de 2/3 de MD-LMMC pour 1/3 de MP-LMMC correspond à ce que l'on retrouve habituellement dans la littérature.

Dans le groupe contrôle, le ratio homme/femme est similaire à celui du groupe LMMC. On observe 58% de pathologies réactionnelles avec 55 cas, contre 40 cas d'hémopathies. Parmi les hémopathies, les SMP représentent 17 cas, et les SMD 8 cas. Parmi les causes réactionnelles, les cancers et les maladies auto-immunes représentent les pathologies les plus fréquentes.

III.1.2. Définition d'un seuil pour l'ensemble de la cohorte

Le premier objectif de cette étude est de définir le seuil de chaque sous-population, permettant de poser le diagnostic de LMMC avec la probabilité d'erreur la plus faible possible.

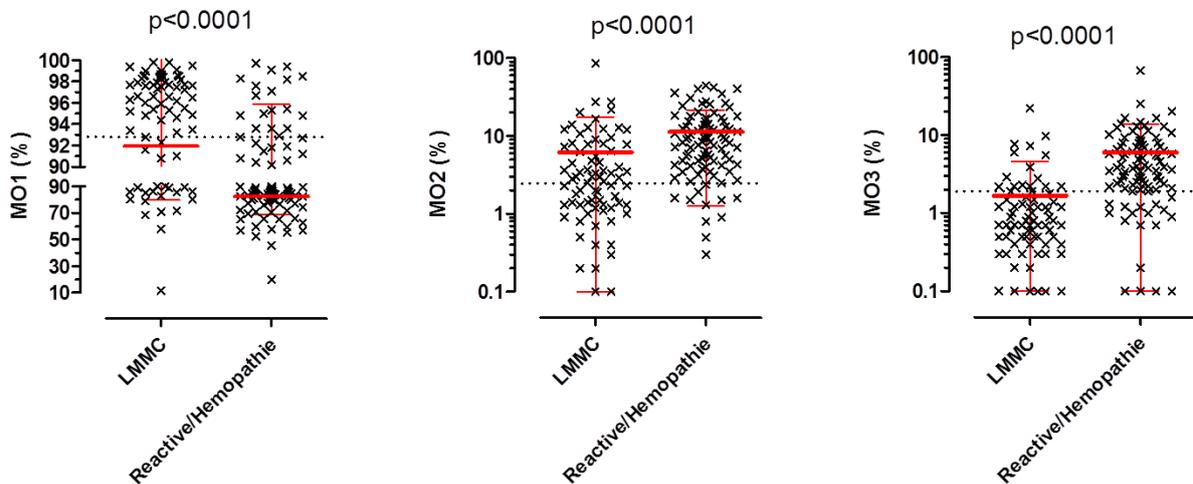


Figure 11 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Whitney.

Les pourcentages des 3 sous-populations de monocytes sont statistiquement différents entre les patients LMMC et non-LMMC ($p < 0.0001$, Figure 11). Un seuil peut donc être défini pour chacune d'entre elles, afin de séparer ces deux groupes de patients, de la manière la plus pertinente possible.

Pour cela, le nombre de Faux Positifs (FP, patients classés « malade » à tort) ou de Faux Négatifs (FN, patients classés « non malade » à tort) devra être le plus bas possible. Pour déterminer efficacement ces seuils, nous avons construit des courbes ROC pour chaque sous-population de monocytes. La cohorte LMMC correspond au groupe malade et la cohorte non LMMC au groupe « contrôle ». La détermination du seuil le plus performant sera faite en fonction de la comparaison des AUC.

III.1.2.1. Monocytes classiques CD14⁺/CD16⁻

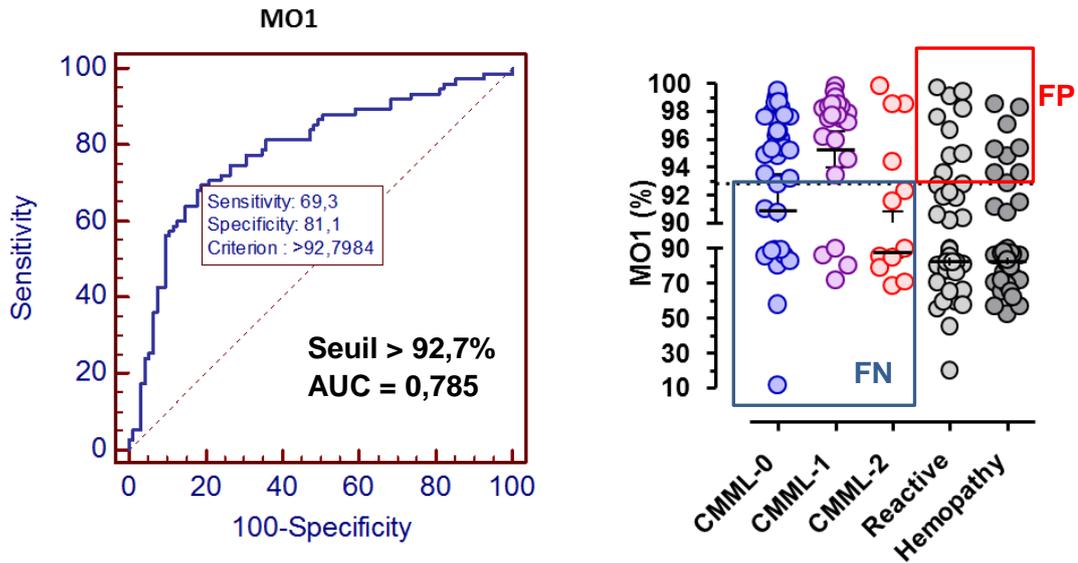


Figure 12 : Courbe ROC et distribution des MO1 sur la cohorte globale.

A gauche, courbe ROC sur les MO1 avec une AUC = 0,785.

A droite, la population MO1 selon les catégories de patients. En pointillé le seuil de 92,7%.

On remarque un total de 20 FP, en rouge, dont 11 font partie des monocytozes réactionnelles. Le total de FN en bleu est de 23. Leur proportion est particulièrement élevée chez les patients LMMC 2 (4 VP pour 8 FN).

En appliquant le seuil de 92,7% de MO1 sur la cohorte totale on obtient une VPP à 0,72 et une VPN à 0,77 (Tableau 9). L'AUC obtenue est de 0,785.

Tableau 9 : Valeurs de VPP et de VPN dans la population MO1 au seuil de 92,7%.

	Cohorte	
Nombre de cas	Test positif (si >92.7%)	Test négatif
LMMC	VP = 52	FN = 23
Contrôle	FP = 20	VN = 75
TEST	VPP = 0,72	VPN = 0,77

III.1.2.2. Monocytes intermédiaires CD14⁺/CD16⁺

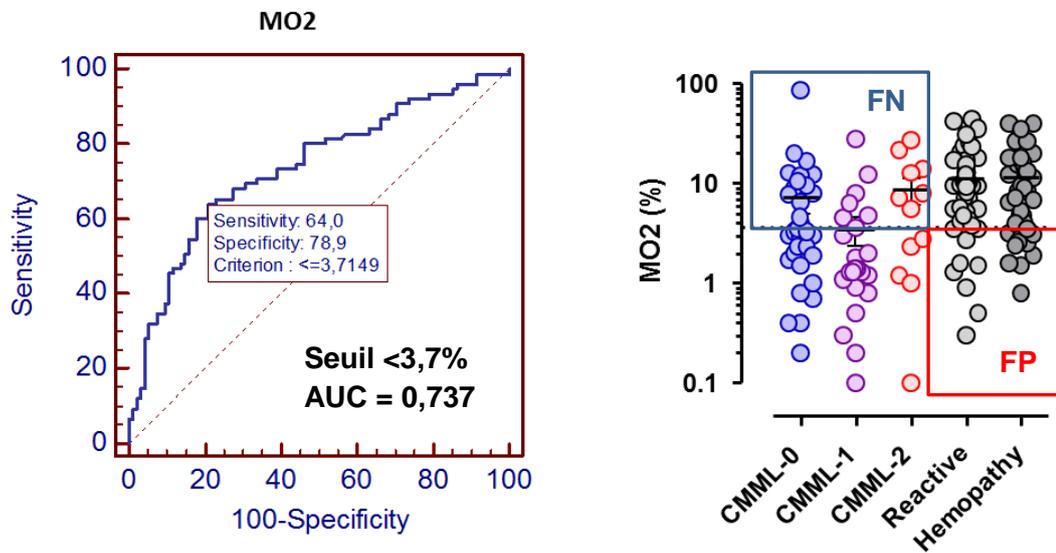


Figure 13 : Courbe ROC et distribution des MO2 sur la cohorte globale.

A gauche, courbe ROC sur les MO2 avec une AUC = 0,737.

A droite, la population MO2 selon les catégories de patients. En pointillé le seuil de 3,7%.

On remarque un total de 20 FP, en rouge, dont 9 font partie des monocytozes réactionnelles. Le total de FN en bleu est de 28.

En appliquant le seuil de 3,7% de MO1 sur la cohorte totale on obtient une VPP à 0,70 et une VPN à 0,73 (Tableau 9). L'AUC obtenue est de 0,737.

Tableau 10 : Valeurs de VPP et de VPN dans la population MO2 au seuil de 3,7%.

Nombre de cas	Cohorte	
	Test positif (si <3.7%)	Test négatif
LMMC	VP = 47	FN = 28
Contrôle	FP = 20	VN = 75
TEST	VPP = 0,70	VPN = 0,73

III.1.2.3. Monocytes non classiques CD14-/CD16+

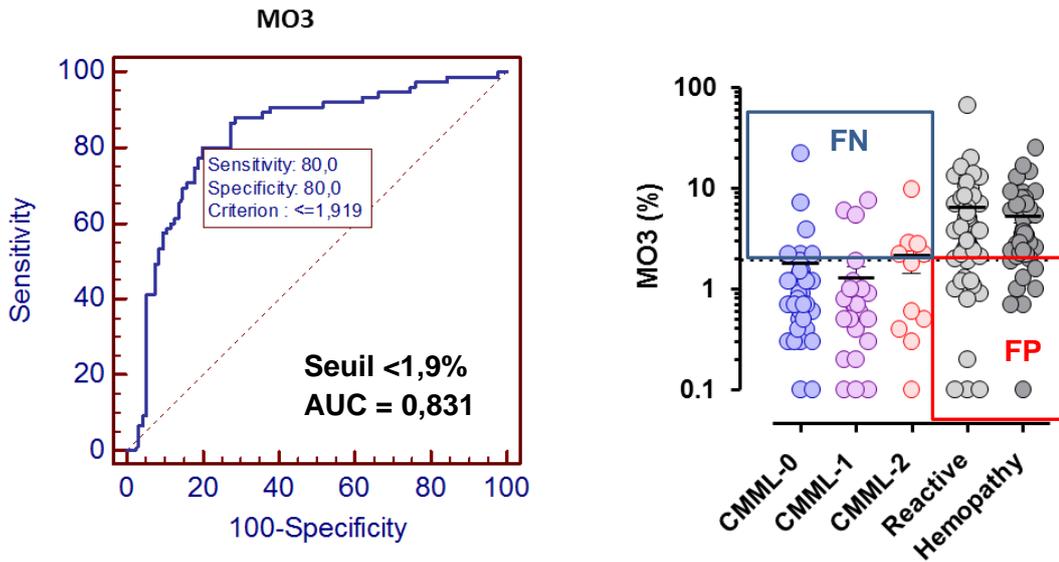


Figure 14 : Distribution des MO3 sur la cohorte globale.

A gauche, courbe ROC sur les MO3 avec une AUC = 0,831.

A droite, la population de MO3 selon les catégories de patients. En pointillé le seuil de 1,9%.

On observe un nombre 19 FP, 11 d'entre eux sont des patients ayant une monocytose réactionnelle. Les FN sont au nombre de 16 : 7 patients classés en LMMC 0, 3 patients en LMMC 1 et 6 en LMMC 2. Par ailleurs, l'AUC obtenue est de 0,831.

En appliquant le seuil de 1,9% de MO3 sur la cohorte totale, on obtient une VPP à 0,76 et une VPN à 0,83.

Tableau 11 : Valeurs de VPP et de VPN dans les populations de MO3 au seuil de 1,9%.

Nombre de cas	Cohorte	
	Test positif (si <1,9%)	Test négatif
LMMC	VP = 59	FN = 16
Contrôle	FP = 19	VN = 76
TEST	VPP = 0,76	VPN = 0,83

III.1.3. Définition des seuils selon les formes de LMMC

En réalité, la LMMC est divisée en deux formes bien distinctes, SMD et SMP. Cette différence d'expression a une influence sur la proportion des sous-populations monocytaires. La répartition des patients suivant ces deux formes de la maladie est représentée Figure 15.



Figure 15 : Répartition des cas LMMC (0,1 et 2) et du groupe contrôle (en orange) dans les deux formes de la maladie. Forme SMD si leucocytes <13 G/L et forme SMP si leucocytes ≥13 G/L.

Dans le groupe SMD, on retrouve 50 cas de LMMC pour 89 patients au total, soit une prévalence de 56%. Dans le groupe « non malades SMD », on retrouve 22 monocytozes réactionnelles et 17 associées à des hémopathies.

Dans le groupe SMP, on retrouve 25 cas de LMMC pour 81 patients au total, soit une prévalence de 31%. Dans le groupe « non malades SMP », on retrouve 33 monocytozes réactionnelles et 23 associées à des hémopathies (Figure 15).

III.1.3.1. Dans le groupe SMD

La première étape, comme lors de l'étude sur la cohorte totale, a été de vérifier que le taux des sous-populations monocytaires est statistiquement différent entre les groupes LMMC et contrôle. Cela dans le but de déterminer les sous-populations les plus intéressantes à étudier.

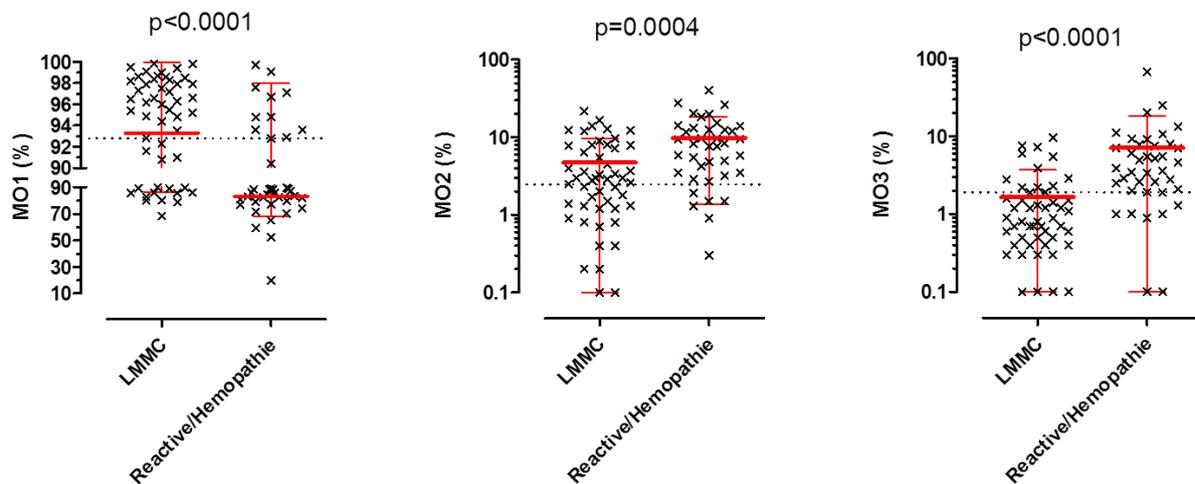


Figure 16 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle dans la cohorte SMD. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Whitney.

Statistiquement, il existe une différence en termes de pourcentage d'expression des 3 sous-populations monocytaires entre les groupes MD-LMMC et contrôle dans la cohorte SMD.

Concernant l'étude des MO1, l'AUC obtenue est de 0,774 en utilisant un seuil de 89,6%. Ce seuil est légèrement inférieur à celui de 92,7% retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 11 FN et 12 FP. La VPP obtenue est de 0,76 et la VPN est de 0,71.

Concernant l'étude des MO2, l'AUC obtenue est de 0,721 en utilisant un seuil de 4%. Ce seuil est légèrement supérieur à celui de 3,7% retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 18 FN et 11 FP. La VPP obtenue est de 0,74 et la VPN est de 0,61.

Concernant l'étude de MO3, l'AUC obtenue est de 0,817 en utilisant un seuil de 1,9 %. Ce seuil est identique à celui retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 12 FN et 8 FP. La VPP obtenue est de 0,83. La VPN obtenue est de 0,72.

L'ensemble des graphiques correspondants sont représentés Figure 18.

III.1.3.2. Dans le groupe SMP

De même que pour le groupe SMD, la première étape a été de vérifier que le taux des sous-populations monocytaires est statistiquement différent entre les groupes LMMC et contrôle. Cela dans le but de déterminer les sous-populations les plus intéressantes à étudier.

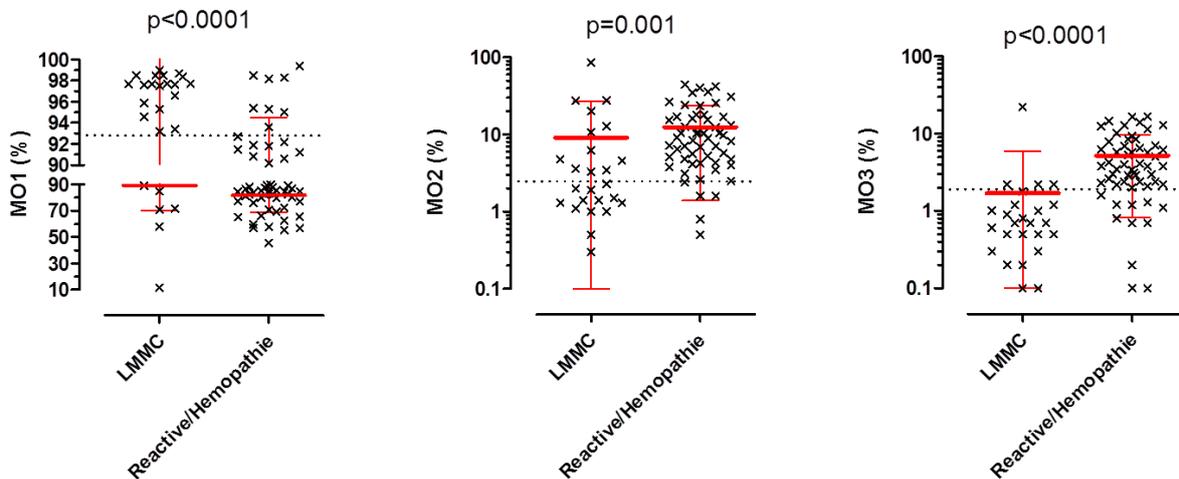


Figure 17 : Comparaison des pourcentages de MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et contrôle dans la cohorte SMP. Chaque croix représente un patient. En rouge sont représentés la moyenne et l'écart-type de chaque groupe. Test de Mann-Whitney.

Statistiquement, il existe une différence en termes de pourcentage d'expression des 3 sous-populations monocytaires entre les groupes MP-LMMC et contrôle.

Concernant l'étude des MO1, l'AUC obtenue est de 0,775 en utilisant un seuil de 92,7%. Ce seuil est identique à celui retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 6 FN et 9 FP. La VPP obtenue est de 0,67. La VPN obtenue est de 0,89.

Concernant l'étude des MO2, l'AUC obtenue est de 0,729 en utilisant un seuil de 3,6%. Ce seuil est similaire à celui de 3,7% retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 10 FN et 9 FP. La VPP obtenue est de 0,63 et la VPN est de 0,82.

Concernant l'étude des MO3, l'AUC obtenue est de 0,863 en utilisant le seuil de 2,2%. Ce seuil est légèrement supérieur à celui de 1,9% retrouvé dans la cohorte totale. On retrouve 4 FN et 14 FP. La VPP obtenue est de 0,6 et la VPN de 0,91.

L'ensemble des graphiques correspondants sont représentés Figure 19.

Les différentes VPP/VPN obtenues en fonction des seuils et des sous-groupes de patients (totale/SMD/SMP) sont regroupées en annexe 4.

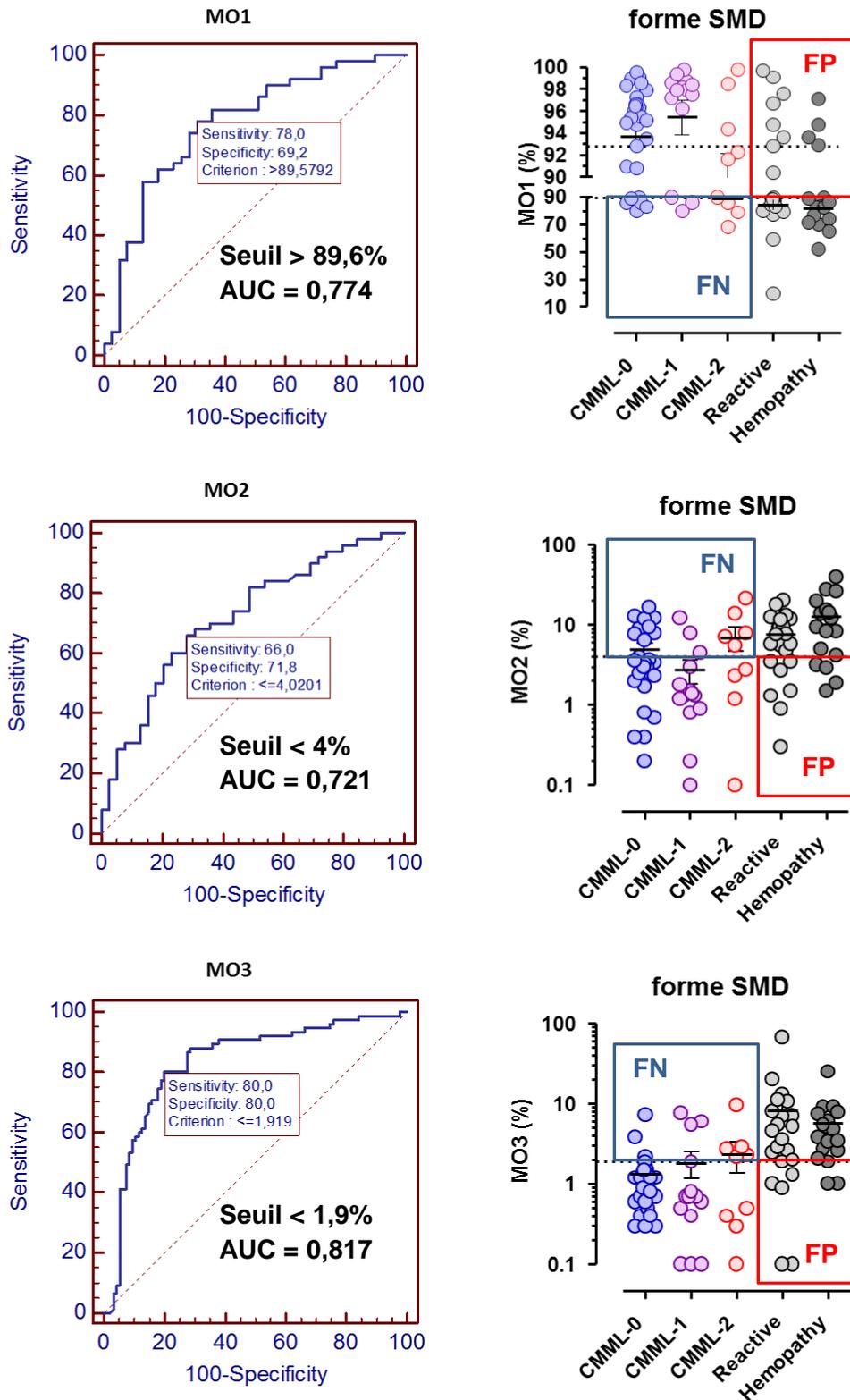


Figure 18 : Courbes et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte SMD. A gauche les courbes ROC des 3 sous-populations sont représentées pour la forme SMD. A droite, la distribution des patients selon leur classification. La population MO1 est en haut, celle des MO2 au milieu et les MO3 en dessous. Le seuil défini dans l'étude de la cohorte totale est aussi représenté. Les FP et les FN sont indiqués en rouge et en bleu respectivement.

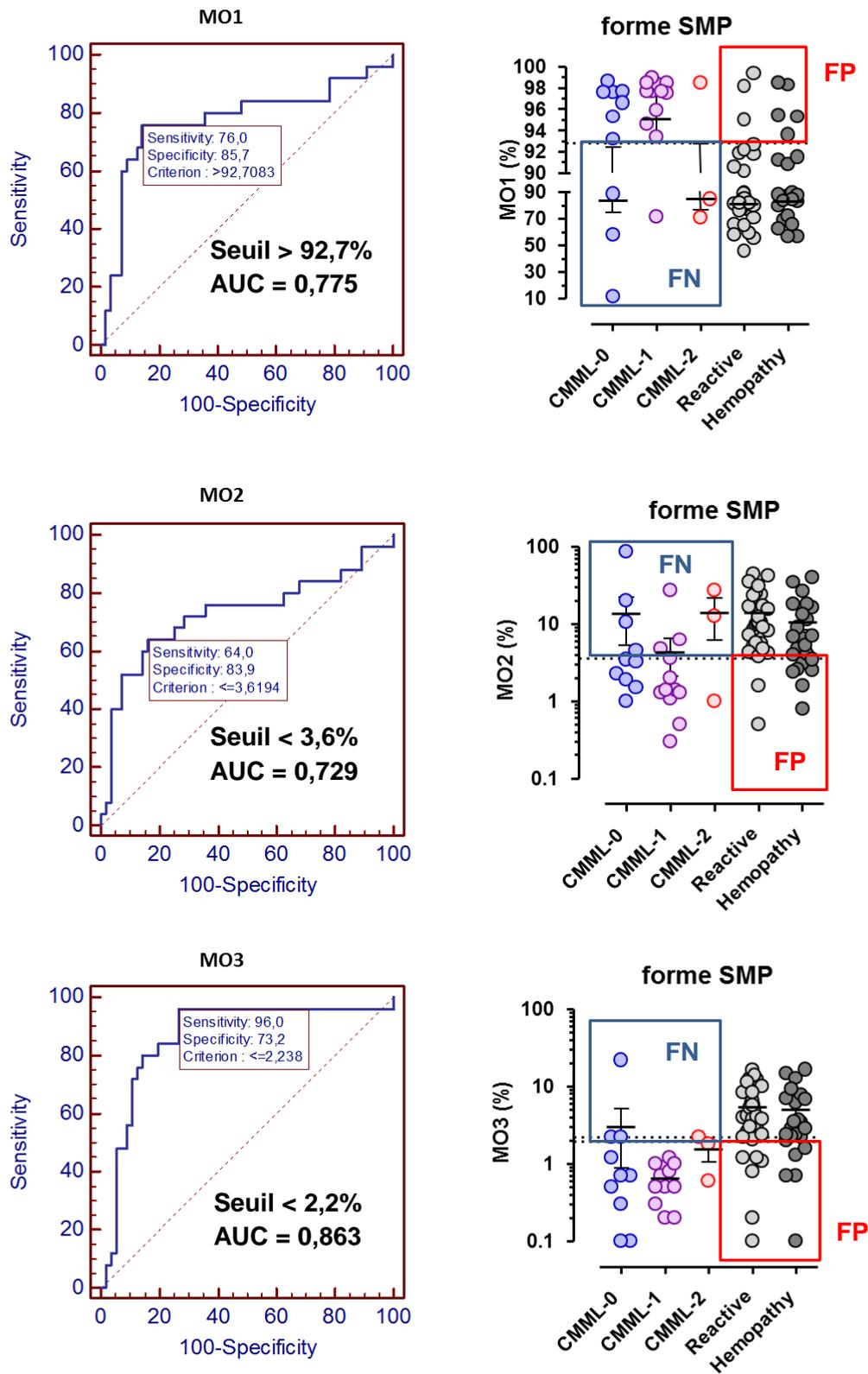


Figure 19 : Courbes et distribution des 3 sous-populations dans la cohorte SMP. A gauche les courbes ROC des 3 sous-populations sont représentées pour la forme SMP. A droite, la distribution des patients selon leur classification. La population MO1 est en haut, celle des MO2 au milieu et les MO3 en dessous. Le seuil défini dans l'étude de la cohorte totale est aussi représenté. Les FP et les FN sont indiqués en rouge et en bleu respectivement.

III.2. Expression de nouveaux marqueurs pour l'étude des monocytes

Une récente étude parue en 2016 dans *l'American Journal of Clinical Pathology* a étudié un panel de marqueurs sur différentes populations cellulaires (blastes, promonocytes, monocytes, etc...) (49). 11 marqueurs (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD38, CD45, CD56, CD64, et HLA-DR) ont été étudiés sur des monocytes d'un groupe contrôle et d'un groupe LMMC. Il en résulte une hétérogénéité importante des monocytes de patients atteints de LMMC et donc, une absence de marqueurs spécifiques de la maladie ou d'un stade de la maladie. Dans notre étude, les marqueurs étudiés sont différents, au nombre de 6 (CD64, CD184, CD9, CD36, CD123 et CD99). Ils ont été sélectionnés à partir des résultats de l'étude de Wong *et al* (32).

En ce qui concerne les résultats qui vont suivre (Figures 20 et 21), « ns » est indiqué lorsque la différence est non significative. Les étoiles correspondent aux valeurs statistiques :

-*** pour $P < 0.001$

-** pour $0.01 < P < 0.001$

-* pour $0.05 < P < 0.01$

Il s'agit d'un test de Student apparié. Le pourcentage d'expression du marqueur par les sous-populations MO2 et MO3 est comparé au pourcentage d'expression du même marqueur par les MO1.

III.2.1. Dans le groupe contrôle

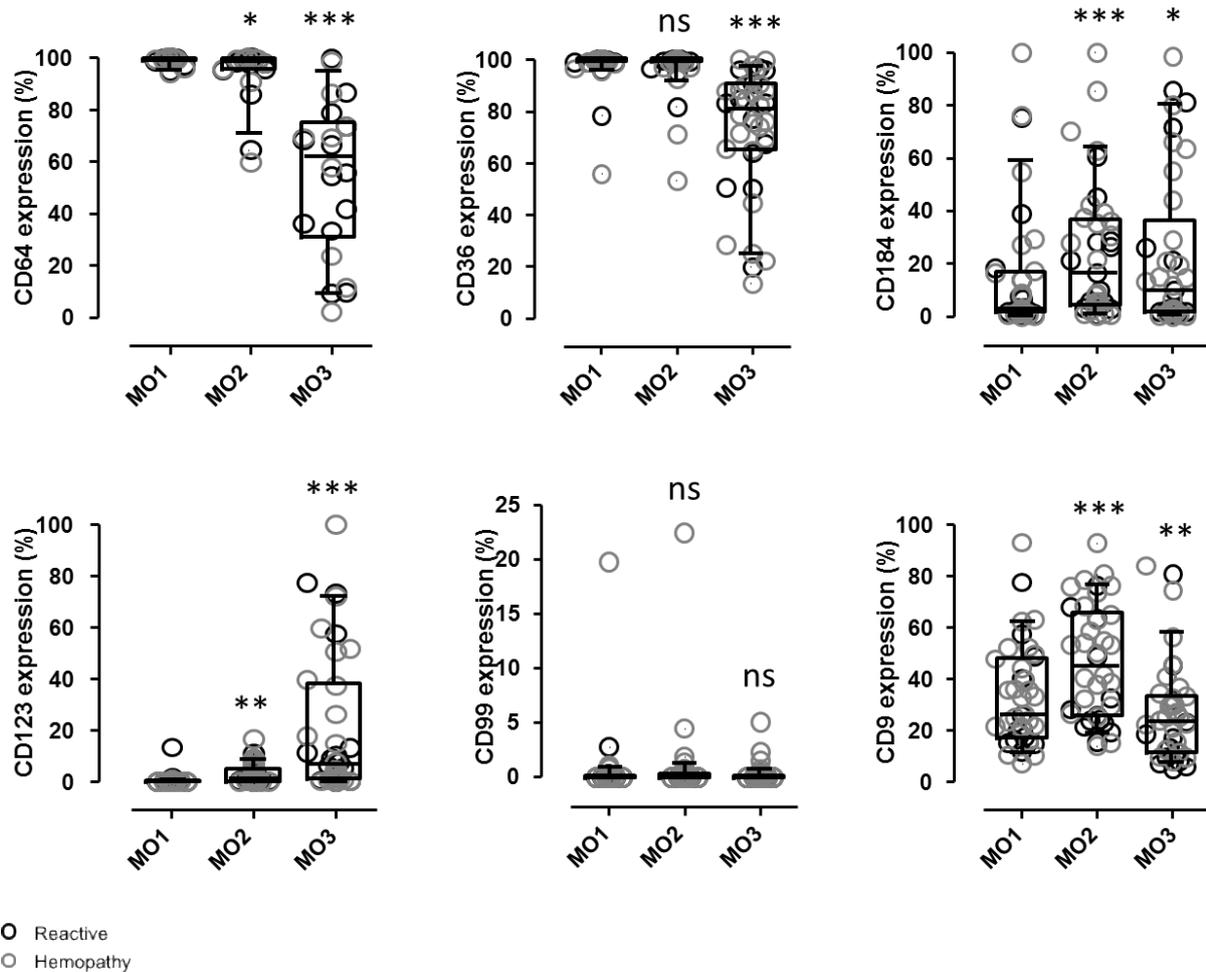


Figure 20 : Pourcentages d'expression des différents marqueurs testés dans les sous-populations monocytaires chez les patients du groupe contrôle.

On remarque que le pourcentage d'expression des marqueurs testés est différent en fonction des sous-populations monocytaires étudiées.

Le CD64 et le CD36 sont deux marqueurs moins exprimés par les monocytes « non classiques ». Au contraire, ces derniers expriment de manière plus importante le CD123 et le CD184.

Les monocytes « intermédiaires » montrent la plus forte expression du CD9.

Enfin, le pourcentage d'expression du CD99 est équivalent dans les trois sous-populations de monocytes.

III.2.2. Dans le groupe LMMC

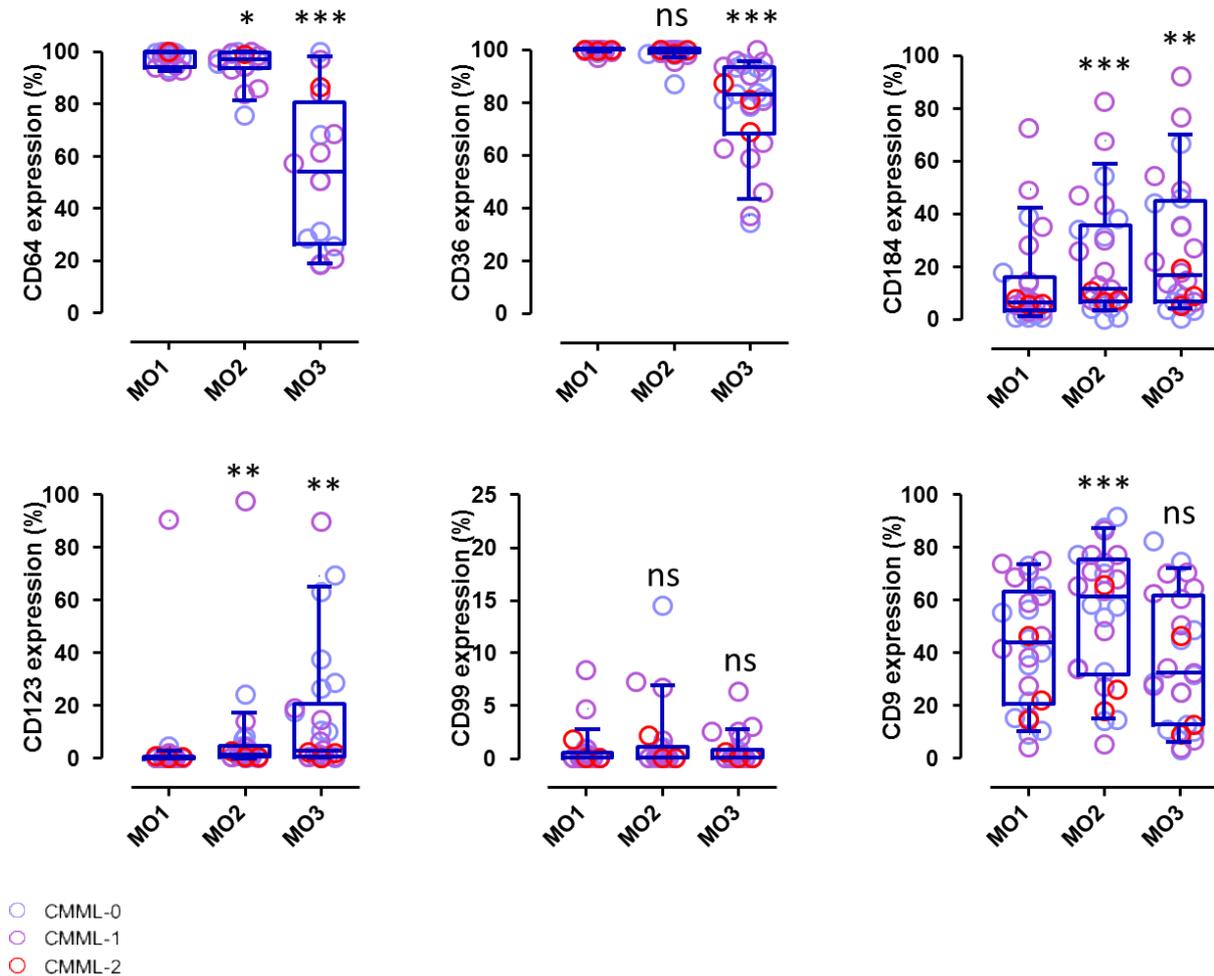


Figure 21 : Pourcentages d'expression des différents marqueurs testés dans les sous-populations monocytaires chez les patients du groupe LMMC.

Là encore, l'expression des différents marqueurs testés est statistiquement différente selon la sous-population monocyttaire étudiée.

L'expression du CD64 et du CD36 est moins importante chez les monocytes « non classiques ». Ils expriment le CD123 et le CD184 plus fortement que les monocytes « classiques » et « intermédiaires ».

Les monocytes « intermédiaires » quant à eux ont une expression plus importante du CD9.

Enfin, le pourcentage d'expression du CD99 est équivalent dans les trois sous-populations monocytaires.

Au sein de chaque groupe de patients, le pourcentage d'expression des marqueurs membranaires varie selon la population monocytaire étudiée. Cependant, l'expression des marqueurs membranaires est statistiquement similaire dans chaque sous-population monocytaire, que ce soit dans le groupe contrôle ou dans le groupe LMMC.

On retrouve ce résultat en calculant la valeur de la *P value* pour chacun des marqueurs. On obtient toujours $P > 0.05$, statistiquement, le pourcentage d'expression des marqueurs n'est donc pas différent entre les patients LMMC et non LMMC pour une sous-population monocytaire donnée.

Tableau 12 : Comparaison des pourcentages d'expression des différents marqueurs par les sous-populations MO1, MO2 et MO3.

	p	Comparaison des sous-populations monocytaires LMMC vs non-LMMC		
		MO1	MO2	MO3
Expression des marqueurs	CD64	0,15	0,43	0,82
	CD184	0,41	0,75	0,12
	CD36	0,3	0,82	0,49
	CD9	0,14	0,2	0,17
	CD99	0,9	0,7	0,53
	CD123	0,42	0,71	0,37

III.3. Intensité moyenne de fluorescence et nouveaux marqueurs

Puisque le pourcentage d'expression des marqueurs testés n'est pas différent entre les groupes LMMC et non-LMMC, nous avons étudié la MFI (Mean Fluorescence Intensity ou intensité fluorescence moyenne) des 4 marqueurs les plus exprimés. Les résultats sont présentés dans la Figure 22.

On constate que les MFI du CD9 et du CD64 sont identiques dans les sous-populations MO1, MO2 et MO3 entre les groupes LMMC et non-LMMC.

La MFI du CD184 est statistiquement plus importante dans la sous-population MO3 chez les patients LMMC.

La MFI du CD36 est statistiquement plus importante dans la sous-population MO1 chez les patients LMMC.

Les différences entre les MFI du CD184 sur MO3 et du CD36 sur MO1 ne permettent cependant pas de discriminer de façon claire les patients LMMC et non-LMMC.

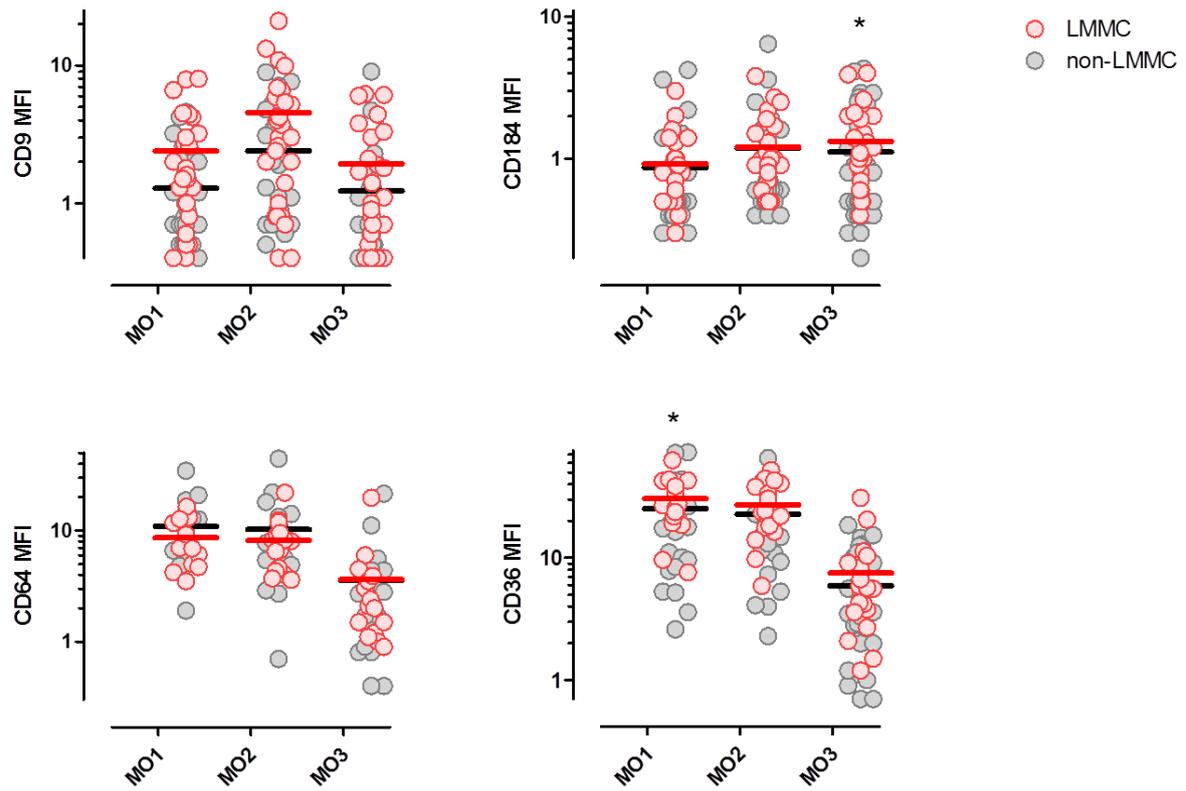


Figure 22 : MFI des nouveaux marqueurs en fonction des sous-populations MO1, MO2 et MO3. Comparaison entre les patients LMMC et non-LMMC. Test de Mann-Withney.

III.4. Mise en place d'un CMML-Score biologique

Les performances obtenues avec les seuils définis dans les différentes études ne sont pas parfaites :

-Selimoglu *et al* en 2015 avec un taux de monocytes « classiques » >94% (3)

-Picot *et al* en 2018 avec un taux de monocytes « classiques » > 95% (47)

Et enfin l'étude ici présente avec un taux de monocytes « classiques » > 92,7%.

La cytométrie en flux à elle seule n'est pas suffisante pour affirmer le diagnostic de LMMC. Il s'agit d'un examen supplémentaire, disponible pour les cliniciens. Sa réalisation nécessite un échantillon de sang total recueilli sur tube EDTA. L'idée d'un score biologique associant plusieurs paramètres obtenus rapidement (résultats de la NFS et de la CMF) qui permettraient de discriminer les patients en malades et non-malades nous est donc venue.

III.4.1. Paramètres biologiques et détermination des seuils

Pour déterminer les paramètres de la NFS permettant de classer au mieux les patients en malades et non-malades, nous avons construits les différentes courbes ROC correspondantes. Le choix d'intégrer un paramètre au score, ainsi que son seuil sera fonction de l'AUC obtenue.

Les paramètres testés sont les suivants :

-Taux de Leucocytes en G/L

-Taux d'Hémoglobine en g/dL

-Taux de Plaquettes en G/L

-VGM en fL

-Ratio PNN/Monocytes (calculé à partir de la formule sanguine)

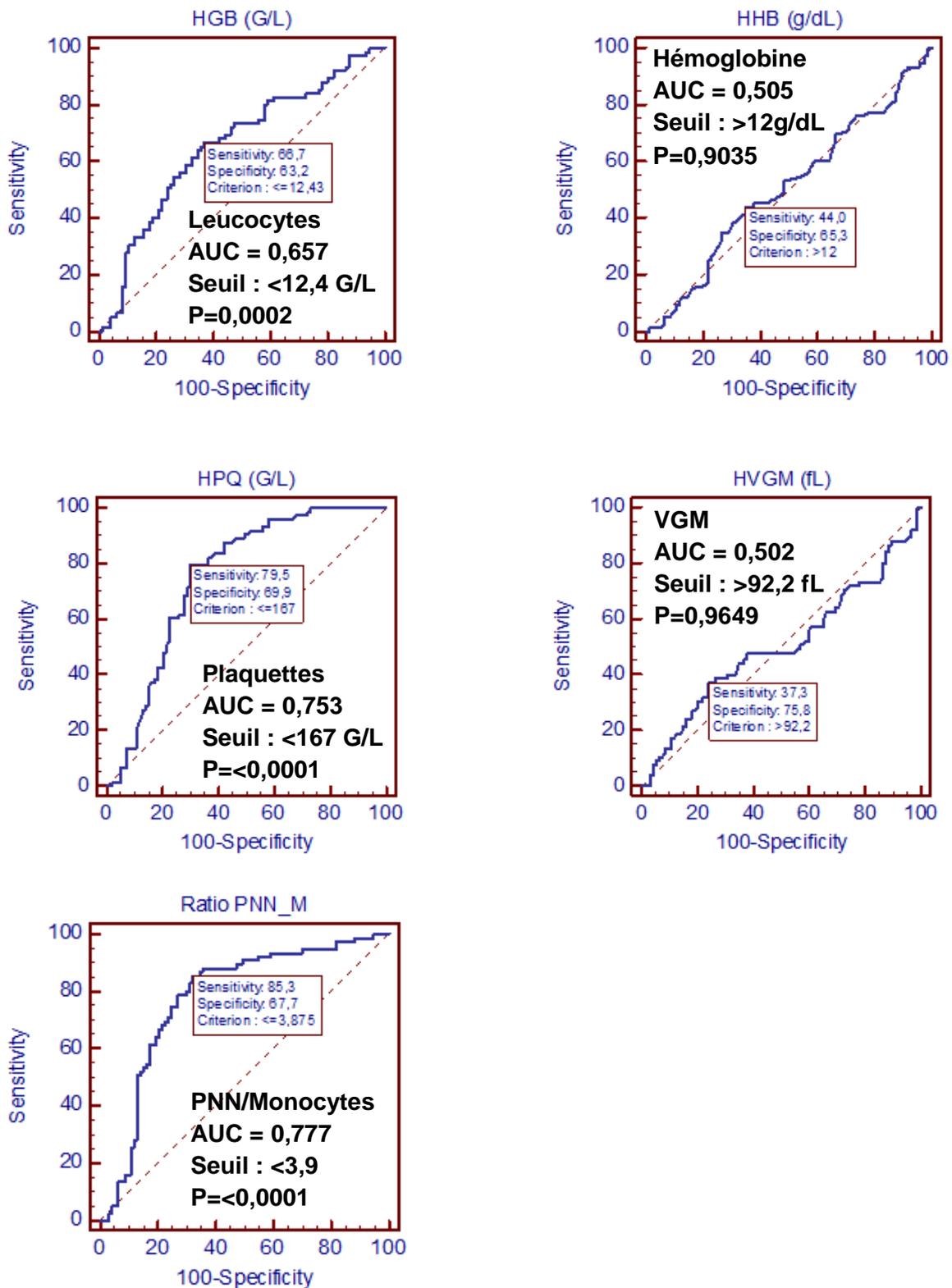


Figure 23 : Courbes ROC des différents paramètres de la NFS testés, AUC et seuils correspondants. Ces courbes ont été construites en utilisant la totalité de la cohorte (n=170).

Les paramètres de la NFS dont l'AUC semble être satisfaisante ($p < 0,05$) sont donc les leucocytes (AUC = 0,657), les plaquettes (AUC = 0,753) et le ratio PNN/Monocytes (AUC = 0,777). Ces paramètres peuvent être associés pour discriminer les patients LMMC des patients non-LMMC.

Concernant la cytométrie en flux, dans la cohorte totale, les monocytes « classiques », au seuil de 92,7% permettent d'obtenir une AUC = 0,785 ($p < 0,0001$). Les monocytes « non classiques », au seuil de 1,9% permettent d'obtenir une AUC = 0,831 ($p < 0,0001$).

Afin de rendre ce score utilisable facilement en pratique courante, les différents seuils définis précédemment ont été arrondis.

Le nombre de point associé à chaque paramètre du score a été défini en fonction de l'importance de l'AUC obtenue, comme présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Système de score

Paramètres	Monocytes classiques (%)	Monocytes non classiques (%)	Leucocytes (G/L)	Plaquettes (G/L)	Ratio PNN/Monocytes
Seuil	>93%	<2%	<13	<150	<4
Score	2	3	1	2	2

Le score maximal pouvant être atteint est donc de 10.

Pour les 170 patients inclus dans cette étude, nous avons calculé ce CMML-score biologique. Les résultats sont présentés Figure 24.

On observe que pour des scores à 0 ou 1, on ne retrouve aucun patient du groupe LMMC. De la même manière, pour un CMML-score à 10, tous les patients font partie du groupe malade (Figure 24)

En réorganisant les patients par groupe (Figure 25), il est possible d'affiner la valeur pronostique du CMML-score.

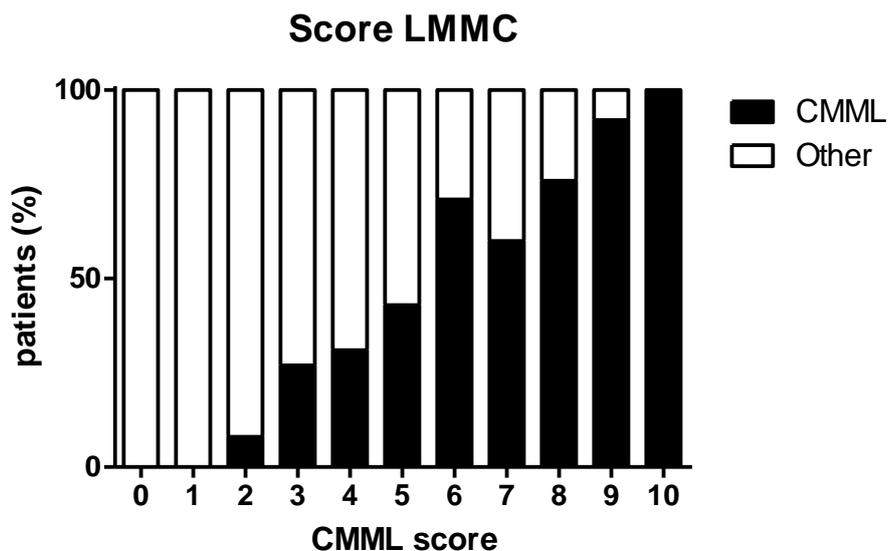


Figure 24 : Pourcentage de patients LMMC/non-LMMC en fonction du résultat du CMML-score biologique. En noir les patients du groupe malade, en blanc ceux du groupe non-malade.

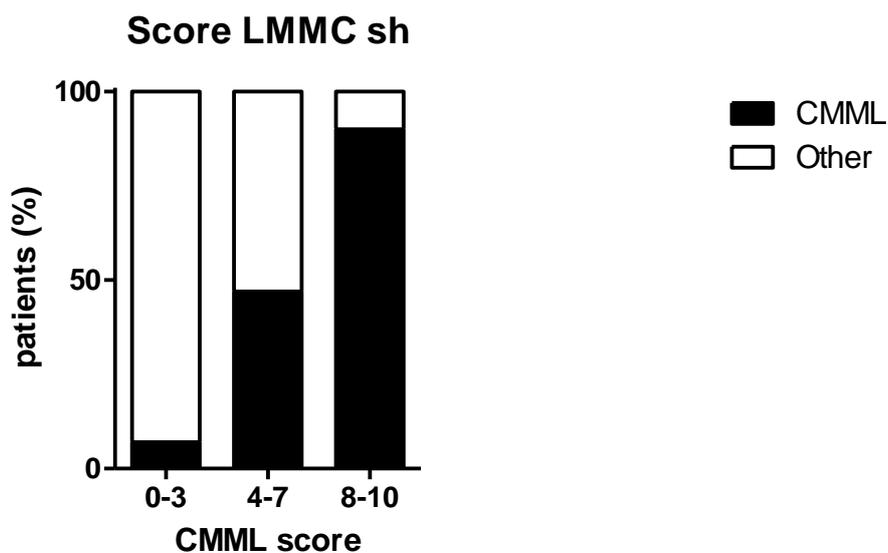


Figure 25 : CMML-score classement en sous-groupes. En noir les patients du groupe malade, en blanc ceux du groupe non-malade.

3 Groupes se distinguent aisément :

- Les patients ayant un score compris entre 0 et 3 sont quasiment tous des non-LMMC.
- Les patients obtenant un score compris entre 4 et 7 font partie de la zone grise. Ils se répartissent équitablement entre les groupes LMMC et non-LMMC.
- Les patients obtenant un score compris entre 8 et 10 sont quasi exclusivement des LMMC.

En considérant que l'obtention d'un score >7 est positif, et permet de classer un patient dans le groupe LMMC, et qu'à contrario un score <4 est négatif, et permet de classer un patient dans le groupe non-LMMC, il est possible de calculer les VPP et VPN du test.

Tableau 14 : VPP et VPN du CMML-score

Nombre de cas	Test négatif (CMML-score <4)	Test positif (CMML-score >7)
LMMC	FN = 5	VP = 44
Contrôle	VN = 62	FP = 5
TEST	VPN = 0,93	VPP = 0,90

On obtient ainsi une VPN à 0,93 et une VPP à 0,90.

La zone grise du test correspond à un score compris entre 4 et 7. Sur les 170 patients auxquels ce score a été appliqué, 53 se situent dans cette zone grise.

Les 5 FN sont 4 patients au stade LMMC2 et un patient au stade LMMC1 avec des blastes sanguins.

IV. Discussion

IV.1. Validation du seuil de monocytes classiques

Le principal objectif de cette étude est de confirmer les résultats observés par Selimoglu *et al* (3) au CHU de Toulouse, afin de pouvoir utiliser la cytométrie en flux comme un argument supplémentaire de diagnostic de la LMMC.

La répartition des patients dans notre étude est proche de ce que l'on retrouve dans la littérature concernant l'âge, le sex ratio et la proportion de LMMC-MP et LMMC-MD. Ces caractéristiques sont similaires dans les groupes malades et contrôles.

En recherchant le seuil diagnostique le plus performant sur la cohorte totale, l'AUC la plus importante est obtenue pour les MO3, au seuil de 1,9% (AUC=0,831 VPP=0,76 VPN=0,83) devant les MO1 (Seuil : 92,7% AUC=0,785 VPP=0,72 VPN=0,77) et les MO2 (Seuil : 3,7% AUC=0,737 VPP=0,7 VPN=0,73). Il semble donc dans un premier temps plus efficace d'étudier la sous-population des MO3 afin de diagnostiquer la LMMC.

Lorsque l'on divise la cohorte totale en deux sous-groupes, SMD et SMP, on retrouve le même profil de résultat.

Dans la cohorte SMD, les MO3 au seuil de 1,9% présentent les meilleures performances (AUC=0,817 VPP=0,83 et VPN=0,72) là encore devant les MO1 (Seuil : 89,6% AUC=0,774 VPP=0,76 et VPN=0,71) et enfin les MO2 (Seuil : 4% AUC=0,721 VPP=0,74 et VPN=0,61). Pour les patients ayant une leucocytose <13G/L, il semble également que la sous-population permettant de réaliser le diagnostic de LMMC de la façon la plus efficace soit celle des MO3. Il est à noter que parmi les 8 FP décrit pour les MO3 dans cette cohorte, 6 sont des patients au stade LMMC2 avec des blastes circulants. La NFS seule aurait entraîné des examens complémentaires dans ces cas-là.

Dans la cohorte SMP, les MO3 au seuil de 2,2% permettent d'obtenir l'AUC la plus importante (AUC=0,863 VPP=0,6 VPN=0,91) devant les MO1 (Seuil : 92,7% AUC=0,775 VPP=0,67 et VPN=0,89) et enfin les MO2 (Seuil : 3,6% AUC=0,729 VPP=0,63 et VPN=0,82).

Dès lors, le premier constat est qu'il ne semble pas utile de séparer les patients en fonction de leur leucocytose afin d'appliquer différents seuils ou d'observer différentes sous-populations monocytaires.

De plus, quel que soit le sous-groupe des patients, il semble que la sous-population des MO3 est la plus pertinente à étudier. Au contraire, la sous-population des MO2 ne semble pas avoir d'intérêt pour discriminer les patients LMMC des non-LMMC dans notre cohorte, contrairement à ce qui a été montré par Picot *et al* (47).

Ces résultats s'éloignent quelque peu de ceux de Selimoglu *et al* (3), qui proposent d'utiliser les MO1 dans le diagnostic de la LMMC par cytométrie en flux, avec un seuil estimé à 94,6% pour une AUC à 0,977.

L'inclusion des patients dans l'étude est probablement la principale cause des différences observées. L'étude parue en 2015 était rétrospective, et comportait des donneurs sains, des patients LMMC connus et des monocytoses réactionnelles ou hémopathies connues. Dans notre étude, les patients inclus sont ceux pour lesquels une suspicion clinique de LMMC existe, sélectionnés au fil de l'eau. Ainsi, un certain nombre de cas ambigus (SMD avec

monocytose, absence de contrôle de la NFS à 3 mois, par exemple) font partie de notre cohorte.

L'étude de Hudson *et al* (48) parue en juillet 2018 se propose d'appliquer les seuils définis par Selimoglu *et al* (94,6% de MO1) dans les mêmes conditions d'inclusion que notre étude. Les performances retrouvées sont moins bonnes que pour Selimoglu *et al* (3) concernant les MO1 (AUC=0,881 vs 0,977), mais plus surprenant, la population de MO3 s'avère être la plus performante pour séparer les patients LMMC et contrôle (AUC = 0,995).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Hudson *et al* (48). En routine, lorsqu'une suspicion clinique de LMMC donne lieu à des examens biologiques, l'utilisation d'un seuil de 2% de MO3 quantifié par cytométrie en flux, permet d'obtenir un test suffisamment discriminant (AUC=0,831) pour apporter un argument en faveur ou non d'une LMMC.

Cependant, on note une sensibilité et une spécificité évaluées à 80% avec ce seuil, ce qui est loin d'être suffisant, notamment parce que le diagnostic différentiel se fait avec des patients qui n'ont pas d'hémopathies. L'idée d'ajouter de nouveaux marqueurs de surface à un panel pour obtenir un test plus performant a alors été envisagé, comme cela est le cas pour le diagnostic des lymphomes, du myélome ou des leucémies aiguës lymphoblastiques.

IV.2. Expression des nouveaux marqueurs

Comme l'ont montré Wong *et al* (32), les monocytes expriment de nombreux marqueurs de surface. La caractérisation phénotypique complète des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux n'a pour l'heure pas été réalisée.

Dans leur étude, Harrington *et al* (49) ont testés 11 marqueurs : CD11b, CD15, CD14, CD33, CD36, CD45, CD56 et HLA-DR afin d'en décrire l'expression par les monocytes clonaux de patients LMMC et les monocytes sains. Il s'agissait, contrairement à notre étude, d'échantillons de moelle osseuse, plus complexes à analyser par CMF à cause de la présence de progéniteurs monocytaires. Dans cette étude, aucun marqueur ne permet de différencier les patients LMMC du groupe contrôle, ni même de différencier les stades de la maladie (LMMC 0/1/2).

Dans notre étude, nous avons regardé l'expression de 6 marqueurs : CD64, CD184, CD9, CD36, CD123 et CD99. Ces marqueurs permettent de différencier de façon efficace les sous-populations MO1, MO2 et MO3, ce qui peut être intéressant pour leur étude dans différents contextes pathologiques (monocytose réactionnelle, pathologies cardiaques, auto-immunes ou cancer). Malheureusement, dans le cadre du diagnostic de LMMC, nous n'avons pas montré d'expression différente entre les monocytes de LMMC et de non-LMMC.

D'autre part, Wong *et al* (32) ont montré que les monocytes « intermédiaires » présentent un pourcentage d'expression intermédiaire (entre les « classiques » et les « non classiques ») pour certains marqueurs. On retrouve des résultats similaires dans notre étude pour le CD64, le CD184 et le CD123, qui sont exprimés de manière équivalente chez les patients LMMC ou contrôle. Le CD9 est cependant exprimé de façon préférentielle par les MO2. Ce résultat pourrait remettre en question le statut de population de transition des MO2 et doit pousser à envisager une origine ou un processus de différenciation indépendants des différentes sous-populations.

La difficulté de mettre en évidence des marqueurs aberrants, spécifiques des monocytes clonaux, vient probablement de la grande diversité de marqueurs pouvant être retrouvés sur les monocytes. Leur étude par cytométrie en flux est donc complexe. A l'heure actuelle,

aucune étude n'a réussi à déterminer des marqueurs phénotypiques permettant de classer les monocytes en « monocytes clonaux » ou « monocytes sains/réactionnels ». De plus, la LMMC fait partie des syndromes frontières myéloprolifératifs/myélodysplasiques. Ses expressions clinique et biologique sont très hétérogènes. On retrouve notamment des formes dysplasiques ou prolifératives. Il est donc actuellement difficile d'imaginer pouvoir établir une cartographie unique des marqueurs membranaires du monocyte clonal.

La cytométrie en flux reste une analyse permettant d'obtenir un argument supplémentaire pour le diagnostic de LMMC, sans être suffisante à elle seule. Il s'agit d'une analyse rapide, nécessitant du matériel simple d'accès (sang circulant) et relativement peu coûteuse (comparativement à la biologie moléculaire ou la cytogénétique). Elle pourrait permettre de remplacer le critère : « monocytose chronique >3 mois » défini par l'OMS et donc de s'affranchir du délai d'attente pour les patients positifs. Mais elle n'évite par la réalisation d'examen complémentaires en cas de résultats en faveur d'une LMMC.

Dans le but d'exclure rapidement le diagnostic, ou au contraire de réaliser au plus vite des examens complémentaires, l'idée d'un CMML-score biologique nous a semblé être une bonne alternative.

IV.3. Mise en place d'un CMML-Score biologique

Nos résultats ont montré, sur les 170 patients étudiés, que certains paramètres de la NFS (taux de leucocytes, taux de plaquettes et ratio PNN/monocytes) peuvent être utiles pour discriminer les patients LMMC, des non-LMMC. En ajoutant à ces paramètres les seuils prédéfinis de MO1 et de MO3 puis en pondérant chacun de ces paramètres en fonction de l'importance de leur AUC, un score sur 10 a été élaboré.

Après utilisation de ce score sur la cohorte, il en ressort que les patients peuvent être classés en 3 groupes :

- Score 0-3 : négatif, absence de LMMC
- Score 4-7 : douteux/zone grise : insuffisant pour écarter ou affirmer une éventuelle LMMC
- Score 8-10 : fortement en faveur d'une LMMC

En effet parmi les 5 FP observés, on retrouve 4 patients suivis, pour qui un diagnostic est déjà établi :

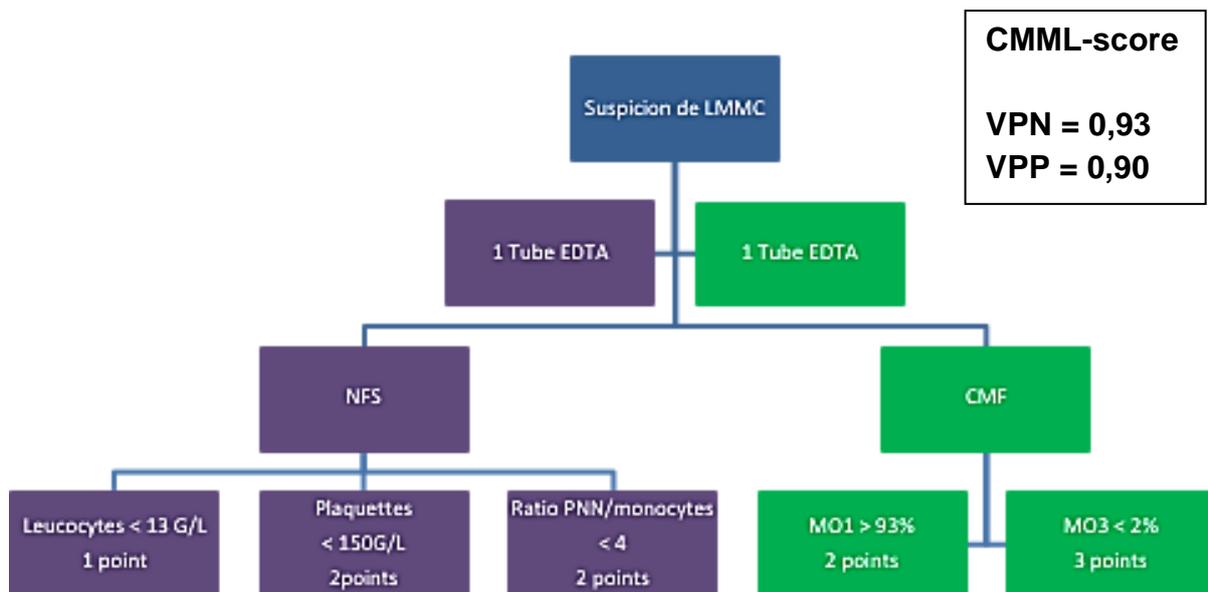
- 1 granulomatose médullaire suivi depuis plusieurs années
- 1 suivi de carcinome mammaire
- 1 ARS diagnostiquée en 2012 avec splénomégalie apparue en 2017
- 1 thrombopénie auto-immune traitée par rituximab

Parmi les 5 FN, on retrouve 4 patients au stade LMMC 2 et 1 patient au stade LMMC 1 avec des blastes circulants.

L'utilisation de ce score, uniquement biologique, permettrait à l'aide de 2 tubes EDTA, de déterminer une conduite à tenir (Figure 26) en fournissant une réponse en 24 heures.

En utilisant ce score, un gain de temps est réalisé (24h vs 3 mois pour objectiver une monocytose chronique) ainsi qu'un gain d'argent (NFS + CMF comparées à la cytogénétique ou la biologie moléculaire).

Néanmoins, 31% des patients de notre étude restent classés dans la zone grise. Pour diminuer cette proportion, plusieurs options sont envisageables comme améliorer la sensibilité de la CMF en ajoutant de nouveaux marqueurs ou encore ajouter des éléments cliniques au score (peut-être difficile en l'absence de signes cliniques spécifiques). Les critères dépendants de la NFS pourraient aussi être complétés par la mesure des index de granulose. Certains automates permettent de mesurer ces index et mettent en évidence la présence d'une éventuelle dysplasie.



Score	Conduite à tenir
0-3	Absence d'arguments en faveur d'une LMMC
4-7	Examens biologiques de routine insuffisants pour écarter une éventuelle LMMC. A confronter au contexte clinique et à explorer si nécessaire
8-10	Arguments biologiques en faveur d'une LMMC. Examens complémentaires à réaliser (myélogramme, cytogénétique, biologie moléculaire)

Figure 26 : Calcul du CMML-score et conduite à tenir.

Pour terminer, il convient de rappeler que la cohorte de patients étudiés est relativement restreinte (170 sujets), que l'obtention des données de CMF est sujette à interprétation et difficile à standardiser. Par conséquent ces différents résultats ainsi que le score proposé, reflètent uniquement la population de patient de l'IUCT-O et devront être validés par une étude prospective multicentrique.

Références bibliographiques

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 2016;127(20):2391-405.
2. Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *Br J Haematol*. mai 2014;165(3):273-86.
3. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 4 juin 2015;125(23):3618-26.
4. Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* [Internet]. [cité 18 août 2018];0(0). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejh.13092>
5. Solary E, Itzykson R. How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 13 juill 2017;130(2):126-36.
6. Parikh SA, Tefferi* A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 1 juin 2012;87(6):610-9.
7. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 93(6):824-40.
8. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 11 avr 2013;121(15):3005-15.
9. Fenaux G de travail : P, Ades L, Fontenay M, Raynaud S, Eclache V, Rose C, et al. French consensus on myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia: diagnostic, classification and treatment 2015 update by the Myelodysplasia French Group. *Hématologie*. 20151-2;(1):28–45.
10. Grignano E, Mekinian A, Braun T, Liozon E, Hamidou M, Decaux O, et al. Autoimmune and inflammatory diseases associated with chronic myelomonocytic leukemia: A series of 26 cases and literature review. *Leuk Res*. août 2016;47:136-41.
11. Mathew RA, Bennett JM, Liu JJ, Komrokji RS, Lancet JE, Naghashpour M, et al. Cutaneous manifestations in CMML: Indication of disease acceleration or transformation to AML and review of the literature. *Leuk Res*. 1 janv 2012;36(1):72-80.
12. Dyachenko P, Rozenman D, Bennett M. Unusual skin and testicular lesions in a patient with CMML. *Eur J Intern Med*. juill 2006;17(4):290-1.
13. Tang G, Fu B, Hu S, Lu X, Tang Z, Li S, et al. Prognostic impact of acquisition of cytogenetic abnormalities during the course of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1 oct 2015;90(10):882-7.
14. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J*. févr 2016;6(2):e393.

15. Wassie EA, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am J Hematol.* 89(12):1111-5.
16. Elena C, Galli A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 8 sept 2016;128(10):1408-17.
17. Itzykson R, Duchmann M, Lucas N, Solary E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int J Hematol.* juin 2017;105(6):711-9.
18. Obba S. Caractérisation et implication de l'autophagie au cours de la différenciation macrophagique des monocytes. Application à la Leucémie Myélomonocytaire Chronique. :176.
19. Patel BJ, Przychodzen B, Thota S, Radivoyevitch T, Visconte V, Kuzmanovic T, et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* déc 2017;31(12):2815-23.
20. Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics.* févr 2012;7(2):201-7.
21. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature.* 9 déc 2010;468(7325):839-43.
22. Komeno Y, Huang Y-J, Qiu J, Lin L, Xu Y, Zhou Y, et al. SRSF2 Is Essential for Hematopoiesis, and Its Myelodysplastic Syndrome-Related Mutations Dysregulate Alternative Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell Biol.* sept 2015;35(17):3071-82.
23. Nagase R, Inoue D, Pastore A, Fujino T, Hou H-A, Yamasaki N, et al. Expression of mutant *Asx1* perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *J Exp Med.* 4 juin 2018;215(6):1729-47.
24. Kuo M-C, Liang D-C, Huang C-F, Shih Y-S, Wu J-H, Lin T-L, et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia.* août 2009;23(8):1426-31.
25. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood.* 21 mars 2013;121(12):2186-98.
26. Zhao Y, Zou W, Du J, Zhao Y. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *J Cell Physiol* [Internet]. [cité 5 juill 2018];0(0). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.26461>
27. Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, Neubauer RH, Oliver C, Favilla T, et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest.* sept 1983;72(3):1093-105.

28. Akiyama Y, Stevenson GW, Schlick E, Matsushima K, Miller PJ, Stevenson HC. Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *J Leukoc Biol.* mai 1985;37(5):519-30.
29. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 11 janv 2008;111(8):3941-67.
30. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 21 oct 2010;116(16):e74-80.
31. Ziegler-Heitbrock L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol* [Internet]. 17 août 2015 [cité 12 juill 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538304/>
32. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 4 août 2011;118(5):e16-31.
33. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 81(3):584-92.
34. HERRA CM, KEANE CT, WHELAN A. Increased expression of Fcγ receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. 2018;6.
35. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al. CD14hiCD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med* [Internet]. 7 juill 2015 [cité 15 juill 2018];13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493812/>
36. Amoruso A, Sola D, Rossi L, Obeng JA, Fresu LG, Sainaghi PP, et al. Relation among anti-rheumatic drug therapy, CD14 + CD16 + blood monocytes and disease activity markers (DAS28 and US7 scores) in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Pharmacol Res.* mai 2016;107:308-14.
37. Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, Suzuki K, Yamaoka K, Takeuchi T. CD14brightCD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2017 [cité 15 juill 2018];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5301443/>
38. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A. Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* août 2010;161(2):332-41.
39. Burbano C, Vasquez G, Rojas M. Modulatory Effects of CD14+CD16++ Monocytes on CD14++CD16- Monocytes: A Possible Explanation of Monocyte Alterations in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 66(12):3371-81.
40. Song Y, Zhou Q, Zhu H, Jing Y, Zhang X, Yang Y, et al. Frequency of circulating CD14++CD16+ intermediate monocytes as potential biomarker for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. [cité 16 juill 2018];0(ja). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jop.12760>

41. Feng A-L, Zhu J-K, Sun J-T, Yang M-X, Neckenig MR, Wang X-W, et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol.* avr 2011;164(1):57-65.
42. Jiang X-Q, Zhang L, Liu H-A, Yuan N, Hou P-Q, Zhang R-Q, et al. Expansion of CD14+CD16+ monocytes is related to acute leukemia. *Int J Clin Exp Med.* 15 août 2015;8(8):12297-306.
43. Suzuki A, Fukuzawa K, Yamashita T, Yoshida A, Sasaki N, Emoto T, et al. Circulating intermediate CD14++CD16+ monocytes are increased in patients with atrial fibrillation and reflect the functional remodelling of the left atrium. *Europace.* 29 janv 2016;eu422.
44. Lo S-C, Lee W-J, Chen C-Y, Lee B-C. Intermediate CD14++CD16+ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging.* août 2017;33(8):1223-36.
45. Hewing B, Au SC-D, Ludwig A, Ellerbroek R, van Dijck P, Hartmann L, et al. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc Transl Res.* févr 2017;10(1):27-34.
46. Tang M-X, Zhang Y-H, Hu L, Kwak-Kim J, Liao A-H. CD14++CD16+HLA-DR+ Monocytes in Peripheral Blood are Quantitatively Correlated with the Severity of Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 74(2):116-22.
47. Picot T, Aanei CM, Flandrin Gresta P, Noyel P, Tondeur S, Tavernier Tardy E, et al. Evaluation by Flow Cytometry of Mature Monocyte Subpopulations for the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Front Oncol [Internet].* 12 avr 2018 [cité 13 juill 2018];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906716/>
48. Hudson CA, Burack WR, Leary PC, Bennett JM. Clinical Utility of Classical and Nonclassical Monocyte Percentage in the Diagnosis of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol [Internet].* [cité 22 août 2018]; Disponible sur: <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/ajcp/advance-article/doi/10.1093/ajcp/aqy054/5049599>
49. Harrington AM, Schelling LA, Ordobazari A, Olteanu H, Hosking PR, Kroft SH. Immunophenotypes of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Subtypes by Flow Cytometry: A Comparison of CMML-1 vs CMML-2, Myeloproliferative vs Dysplastic, De Novo vs Therapy-Related, and CMML-Specific Cytogenetic Risk Subtypes. *Am J Clin Pathol.* août 2016;146(2):170-81.
50. 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.
51. Haute Autorité de Santé - ALD n° 2 - Syndromes myélodysplasiques [Internet]. [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_662211/en/bone-marrow-failures-and-other-chronic-cytopenias-myelodysplastic-syndromes
52. VIDAL Hoptimal [Internet]. [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: <http://svm-hoptimal:8012/showProduct.html?productId=90991>
53. Eissa H, Gooley TA, Sorrow ML, Nguyen F, Scott BL, Doney K, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: Relapse-Free

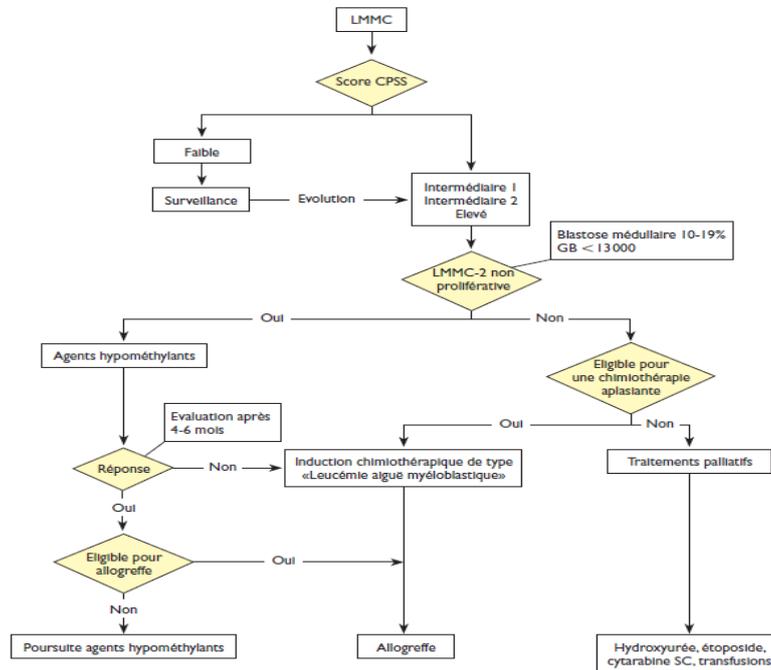
Survival is Determined by Karyotype and Comorbidities. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. juin 2011;17(6):908-15.

54. Park S, Labopin M, Yakoub-Agha I, Delaunay J, Dhedin N, Deconinck E, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Eur J Haematol*. 90(5):355-64.
55. Leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic et thérapeutique - *Revue Médicale Suisse* [Internet]. [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2013/RMS-N-395/Leucemie-myelomonocytaire-chronique-diagnostic-et-therapeutique>
56. Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu RV, Mughal TI, Orazi A, et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood*. 19 mars 2015;125(12):1857-65.
57. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med*. 1 oct 1983;158(4):1092-113.
58. To LB, Levesque J-P, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*. 27 oct 2011;118(17):4530-40.
59. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med*. 1 mai 1993;177(5):1231-7.
60. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, et al. Identification of a Novel Family of Oxidized Phospholipids That Serve as Ligands for the Macrophage Scavenger Receptor CD36. *J Biol Chem*. 11 oct 2002;277(41):38503-16.
61. Giudice ID, Matutes E, Morilla R, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Rafiq F, et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica*. 1 janv 2004;89(3):303-8.
62. Lee K-J, Lee S-H, Yadav BK, Ju H-M, Kim M-S, Park JH, et al. The activation of CD99 inhibits cell-extracellular matrix adhesion by suppressing β 1 integrin affinity. *BMB Rep*. 31 mars 2012;45(3):159-64.

Annexes

Annexe 1. Algorithme thérapeutique proposé pour la prise en charge de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

Hafraoui et al, 2013



Patnaik et al, 2014

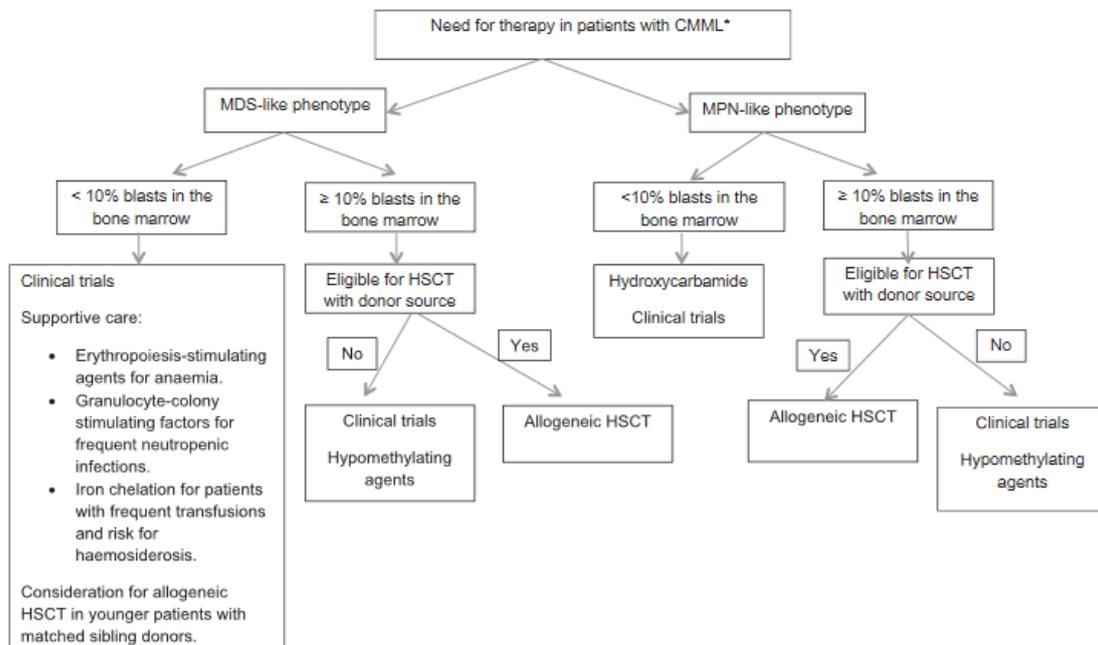


Fig 6. Management algorithm. Our management approach of newly diagnosed patients with chronic myelomonocytic leukaemia. *Need for therapy includes one or more of the following: haemoglobin < 100 g/l, platelet count < $50 \times 10^9/l$, white cell count > $20 \times 10^9/l$, symptoms of organ infiltration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

Annexe 2. Proposition de critères d'évaluation de la réponse aux traitements, adaptés à la LMMC.

Savona et al, 2015

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

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

Annexe 3. Tableau comparatif des patients de chaque cohorte

Patients LMMC

	Cohorte 2018 (n=30)	Cohorte 2017 (n=45)
Age médian en années (min-max)	72 (53-90)	72 (42-91)
Masculin/Féminin	18/12	32/13
Leucocytes en G/L (min-max)	12,65 (3,35-97,44)	12,58 (4,74-52,11)
Leucocytes <13/>13 G/L	19/11	31/14
Hb en g/dL (min-max)	11 (5,7-16,1)	10,95 (6,8-16,9)
Taux plaquettaire en G/L (min-max)	161 (9-322)	159,5 (22-352)
Taux de monocytes en G/L (min-max)	1,9 (0,6-14,2)	1,9 (0,9-18,2)
Taux de monocytes en % (min-max)	15,8 (2-58)	15,85 (6,1-61,8)
LMMC 0/1/2	12/13/5	25/13/7

Patients Non-LMMC

	Cohorte 2018 (n=41)	Cohorte 2017 (n=54)
Age médian en années (min-max)	72 (29-93)	71 (27-89)
Masculin/Féminin	26/15	36/18
Leucocytes en G/L (min-max)	12,58 (2,55-112,26)	12,58 (3,79-718,9)
Leucocytes <13/>13 G/L	24/17	15/39
Hb en g/dL (min-max)	10,9 (6,9-16,6)	10,95 (3,9-17,2)
Taux plaquettaire en G/L (min-max)	159,5 (5-1551)	163 (8-1744)
Taux de monocytes en G/L (min-max)	1,9 (0,9-104,4)	1,9 (0,8-21,6)
Taux de monocytes en % (min-max)	15,70 (2,4-93)	15,85 (2-56)
Réactionnel/hémopathie	26/15	29/25

Tableau 15 : Principales caractéristiques des patients inclut en 2017 et 2018.

Annexe 4. VPP et VPN obtenues avec les différentes populations monocytaires dans les différents groupes de patients.

	Monocytes classiques				Monocytes intermédiaires				Monocytes non classiques			
Cohorte totale n = 170	VP	52	VPP	0,72	VP	47	VPP	0,7	VP	59	VPP	0,76
	FP	20			FP	20			FP	19		
	VN	75	VPN	0,77	VN	75	VPN	0,73	VN	76	VPN	0,83
	FN	23			FN	28			FN	16		
Cohorte SMD n = 89	VP	39	VPP	0,76	VP	32	VPP	0,74	VP	38	VPP	0,83
	FP	12			FP	11			FP	8		
	VN	27	VPN	0,71	VN	28	VPN	0,61	VN	31	VPN	0,72
	FN	11			FN	18			FN	12		
Cohorte SMP n = 81	VP	19	VPP	0,67	VP	15	VPP	0,63	VP	21	VPP	0,6
	FP	9			FP	9			FP	14		
	VN	47	VPN	0,89	VN	47	VPN	0,82	VN	42	VPN	0,91
	FN	6			FN	10			FN	4		

Annexe 5. Liste des 50 gènes les plus exprimés par chacune des 3 sous-populations de monocytes et marqueurs de surface (32).

Table 1. Top 50 genes most highly expressed by the classical monocyte subset sorted by decreasing absolute fold change values

Gene name	Fold change normalized to intermediate*	
	Classic	Nonclassic
S100 calcium binding protein A12 (S100A12)	13.76	-2.35
Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP)	13.27	-2.38
Peptidyl arginine deiminase type IV (PAD14)	10.08	-2.19
Neuregulin 1 (NRG1)	9.94	-1.40
most cell-expressed membrane protein 1 (MCEMP1)	9.93	-2.93
Thrombospondin 1 (THBS1)	9.25	-1.46
Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 (CRISPLD2)	8.79	-1.61
Coagulation factor XIII A1 polypeptide (F13A1)	8.14	-1.53
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1 (MOSC1)	7.81	-1.73
Cytochrome P450 family 27 subfamily A polypeptide 1 (CYP27A1)	7.61	-2.22
CD163 antigen (CD163)	7.42	-3.44
Glutaminy-peptide cyclotransferase (QPCT)	7.31	-2.32
ADAM metallopeptidase domain 19 (ADAM19)	7.28	-1.54
Asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2)	6.82	-1.89
Ribonuclease RNase A family 2 (RNASE2)	6.31	-2.66
Coagulation factor V (proaccelerin labile factor; F5)	5.92	-1.44
Folate receptor 3 (gamma; FOLR3)	5.82	-2.32
Ribonuclease RNase A family 4 (RNASE4)	5.72	-1.58
Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1)	5.70	-2.51
Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 3 (EDG3)	5.57	-1.25
Prokineticin 2 (PROK2)	5.52	-1.87
C-type lectin domain family 4 member D (CLEC4D)	5.42	-1.34
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B; S100A9)	5.38	-2.03
Oncostatin M (OSM)	5.36	-2.27
Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (CSPG2)	5.34	-3.98
Lectin galactoside-binding soluble 2 (GALS2)	5.33	-2.51
Angiogenin ribonuclease RNase A family 5 (ANG)	5.26	-2.14
Vanin 2 (VNN2)	5.21	-1.34
Epstein-Barr virus-induced gene 2 (EBI2)	4.31	-5.13
Urotensin 2 (UTS2)	5.06	-1.75
Ribonuclease P RNA component H1 (RPPH1)	4.76	-1.38
Microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1)	4.75	-1.88
Interleukin 8 (IL-8)	4.74	-1.08
Chemokine C-C motif receptor 2 (CCR2)	4.73	-1.25
Selectin L (SELL)	4.68	-1.84
Dysferlin limb girdle muscular dystrophy 2B (DYSF)	4.58	-1.72
Metallothionein 1F (MT1F)	4.57	-1.36
CD14 antigen (CD14)	4.54	-4.29
Ribonuclease RNase A family k6 (RNASE6)	3.72	-4.44
Colony-stimulating factor 3 receptor (CSF3R)	4.38	-1.62
Stabilin 1 (STAB1)	2.55	-4.35
Cytochrome P450 family 1 subfamily B polypeptide 1 (CYP1B1)	4.31	-1.16
Alcohol dehydrogenase iron containing 1 (ADHFE1)	4.29	-1.15
Phospholipase A2 group VII (PLA2G7)	4.27	-2.98
Matrix metallopeptidase 25 (MMP25)	4.14	-1.30
Zinc finger protein 395 (ZNF395)	4.11	-1.57
Solute carrier family 2 member 3 (SLC2A3)	3.78	-3.96
Early growth response 1 (EGR1)	3.79	-2.26
CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2 (CMTM2)	3.78	-1.15
CD9 antigen p24 (CD9)	2.60	-3.66

*Obtained by calculating the MFI values of classical or nonclassical relative to intermediate.

Table 2. Top 50 genes most highly expressed by the intermediate monocyte subset sorted according to decreasing absolute fold change values

Gene name	Fold change normalized to intermediate*	
	Classic	Nonclassic
GDNF family receptor- α 2 (GFRA2)	-5.25	-2.62
Natural killer cell group 7 sequence (NKG7)	-4.86	-1.03
Plasmalemma vesicle associated protein (PLVAP)	-4.53	-1.28
Placenta-specific B (PLAC8)	-3.35	-1.33
MARCKS-like 1 (MARCKSL1)	-3.23	-1.01
E2F transcription factor 2 (E2F2)	-3.05	-1.22
Quanylate binding protein 4 (GBP4)	-3.03	-1.00
C-type lectin domain family 10 member A (CLEC10A)	-1.48	-2.73
Complement component 1 q subcomponent C chain (C1QC)	-2.72	-1.10
Epithelial V-like antigen 1 (EVA1)	-1.07	-2.67
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK)	-2.65	-1.04
Monoglyceride lipase (MGLL)	-2.59	-1.06
Development and differentiation enhancing factor-like 1 (DDEFL1)	-2.47	-1.00
Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)	-1.68	-2.44
Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3 (NR1H3)	-2.41	-1.57
Fructose-16-bisphosphatase 1 (FBP1)	-2.39	-1.36
Acid phosphatase 2 lysosomal (ACP2)	-2.36	-1.08
Guanylate binding protein 1 interferon-inducible 67kDa (GBP1)	-2.27	-1.26
G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1)	-2.24	-1.20
SAM and SH3 domain containing 1 (SASH1)	-2.24	-1.36
Olfactomedin 1 (OLFM1)	-1.21	-2.20
TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1)	-2.17	-1.08
Major histocompatibility complex class II DO- α (HLA-DOA)	-1.74	-2.15
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I (CAMK1)	-2.14	-1.04
Protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1)	-2.13	-1.02
Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 (EPB41L3)	-2.09	-1.21
H19 imprinted maternally expressed untranslated mRNA (H19)	-2.08	-2.11
Stearoyl-CoA desaturase (SCD)	-1.69	-2.04
Coactosin-like 1 (COTL1)	-2.03	-1.07
Solute carrier family 29 member 1 (SLC29A1)	-2.02	-1.02
DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)	-1.14	-2.01
Transglutaminase 2 (TGM2)	-2.00	-1.67
Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3 (LILRA3)	-1.99	-1.00
Activating transcription factor 5 (ATF5)	-1.48	-1.99
Glycoprotein A33 (GPA33)	-1.98	-1.04
Zinc finger protein 703 (ZNF703)	-1.98	-1.05
Sorting nexin 5 (SNX5)	-1.96	-1.01
C-type lectin domain family 10 member A (CLEC10A)	-1.37	-1.96
Tubulin- α ubiquitous (K-ALPHA-1)	-1.92	-1.17
Major histocompatibility complex class II DP- β 1 (HLA-DPB1)	-1.46	-1.91
Dehydrogenase/reductase member 9 (DHRS9)	-1.41	-1.90
Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2)	-1.89	-1.21
ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1 (RGL1)	-1.89	-1.51
PR domain containing 1 with ZNF domain (PRDM1)	-1.04	-1.89
Fatty acid desaturase 1 (FADS1)	-1.05	-1.88
Solute carrier family 2 member 8 (SLC2A8)	-1.87	-1.22
c-src tyrosine kinase (CSK)	-1.86	-1.08
Isochorismatase domain containing 2 (ISOC2)	-1.82	-1.10
CD300c antigen (CD300C)	-1.81	-1.19
FYVE RhoGEF and PH domain containing 2 (FGD2)	-1.78	-1.04

*Obtained by calculating the MFI values of classical or nonclassical relative to intermediate.

Table 3. Top 50 genes most highly expressed by the nonclassical monocyte subset sorted according to decreasing absolute fold change values

Gene name	Fold change normalized to intermediate*	
	Classic	Nonclassic
Complement component 1 q subcomponent- α polypeptide (C1QA)	-15.64	1.47
Hairy and enhancer of split 4 (HES4)	-14.80	1.58
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C)	-14.06	1.62
Complement component 1 q subcomponent- β polypeptide (C1QB)	-11.56	1.36
ras homolog gene family member C (RHOC)	-8.63	1.25
C-type lectin domain family 4 member F (CLEC4F)	-8.32	1.43
Adenosine deaminase (ADA)	-7.05	1.63
Transgelin (TAGLN)	-6.06	1.60
Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)	-5.96	1.28
CD79B antigen (CD79B)	-5.83	1.77
Cathepsin L (CTSL)	-5.28	1.31
Surfactant pulmonary-associated protein D (SFTPD)	-4.74	2.07
ABI gene family member 3 (ABI3)	-4.65	1.08
SET binding protein 1 (SETBP1)	-4.61	1.47
Fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFR1)	-4.54	1.19
CD79B antigen (CD79B)	-4.31	1.48
Sprouty-related EVH1 domain containing 1 (SPRED1)	-4.23	1.19
Jun dimerization protein p21SNFT (SNFT)	-4.23	1.35
Enah/Vasp-like (EVL)	-4.21	1.12
Metastasis suppressor 1 (MTSS1)	-4.00	1.72
SH2 domain containing 1B (SH2D1B)	-2.38	3.79
Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2)	-3.94	1.42
Nasal embryonic LHRH factor (NELF)	-3.92	1.06
Cbl-interacting protein Sts-1 (STS-1)	-3.83	1.18
Sialic acid binding Ig-like lectin 10 (SIGLEC10)	-3.63	1.46
CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B)	-3.63	1.23
Protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3)	-3.61	1.97
LY6/PLAUR domain containing 2 (LYPD2)	-3.59	5.87
SID1 transmembrane family member 2 (SIDT2)	-3.59	1.26
Insulin-induced gene 1 (INSIG1)	-3.59	1.61
Lymphotoxin- β (LTB)	-3.50	1.27
3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (PAPSS2)	-3.41	1.38
ATP-binding cassette subfamily C member 3 (ABCC3)	-3.41	1.79
Caspase 5 apoptosis-related cysteine peptidase (CASP5)	-3.39	1.65
Vitellogenesis membrane outer layer 1 homolog (chicken; VMO1)	-1.35	3.28
Heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)	-3.27	1.09
Guanine nucleotide binding protein- γ transducing activity polypeptide 2 (GNGT2)	-3.26	1.16
Heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1)	-3.25	1.34
Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog (RRAS)	-3.22	1.21
Ring finger protein 122 (RNF122)	-3.21	1.59
Cadherin-like 23 (CDH23)	-3.20	3.60
Formin-like 2 (FMNL2)	-3.20	1.60
Regulator of G-protein signalling 12 (RGS12)	-3.19	1.29
Secretoglobin family 3A member 1 (SCGB3A1)	-3.17	2.07
fer-1-like 3 myoferlin (C. elegans) (FER1L3)	-3.15	1.11
Calmodulin-like 4 (CALML4)	-3.08	1.12
Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)	-3.07	1.03
Creatine kinase brain (CKB)	-2.22	3.07
Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1)	-3.04	1.30
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3)	-2.99	1.22

*Obtained by calculating the MFI values of classical or nonclassical relative to intermediate.

Table 5. Systematic summary of surface markers that uniquely separates the 3 monocyte subsets

Marker	MFI minus isotype MFI (mean ± SD)			Average fold change			P		
	Classical	Intermediate	Nonclassical	C vs I	C vs N	I vs N	C vs I	C vs N	I vs N
Classical monocyte subset									
CD62L (n = 5)	2715 ± 1555	790 ± 527	605 ± 426	3.4	4.5	1.3	*	*	NS
CD54 (n = 6)	2385 ± 588	5270 ± 1207	4326 ± 1717	-2.2	-1.8	1.2	†	*	NS
CD40 (n = 6)	20 ± 24	126 ± 40	90 ± 45	-6.4	-4.5	1.4	‡	*	NS
CD36 (n = 5)	33 184 ± 13 648	15 853 ± 4591	3244 ± 950	2.1	10.2	4.9	*	‡	NS
CD99 (n = 5)	22 692 ± 6961	8914 ± 3415	1594 ± 1074	2.5	14.2	5.6	†	‡	NS
CCR1 (n = 6)	905 ± 440	355 ± 188	55 ± 63	2.6	16.4	6.4	†	‡	NS
P2XR1 (n = 5)	182 ± 82	847 ± 202	1026 ± 378	-4.7	-5.6	-1.2	†	‡	NS
CCR2 (n = 6)	968 ± 440	36 ± 59	4 ± 7	26.7	230.5	8.6	‡	‡	NS
CLEC4D (n = 7)	1260 ± 778	115 ± 110	6 ± 15	11.0	200.1	18.2	‡	‡	NS
CLEC5A (n = 5)	753 ± 209	217 ± 34	43 ± 23	3.5	17.4	5.0	‡	‡	NS
CXCR1 (n = 6)	159 ± 58	32 ± 18	7 ± 8	5.0	21.5	4.3	‡	‡	NS
CXCR2 (n = 6)	557 ± 239	78 ± 42	23 ± 28	7.1	24.6	3.4	‡	‡	NS
IL13Ra1 (n = 8)	971 ± 647	107 ± 151	39 ± 92	9.1	24.6	2.7	‡	‡	NS
CD64 (n = 4)	2135 ± 449	931 ± 193	236 ± 58	2.3	9.0	3.9	‡	‡	*
Intermediate monocyte subset									
HLA-ABC (n = 6)	29 026 ± 5768	36 894 ± 5088	27 796 ± 3563	-1.3	1.0	1.3	*	NS	*
CLEC10A (n = 6)	9 ± 14	64 ± 40	15 ± 12	-6.9	-1.6	4.3	†	NS	*
GFRA2 (n = 7)	6 ± 10	138 ± 95	37 ± 25	-6.2	-23.0	3.7	†	NS	*
HLA-DR (n = 5)	3916 ± 1363	31 755 ± 9410	12 584 ± 5924	-8.1	-3.2	2.5	‡	NS	†
Nonclassical monocyte subset									
CD163 (n = 5)	4310 ± 2587	4678 ± 2295	632 ± 526	-1.1	6.8	7.4	NS	*	*
CD115 (n = 4)	295 ± 170	470 ± 199	865 ± 187	-1.6	-2.9	-1.8	NS	†	*
CD11b (n = 4)	4043 ± 1197	3617 ± 1365	915 ± 684	1.1	4.4	4.0	NS	†	*
SLAN (n = 5)	32.4 ± 21.0	16.8 ± 17.5	119.0 ± 56.9	1.9	-3.7	-7.1	NS	†	†
CD1d (n = 4)	1072 ± 528	810 ± 297	193 ± 138	1.3	5.5	4.2	NS	‡	†
CCR5 (n = 7)	219 ± 62	249 ± 116	30 ± 47	-1.1	7.3	8.3	NS	‡	‡
CD294 (n = 9)	131 ± 124	207 ± 124	476 ± 147	-1.6	-3.6	-2.3	NS	‡	‡
Siglec10 (n = 9)	76 ± 92	584 ± 340	1615 ± 659	-7.7	-21.3	-2.8	*	‡	‡

C indicates classical monocyte subset; I, intermediate monocyte subset; N, nonclassical monocyte subset; n, the number of individuals tested for each surface marker; and NS, not significant.

*P < .05 (ANOVA and post-hoc Tukey test).

†P < .01 (ANOVA and post-hoc Tukey test).

‡P < .001 (ANOVA and post-hoc Tukey test).

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.

Caractérisation phénotypique des monocytes de patients atteints de LMMC

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie maligne clonale caractérisée par une monocytose supérieure à 1G/L durant plus de 3 mois. Les monocytoses réactionnelles constituent le principal diagnostic différentiel. Dans un premier temps, nous avons étudié par cytométrie en flux la répartition des sous-populations monocytaires classiques (CD14⁺/CD16⁻), intermédiaires (CD14⁺/CD16⁺) et non classiques (CD14⁻/CD16⁺) chez 170 patients. Nous avons défini plusieurs seuils permettant de différencier les patients du groupe LMMC et du groupe non-LMMC. Afin d'améliorer les performances de ce test, nous avons étudié l'expression de 6 nouveaux marqueurs (CD64, CD184, CD9, CD36, CD123, CD99) par les sous-populations monocytaires des groupes LMMC et non-LMMC. Enfin dans une dernière partie, nous avons établi un score-LMMC utilisant différents résultats de la numération/formule sanguine (leucocytes <13 G/L, plaquettes <150 G/L, ratio PNN/monocytes <4) et de la cytométrie en flux (Monocytes classiques > 93% et Monocytes non classiques < 2%). Ce score, de 10 au maximum, permet de classer les patients en 3 groupes distincts. De 0 à 3 : absence d'arguments en faveur d'une LMMC. De 8 à 10 : arguments biologiques en faveur d'une LMMC. Ce score est associé à une valeur prédictive positive de 0,90 et une valeur prédictive négative de 0,93.

Mots-clés : **LMMC, Cytométrie en flux, monocytes, sous-populations, CD14, CD16**

Phenotypical characterization of monocytes from CMML patients

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a clonal malignant hemopathy characterized by a monocytosis over 1G/L lasting for 3 months at least. Reactive monocytosis are the most important differential diagnostic. First, we studied by flow cytometry the distribution of the classical (CD14⁺/CD16⁻), intermediate (CD14⁺/CD16⁺) and non-classical (CD14⁻/CD16⁺) monocyte subsets among 170 patients. We established different cut off values that allow us to classify CMML and non-CMML patients. In order to improve the performances of this test, we studied the expression of 6 new markers (CD64, CD184, CD9, CD36, CD123, CD99) by the monocyte subsets of CMML and control group. Lastly, we have made a CMML score using some complete blood count results (white blood cell count <13G/L, platelet count <150G/L, PNN/Monocytes ratio <4) and some flow cytometry results (Classical monocytes >93% and non-classical monocytes <2%). This score, up to 10, can separate 3 distinct groups of patients. From 0 to 3 : lack of arguments for a CMML. From 8 to 10 : biological argument in favor of a CMML. This score is associated with a positive predictive value of 0,90 and a negative predictive value of 0,93.

Keywords : **CMML, flow cytometry, monocyte, subset, CD14, CD16**

