

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2005

N°26

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE
MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 28 avril 2005

Par **Mme Stéphanie HAINOS-GODON**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 10 septembre 1990 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**LE NOMBRE ET LES FONCTIONS DES BLASTES DANS
LE SANG PERIPHERIQUE PERMETTENT-ILS
D'AIDER AU DIAGNOSTIC DE LA PHASE PRECOCE
DES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES ?**

Président : Mr Jacques Aubry, Professeur d'Immunologie.

Directeur : Mr Franck Geneviève, PH d'Hématologie biologique.

Membres du jury : Mr Charles Foussard, PH d'Hématologie clinique
Mme Mathilde Hunault-Berger, PU-PH d'Hématologie clinique
Mr Marc Zandecki, PU-PH d'Hématologie biologique

INTRODUCTION. BUTS DE L'ETUDE (p.1)

I. GENERALITES (p.3)

1. Epidémiologie (p.4)
2. Physiopathologie (p.4)
3. Classification (p.5)
4. Les anomalies génétiques (p.8)
 - 4.1 Anomalies considérées comme facteur de bon pronostic (p.8)
 - 4.2 Anomalies considérées comme facteur de pronostic intermédiaire (p.8)
 - 4.3 Anomalies considérées comme de mauvais pronostic (p.9)

II. DIAGNOSTIC (p.10)

1. L'hémogramme (p.11)
2. Le myélogramme (p.12)
3. La dysmyélopoïèse (p.13)
4. La biopsie ostéomédullaire (p.14)
5. Le caryotype (p.15)
6. La culture cellulaire (p.15)
7. Autres examens et découvertes d'anomalies biologiques (p.16)
8. Examens nécessaires au diagnostic différentiel (p.17)
9. Difficultés diagnostiques (p.18)

III. NUMERATION DES BLASTES ET EXPRESSION DE L'ANTIGENE CD34 (p.21)

1. Définition de la molécule CD34 (p.22)
2. Intérêt du CD34 (p.22)
3. Différentes techniques de numération des blastes (p.23)
 - 3.1 Numération en microscopie optique (p.23)
 - 3.1.1 Principe (p.23)
 - 3.1.2. Sensibilité de la méthode (p.24)
 - 3.2 Le marquage sur frottis par immunocytochimie (p.24)
 - 3.3 La culture cellulaire (p.25)
 - 3.4 La cytométrie en flux (p.25)
 - 3.4.1. Technique n°1 (selon l'ISHAGE) (p.25)
 - 3.4.1.1. Principe (p.26)
 - 3.4.1.2 Résultats (p.28)
 - 3.4.1.2.1. Dans le sang (p.28)
 - 3.4.1.2.1.1. Nombre de cellules exprimant le CD34 chez le sujet sain (p.28)
 - 3.4.1.2.1.2. Nombre de cellules exprimant le CD34 au cours de diverses hémopathies (p.30)
 - 3.4.1.2.1.3. Nombre de cellules exprimant le CD34 au cours d'autres pathologies (p.31)
 - 3.4.1.2.2. Dans la moelle (p.32)
 - 3.4.1.3. Avantages et inconvénients (p.33)
 - 3.4.2. Technique n°2 (CD45/SSC) (p.33)
 - 3.4.2.1. Principe (p.33)
 - 3.4.2.2. Résultats (p.34)
 - 3.4.2.3. Avantages et inconvénients (p.34)
 - 3.4.3. Technique n°3 (Exclusion des cellules non blastiques) (p.35)
 - 3.4.3.1. Principe (p.35)
 - 3.4.3.2. Avantages et inconvénients (p.35)

IV. IMMUNOPHENOTYPE DES BLASTES (p.37)

V. CULTURE CELLULAIRE DANS LES SYNDROMES MYELODYSPLASIQUES (p.44)

1. Les techniques (p.45)
2. Les résultats (p.46)

VI. MATERIEL ET METHODES (p.49)

1. Les patients (p.50)
 - 1.1 Les critères d'inclusion (p.50)
 - 1.2 Données recueillies (p.51)
 - 1.3 Dossiers exploités et facteurs d'exclusion (p.51)
 - 1.4 Classification (p.52)
2. Les techniques utilisées (p.55)
 - 2.1. Méthode de numération des blastes par microscopie optique (p.55)
 - 2.2. Méthode de numération par cytométrie en flux (p.55)
 - 2.2.1. Recueil du prélèvement (p.55)
 - 2.2.2. Méthodes de numération n°1 et n°2 (p.55)
 - 2.2.3. Méthode de numération n°3 (p.56)
 - 2.3. Phénotypage en CEF (p.57)
 - 2.3.1. Panels d'anticorps retenus (p.57)
 - 2.3.2 Procédure technique (p.58)
 - 2.4. Quantification de fluorescence du CD34 (p.60)
 - 2.4.1. Billes de quantification de la fluorescence (p.60)
 - 2.4.2. Procédure technique (p.60)
 - 2.5. Culture cellulaire (p.61)
 - 2.5.1. Séparation cellulaire (p.61)
 - 2.5.2. Mise en culture (p.62)
 - 2.5.3. Lecture (p.62)
 - 2.5.4. Expression des résultats (p.63)
3. Expression des résultats et statistiques (p.63)

VII. RESULTATS DES METHODES DE NUMERATION (p.65)

1. Les méthodes de numération (p.66)
 - 1.1 Dans le sang (p.66)
 - 1.1.1. Méthode n°1 (p.66)
 - 1.1.2. Méthode n°2 (p.70)
 - 1.1.3. Méthode n°3 (p.74)
 - 1.2. Dans la moelle (p.77)
 - 1.2.1. Méthode de numération n°1 (p.77)
 - 1.2.2. Méthode de numération n°2 (p.78)
2. Comparaison des méthodes de numération (p.81)
 - 2.1. Dans le sang (p.81)
 - 2.2. Dans la moelle (p.82)

VIII. RESULTATS DU PHENOTYPE DES BLASTES (p.84)

1. Dans le sang (p.85)
2. Dans la moelle (p.90)

IX. RESULTATS DE LA QUANTIFICATION DE FLUORESCENCE DE L'ANTIGENE CD34 (p.95)

1. Dans le sang (p.96)
2. Dans la moelle (p.98)

X. RESULTATS DE LA CULTURE (p.101)

1. Dans le sang (p.102)
2. Dans la moelle (p.105)

XI. DISCUSSION (p.108)

1. Numération des blastes (p.109)
2. Le phénotype (p.112)
 - 2.1. Dans le sang (p.112)
 - 2.2. Dans la moelle (p.114)
3. La quantification de fluorescence de l'antigène CD34 (p.115)
4. La culture in vitro des progéniteurs (p.115)
 - 4.1. Dans le sang (p.115)
 - 4.2. Dans la moelle (p.116)
5. Synthèse (p.118)

XII. CONCLUSION (p.120)

BIBLIOGRAPHIE (p.122)

ANNEXES (p.127)

INTRODUCTION

BUTS DE L'ETUDE

Les syndromes myélodysplasiques sont diagnostiqués à l'aide de critères, parmi lesquels l'existence d'une dysplasie morphologique, d'une blastose médullaire, et en fonction du nombre de blastes du sang périphérique et de la moelle osseuse. L'étude cytogénétique conventionnelle complète le diagnostic dans la moitié des cas.

Le diagnostic des syndromes myélodysplasiques n'est pas toujours aisé, surtout quand la dysmyélopoïèse et l'excès de blastes sont absents. Les cytopénies réfractaires simples sont souvent un diagnostic d'exclusion, retenu après une période d'observation (6-12 mois) et l'élimination des diverses autres étiologies des cytopénies.

Nous avons voulu préciser dans la première partie de notre travail, si la numération des blastes ou progéniteurs circulants dans le sang, par des techniques de cytométrie en flux, pouvait être un élément diagnostique afin de différencier les syndromes myélodysplasiques purement cytopéniques (sans excès de blastes) des cytopénies réactionnelles.

Dans la deuxième partie, nous avons comparé les différents profils immunophénotypiques des blastes chez ces mêmes patients et nous avons réalisé une quantification d'expression de l'antigène CD34 sur les blastes sanguins et, quand cela était possible dans la moelle.

Enfin, à l'aide d'une technique de culture *in vitro*, nous avons voulu préciser la qualité de croissance cellulaire des progéniteurs sanguins et médullaires, toujours dans le but de discriminer pathologies réactionnelles ou tumorales.

I. GENERALITES

Les syndromes myélodysplasiques constituent un ensemble de maladies clonales de la cellule souche hématopoïétique. Elles se caractérisent par une prolifération et une différenciation anormales des progéniteurs hématopoïétiques conduisant à une moelle richement cellulaire avec dysplasie des trois lignées myéloïdes (granuleux, érythrocytes et plaquettes). L'hématopoïèse inefficace aboutit aux cytopénies périphériques. L'évolution naturelle se fait vers une transformation en leucémie aiguë myéloblastique ou une insuffisance médullaire.

1. EPIDEMIOLOGIE

Ces désordres apparaissent typiquement chez les personnes âgées (médiane d'âge au diagnostic de 70 ans). L'incidence dans la population générale est estimée à 2,1 à 12,6/100 000/an en Europe; elle augmente à 15 à 50/100 000/an au-delà de 70 ans. 10% seulement des cas observés chez l'adulte surviennent chez l'adulte avant 50 ans (1). Les formes de l'enfant sont très rares.

On note une légère prédominance masculine.

Dans plus de 90% les cas de syndromes myélodysplasiques sont idiopathiques

Chez les agriculteurs, les travailleurs de l'industrie textile, l'exposition aux huiles, solvants ammoniacaux, benzène, pesticides, insecticides, tabagisme semblent être des facteurs de risque de syndrome myélodysplasique primitif (2).

Les SMD peuvent également parfois être secondaires aux radiations ionisantes, radiothérapies et/ou chimiothérapie anti-néoplasiques, au G-CSF, à des maladies hématologiques acquises (aplasie médullaire) ou constitutionnelles (syndrome de Down ou de Fanconi) (3).

2. PHYSIOPATHOLOGIE

Elle est imparfaitement connue : on sait cependant qu'il s'agit d'une maladie clonale touchant une cellule souche myéloïde ou totipotente. Il existe quelques anomalies génétiques récurrentes mais non constantes (del (5q), monosomie 7, trisomie 8), et il en est de même pour

les anomalies moléculaires, en dehors de mutations activatrices des gènes ras (N-ras, K-ras et H-ras) dans 25 à 40% des cas, de mutations ponctuelles du gène p53 et une hyperméthylation du gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine p15(4,5).

Une apoptose excessive est sans doute l'élément majeur des SMD. On peut considérer que les SMD à leur début associent une prolifération excessive et une apoptose accrue à la fois des progéniteurs et des précurseurs. A mesure que les SMD évoluent, l'apoptose excessive des précurseurs persiste alors que celle des progéniteurs diminue, avec pour corollaire une augmentation progressive du pourcentage de blastes médullaires et l'aggravation des cytopénies périphériques. A l'étape ultime, la moelle est riche en blastes peu apoptotiques et en phase de prolifération intense, sans différenciation : c'est le stade de leucémie aiguë terminale (6,7).

3. CLASSIFICATION

La première classification internationale élaborée en 1976 et modifiée en 1982 se base sur les anomalies morphologiques et sur le décompte des différentes populations sanguines et médullaires (8).

Dans le but d'intégrer les données cliniques, étiologiques, cytogénétiques et moléculaires, une nouvelle classification a été proposée, sous l'égide de l'organisation mondiale de la santé (OMS). Elle vise à une meilleure homogénéité des groupes diagnostiques définis, en terme de physiopathologie et de pronostic (1,9,10).

Cf. Tableau 1 : Classification des SMD pour le pronostic et la survie déterminé par les classifications FAB, OMS et IPSS. (1)

Les leucémies myélomonocytaires chroniques (FAB) rejoignent le groupe des syndromes myéloprolifératifs/dysplasiques dans la classification OMS. Par définition, il faut un nombre de monocytes > 1G/l. (11)

Cette classification insiste sur l'importance d'une caractérisation précise des anomalies morphologiques et sur le nombre de lignées atteintes.

Caractéristiques des patients		Classification			
SANG	MOELLE	FAB	OMS	Score	IPSS Caryotype :cytopénies :cytogénétique
Anémie, sans ou avec de rares blastes, sans corps d'Auer.	Dysérythropoïèse uniquement ; <5% blastes ; <15% de sidéroblastes en couronne ; Sans corps d'Auer.	Anémie réfractaire	Anémie réfractaire	0	Caryotype normal Cytopénies : 0/1 Del(5q) Del(20q) -Y
Anémie seule, sans blastes ni corps d'Auer.	Dysérythropoïèse uniquement ; <5% blastes ; >15% de sidéroblastes en couronne ; Sans corps d'Auer	Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne	Anémie réfractaire sidéroblastique idiopathique		
Cytopénies (2 ou 3), sans ou avec de rares blastes, sans corps d'Auer. <1000 monocytes/µl	Dysplasie sur au moins 10% des éléments d'au moins 2 lignées ou similaire à une anémie réfractaire	Anémie réfractaire	Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée		
Cytopénies (2 ou 3), sans ou avec de rares blastes, sans corps d'Auer. <1000 monocytes/µl	Idem et > 15% de sidéroblastes en couronne.	Anémie réfractaire	Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée avec sidéroblastes en couronne		
K1< ;Cytopénies, <5% blastes, sans corps d'Auer. <1000 monocytes/µl	Dysplasie uni ou multi-lignée, 5-9% de blastes, pas de corps d'Auer	Anémie réfractaire avec excès de blastes	Anémie réfractaire avec excès de blastes de type I.	0,5	Intermédiaire
Cytopénies, <5% blastes	Dysplasie uni ou multi-lignée, <10% blastes	Anémie réfractaire avec excès de blastes	Anémie réfractaire avec excès de blastes de type I.	1	Pauvre ; -7 Del(7q) ≥3 anomalies
Cytopénies, 5 à 19% de blastes, corps d'Auer, ±1000 monocytes/µl	Dysplasie uni ou multi-lignée, 10-19% blastes, ± corps d'Auer	Anémie réfractaire avec excès de blastes	Anémie réfractaire avec excès de blastes de type II.	1,5	Pauvre 11-20% blastes
Cytopénies (2 ou 3), sans ou avec de rares blastes, sans corps d'Auer. <1000 monocytes/µl	Dysplasie présente sur une seule lignée, <5% blastes, pas de corps d'Auer.	/	SMD inclassable (SMD-U)		
Anémie, nombre de plaquettes normal ou augmenté, <5% blastes.	Nombre normal ou augmenté de mégacaryocytes, au noyau non lobé, <5% blastes, pas de corps d'Auer	/	SMD associée avec une délétion du 5q		
Cytopénies (Hb<10g/dl, Neutrophiles <1 500/µl, Plaquettes<100 000/µl)				2	Pauvre 21-30% blastes

Tableau 1 : Classification des SMD pour le pronostic et la survie déterminé par les classifications FAB, OMS et IPSS.
(Mufti GJ et coll, 2004)

Noesslinger, Germing et coll. ont évalué la nouvelle classification et étudié l'homogénéité des sous-groupes grâce au score pronostique international (IPSS : International Prognostic Scoring system) (12,13,14). Noesslinger montre une augmentation du nombre de SMD à score faible ou intermédiaire-1 du fait de l'élimination des AREB-t de la nouvelle classification. Cependant il met en exergue l'absence de prise en compte de la dysmyélopoïèse dans le score IPSS, le rendant peu discriminant dans les SMD sans excès de blastes ou avec excès modéré de blastes. Ainsi, Germing et coll., (13) en comparant la nouvelle classification et la survie de 1 600 patients, montrent une différence significative en terme de survie entre AR et CRMD, confirmant l'intérêt de la prise en compte de la dysmyélopoïèse par la classification OMS. En effet, les cytopénies réfractaires touchant plusieurs lignées se trouvent plus fréquemment associées à des anomalies cytogénétiques défavorables. La classification OMS semble donc un meilleur outil prédictif en terme de survie (15). Le score IPSS, utile aux cliniciens en ce qui concerne le traitement devrait donc donner plus de poids à la quantification de la dysmyélopoïèse, ainsi qu'aux anomalies cytogénétiques et moléculaires.

On peut noter qu'il reste la catégorie ouverte pour les SMD inclassables.

Score IPSS (défini au cours du Workshop international analysant les facteurs de risque des SMD (14) :

Nombre de points					
Variable pronostique :	0	0,5	1	1,5	2
Nombre de cytopénies*	0 ou 1	2 ou 3			
% de blastes médullaires	<5	5-10		11-20	21-30
Catégorie cytogénétique**	Favorable	Intermédiaire	Défavorable		

*Cytopénies : Hémoglobine < 10g/dl ; plaquettes < 100 G/l ; neutrophiles < 1,5 G/l

**Cytogénétique favorable : 5q-, 20q-, -Y, caryotype normal ;

Cytogénétique défavorable : anomalies du chromosome 7, caryotype complexe (plus de trois anomalies)

Cytogénétique intermédiaire : autres anomalies.

Il existe quatre groupes, associés à un risque différent à la fois de survie globale et de transformation en leucémie aiguë :

	score	Survie médiane (ans)
Risque faible	0	5,7
Risque intermédiaire I	0,5-1,0	3,5
Risque intermédiaire II	1,5-2,0	1,1
Elevé	≥ 2,5	0,4

4. LES ANOMALIES CYTOGENETIQUES

On distinguera les anomalies considérées comme facteur de bon pronostic par le score IPSS, les anomalies de pronostic intermédiaire et les anomalies de mauvais pronostic (3,14,16,17).

4.1 Anomalies considérées comme facteur de bon pronostic

Trois anomalies cytogénétiques sont reconnues comme facteurs de bon pronostic dans les SMD de novo. Ce sont les délétions partielles du bras long du chromosome 5 et du chromosome 20, ainsi que la perte du chromosome Y, à condition que chacun de ces réarrangements soit observé de manière isolée. Toute association de ces anomalies entre elles ou avec une autre aberration chromosomique supprime le caractère favorable de ces anomalies.

4.2 Anomalies considérées comme facteur de pronostic intermédiaire

Pour faire partie de ce groupe, il faut tout au plus deux aberrations chromosomiques, exception faite de la monosomie 7, qui, même isolée, est considérée comme de mauvais pronostic :

- ⇒ Trisomie 8
- ⇒ Autres trisomies récurrentes : les trisomies 6, 11, 13 et 21
- ⇒ Trisomies partielles pour les bras longs du chromosome 1

- ⇒ Anomalies impliquant le bras court du chromosome 12
- ⇒ Autres délétions partielles : délétion 11q / délétion 13q
- ⇒ Translocations équilibrées : $t(11;16)(q23;p13)$, $inv(11)(p15q22)$, $t(3;5)(q25;q34)$, translocations équilibrées impliquant 3q26 et le locus MDS1/EVI-1
- ⇒ Anomalies du chromosome X

4.3 Anomalies chromosomiques considérées comme de mauvais pronostic

- ⇒ Syndrome 17p- : les délétions du bras court du chromosome 17 sont habituellement associées à une anomalie morphologique des granuleux de type pseudo Pelger-Huet et présence de vacuoles dans les neutrophiles. (18)
- ⇒ Monosomie 7 et délétions partielles du bras long du 7 (7q-) : le risque élevé de transformation leucémique et une survie médiane globalement diminuée qui leur sont habituellement associées font le caractère péjoratif de ces anomalies.
- ⇒ Caryotypes anormaux complexes.

DIAGNOSTIC

II. DIAGNOSTIC (20)

Le diagnostic des syndromes myélodysplasiques a jusqu'à maintenant été posé grâce à l'intégration à la fois de l'évaluation clinique du patient, de l'hémogramme, de la description des anomalies morphologiques du frottis sanguin et du frottis médullaire, parfois de la biopsie ostéo-médullaire, et de la participation de la cytogénétique.

Une clinique peu spécifique, la subtilité et la subjectivité des anomalies morphologiques sur les frottis sanguins et médullaires, la présence d'anomalies génétiques dans seulement 50% des cas, rendent le diagnostic difficile et en particulier à un stade précoce (19).

1. L'hémogramme

Les cytopénies sont fréquentes, isolées ou associées, elles aident en outre à définir des classes pronostiques

- L'anémie : arégénérative, souvent macrocytaire. On peut également rencontrer dans de plus faibles proportions des anémies microcytaires ou présentant une double population d'hématies (l'une microcytaire, l'autre macrocytaire ou normocytaire), une macrocytose isolée.

Parfois quelques érythroblastes circulants.

- Les leucocytes :
 - ◆ Les PNN : neutropénie (<1.5G/l), anomalies morphologiques type dégranulation
 - ◆ Les éosinophiles : anomalies nucléaires et/ou cytoplasmiques dans 10 à 20% des cas
 - ◆ Les basophiles : anomalies morphologiques (granulation de taille réduite), ou de nombre (augmenté dans 5% des cas)
 - ◆ Présence ou non de blastes (1 à 5%)
 - ◆ Monocytose (>1 G/l)
 - ◆ Myélémie possible
 - ◆ Lymphocytes : pas d'anomalie quantitative ou qualitative cependant, il est noté une association privilégiée des syndromes myélodysplasiques et leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) ou lymphomes non Hodgkiniens (LNH) de bas grade

- Les plaquettes :
 - ◆ Nombre augmenté (syndrome 5q-) ou diminué
 - ◆ Thrombopathie (qui explique les saignements quand la numération est peu diminuée)
 - ◆ Dans 10% des cas, présence de quelques micromégacaryocytes ou noyaux nus de mégacaryocytes

2. Le myélogramme

Il est souvent informatif et fait le diagnostic dans deux tiers des cas. Parfois, il est sensiblement normal, surtout au début de la maladie et/ou dans les cytopénies réfractaires simples, et c'est un second examen réalisé quelques mois plus tard qui permettra de conclure. Les anomalies morphologiques sont parfois dissociées des anomalies de l'hémogramme (par exemple, des anomalies morphologiques touchant les mégacaryocytes médullaires sans thrombopénie périphérique).

Cellularité : normale ou augmentée (environ 10% de cas avec myélofibrose).

- Mégacaryocytes : leur nombre est variable, soit diminué en parallèle de la thrombopénie, soit le nombre est normal malgré la thrombopénie.

Dans 10% des cas, ils sont nombreux, en parallèle d'une thrombocytose (permet d'évoquer certaines anomalies cytogénétiques comme le syndrome 5q-).

Il existe divers types d'anomalies morphologiques.

- Blastes : leur nombre est normal (<5%) ou augmenté, jusqu'à 19%, au-delà, pour la classification OMS, il s'agit d'une leucémie aiguë.
- La lignée granulocytaire : plusieurs aspects sont possibles, allant de l'absence de particularité à l'excès de blastes, myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, associé à un défaut des formes matures, qui rend compte de la prolifération excessive des précurseurs précoces et de l'apoptose excessive des formes tardives.

Diverses anomalies morphologiques portant sur le noyau comme sur le cytoplasme peuvent être observées.

- Lignée érythroblastique : parfois quantitativement diminuée (érythroblastopénie), souvent un peu augmentée (30-50%). Une réaction chimique (coloration de Perls ou coloration au bleu

de Prusse qui teinte en bleu-vert les grains de fer ou sidérosomes) recherche la présence de fer dans les érythroblastes et permet la mise en évidence des sidéroblastes en couronne, correspondant à une forme particulière de syndrome myélodysplasique (anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne).

- Autres cellules :
 - ◆ Excès d'histiocytes surchargés en lipofuschines (de couleur variable, parfois bleu de mer)
 - ◆ Plasmocytes : nombre augmenté (5-8%) dans 10% des cas (parfois gammopathie monoclonale de signification indéterminée associée)
 - ◆ On peut observer des lymphocytoses > 20% : association syndrome myélodysplasique-lymphoprolifération de bas grade.

Les anomalies morphologiques jouent également un rôle essentiel dans le diagnostic.

3. La dysmyélopoïèse

Les anomalies morphologiques sont présentes dans environ 60% des syndromes myélodysplasiques, plus rarement dans les anémies réfractaires et les cytopénies réfractaires simples que dans les AREB. C'est la répétition des examens qui permet de confirmer l'apparition d'anomalies morphologiques. On peut observer des anomalies dans le sang, dans la moelle, ou les deux. Certaines anomalies ne sont pas spécifiques des SMD. Il faut que l'anomalie soit nette sur au moins 10% des cellules de la lignée. (OMS)

- La dysérythropoïèse :

On décrira des anomalies nucléaires et des anomalies cytoplasmiques :

- ◆ *Anomalies nucléaires* :
 - Erythroblastes multinucléés.
 - Fragments nucléaires macroblastes, mégalo-blastes.
- ◆ *Anomalies cytoplasmiques* :
 - Aspect feuilleté du cytoplasme
 - Présence de ponctuations basophiles, sidéroblastes en couronne mis en évidence par la coloration de Perls.

Il s'associe souvent à cette dysérythropoïèse une augmentation du pourcentage d'érythroblastes dans la moelle (>30%)

- La dysgranulopoïèse :

- ◆ *Anomalies nucléaires* :

- Hyposegmentation des polynucléaires bilobés (en bissac) ou unilobés (pseudo-Pelger)
- Polynucléaires hypersegmentés beaucoup plus rarement
- Polynucléaires en anneaux
- Condensation anormale de la chromatine

- ◆ *Anomalies cytoplasmiques* :

- Hypogranularité : dégranulation à partir du promyélocyte
- Hypergranularité
- Présence de vacuoles cytoplasmiques
- Persistance de vacuoles cytoplasmiques
- Persistance de la basophilie du cytoplasme dans les formes matures
- Présence de corps d'Auer

- La dysmégacaryopoïèse :

- Mégaloblastes
- Micromégacaryocytes
- Mégacaryocytes bi/trinucléés
- Mégacaryocytes monolobés
- Mégacaryocytes plurinucléés
- Présence d'amas de mégacaryocytes

4. La biopsie ostéomédullaire (BOM)

Dans les cas où l'hémogramme et le myélogramme ne permettent pas de conclure, la biopsie ostéomédullaire prend tout son intérêt (en association avec le caryotype), pour poser un diagnostic.

La BOM est de plus, indispensable en cas de fibrose médullaire, présente dans 15% des cas environ, et en cas d'hypoplasie médullaire rencontrée dans 15 à 20% des SMD.

S'il existe une fibrose médullaire, la biopsie permet d'apprécier son caractère focal ou diffus, l'intensité de cette fibrose, sa qualité essentiellement réticulinique, rarement collagénique, à la différence de la myélofibrose de la splénomégalie myéloïde.

Par ailleurs, seule la biopsie médullaire mettra en évidence une localisation anormale des éléments hématopoïétiques et la présence d'îlots de précurseurs immatures soit en plein espace médullaire soit en position paratrabéculaire d'où ils sont plus difficilement accessibles à la ponction.

5. Le caryotype

Il met en évidence des anomalies évocatrices de SMD. Les anomalies sont classées selon leur valeur pronostique. (cf. I.4. les anomalies cytogénétiques)

Le piège des anomalies cytogénétiques est l'absence de métaphases analysables chez 20% des patients. Par ailleurs 30 à 60% des patients montrent un caryotype normal et de ce fait la cohorte de ces patients est considérée comme ayant un bon pronostic alors qu'ils semblent avoir une espérance de vie variable (21).

6. La culture cellulaire

La culture cellulaire peut se réaliser en milieu liquide, avec les systèmes de culture à long terme pour étudier les progéniteurs et leur microenvironnement, en **milieu semi-solide** - méthyl cellulose ou agar- en **collagène**, comme dans notre étude pour étudier la capacité clonogénique des progéniteurs.

Dans l'étude de la myélopoïèse, on peut estimer quantitativement la capacité des progéniteurs présents dans une aliquotte standardisée, à générer des colonies de cellules granulocytaires, érythrocytaires ou mégacaryocytaires.

Le contraste entre des cytopénies périphériques et une moelle riche qui caractérise les SMD est dû à des troubles de différenciation et de prolifération cellulaire en rapport avec une apoptose augmentée. Ces anomalies se retrouvent en culture in vitro où le nombre de colonies issues de la moelle est diminué, voire absent, et le nombre de colonies abortives peut être un facteur prédictif de la transformation leucémique (22,23).

On obtient dans les SMD 2 types de pousse cellulaire en milieu semi-solide :

- Un mode leucémique : Elle se définit par la formation de micro- ou macro-clusters avec défaut de maturation et/ou par la persistance de cellules blastiques isolées après sept jours de culture. Ces clusters sont rares chez les sujets normaux.
- Un mode non leucémique : Persistance de la formation de colonies. 20 à 30% d'incidence d'évolution leucémique. (24)

Les conditions expérimentales (type de milieu de culture, choix et doses des facteurs de croissance qui maintiennent la croissance cellulaire, variabilité analytique) en faisaient des tests difficilement standardisables.

Actuellement, les milieux commercialisés sont prêts à l'emploi et la standardisation de la lecture s'est développée.

Son intérêt majeur est l'étude de la **fonctionnalité** du progéniteur sous stimulation de facteurs de croissance. C'est une technique dynamique.

7. Autres examens et découverte d'anomalies biologiques

- Bilan martial :

Le fer sérique est normal ou augmenté. La ferritinémie est augmentée chez 25% des patients au diagnostic, et des valeurs très élevées sont fréquentes en cours d'évolution. Témoin d'une érythropoïèse inefficace au départ, la ferritinémie reflète la surcharge progressive en fer au cours du traitement transfusionnel réalisé chez la plupart des patients (une chélation est alors nécessaire).

- Présence de stigmates d'hémolyse, essentiellement une augmentation de la bilirubine libre et des LDH le plus souvent due à une hémolyse intramédullaire, plus exceptionnellement à une hémolyse périphérique soit corpusculaire, soit d'origine auto-immune avec un test de Coombs positif.

- Anomalies de l'hémoglobine, avec augmentation de l'hémoglobine F.

- Perte d'antigènes de groupes sanguins, expliquant les difficultés de groupage érythrocytaire.

- Anomalies des plaquettes avec thrombopathie responsable d'un allongement du temps de saignement ou d'hémorragies muqueuses alors que le chiffre de plaquettes est normal ou seulement modérément diminué ; défaut d'agrégation plaquettaire.
- Signes en rapport avec la dysgranulopoïèse : défaut de phagocytose ou de bactéricidie.
- Signes en rapport avec un état dysimmunitaire : test de Coombs direct positif chez 5% des patients (sans anémie hémolytique), hypergammaglobulinémie : polyclonale dans 20% des cas, monoclonale dans 10% des cas, lymphopénie, déficit en lymphocytes CD4+ ou en cellules NK.
- Augmentation de l'acide urique témoignant de l'hypercatabolisme médullaire.

Aucune de ces anomalies biologiques n'est spécifique des SMD.

8. Examens nécessaires au diagnostic différentiel

Plusieurs situations peuvent se présenter :

- Cytopénie avec présence de blastes sanguins, même en très petit nombre : le myélogramme est informatif et il s'agit soit d'un SMD, soit d'une leucémie aiguë.
- Cytopénie sans blastose sanguine, on réalise alors les bilans suivants :
 - ◆ Dosage de la vitamine B12 et des folates sanguins.
 - ◆ Bilan thyroïdien : une hypothyroïdie peut cependant coexister avec un SMD.
 - ◆ Bilan d'insuffisance rénale : urée, créatininémie
 - ◆ Bilan d'une anémie hémolytique
 - ◆ Recherche d'une prise de médicaments ou de toxiques cytopéniants (éthylisme chronique)

Le myélogramme est ensuite réalisé, qui permet souvent le diagnostic et permet également de compléter le bilan par l'étude cytogénétique à partir de la moelle.

Dans 25% des cas malgré tout, les examens pratiqués ne permettent pas de conclure et une réévaluation après 6 mois est nécessaire.

- L'hémoglobinurie nocturne paroxystique (HNP) qui correspond à une forme rare d'hypoplasie médullaire, aux confins des aplasies médullaires et des SMD, peut être évoquée. On peut aujourd'hui diagnostiquer, grâce à la cytométrie en flux, le clone HNP caractérisé par l'absence des protéines membranaires : CD59 et CD55 sur les leucocytes sanguins.

- On peut rencontrer des difficultés diagnostiques entre l'aplasie médullaire et un syndrome myélodysplasique hypoplasique :

	Aplasia médullaire	SMD hypoplasique
Age	Tous âges	>50ans
Hémogramme	Pancytopénie	Pancytopénie
Dysgranulopoïèse	Non	Parfois
Micromégacaryocytes circulants	Non	Parfois (avec éventuellement anomalies de morphologie des plaquettes)
Hémoglobine F	Parfois	Parfois
Blastes sanguins	Non	Parfois
BOM	Pauvre Disparition du tissu hématopoïétique	Pauvre Petits foyers d'hématopoïèse résiduelle Petits regroupement de cellules immatures en îlots Parfois dysplasie des mégacaryocytes Fibrose possible Sidéroblastes en couronne possibles
Caryotype	Normal (mais difficile +++)	Anomalies fréquentes
Clone HNP	Parfois	Parfois
Clonalité	15% patients clonaux	Majorité sont clonaux
Culture de progéniteurs	Diminution du nombre de progéniteurs	Idem (anomalies qualitatives des colonies)
TNF	Augmenté	Augmenté (alpha)
Pronostic	Mortel sans traitement	Relié à l'IPSS
Evolution en leucémie aiguë	5-10%	25%

9. Difficultés diagnostiques

Le diagnostic de SMD est un processus complexe principalement basé sur les critères morphologiques qui mènent à une classification et à une évaluation pronostique où la cytogénétique joue également un rôle prédominant. Cependant bien que l'examen cytogénétique donne une bonne évaluation du pronostic, les **anomalies caryotypiques ne sont présentes que dans 40 à 60% des cas de myélodysplasies**. Les études moléculaires ont été évaluées en tant que modalité diagnostique mais la fréquence relativement faible des anomalies du génome rend la technique peu applicable. (25)

▪ Le premier problème qui se pose est la difficulté à évaluer chez un certain nombre de patients la morphologie médullaire, soit à cause de l'**hypocellularité**, soit à cause de la **myélofibrose**.

Une moelle hypocellulaire dans la cadre d'une pancytopenie peut être attribuée à une myélodysplasie ou à une aplasie médullaire : la différence entre les deux, basée sur la seule morphologie peut être rendue impossible par une moelle difficile à aspirer et ne ramenant pas un nombre suffisant de cellules pour asseoir le diagnostic. Par ailleurs, la myélofibrose, que l'on peut retrouver dans un certain nombre de désordres aigus ou chroniques, peut masquer les caractères morphologiques spécifiques et transformer le diagnostic en véritable difficulté. (25)

• Le second problème est le **manque de standardisation** des critères morphologiques dont l'évaluation aussi bien qualitative que quantitative est opérateur-dépendante.

A partir de quand parle-t-on de myélodysplasie, combien faut-il compter de cellules dysplasiques par rapport au clone normal 10% (selon l'OMS), 20%, 50% ? (26)

Toutes les anomalies ont-elles la même valeur et comment être objectif quand on parle de cytologie ? (27)

Certains cytologistes prennent en compte uniquement les caractères de dysmyélopoïèse lorsqu'ils atteignent au moins deux lignées cellulaires (érythroblastes, granuleux, monocytes ou mégacaryoblastes) ou excèdent 10% des éléments d'une même lignée, suggérant ainsi qu'une dysmyélopoïèse physiologique peut exister. (28)

En pratique, la reproductibilité inter-observateur pour la reconnaissance de la dysplasie est faible, en particulier dans les SMD de bas grade. Dans une étude menée par Ramos et al, la reconnaissance des blastes et des sidéroblastes en couronne a fait la quasi unanimité entre les 5 cytologistes experts mais les avis sont restés très partagés quant à la dysérythropoïèse ($r=0,27$) ou même la dysgranulopoïèse ($r=0,45$) (27).

Les difficultés proviennent aussi du fait qu'un certain nombre de désordres réactionnels sont associés à des atypies morphologiques, et que des **anomalies morphologiques bénignes peuvent être observées chez des sujets sains avec un hémogramme normal** (27,28).

Des équipes ont tenté de mettre en place des « algorithmes » pour avoir une reproductibilité fiable dans le diagnostic.

G. Flandrin a établi une « grille » des myélodysplasies, en cours d'évaluation et déjà à l'étude pour les LAM (GOELAM)

Devant les difficultés diagnostiques, nous nous sommes intéressés à différentes méthodologies, directement applicables sur le sang circulant ou sur la moelle : la numération des blastes, leur immunophénotype, la culture des progéniteurs.

La numération des blastes sanguins constitue un élément diagnostique et pronostique important au cours des syndromes myélodysplasiques (elle différencie les anémies réfractaires ou les cytopénies réfractaires des AREB) mais qu'en est-il dans les stades précoces ?

Comment définir précisément les blastes sanguins (et médullaires), quantitativement et qualitativement ?

**NUMERATION DES BLASTES
ET EXPRESSION DE
L'ANTIGENE CD34**

III. Numération des blastes et expression de l'antigène CD34

1. Définition de la molécule CD34

C'est une molécule transmembranaire, hautement glycosylée. Elle est présente sur une petite population de cellules médullaires : les blastes, mais aussi les cellules du stroma médullaire et sur les cellules souches endothéliales.

Sa fonction via son ligand CD32L (L-sélectin) serait de jouer un rôle dans les contacts cellulaires leucocytes-cellules endothéliales

Dans les premières études, la présence de cet antigène de surface a été estimé à 1 à 5% en moyenne des cellules de la moelle osseuse normale et à 0,1 à 0.5% des cellules nucléées circulantes, chez le sujet sain (29,30). La réévaluation par des techniques très sensibles montre des valeurs entre 0,6 et 2,8% des cellules de la moelle osseuse (31-34) et 0,02 et 0,12% des cellules nucléées circulantes chez le sujet sain (35-40). La molécule CD34 sert de marqueur pour identifier et séparer les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs puisqu'on ne la trouve pas sur les cellules complètement différenciées ou les précurseurs matures (41).

Sélectionner les cellules exprimant le CD34 revient donc à sélectionner toutes celles qui vont de la cellule pluripotente aux différentes cellules clonogéniques.

2. Intérêt du CD34

L'intérêt pour ce marqueur vient de son utilisation pour quantifier les cellules souches dans un greffon, en culture cellulaire, et comme marqueur dans certaines hémopathies, pour le diagnostic et la classification,(expression dans les LAM avec t(8,21)(42)), parfois comme indicateur pronostique.(ex : dans la LAL-B de l'enfant,la présence du CD34+ est considérée comme de bon pronostic (43), la coexpression avec le CD2 dans les LAM avec inv(16) est également considérée comme de bon pronostic(44)).

Des études ont cependant montré que la véritable cellule souche hématopoïétique qui a la capacité à la fois d'autorenouvellement et de différenciation, est CD34- dans les systèmes murins et humains.(Profil antigénique : CD3 ,CD45, GPA , HLA-DR).(45)

Une étude de Zanjani a par ailleurs montré que la fraction CD34- dans la moelle osseuse humaine normale contient des cellules capables de rétablir l'hématopoïèse et de différenciation en progéniteurs CD34+ et en lignées lymphohématopoïétiques (46,47).

3. Différentes techniques de numération des blastes et résultats de la littérature

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour numérer les blastes :

3.1 Numération en microscopie optique

3.1.1 Principe

La numération en microscopie optique s'appuie sur la morphologie des blastes après coloration des frottis en May-Grünwald-Giemsa (MGG).

- Caractères morphologiques des blastes sanguins (20) :

Le plus souvent leur niveau de différenciation est faible, mais leur morphologie évoque des myéloblastes, souvent dépourvus de granulations (cytochimie de la myéloperoxydase le plus souvent négative), ils peuvent présenter une taille réduite avec un rapport nucléocytoplasmique élevé, ou au contraire un cytoplasme abondant (la cellule émet alors une sorte de prolongement cytoplasmique). Ils peuvent également évoquer des promyélocytes, parfois des micromégacaryocytes.

La présence de cellules évoquant des proérythroblastos est très rare dans le sang périphérique.

- Caractères morphologiques de la blastose médullaire :

Elle est faite soit du même type de blastes que dans le sang, soit elle est plus composite.

3.1.2 Sensibilité de la méthode

Les différences observées dans les décomptes de cellules dépendent non seulement de la distribution due à l'étalement lors de la réalisation du frottis mais aussi de la distribution aléatoire des cellules. Ils représentent de loin, la cause la plus importante de non corrélation entre les différents décomptes.

Les populations de cellules majoritaires suivent pour leur distribution une loi gaussienne, tandis que les populations mineures, comme les blastes, suivent la distribution de Poisson.

Dans le cas particulier des petites populations, si le compte est de 3 pour 100 cellules dénombrées, dans 95 comptes sur 100, la fourchette de cette population variera de 0 à 6%. (48)
Cette méthode est donc peu sensible.

3.2 Le marquage sur frottis par immunocytochimie

L'examen immunocytochimique consiste à révéler sur frottis, par réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires, grâce à une enzyme ou à une substance fluorescente.

L'antigène CD34 n'est pas détruit par les techniques habituelles de fixation, c'est pourquoi on trouve une bonne corrélation entre l'évaluation en cytométrie en flux et l'immunocytochimie sur frottis sanguin (49). Il a donc été utilisé par certains pour mettre en évidence l'antigène CD34 afin d'étudier la survie des patients atteints de syndrome myélodysplasique mais n'a finalement pas été retenu en routine.

On peut y associer un tri immunomagnétique des cellules exprimant le CD34, l'immunocytochimie étant alors utilisée pour vérifier la pureté.

Cependant, le nombre de cellules évaluées reste limité. (50)

Les variations sont importantes selon la durée et le type de fixateur (risque de destruction des antigènes membranaires), la dilution de l'anticorps, le type d'anticorps utilisé (en effet, un même anticorps issu de sociétés différentes ne reconnaît pas le même motif antigénique du récepteur) et le mode de démasquage antigénique (51).

3.3 La culture cellulaire

Chez le sujet sain et au cours des divers protocoles de greffes de progéniteurs, cette méthode est utilisée pour apprécier à la fois le nombre de progéniteurs et la qualité de leur croissance in vitro. Il y a souvent une bonne relation entre le nombre de progéniteurs exprimant le CD34 définis par cytométrie en flux et la culture cellulaire.

Par contre, dans les SMD, comme nous l'avons signalé précédemment (paragraphe II.6.) et nous le reprendrons plus loin (chapitre V), la culture cellulaire va plutôt refléter l'importance des anomalies fonctionnelles plutôt que le nombre de progéniteurs.

3.4 La cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux permet de définir pour chaque cellule de l'échantillon : sa structure, ses propriétés fonctionnelles (plus ou moins globales), et la présence de telle ou telle molécule (utilisation d'anticorps monoclonaux). Par ailleurs, la rapidité de l'analyse (de l'ordre de 10^4 cellules par minute) autorise l'examen d'un nombre de cellules infiniment plus grand que la simple lecture microscopique. Cette augmentation de la taille de l'échantillon étudié ajoute encore à la fiabilité de la méthode et permet de remarquer plus facilement des sous populations très minoritaires.

Elle a donc permis de baisser considérablement le seuil de détection des populations cellulaires minoritaires, à moins de 0.1% de CD34+ dans un échantillon de sang par exemple.

Différentes méthodes de numération des blastes ont été proposées :

3.4.1 Technique n°1 (selon l'ISHAGE) (52)

Méthode de numération basée sur l'expression par les cellules blastiques de l'antigène CD34.

3.4.1.1 Principe

En 1995, l'ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) valide une méthode simple, rapide et sensible pour harmoniser la quantification des cellules exprimant le CD34 dans le sang circulant et les produits d'aphérèse.

Les techniques souffrent jusque là d'un manque de standardisation et de reproductibilité (53,54).

C'est une méthode multiparamétrique utilisant les paramètres morphologiques (SSC : Side Scatter et FSC : Forward Scatter), le CD45-FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) marqueur pan-leucocytaire et le CD34-PE (Phycoérythrine).

Le FSC ou Forward Scatter, défini par une diffusion laser dans l'axe, rend compte de la taille de la cellule.

Le SSC ou Side Scatter, défini par une diffusion laser aux grands angles, est proportionnel à l'hétérogénéité du contenu cellulaire (« granulosité cellulaire »).

Le pourcentage de cellules exprimant le CD34 est obtenu par un fenêtrage séquentiel :

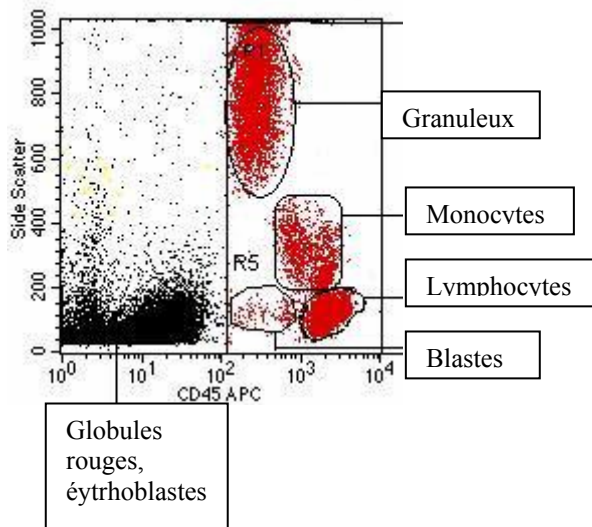
- a) Les leucocytes sont sélectionnés (ils expriment le CD45).
- b) Parmi les leucocytes, on sélectionne les cellules exprimant le CD34.
- c) Les cellules exprimant faiblement le CD45 et ayant une faible granularité sont sélectionnées parmi les événements exprimant le CD34.
- d) Ne sont gardés que les cellules dont la taille est faible à intermédiaire.

La technique doit être réalisée en double et plus de 100 événements doivent être collectés dans la dernière fenêtre pour valider la technique.

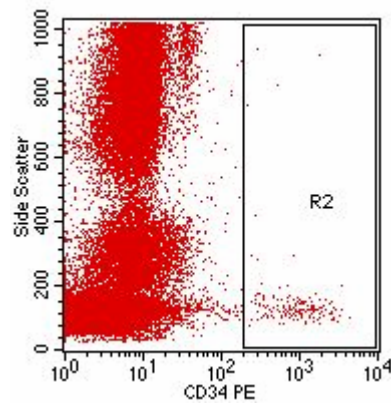
On obtient un pourcentage d'événements exprimant le CD34, et rapporté au nombre des leucocytes, on obtient la valeur absolue des cellules exprimant le CD34.

Graphes des différentes populations en cytométrie en flux et sélection des cellules

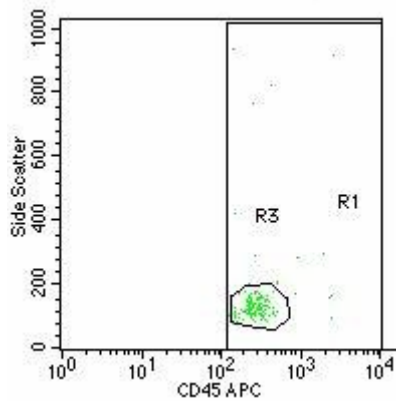
exprimant le CD34 :



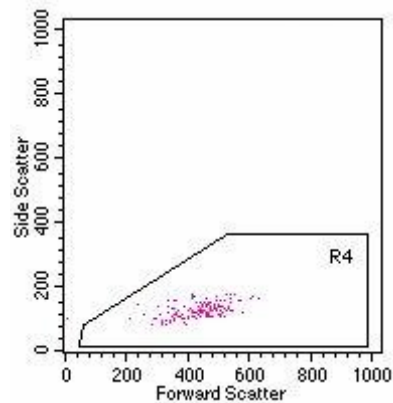
Etape A : sélection des leucocytes (CD45+)



Etape B : Sélection des leucocytes exprimant le CD34



Etape C : Les cellules exprimant faiblement le CD45 et ayant une structure faible sont sélectionnées parmi les événements exprimant le CD34



Etape D : les blastés sont de taille faible à intermédiaire

3.4.1.2 Résultats

3.4.1.2.1 Dans le sang

Une partie de notre travail ayant pour but de comparer le nombre de cellules CD34+ circulantes chez des patients porteurs de syndromes myélodysplasiques avec des malades atteints d'autres pathologies, nous nous sommes donc intéressés aux données de la littérature concernant le nombre de cellules CD34+ circulantes dans diverses situations (sujets sains, hémopathies, cytopénies réactionnelles...) ainsi qu'aux techniques de détermination.

La recherche dans « med-line » trouve de nombreux articles pour le seul mot-clé « CD34+ », concernant essentiellement la mobilisation des cellules CD34+ dans le cadre des greffes de cellules souches.

Il est donc nécessaire d'affiner la recherche par association de mots-clé et il s'avère que peu de publications existent quant à la numération des cellules exprimant le CD34 dans le diagnostic précoce des myélodysplasies.

Par ailleurs, les comparaisons de populations au sein de ces études, concernent les myélodysplasies et les témoins sains sans toutefois comparer avec des populations présentant des cytopénies réactionnelles.

3.4.1.2.1.1 Nombre de cellules exprimant le CD34 chez le sujet sain

Nous n'avons pas retrouvé d'études publiées spécifiquement sur ce sujet. Les données que nous avons pu recueillir sont celles de sujets témoins, reportées au cours d'études évaluant l'intérêt des facteurs de croissance dans la mobilisation des cellules exprimant le CD34, dans le cadre de la thérapie cellulaire ou au cours d'études évaluant le nombre de cellules circulantes exprimant le CD34 dans diverses pathologies.

Les résultats retrouvés sont les suivants :

Auteur	Année	Réf.	Moy(CD34+)	Méthode
Lane	1995	35	0,07 ± 0,05% = 1,6 ± 0,7. 10⁶ /l (n=18,moy d'âge = 28 ans)	Méthode d'enrichissement par billes immunomagnétiques puis CMF avec fenêtrage FSC/SSC
Sutherland	1996	52	0,03 à 0,09 %	Méthode ISHAGE
Barosi	2001	36	0,25.10⁶ /l (n=21)	Méthode ISHAGE
Andreasson	2002	37	1,9± 0.8.10⁶/l (n=10)	Méthode ISHAGE
Mastrandrea	2002	38	0,03% (n=20, moy d'âge = 28,9 ans)	Protocole de Milan partiellement modifié.
Fuchigami	1999	39	0.81± 0.36.10⁶/l (n=36, moy d'âge = 61 ans)	Méthode ISHAGE

Les résultats présentés concernent des sujets sains n'ayant pas reçu de facteurs de croissance. Ces quelques études s'accordent pour dire que le pourcentage de CD34+ circulantes chez les sujets sains est situé entre 0.02 et 0,12%. En valeur absolue, l'échelle de CD34+ se situe entre 0.25 à 2.7.10⁶ /l.

On peut noter l'hétérogénéité dans l'âge de patients et aussi dans les méthodes, même si elles tendent à se standardiser : Certains auteurs comme Lane, utilisent une méthode d'enrichissement par microsphères immunomagnétiques après Ficoll et une fixation des cellules par paraformaldéhyde (35). Il n'analyse que 40 000 cellules en cytométrie. Mastrandrea utilise le protocole dit de Milan, partiellement modifié : élimination des cellules différentes des leucocytes et marquage par le CD34. Comme pour la méthode ISHAGE, il prend en compte les caractères de taille, de structure et la fluorescence du CD34. (38)

Fuchigami, quant à lui, utilise l'iodure de propidium (qui marque l'ADN) pour exclure les débris (39).

C'est Gratama, dans une étude multicentrique en 1997, qui démontre la nécessité d'abandonner les protocoles locaux dans la numération des cellules exprimant le CD34 dans le sang périphérique pour acquérir un langage commun et améliorer la reproductibilité (53).

La méthode de l'ISHAGE, décrite ci-dessus, sera alors adoptée dans la majorité des études.

3.4.1.2.1.2 Nombre de cellules exprimant le CD34 au cours de diverses hémopathies

Auteur	Année	Réf.	Résultats
Barosi	2001	36	<p>SMC (primitive) : n=65, médiane(CD34+) = 301,9.10⁶/l</p> <p>SMC(post-PV ou post-TE) : n=19, méd(CD34+)=147,2.10⁶/l</p> <p>SMC(avec splénectomie) : n=8, méd(CD34+) = 616,0.10⁶/l</p> <p>SMC(sans splénectomie) : n=76, méd(CD34+) = 232,0.10⁶/l</p> <p>SMC(sous chimiothérapie) : n=17, méd(CD34+) = 391,0.10⁶/l</p> <p>SMC(sans chimiothérapie) : n=67, méd(CD34+) = 235,5.10⁶/l</p> <p>Polyglobulies de Vaquez : n=6, méd(CD34+)=5,0.10⁶/l</p> <p>TE : n=6, méd(CD34+) = 6,0. 10⁶/l</p> <p>Désordres myéloprolifératifs atypiques : n=8, méd(CD34+)=5,0.10⁶/l</p>
Andreasson	2002	37	<p>SMC : n=12, moy(CD34+)= 568± 686.10⁶/l</p> <p>Polyglobulies de Vaquez : n=21, moy(CD34+) = 10.2 ±32.10⁶/l</p> <p>TE : n=22, moy(CD34+) = 3 ±3.7.10⁶/l</p>
Fuchigami	1999	39	<p>Aplasies médullaires : 0.39 ±0.76.10⁶/l (n=12)</p> <p>Anémies réfractaires : 0.21± 0.29.10⁶/l (n=27)</p> <p>AREB : 46.54 ±37.10⁶/l (n=6)</p> <p>AREB-t : 57.00 ±52.36.10⁶/l (n=3)</p> <p>LMMC : 3.69 ±4.64.10⁶/l (n=4)</p>

SMC : Splénomégalie myéloïde chronique ; TE : Thrombocytémie Essentielle ;PV :Polyglobulie de Vaquez ; AREB :anémie réfractaire avec excès de blastes ;

AREB-t : anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation.

On note une hétérogénéité importante des résultats concernant les splénomégalias myéloïdes chroniques : cela peut s'expliquer par des populations d'effectifs différents, par les différents stades évolutifs de la maladie, la mise en place de traitements et le type de traitement, bien que Barosi, dans son étude, fasse la différence entre les SMC primitives, post-Vaquez, post-Thrombocytémie essentielle, ayant ou pas une splénectomie, avec ou sans chimiothérapie (36).

Barosi rapporte également son intérêt pour le CD34 comme marqueur de la progression dans la maladie. Il montre que le nombre de cellules exprimant le CD34 dans le sang circulant reflète le nombre de cellules immatures myéloïdes et érythroïdes relarguées dans le sang périphérique, en particulier les myéloblastes. Les patients ayant des blastes sur frottis (en microscopie optique) dans le sang périphérique, ont, en moyenne, 4 fois plus de cellules exprimant le CD34 (en cytométrie en flux) que les patients sans blaste dans le sang

périphérique. C'est en accord avec les données de Fuchigami dans les SMD : il montre que les patients myélodysplasiques ayant plus de 1% de blastes sur le frottis sanguin, ont un taux élevé de cellules exprimant le CD34 ($>10 \cdot 10^6/l$) (39).

Les résultats paraissent plus homogènes dans les polyglobulies de Vaquez ou dans les Thrombocytémies Essentielles.

L'étude de Fuchigami est centrée sur les syndromes myélodysplasiques : il ne retrouve pas de corrélation entre les cellules circulantes exprimant le CD34 et les paramètres hématologiques tels que l'hémoglobine, la numération leucocytaire ou plaquettaire. Par contre, en analyse uni et multivariée, il montre qu'un nombre élevé de cellules exprimant le CD34 ($>1 \cdot 10^6/l$) dans le sang circulant est un facteur de mauvais pronostic (39).

Selon la même étude, la différence entre la moyenne des cellules exprimant le CD34 chez les témoins sains et celle des anémies réfractaires, respectivement $0,81 \cdot 10^6/l$ et $0,21 \cdot 10^6/l$, est significative ($p < 0,001$).

L'aspect structural des cellules exprimant le CD34 varie selon les pathologies : pour les aplasies médullaires, les cellules exprimant le CD34 apparaissent petites (FSC faible), alors que pour les myélodysplasies de « haut grade » (AREB et AREB-t), les cellules exprimant le CD34 semblent de plus grande taille (FSC fort).

Des résultats préliminaires dans la moelle osseuse chez 11 patients présentant une anémie réfractaire montrent une diminution des cellules exprimant le CD34 dans la moelle osseuse et dans le sang : l'auteur émet alors l'hypothèse d'une hématopoïèse déprimée par le clone dysplasique dans la moelle osseuse.

On notera juste que tous les patients ne sont pas au diagnostic, certains sont en cours de traitement, et dans le cas des aplasies médullaires, 3 patients ont été analysés, chacun à 3 reprises, à un mois d'intervalle.

3.4.1.2.1.3 Nombre de cellules exprimant le CD34 au cours d'autres pathologie

Auteur	Année	Réf.	Résultats
Mastrandrea	2002	38	Patients allergiques : Méd(CD34+)=0,25% (n=22)

Dans le registre de l'allergologie, Mastrandrea a comparé le nombre de cellules exprimant le CD34 dans le sang circulant chez des patients présentant des réactions allergiques et chez un groupe de patients sains :

Médiane (CD34+) = 0,25% (n=22)

(Patients sains, n=20, médiane (CD34+) = 0,03% (0,01-0,09%))

Dans le cadre pathologique, le nombre de cellules exprimant le CD34 est significativement plus élevé que dans le groupe de patients témoins.

3.4.1.2.2 Dans la moelle

Auteur	Année	Réf.	Résultats
Karakantza M	1995	40	Témoins sains(n=10) Moy(CD34+)= 2,3±0,34% Aplasie médullaire (n=8) Moy(CD34+)=0,71± 0,15%
Otawa M	2000	31	Témoins sains (n=7) Moy(CD34+)= 0,82 0,24% Aplasie médullaire (n=11) Moy(CD34+)= 0,18 0,14% Anémies réfractaires simples (n=12) Moy(CD34+)= 1,03 1,55%
Del Canizo MC	2003	32	Témoins sains (n=12) Moy(CD34+)= 1± 0,3% SMD tous groupes confondus (n=114) Moy(CD34+)= 3,6 ±5,5%
Micheva I	2004	33	Témoins sains(n=11) Moy(CD34+)= 2,0± 0,8% AR (n=5) Moy(CD34+)= 2,47% ARSI (n=2) Moy(CD34+)= 3,43% AREB (n=5) Moy(CD34+)= 9,54% AREBt (n=2) Moy(CD34+)= 16,65%
Arroyo JL	2004	34	AR (n=41) Méd(%CD34+)= 0,9% (0,1-4,4%) ARSI (n=18) Méd(%CD34+)= 0,7% (0,3-9,3%) AREB (n=8) Méd(%CD34+)= 4% (0,1-12,5%) AREBt (n=10) Méd(%CD34+)= 14% (0-31,5%)

Comme dans le sang, les données recueillies sur le nombre de cellules exprimant le CD34 chez les patients sains dans la moelle osseuse, sont rapportées au cours d'études concernant différentes hémopathies.

Ces quelques études s'accordent pour dire que le pourcentage de cellules exprimant le CD34 se situe entre 0,82 et 2,3%. Les résultats sont homogènes malgré des échantillons dont les effectifs sont faibles.

Les résultats retrouvés pour les aplasies médullaires sont toujours significativement plus faibles par rapport à la population témoin. (31,40).

Dans les syndromes myélodysplasiques précoces (anémies réfractaires simples et ARSI), les valeurs présentées sont proches de celles des valeurs témoins, seuls les groupes des AREB ou AREB-t présentent des valeurs significativement plus élevées par rapport aux témoins.

3.4.1.3 Avantages et inconvénients

Cette procédure présente une grande sensibilité puisqu'elle permet de détecter 1 CD34+ parmi 10 000 événements, une grande spécificité par l'emploi d'anticorps pan-CD45 et pan-CD34 détectant tous les glycoformes CD34, reproductibilité, rapidité et simplicité. (52) Dans une étude mettant en comparaisons différentes techniques de numération des cellules exprimant le CD34, la méthode recommandée par l'ISHAGE présente le plus faible coefficient de variation. (53)

C'est actuellement la méthode de référence pour numérer les cellules souches dans les produits d'aphérèse.

Cependant, la méthode ne permet de numérer que les blastes exprimant le CD34, mais qu'en est-il des blastes qui ne l'expriment pas ?

3.4.2 Technique n°2 (CD45/SSC) (55)

Détermination des cellules blastiques identifiées par les caractères suivants : CD45 faible et SSC faible.

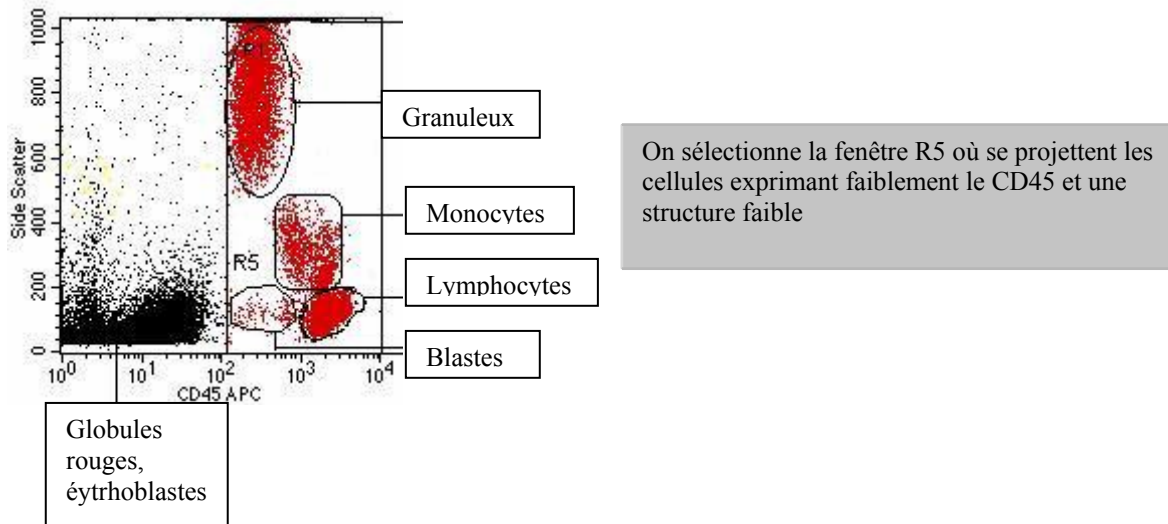
3.4.2.1 Principe

Cette technique, dérivée de la méthode ISHAGE, a été proposée par Lacombe et coll. en 1997, pour mieux cerner le profil immunophénotypique des blastes au cours des leucémies aiguës (55).

Dans un cytogramme biparamétrique CD45/SSC, les blastes se projettent dans une région CD45⁺ faible et SSC faible.

La technique permet de sélectionner les blastes et de limiter les contaminations liées aux cellules normales résiduelles (lymphocytes, granuleux, monocytes, érythroblastes).

Cytogramme biparamétrique CD45/SSC permettant la numération des blastes par la méthode n°2



3.4.2.2 Résultats

C'est la technique de référence dans le phénotype des leucémies aiguës mais elle n'est pas appliquée en routine pour numérer les blastes d'échantillons divers.

Seule l'étude de Lacombe a mis en œuvre cette technique pour numérer les blastes sur des échantillons de moelle osseuse dans le cadre des leucémies aiguës myéloblastiques. (55)

L'étude montre une bonne corrélation pour les différentes populations cellulaires, entre la microscopie optique et la cytométrie en flux.

3.4.2.3 Avantages et Inconvénients

Si pour des blastoses importantes, les méthodes sont bien corrélées (31), en revanche il manque des données pour des blastoses faibles comme dans les syndromes myélodysplasiques. La fenêtre blastique peut être contaminée par des granuleux peu matures ou matures et faiblement granuleux, par des monocytes anormaux, par des hémotogonies ou par les lymphocytes T ou B.

Il manque un paramètre supplémentaire, comme dans la méthode ISHAGE, pour augmenter la sensibilité de détection.

3.4.3 Technique n°3 (Exclusion des cellules non blastiques)

Détermination des cellules blastiques par élimination séquentielle des autres cellules.

3.4.2.1 Principe

Dans le cadre d'une étude sur l'évolution de la blastose périphérique au cours de la phase d'induction thérapeutique dans les LAM, Lacombe et Béné (étude du GEIL en cours) ont proposé un protocole d'étude par cytométrie en flux pour détecter et quantifier la chute du nombre de cellules blastiques.

Pour s'affranchir des inconvénients des autres méthodes, ils ont mis au point une technique basée sur la soustraction séquentielle des cellules non blastiques.

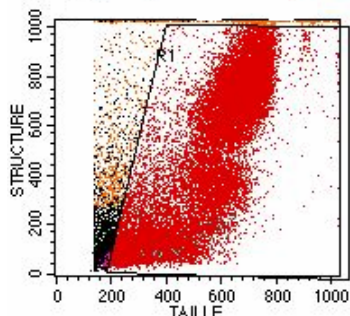
La méthode est basée sur l'analyse d'un échantillon de sang marqué par la combinaison des anticorps monoclonaux suivants : CD14-APC/ CD11b-PE/ CD16-FITC/ CD45-PerCP.

3.4.2.2 Avantages et inconvénients

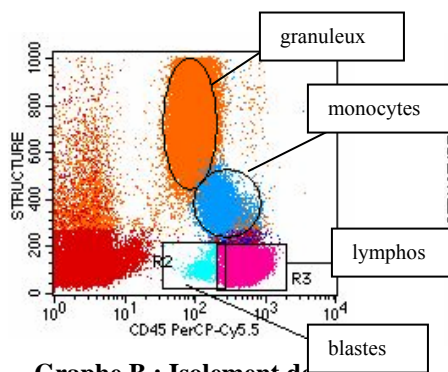
La méthode étant en cours d'évaluation, la sensibilité de la technique reste à déterminer. On peut supposer cependant qu'elle est, par l'importance de l'échantillon analysé en cytométrie en flux, plus sensible que la microscopie optique.

En revanche, les éléments comptés peuvent être contaminés par des éléments non blastiques et il serait intéressant de procéder à une analyse morphologique et fonctionnelles des éléments obtenus dans la fenêtre, grâce à un trieur associé au cytomètre de flux, permettant de récupérer les cellules sélectionnées.

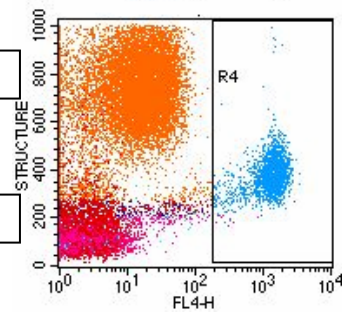
La numération des blastes peut être une première étape dans le diagnostic des syndromes myélodysplasiques, cependant il faut pourvoir déterminer la nature de ces blastes et leur fonctionnalité par l'intermédiaire de leur phénotype mais aussi de la mise en culture de ces cellules.



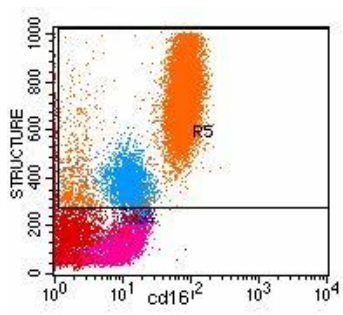
Graph A : Elimination des débris



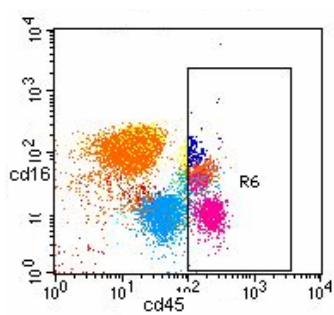
Graph B : Isolement des populations leucocytaires γ compris blastiques



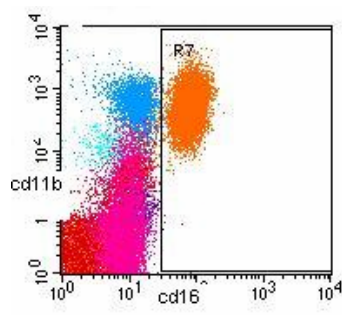
Graph C : Isolement des monocytes matures



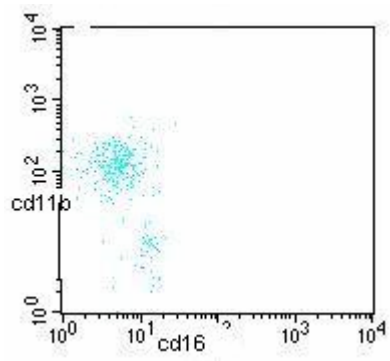
Graph D : Isolement des granuleux matures (CD16+) et immatures (CD16-)



Graph E : Isolement des lymphocytes



Graph F : Caractérisation de la maturité des éléments granuleux



Graph G : Identification des cellules blastiques

Schéma explicatif de la méthode de numération n°3

**IMMUNOPHENOTYPE
DES BLASTES SANGUINS**

IV. IMMUNOPHENOTYPE DES BLASTES

La maîtrise du phénotype des blastes dans les syndromes myélodysplasiques pourrait améliorer, comme dans d'autres pathologies, le diagnostic, le pronostic, ou même l'élaboration d'agents thérapeutiques visant les antigènes de surface. Cependant les données recueillies jusqu'à maintenant ne donnent pas de résultats homogènes. Ceci est certainement lié aux difficultés d'exploitation d'une population mineure que représentent les blastes dans l'échantillon (56). Par ailleurs, l'utilisation du phénotypage dans les syndromes myélodysplasiques manque de standardisation puisqu'on note l'absence de panel d'anticorps clairement défini comme pour les LAM ou les LLC.

Nous nous sommes attachés à retenir les données sur les blastes essentiellement dans le sang, puisque c'est l'approche la plus aisée, en gardant cependant la moelle comme référentiel.

Dans les premières études sur l'immunophénotype dans les syndromes myélodysplasiques, quelques investigateurs décrivent de nombreuses anomalies phénotypiques individuelles, résumées par la suite par Elghetany (49). Ces anomalies concernent l'ensemble des lignées cellulaires. On retiendra pour ce qui concerne les blastes :

a) L'augmentation d'expression d'une glycoprotéine transmembranaire : la glycoprotéine P. L'augmentation de la PGP sur les blastes de la moelle est associée à un phénotype immature ainsi qu'à un risque élevé de transformation en leucémie aiguë (57,58).

b) Expression aberrante du CD56 (marqueur des cellules NK) sur les myéloblastes (59).

Elghetany oppose déjà des réserves quant à la standardisation des méthodes employées :

- La cytochimie par rapport à la cytométrie en flux, même si elles présentent une bonne corrélation, ne présentent pas de résultats identiques.
- Les méthodes de lyse des globules rouges ne sont pas les mêmes.
- L'emploi d'anticorps différents et de marqueurs de fluorescence différents.
- Les méthodes de fenêtrage employées (CD45/SSC par rapport à FSC/SSC).
- La définition des seuils de positivité : certains utilisent des populations témoin, d'autres mettent arbitrairement le seuil à 20%.
- L'expression des résultats : pourcentage de cellules positives ou négatives, l'intensité de fluorescence de patients ou des groupements de patients,...

Bien que tous ces articles suggèrent l'intérêt diagnostique de ces anomalies, elles semblent difficilement applicables en routine.

Orfao (60), dans une autre revue de la littérature, constate également le **manque de standardisation** dans les procédures techniques et dans l'interprétation des données. Il préconise une analyse immunologique des cellules pathologiques dans un échantillon en 3 étapes : **l'attribution de la lignée**, l'analyse du **degré d'hétérogénéité** de la population de cellules anormales attribuable soit à l'existence de clones pathologiques soit à la présence de cellules à différents stades de maturation, et enfin davantage de **caractérisation phénotypique** des cellules pathologiques identifiées.

Plus récemment, quelques publications ont envisagé, de manière plus cohérente et à des fins diagnostiques, le traitement de ces anomalies immunophénotypiques.

La première de ces études a été publiée en 2000 :

Travaillant sur la moelle, et comparant des groupes de témoins sains, d'aplasies médullaires et d'anémies réfractaires, Ottawa constate **l'hétérogénéité** du schéma antigénique des progéniteurs hématopoiétiques (31).

Utilisant un panel plus large d'anticorps pour évaluer la présence d'anomalies phénotypiques sur les populations myéloïdes, érythroblastiques et mégacaryocytaires dans la moelle, Stetler-Stevenson étudie une cohorte de patients souffrant soit de myélodysplasie, soit d'aplasie médullaire et comparée à un groupe témoin (61). Les anomalies (Par exemple : granuleux CD67-, expression d'antigènes non myéloïdes sur des cellules myéloïdes, expression anormale du récepteur à la transferrine (CD71) et asynchronisme d'expression entre le CD45 et la glycophorine A sur les érythroblastes, nombre augmenté de mégacaryocytes détectés par le CD41a et le CD61...) devaient être présentes sur au moins 2 lignées cellulaires pour être compatibles avec une myélodysplasie et 84% des 45 cas de myélodysplasies montraient de telles aberrations.

La cytométrie en flux a permis de poser le diagnostic de myélodysplasie pour 6 des 8 patients pour lesquels la morphologie cellulaire et l'étude cytogénétique ne permettaient pas de

conclure, par la démonstration d'anomalies immunophénotypiques présentes sur deux à trois lignées hématopoïétiques.

Deux études récentes décrivent la relation entre les anomalies immunophénotypiques et le stade de myélodysplasie :

⇒ Ogata et coll., travaillant sur le sang et la moelle, utilise une technique de centrifugation en gradient de densité pour obtenir une préparation enrichie en blastes, suivie d'un passage en cytométrie en flux, à l'aide d'un fenêtrage CD45/SSC pour identifier la population blastique (62). La grande majorité des patients, et quel que soit le sous-type de myélodysplasies, montre pour leurs cellules blastiques un immunophénotype de précurseurs myéloïdes (CD13, CD33, CD34, CD38) avec parfois l'expression d'antigènes aberrants (CD10, CD11b, CD56, comme l'avait déjà décrit Mann (59)). Les blastes des SMD « avancés » (LMMC, AREB, AREB-t et SMD-LA) ont un phénotype plus immature que les blastes des anémies réfractaires ou des anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne. Sur cette population, il décrit également une augmentation de l'expression du CD10 et du CD15 dans les cas de myélodysplasie « de bas grade », alors que l'on retrouvait plus fréquemment l'expression du CD7 et du CD117 dans les myélodysplasies « de haut grade » (AREB et AREB-t). En 2004, il complète cette étude et montre que lorsque le nombre de blastes médullaires augmente, les cas où ils expriment CD7, CD56 et CD117 augmentent et les cas où ils expriment CD10, CD11b et CD15 diminuent (diminution non significative pour le CD15). Il constate également que le phénotype des blastes, pour un même patient, est le même dans le sang et dans la moelle. (63) Ces caractéristiques, en association avec une diminution de la réactivité à la myéloperoxydase en cytochimie (négatif dans 58% des cas), suggèrent que les blastes, dans les syndromes myélodysplasiques « de haut grade », ont un immunophénotype plus immature. Il émet alors l'hypothèse que le clone SMD se montre moins capable de différenciation en cellules matures, ce qui entraîne l'augmentation du pourcentage de blastes.

⇒ Dans une seconde étude, Maynadie, Feuillard et le Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) ont évalué les blastes médullaires de patients atteints de syndromes myélodysplasiques (64). Ils ont évalué le niveau d'expression des antigènes par un ratio de fluorescence (intensité de fluorescence / autofluorescence) et a appliqué un système d'analyse en clusters. Par ailleurs, il a choisi les marqueurs les plus discriminants pour les 2 populations

étudiées : les blastes (CD16, CD34, CD36, CD38, CD71, HLA-DR) et les granuleux (CD11b, CD13, CD33, CD36, CD38, CD71 et HLA-DR).

Sur la population blastique, l'augmentation du CD16 et du CD117 était associée aux LMMC, l'augmentation d'expression du CD34 était associée à une augmentation des blastes et aux anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB ou AREB en transformation). Au final, l'expression du CD34 et du CD36 sur les blastes permettait de définir des sous-groupes associés à un IPSS défavorable et à un risque cytogénétique.

Dans ces 2 dernières études, les populations étudiées n'étaient pas homogènes, et les modifications des profils antigéniques n'ont pas été corrélées avec des profils de maturation normale, rendant ainsi la compréhension des relations entre profils antigéniques et hématopoïèse normale, difficile.

Une autre évaluation sur la moelle conduite par Del Canizo et coll. a comparé les différences entre les populations cellulaires et leur répartition, obtenues à partir de patients sains et de patients atteints de myélodysplasie (32). Dans cette étude, quatre profils antigéniques aberrants ont été décrits dans le cadre des myélodysplasies, dont l'augmentation des cellules CD34+ présentant en coexpression le CD15 mais sans antigène HLA-DR (présent dans 73% des cas chez Del Canizo et 67% chez Arroyo).

Remarque : Ces profils seront repris en 2004 par Arroyo (34) dans le cadre d'une étude sur l'impact pronostique de ces différents immunophénotypes.

La plus complète documentation sur les anomalies immunophénotypiques dans les myélodysplasies a été récemment publiée par Wells et coll. (65). Il décrit une série d'anomalies phénotypiques portant sur les myéloblastes, les formes matures de la lignée myéloïde, et les monocytes dans la moelle chez 115 patients. Pour les anomalies les plus fréquentes relatives aux blastes, on note :

- a) homogénéité antigénique (29% des patients)
- b) expression anormale d'antigènes lymphoïdes tels que CD19, CD5, CD56, CD7 (23% des patients)
- c) Intensité anormale des antigènes myéloïdes (19% des patients)
- d) Diminution du CD45 (16% des patients)

Il a alors élaboré un système complexe de score prenant en compte les anomalies touchant une ou plusieurs lignées, la présence du CD34 ou d'antigènes lymphoïdes sur les formes

matures des lignées myéloïde ou monocyttaire, le pourcentage des myéloblastes anormaux. Les éléments les plus fréquemment rencontrés dans les myélodysplasies et responsables de l'augmentation du score étaient : le pourcentage de blastes anormaux, l'expression asynchrone du CD16, du CD13 ou d'autres antigènes, l'expression du CD56 sur les formes matures myéloïdes ou monocytaires. Ce score donnant une large place au pourcentage de blastes, il n'est pas étonnant qu'il soit bien corrélé à l'IPSS et au pronostic en post-transplantation.

Prises dans leur ensemble, les études citées démontrent que les anomalies phénotypiques sont le lot commun des syndromes myélodysplasiques et sont capables de faire la distinction pour la majorité des patients entre les patients myélodysplasiques et les patients sains.

Cependant, ces études ne répondent pas à une question essentielle du diagnostic concernant la capacité de la technique à distinguer un groupe de patients myélodysplasiques avec un groupe de patients atteints de cytopénies réactionnelles.

Seuls Kussick et Wood ont tenté de corrélérer, pour 170 patients avec cytopénies inexplicées, les anomalies immunophénotypiques avec la cytogénétique et les anomalies morphologiques. (66)

Les patients ont été classés, après cytométrie en flux en normal, anormal ou indéterminé. Le type d'anomalies identifiées étaient comparables à celle décrites précédemment et incluaient également les asynchronismes de maturation antigénique, l'augmentation ou la diminution d'intensité d'expression d'antigènes, l'expression aberrante d'antigènes (antigènes lymphoïdes sur des lignées myéloïdes par exemple).

Sur les 72 cas considérés comme normaux en CMF, aucun ne montrait d'anomalies cytogénétiques ou de morphologie compatible avec une myélodysplasie.

Sur les 70 cas considérés comme anormaux en CMF, 89% montraient des anomalies morphologiques, 10% ne montraient pas d'anomalies caractéristiques et 63% montraient une cytogénétique anormale.

Sur les 28 cas où la CMF n'a pas permis de conclure, la majorité ne présentait pas d'anomalies morphologiques définies (82%), et aucun des cas ne révélait d'anomalies cytogénétiques.

Utilisant en association la morphologie et la cytogénétique pour diagnostiquer les cas de myélodysplasies, 93% des cas considérés comme anormaux en CMF avaient une myélodysplasie tandis qu'aucun des cas considérés comme normaux en CMF n'avaient de myélodysplasie. Ce qu'il faut également noter, c'est que 46% des cas considérés comme anormaux en CMF montraient moins de 5% de blastes et représentaient donc des myélodysplasies de « bas grade », qui sont souvent les plus difficiles à diagnostiquer. Cette étude montre l'intérêt de la cytométrie en flux dans les myélodysplasies.

Toutes ces études montrent l'importance majeure de la standardisation, pour le type de population étudiée (les blastes, les granuleux, les monocytes...), pour le choix des patients à inclure (patients au diagnostic, sous traitement, présentant un SMD primaire ou secondaire...), pour le panel d'anticorps sélectionnés.

Malgré un large panel d'anticorps utilisé, les différentes études n'ont pas retrouvé de profil immunophénotypique caractérisant les syndromes myélodysplasiques, voire les sous-types de myélodysplasies.

Une seule étude prend en compte des pathologies réactionnelles pour comparer leur phénotype avec celui des myélodysplasies.

C'est une approche difficile où le nombre d'événements est faible et les pathologies réactionnelles sont nombreuses et variées.

L'étude qualitative des blastes circulants se poursuit par leur mise en culture. La culture cellulaire donne un point de vue fonctionnel.

La littérature propose différentes techniques et différents schémas de croissance au sein des myélodysplasies.

**CULTURE CELLULAIRE
DANS LES SYNDROMES
MYELOYDYSPLASIQUES**

V. Culture cellulaire dans les syndromes myélodysplasiques

1. Les techniques

L'hématopoïèse dans les SMD est en partie analysée grâce aux tests clonogéniques in vitro :

⇒ **soit en milieu semi-solide** : agar ou méthyl-cellulose auxquels sont rajoutés des facteurs de croissance. Habituellement c'est un nombre fixe de cellules mononucléées qui est mis en culture.

⇒ **soit en collagène** : c'est un milieu commercialisé contenant une quantité et une qualité constante de facteurs de croissance. La lecture de gels transférés sur lame puis colorés par May-Grünwald-Giemsa s'effectue à J7 et J14 pour les CFU-GM, CFU-E et BFU-E et à J10 pour les CFU-Mk.

Nous avons choisi de mettre en culture en milieu collagène un nombre fixe de cellules exprimant le CD34 :

La technique est validée dans le cadre du contrôle de qualité des greffons.

Il a été démontré qu'un nombre fixe de cellules mononucléées amène un nombre variable de cellules exprimant le CD34 mis en culture, ce qui affecte fortement la croissance des CFU-GM (ratio CD34+/CD34-). Par ailleurs, la capacité à générer des CFU-GM lorsqu'il y a plus de 2% de cellules exprimant le CD34 dans l'échantillon mis en culture est altérée. Un nombre fixe de cellules exprimant le CD34 (200/ml) réduit les différences relatives à la pathologie en ce qui concerne la capacité à former des colonies. La numération est facilitée ainsi que la standardisation de la technique et de la lecture des colonies, grâce à la coloration des gels de collagène (67).

L'intérêt du collagène réside dans :

- La **conservation** des gels et donc la **traçabilité** du résultat.
- La possibilité **d'échanger les lames** avec d'autres laboratoires pour effectuer des contrôles de qualité de lecture.
- Le séchage des gels et leur congélation à -20°C, ce qui permet des **colorations à posteriori** en cytochimie, en immunocytochimie ou en hybridation in situ.

2. Les résultats

Bien que les SMD soient typiquement associés avec une cellularité augmentée de la moelle osseuse, la capacité à développer des colonies à partir des progéniteurs hématopoïétiques, incluant les CFU-GM, CFU-E, CFU-MK, CFU-GEMM et BFU-E, est diminuée voire absente chez la majorité des patients (55-65%). Ce déficit de croissance augmente avec la sévérité du score FAB. (68)

C'est ce qui explique la coexistence de cytopénies périphériques et d'une moelle de cellularité normale ou même souvent augmentée.

La plupart des auteurs ont reporté des études sur la croissance des CFU-GM : chez environ 50 à 90% des patients SMD, le nombre de CFU-GM est réduit.(69)D'autre part, les CFU-GM dans les SMD montrent souvent des anomalies fonctionnelles retrouvées dans les LAM. (70)

On peut faire la distinction entre schémas leucémique et non-leucémique de croissance des CFU-GM :

➤ La croissance de type leucémique inclut la formation de micro ou macro-clusters avec une maturation anormale des blastes au sein d'agrégats, des blastes persistants isolés ou l'élaboration de très petites formations avec moins de 2 colonies pour 100 000 cellules. Ces colonies sont rarement présentes chez les sujets normaux, alors qu'elles résultent chez les sujets en transformation leucémique de la présence de cellules blastiques en cycle.

(La croissance des colonies blastiques est rare en culture car l'adhérence et la réception des signaux de croissance sont diminués)

➤ La croissance non-leucémique est caractérisée par la formation persistante de colonies.

A cause des différentes techniques de culture utilisées, la sélection des patients, la taille des échantillons, la nature des échantillons, la comparaison directe entre les différentes études est souvent difficile :

On retrouve des données conflictuelles sur l'impact pronostique et la valeur de la distinction leucémique et non-leucémique. Pendant que certains auteurs ne retrouvent pas de différences sur le pronostic, d'autres montrent que le schéma de croissance leucémique est prédictif d'une survie réduite et d'un risque augmenté de transformation en LAM (22,23).Tricot et coll. soulignent que la culture de moelle in vitro a une valeur pronostique limitée à cause de la

grande variabilité de croissance des colonies et les frontières très ténues des résultats entre les patients sains et les patients présentant un SMD. D'autres études montrent une corrélation étroite entre les résultats de la culture de moelle in vitro, la proportion de blastes médullaires et la classification FAB : la croissance de type leucémique étant plus fréquente chez les patients avec un stade avancé de SMD par rapport aux patients présentant un sous-type FAB de bon pronostic. (71)

De plus, le schéma de croissance anormale dans la moelle du CFU-GM a été corrélé avec des résultats de cytogénétiques anormaux. (22)

En parallèle, des investigations sur les BFU-E et CFU - MK dans les SMD sont menées : Les différents schémas de croissance à partir d'échantillons de moelle sur méthyl-cellulose ont été comparés : la culture des lignées érythroïdes et mégakaryocytaires ne contribuent pas de façon significative au pronostic déjà obtenu avec les cultures de CFU-GM. (72)

Plus récemment, des cultures à long terme ont été effectuées pour examiner le comportement prolifératif des cellules souches hématopoïétiques ainsi que pour analyser la fonction des cellules stromales dans les SMD. Dans quelques cas, ces techniques ont permis de détecter de nouvelles anomalies cytogénétiques ou moléculaires, qui, compte tenu de la petite taille du clone n'aurait pas pu être détectées par un échantillon conventionnel de moelle osseuse. Il a été suggéré que de telles découvertes avaient un intérêt pronostique (73).

Comme dans les techniques d'immunophénotypage, la nécessité de standardiser les techniques s'est fait ressentir. La culture en méthyl-cellulose ne permet pas toujours de répondre à ces attentes. La culture en collagène, avec un nombre fixe de cellules CD34+ mises en culture permet d'améliorer la standardisation. Mais rares sont les études dans les SMD utilisant ce procédé :

Nous n'avons retrouvé qu'une étude sur la croissance des CFU-MK dans les SMD (n=6) et chez des témoins sains (n=13) à partir de la moelle :

Chez les patients sains, on trouve en moyenne: CFU-MK = 107 ± 53 , (16-180).

Chez les patients SMD: on trouve en moyenne: CFU-MK = 64 ± 74 , (0-156).

Il n'a pas été retrouvé de différences significatives avec les donneurs sains. (68)

Toutes ces études soulignent le caractère primordial des conditions techniques.

Compte tenu de l'ensemble de ces données, notre travail a consisté à appliquer différentes **techniques de cytométrie en flux pour numérer** de la façon la plus précise possible les **blastés** dans le sang circulant, et lorsque cela était possible dans la moelle, pour des témoins sains, des patients présentant des pathologies réactionnelles et des patients présentant un syndrome myélodysplasique.

La deuxième partie de notre travail s'est également appuyée sur une **technique de cytométrie en flux pour phénotyper** les **blastés** dans le sang et dans la moelle, et pour quantifier la fluorescence du CD34. Nous avons ainsi tenté de dégager un éventuel profil particulier des blastés dans diverses situations.

La troisième partie de notre travail a consisté en la **mise en culture** des différents échantillons de sang et parfois de moelle lorsqu'elle était disponible. Le choix du milieu s'est porté sur le collagène avec l'appui d'une technique déjà bien maîtrisée au laboratoire de culture cellulaire au CHU d'Angers. Nous avons étudié les caractères fonctionnels des blastés et tenté de mettre en évidence des profils particuliers de croissance selon les pathologies.

**MATERIELS ET
METHODES**

VI. Matériel et méthodes

1. Les patients

Les analyses ont concerné 101 patients entre mai 2003 et septembre 2004. Nous avons effectué 101 analyses sur le sang et 43 sur la moelle.

1.1 Les critères d'inclusion

⇒ Les témoins :

Patients hospitalisés au CHU d'Angers, sans hémopathie connue, ne présentant pas de cytopénies périphériques. (Services d'orthopédie, de gériatrie, de cardiologie, de moyen séjour).

Nous avons choisi des patients dans une tranche d'âge correspondant à celle des patients atteints de myélodysplasie (56 à 83 ans).

Nous avons analysé 8 échantillons-patients : 7 échantillons de sang et 3 échantillons de moelle. (Seuls 2 échantillons de moelle et de sang ont pu être analysés en parallèle).

⇒ Les autres patients :

Nous avons sélectionné les patients sur des critères qui pourraient évoquer un syndrome méylodysplasique afin d'orienter précocement le diagnostic :

- Cytopénie(s) isolée(s) ou associée(s) : anémie, neutropénie, thrombopénie
- Macrocytose érythrocytaire (VGM>100)
- Monocytose (>1G/l)
- Thrombocytose modérée (en effet, certains syndromes myélodysplasiques comme les syndromes 5q-, présentent des thrombocytoses modérées)
- Signes de dysplasie à la lecture du frottis sanguin : dégranulation des polynucléaires neutrophiles, hyposégmentation du noyau des polynucléaires neutrophiles, double population érythrocytaire...

Nous avons également étudié les patients présentant une suspicion de syndrome myélodysplasique et en consultation dans le service d'Hématologie clinique au CHU d'Angers.

1.2 Données recueillies

Différentes données cliniques et biologiques ont été réunies, après consultation des dossiers patients dans les différents services du CHU d'Angers :

- ⇒ Sur le plan clinique : âge, sexe, diagnostic, antécédents, traitements.
- ⇒ Date de réalisation des techniques
- ⇒ Sur le plan biologique : données de l'hémogramme (hémoglobine, VGM, plaquettes, leucocytes, polynucléaires neutrophiles, monocytes, blastes circulants, atypies morphologiques), données du myélogramme (nombre de blastes, atypies morphologiques, classement), réticulocytes, dosages de la vitamine B12, des folates sériques et globulaires, caryotype lorsqu'il était effectué.
- ⇒ Résultats de la biopsie ostéo-médullaire lorsqu'elle était réalisée.

1.3 Dossiers exploités et facteurs d'exclusion

64 dossiers sur les 101 sont exploitables (64 échantillons de sang et 28 échantillons de moelle) :

Pour 18 dossiers un diagnostic n'a pu être posé.

Les 19 autres dossiers n'ont pu être exploités pour les raisons suivantes : technique de cytométrie en flux non validée (moins de 100 événements collectés dans la fenêtre CD34+/SSC faible), des LMMC versant myéloprolifératif (classification OMS), des syndromes myélodysplasiques en transformation ou en cours de traitement, des splénomégalies myéloïdes chroniques, des leucémies à tricholeucocytes, des rechutes de cancer, des dossiers complexes ne nous permettant pas de dégager une étiologie unique.

La nécessité de techniquer rapidement le prélèvement de sang ne nous permet pas toujours d'attendre le diagnostic précis et nous amène alors à analyser l'échantillon « en aveugle », ce qui explique le nombre de dossiers non exploitables.

La technique de numération n°3 n'a été introduite qu'à partir d'août 2003 et n'a été réalisée que sur le sang. Elle n'a donc pas concerné l'ensemble des échantillons.

De même, l'immunophénotype et la quantification de fluorescence pour le CD34 par la technique des billes n'ont été introduits qu'à partir de la mi-juin 2003.

1.4 Classification

Les patients ont été classés, devant l'ensemble des données rassemblées, en :

- ⇒ **Cytopénies réactionnelles**, comprenant : : Les anémies macrocytaires de l'éthylique chronique, les anémies dues à une insuffisance rénale, les anémies et thrombopénies post-opératoires ou sépticémiques, les carences vitaminiques, les neutropénies constitutionnelles ou de margination, les thrombopénies périphériques.
- ⇒ Les **thrombocytoses et monocytoses réactionnelles** (pour pouvoir comparer à certains syndromes myélodysplasiques comme les syndromes 5q- présentant une thrombocytose modérée ou aux LMMC versant myélodysplasique).

Les **syndromes myélodysplasiques** classés selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : CRDM : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multi-lignées ; ARSI : Anémie Réfractaire Sidéroblastique Idiopathique ; AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes (de type 1 ou 2) ; LMMC : Leucémie Myélomonocytaire Chronique versant myélodysplasique.

Cf. **Tableau 2 : Analyse d'échantillons sanguins et techniques mises en œuvre.**

Cf. **Tableau 3 : Analyse d'échantillons médullaires et techniques mises en œuvre.**

Tableau 2 : Analyse d'échantillons sanguins et techniques mises en œuvre.

	Nombre de patients	Hommes	Femmes	Moyenne d'âge	Témoins sains	Cytopénies réactionnelles	Thrombocytoses ou monocytoses réac.	CRDM	ARSI	AREB-1	AREB-2	Syndrome 5q-	LMMC versant dysplasique
Méthodes de numération n°1 et 2	64	33	31	67 ans	7	24	3	12	6	4	1	2	5
Méthode de numération n°3	32	17	15	64 ans	2	6	1	8	6	3	1	2	3
Immunophénotype	41	25	16	67 ans	10	9	1	10	6	3	1	2	4
Quantification CD34	46	24	22	66 ans	5	13	1	12	6	4	1	2	4
Culture cellulaire	30	17	13	65 ans	2	5	1	9	6	3	1	0	3

Parmi les cytopénies réactionnelles :	Anémies macrocytaires de l'éthylique chronique	Anémies dues à une insuffisance rénale	Post-opératoires ou états septiques	Carences vitaminiques	Neutropénies constitutionnelles ou de margination	Thrombopénies périphériques
Méthodes de numération n°1 et 2	6	2	4	4	4	4
Méthode de numération n°3	0	1	0	0	3	2
Immunophénotype	1	1	0	1	4	2
Quantification CD34	1	1	1	4	4	2
Culture cellulaire	0	0	0	1	3	1

Tableau 3 : Analyse d'échantillons médullaires et techniques mises en œuvre

	Nombre de patients	Hommes	Femmes	Moyenne d'âge	Témoins sains	Cytopénies réactionnelles	Monocytozes réactionnelles	CRDM	ARSI	AREB-1	AREB-2	Syndrome 5q-	LMMC versant dysplasique
Méthodes de numération n°1 et 2	28	16	12	63 ans	3	6	1	8	5	1	1	1	2
Immunophénotype	26	15	11	62 ans	3	4	1	8	4	1	1	1	2
Quantification CD34	28	15	13	62 ans	3	6	1	8	5	1	1	1	2
Culture cellulaire	33	20	13	60 ans	8	6	1	6	5	2	1	0	4

*Parmi les cytopénies réactionnelles, on compte 4 neutropénies constitutionnelles ou de margination, 1 thrombopénie périphérique et une anémie réactionnelle qui ont été analysées ensemble

2. Les techniques utilisées

2.1 Méthode de numération des blastes par microscopie optique

Chaque échantillon de sang a bénéficié d'une numération globulaire sur automate Advia® (Bayer) et d'un frottis sanguin, coloré au May-Grünwald-Giemsa, avec la réalisation d'une formule leucocytaire sur au moins 200 cellules ainsi que la recherche d'atypies morphologiques.

Les résultats sont rendus en pourcentage et en valeur absolue.

Chaque prélèvement médullaire a bénéficié d'une numération des éléments nucléés sur automate Advia® et de la réalisation d'un frottis coloré au May-Grünwald-Giemsa ainsi qu'une coloration de Perls. Le myélogramme a été réalisé sur 200 à 500 cellules.

Les résultats sont rendus uniquement en pourcentage.

2.2 Méthode de numération par cytométrie en flux

2.2.1. Recueil du prélèvement

- Sang périphérique : sang total prélevé sur tube EDTA
- Moelle osseuse : Moelle totale prélevée sur tube hépariné (héparinate de lithium)

2.2.2. Méthodes de numération n°1 et n°2

Ces deux méthodes peuvent être menées en parallèle :

Pour la méthode n°1 selon l'ISHAGE, on ne retient que les cellules exprimant le CD34 et correspondant aux critères blastiques, pour la méthode n°2 selon Lacombe, on ne retient que les cellules se projetant dans la 1^{ère} fenêtre, CD45 faible et SSC faible.

- On prévoit 2 tubes par échantillon (sang ou moelle)

-Marquage par des anticorps CD45-FITC et CD34-PE, qui détectent tous les glycoformes du CD34.

-Utilisation d'un isotype-PE de contrôle

-Dans chaque tube, on rajoute de 100 à 200 µl de sang, ou moins de 100µl de moelle osseuse, de sorte que l'on obtienne de 500 000 à 1 million de cellules nucléées pour chaque tube.

1 ^{er} tube (tube contrôle)	10 µl d'igG PE	5 µl de CD45 APC	Echantillon : 200µl
2 ^{ème} tube	10 µl de CD34 PE	5 µl de CD45 APC	Echantillon : 200µl

-15 minutes à 22°C à l'obscurité.

Lyse des érythrocytes : **Cf. annexe 1**

- Passage sur l'analyseur FACScalibur® (Becton-Dickinson) qui permet d'utiliser une technique de cytométrie en flux **4 couleurs** et analyse par le logiciel CellQuestPro® (BD).

Les cellules isolées sont CD34+, CD45 faiblement positives et SSC faible.

Technique de fenêtrage : **Cf. annexe 2**

- On peut en déduire le nombre absolu de cellules (CD45 faible/SSC faible)/µl et le nombre absolu de cellules exprimant le CD34/µl en rapportant au nombre de leucocytes de chaque patient.

Les valeurs (pourcentages et valeurs absolues) du nombre de cellules exprimant le CD34 sont retenues comme résultats de la 1^{ère} méthode.

Les valeurs (pourcentages et valeurs absolues) du nombre de cellules ayant les caractéristiques CD45 faible/SSC faible sont retenues comme résultats de la 2^{ème} méthode.

2.2.3 Méthode de numération n°3

- On prévoit un tube par échantillon contenant :

CD16 FITC (10µl)/CD11b PE (10µl)/CD45 PERCP (10µl)/CD14 APC (10µl).

- **CD16** : cellules T, NK et lignée myéloïde
- **CD14** : lignée monocyttaire
- **CD11b** : cellules NK, monocytes, granuleux

Dans chaque tube, on rajoute de 100 à 200 µl de sang, de sorte que l'on obtienne de 500 000 à 1 million de cellules nucléées pour chaque tube et on procède à la lyse des érythrocytes (Cf. **annexe 1**)

- Passage sur l'analyseur FACScalibur et analyse par le logiciel CellQuestPro.

- Méthode de fenêtrage : **Cf. annexe 3**
- On obtient un pourcentage de blastes par le logiciel CellQuestPro, qui nous permet d'obtenir, en le rapportant au nombre absolu de leucocytes, un nombre de blastes par μl .
Le nombre de « blastes », en valeur absolue, sera le résultat de la méthode n°3.

2.3 Phénotypage en cytométrie en flux

2.3.1 Panel d'anticorps retenus

	FITC(10μl)	PE(10μl)	PERCP CY5.5(10μl)	APC(5μl)
1^{er} tube	IgG contrôle	IgG contrôle	IgG contrôle	CD45
2^{ème} tube	CD61	/	CD34	CD45
3^{ème} tube	CD38	CD71	CD34	CD45
4^{ème} tube	CD36	GPA	CD34	CD45
5^{ème} tube	CD16	CD13	CD3	CD45
6^{ème} tube	CD15	CD10	CD19	CD45
7^{ème} tube	HLA-DR	CD117	CD33	CD45

Choix des Anticorps :

Il se justifie par l'étude de la littérature et en particulier l'article de Maynadié et coll. (64). La combinaison des anticorps est également utilisée dans le protocole établi en 2002, dans le cadre d'une étude multicentrique, par Jean Feuillard (protocole de consensus pour l'étude immunophénotypique des syndromes myélodysplasiques du GEIL et du GFM).

Les marqueurs choisis couvrent par ailleurs l'ensemble des lignées :

- **CD45** est un marqueur panleucocytaire exprimé faiblement mais de façon stable sur les progéniteurs hématopoïétiques.
- **CD34** marque les cellules souches hématopoïétiques à la fois des lignées lymphoïde et myéloïde.
- **HLA-DR, CD117** et **CD38** progéniteurs hématopoïétiques.
- **CD33, CD13** et **CD15**: marqueurs de la lignée myéloïde et monocytoïde.
- **CD19** marqueur lymphoïde B.

- **CD10** cellules B précoces et centrofoliculaires. On trouve également le CD10 sur les granuleux matures.
- **CD61** marqueur des plaquettes et des mégacaryocytes.
- **CD71, GPA** marqueurs érythroblastiques.
- **CD3** marqueur des lymphocytes T.
- **CD36** marqueur des monocytes et de la lignée érythroblastique et mégacaryocytaire.
- **CD16** : cellules T, NK et lignée myéloïde.

La répétition du CD34 permet de voir la répétabilité de la technique et de servir ainsi de contrôle interne.

L'expression est considérée comme positive quand au moins 20% des cellules collectées dans la fenêtre expriment le marqueur par rapport au contrôle négatif.

Dans un cytogramme biparamétrique CD45/SSC, les blastes se projettent dans une région CD45⁺ faible et SSC faible.

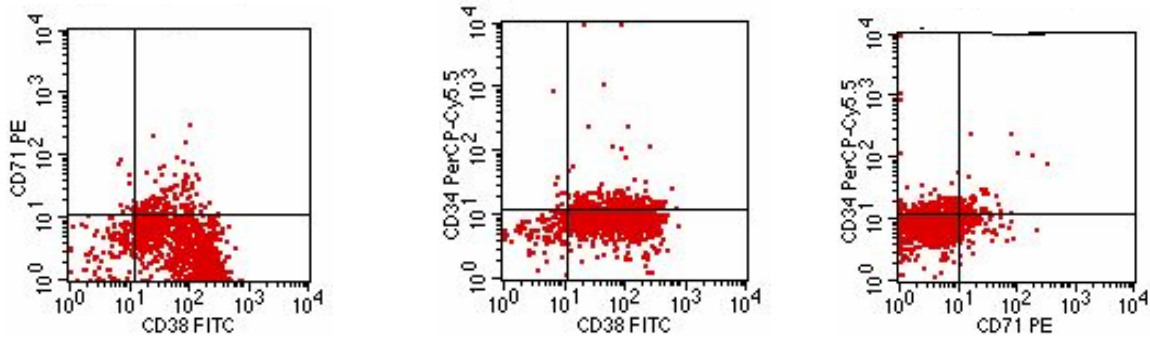
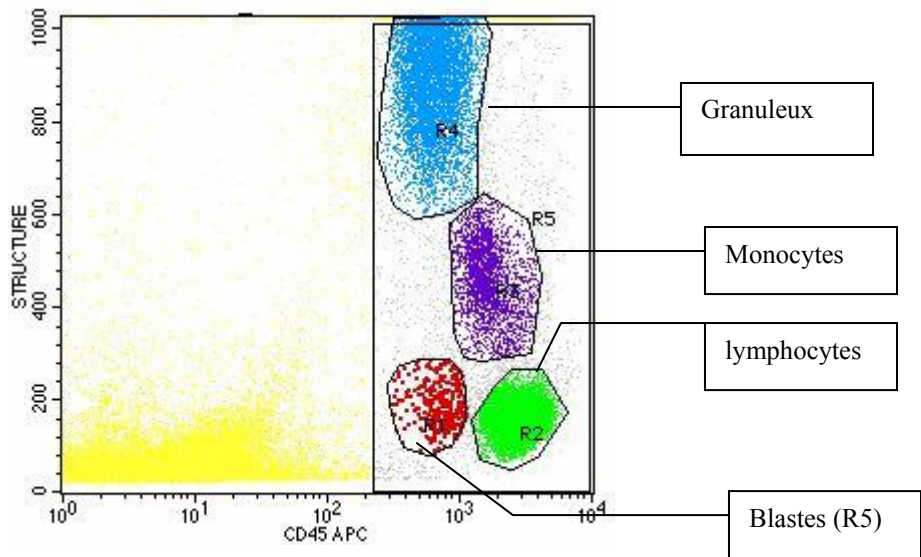
2.3.2 Procédure technique

- La technique s'effectue sur le même type de prélèvement que pour la numération des blastes.
- Dans chaque tube, on incorpore les anticorps dans les proportions décrites dans le tableau ci-dessus, puis on rajoute de 100 à 200 µl de sang ou de moelle par tube, de sorte que l'on obtienne environ 500 000 cellules nucléées.
- 15 minutes à 22°C à l'obscurité.
- Lyse des érythrocytes : **Cf. annexe 1**
- Passage sur l'analyseur FACScalibur[®] (Becton-Dickinson) et analyse par le logiciel CellQuestPro[®] (BD).
- Analyse :

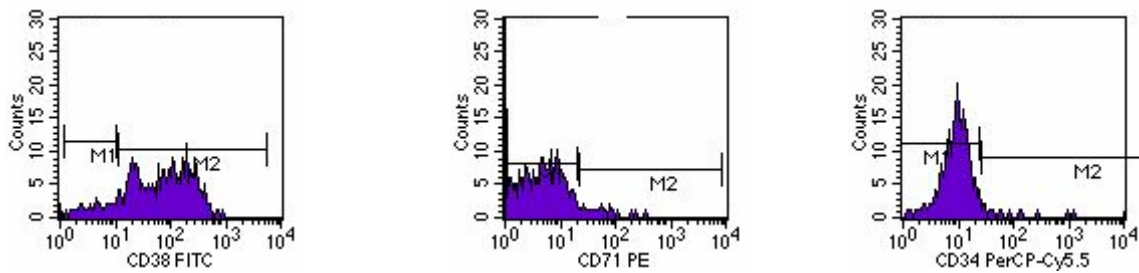
On fenêtrise les blastes tels qu'ils présentent un profil : CD45⁺ faible/SSC faible. Puis la fenêtrise (R1) est analysée dans les 3 plots suivants : FL1/FL2 ; FL1/FL3 ; FL2/FL3

On acquiert entre 200 et 500 événements dans R1

Phénotypage des blastes



Les blastes (CD45 faible/SSC faible) de R5 sont analysés dans les 3 plots.



Pour chaque antigène, on obtient le pourcentage de cellules blastiques positives et la moyenne de fluorescence.

2.4 Quantification de fluorescence du CD34

2.4.1 Billes de quantification de la fluorescence

Les billes de calibration contiennent 5 populations de billes représentant un mélange de fluorochromes excitables à 488 nm et qui émettent à 362 nm et 560 nm.

Chaque population, pour une quantité connue de fluorochrome, va donner une intensité de fluorescence : MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome : l'unité de MESF correspond à l'intensité de fluorescence pour un nombre donné de molécules de fluorochromes en solution). La fluorescence s'exprime sous forme d'un pic sur un graphe monoparamétrique. La moyenne de fluorescence est relevée.

Connaissant pour chaque population la quantité de fluorochrome et la moyenne de fluorescence à laquelle elle correspond, on peut établir une courbe de calibration. (Utilisation du logiciel Excel). **Cf. Annexe 4.**

L'anticorps CD34 choisi est associé au fluorochrome PE (phycoérythrine).

On relève la moyenne de fluorescence (mean) pour le CD34-PE, on la rapporte sur la courbe de calibration. On en déduit la quantité de fluorescence (MESF) pour le CD34.

5 niveaux de fluorescence arbitraires (en plus du blanc) sont donnés en MESF par 5 niveaux de billes :

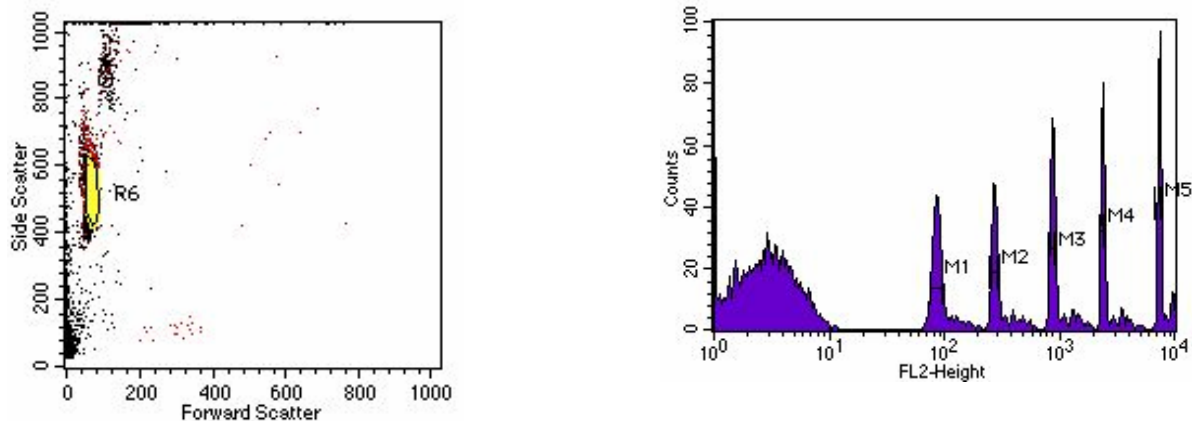
	PE
Blanc	0
1^{ère} population	1 500
2^{ème} population	4 400
3^{ème} population	14 500
4^{ème} population	43 800
5^{ème} population	131 200

2.4.2 Procédure technique

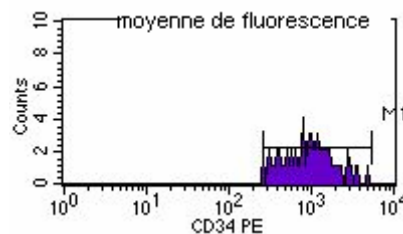
On met 0,5ml de PBS, une goutte (50µl) de billes de calibration fluorosphères DAKO (référence K0110) lot n°81 et une goutte de blanc.

On passe le tube en parallèle de chaque échantillon sur le FACScalibur®.

Pour chaque patient, on obtient donc une courbe d'étalonnage et l'intensité de fluorescence du CD34.



Sélection de la population des billes puis expression de la fluorescence des 5 niveaux.



Moyenne de fluorescence pour l'antigène CD34-PE

2.5 Culture cellulaire

2.5.1 Séparation cellulaire

Le sang périphérique ou la moelle osseuse sont diluées en milieu PBS-DULBECCO Ca²⁺-MG²⁺ 1X (réf: L1825, BIOCHROM AG, VWR, France) volume à volume et au tiers respectivement.

La séparation cellulaire est ensuite réalisée sur gradient de Percoll de densité 1,077 (réf: L6133, BIOCHROM AG, VWR, France) :

Les cellules sont centrifugées 25 minutes sans frein à 20°C (Centrifugeuse Mégafuge 1.0R, HERAUS). L'anneau de cellules mononucléées formé à l'interphase est alors récupéré à l'aide d'une poirette stérile. Les cellules sont transférées dans un tube stérile conique de 15 ml

(FALCON 2096, VWR, France) dans un volume de 10 ml de PBS-DULBECCO Ca²⁺Mg²⁺ 1X.

Des échantillons sont alors prélevés pour la numération cellulaire et la mesure du pourcentage de cellules CD34+.

2.5.2. Mise en culture

Le milieu de culture employé pour l'étude des CFU-GM et des BFU-E est le milieu Stem α .4B (Société Stem Alpha, France). Ce milieu à base de collagène contient 30% de sérum de veau fœtal et un cocktail de protéines recombinantes : Il-3, Il-6, Il-11, SCF, EPO, GM-CSF, G-CSF, FLT-3 Ligand.

Le nombre de cellules implantées est fonction du pourcentage de cellules exprimant le CD34+ (le nombre de cellules exprimant le CD34+ est déterminé par la méthode ISHAGE en cytométrie en flux) :

200 cellules CD34+/ml sont mises en culture

Le milieu de culture employé pour l'étude des CFU-Mk est le milieu Stem α III Mk : ce milieu à base de collagène est sans sérum et contient un cocktail de protéines recombinantes (non divulguées à ce jour pour des raisons de protection industrielle) :

300 cellules CD34+/ml sont mises en culture.

Les différents ingrédients entrant dans la réalisation de cette culture doivent être impérativement maintenus à 4°C avant d'être répartis en boîte 4 puits NUNC (réf : 176740, VWR, France).

2.5.3. La lecture

Elle est réalisée à J7 et J14 pour les CFU-GM, CFU-E et BFU-E et à J10 pour les CFU-Mk.

Les gels de collagène sont récupérés sur lame de verre, déshydratés et colorés au MGG puis lus au microscope optique.

La définition des colonies et clusters a été répartie selon les différentes lignées en colonies immatures et matures (50 cellules) en fonction du degré de différenciation cellulaire, en

macro et microclusters (20 à 49 cellules). Est également retenu un critère de dégénérescence cellulaire.

2.5.4. Expression des résultats

On exprime les résultats en :

- ⇒ **CFU-GM viables ou totales**: nombre de colonies granuleuses pour 10^5 cellules mononucléées (CMN). Ce nombre est obtenu en effectuant la moyenne des colonies de chacun des 3 gels. La différence entre viable ou non, se fait par l'aspect morphologique des colonies observées en microscopie optique.
- ⇒ **BFU-E viables ou totales** : nombre de colonies rouges (moyenne des 3 gels) pour 10^5 cellules mononucléées (CMN). De la même façon que pour le granuleux, on définit les colonies viables ou non.
- ⇒ Pour CFU-GM et BFU-E, on déduit le rapport (**colonies viables / Total des colonies**)
- ⇒ **CFU-MK** : Nombre de colonies matures de la lignée mégacaryocytaire à J10. Moyenne des 3 gels.
- ⇒ **Calcul de la clonogénicité pour chacune des lignées** : nombre de colonies pour 1 CD34+
- ⇒ **Rapport BFU-E/CFU-GM**

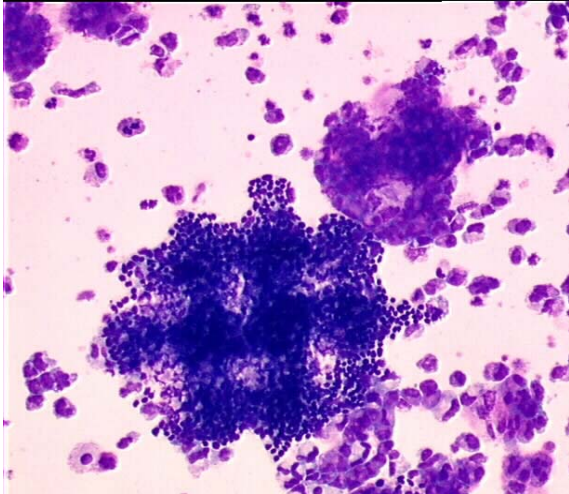
3. Expression des résultats et statistiques

Les statistiques ont été réalisées par le laboratoire des biostatistiques (Dr B. Vielle et Mme E. Parot-Schenkel) du CHU d'Angers à l'aide du logiciel SPSS version 12.0.

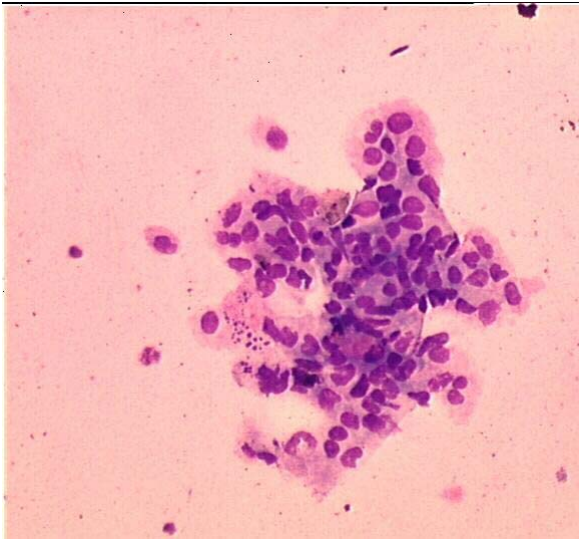
Pour les corrélations entre deux groupes, il a été appliqué le test de Pearson. Les résultats entre deux groupes sont corrélés, c'est-à-dire vont dans le même sens, lorsque $p < 0,01$: La corrélation est alors dite significative.

Pour les comparaisons de moyennes et en raison de la petite taille des échantillons, il a été appliqué les tests non paramétriques de Mann-Whitney : On considère que les résultats sont significativement discordants lorsque $p < 0,05$.

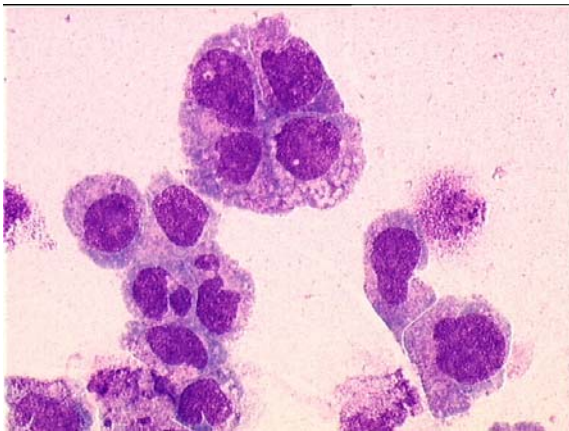
Les résultats sont rendus avec la moyenne ± 2 écarts-type.



BFU-E et CFU-GM normales



Cluster granuleux en dégénérescence (AREB)



Colonies granuleuses en dégénérescence (AREB)

**RESULTATS DES
METHODES DE
NUMERATION**

VII. Les résultats des méthodes de numération

1. Les méthodes de numération

Nous avons choisi d'exprimer les résultats en valeur absolue et en pourcentage dans le sang pour les 3 méthodes de numération. Du fait des variations de la numération leucocytaire parfois très importantes, il nous a semblé plus pertinent, de faire nos comparaisons à partir des valeurs absolues.

Pour la moelle osseuse, tous les résultats et comparaisons ont été exprimés en pourcentage.

1.1 Dans le sang

1.1.1. Méthode n°1

Cf. Tableau 4 : Résultats de la méthode n°1 dans le sang.

⇒ Le groupe témoin (n=7):

- ❖ L'effectif du groupe témoin est un peu plus faible que pour l'ensemble des études.
- ❖ Cependant, les pourcentages de cellules exprimant le CD34 retrouvés dans notre étude sont superposables à ceux rapportés dans la littérature dans le sang chez des sujets sains. De même, en ce qui concerne les valeurs absolues: les résultats s'accordent, dans l'ensemble, pour un nombre de cellules exprimant le CD34, inférieur à $5.10^6/l$. (52, 35-39)

⇒ Les cytopénies réactionnelles (n=24) :

❖ Pour le groupe des **anémies macrocytaires de l'éthylique** (n=6) :

L'effectif est faible, cependant ce groupe constitue une entité homogène présentant une faible dispersion. Les résultats sont superposables à ceux du groupe témoin. (p=0,39)

❖ Pour le groupe des **anémies dues à une insuffisance rénale** (n=2) :

Les 2 valeurs retrouvées sont proches.

Les résultats sont plus faibles que pour le groupe témoin.

❖ Pour le groupe des **cytopénies post-opératoires ou infectieuses** (n=4) :

L'effectif est faible, cependant ce groupe constitue une entité homogène présentant une faible dispersion. Les résultats sont plus faibles que pour le groupe témoin mais de façon non significative. (p=0,87)

❖ Pour le groupe des **cytopénies par carences vitaminiques** (n=4) :

L'effectif est faible, cependant ce groupe constitue une entité homogène présentant une faible dispersion. Les résultats sont superposables à ceux du groupe témoin. (p=1)

❖ Pour le groupe des **neutropénies constitutionnelles ou de margination** (n=4) :

C'est un petit groupe de valeurs homogènes. Si on compare avec le groupe témoin, on trouve une moyenne significativement plus faible. (p=0,008)

❖ Pour le groupe des **thrombopénies périphériques** (n=4) :

C'est un petit groupe de valeurs homogènes. Les résultats sont superposables au groupe témoin.

Pour une partie des cytopénies réactionnelles, les valeurs retrouvées sont superposables aux témoins : groupes des macrocytoses de l'éthylique, post-opératoires, carences vitaminiques et thombopénies périphériques : n=18, moy (CD34)= $2,08 \pm 4,14.10^6/l$. (p=0,72)

Pour les 2 autres groupes : anémies de l'insuffisance rénale et neutropénies périphériques ou de margination, n=6, moy(CD34)= $0,86 \pm 0,36.10^6/l$, les valeurs sont plus faibles par rapports aux témoins et de façon significative lorsqu'on les regroupe. (p=0,003)

⇒ Pour les **thrombocytoses et monocytoses réactionnelles** (n=3) :

L'effectif est faible. La répartition des valeurs est peu homogène.

Par rapport au groupe témoin, la moyenne retrouvée est plus élevée.

Ce groupe de patients servira de base de comparaison pour les syndromes 5q- et les LMMC.

Méthode n°1	Témoins (n=7)	Ethyliques (n=6)	Ins. Rénale (n=2)	Post-op et états septiques (n=4)	Carences (n=4)	Neutropénies (n=4)	Thrombopénies périphériques (n=4)	Thrombocytoses et monocytoses réac.(n=3)
Moy(%CD34)	0,03±0,01 (0,018-0,045)	0,029±0,02 (0,004-0,062)	0,009±0,001 (0,009-0,010)	0,013±0,01 (0,002-0,030)	0,097±0,11 (0,024-0,29)	0,033±0,01 (0,02-0,05)	0,024±0,01 (0,01-0,03)	0,08±0,11 (0,018-0,202)
Moy(CD34).10⁶/l	2,36±1,17 (1,2-4,5)	2,26±1,73 (0,76-4,49)	0,84±0,23 (0,67-1,00)	0,95±0,99 (0,20-2,40)	3,53±3,16 (1,4-9,0)	0,88±0,19 (0,6-1,0)	1,52±0,39 (1,00-1,91)	10,03±14,43 (1,6-26,7)

Méthode n°1	CRDM (n=12)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=4)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=2)	LMMC (n=5)
Moy(%CD34)	0,04±0,06 (0-0,18)	0,028±0,01 (0,05-0,1)	0,073±0,06 (0,01-0,15)	7,58	0,085±0,02 (0,07-0,1)	0,072±0,07 (0,01-0,17)
Moy(CD34).10⁶/l	1,29±1,93 (0-7)	1,38±0,63 (0,5-2,0)	3,66±4,74 (0,4-10,7)	363	3,25±1,06 (2,5-4,0)	2,72±2,57 (0,38-6,70)

Moyenne ± 2 écarts-type. (mini-maxi)

Tableau 4 : Résultats de la méthode n°1 dans le sang

⇒ Pour les cytopénies réfractaires avec dysplasies multilignées (n=12) :

L'effectif est plus important que pour les autres groupes et la répartition montre des valeurs peu dispersées. La moyenne retrouvée dans le groupe des CRDM est significativement plus faible que dans le groupe témoin ($p=0,022$).

Si l'on compare le groupe des CRDM avec chaque cytopénie réactionnelle, on ne retrouve aucune différence significative. Mais si l'on regroupe, comme pour la comparaison avec les témoins, groupes des macrocytoses de l'éthylique, post-opératoires, carences vitaminiques et thombopénies périphériques, on trouve une différence significative ($p=0,045$)

⇒ Pour les anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne (n=6) :

La répartition des valeurs dans ce groupe et dans le groupe témoin est relativement homogène et les deux groupes sont globalement assez superposables. La moyenne retrouvée dans les ARSI est très voisine de celle du groupe témoin et la différence n'est pas significative. ($p=0,059$).

Si l'on compare le groupe des ARSI avec les cytopénies réactionnelles, on ne retrouve aucune différence significative

⇒ Pour les anémies réfractaires avec excès de blastes de type 1 (n=4) :

Même si les valeurs sont un peu plus dispersées dans ce groupe où l'effectif est faible, les valeurs retrouvées sont voisines de celles du groupe témoin. On ne retrouve pas de différences significatives ($p=0,70$).

Les résultats montrent un faible taux de cellules exprimant le CD34, corroborant ainsi la définition des AREB de type 1 qui doivent présenter moins de 5% de blastes dans le sang.

⇒ Pour l'anémie réfractaire avec excès de blastes de type 2 :

On trouve un taux très élevé de cellules exprimant le CD34. Ce patient montrait 4% de blastes dans le sang circulant.

⇒ Pour les syndromes 5q- (n=2) :

Les 2 valeurs retrouvées sont proches entre elles et du groupe des témoins.

Quand on compare avec le groupe des thrombocytoses, on ne retrouve pas de différence.

⇒ Pour les leucémies myélomonocytaires chroniques (n=5) :

La répartition des valeurs dans ce groupe et dans le groupe témoin est relativement homogène et les deux groupes sont globalement assez superposables. La moyenne retrouvée dans les LMMC est très voisine de celle du groupe témoin et la différence n'est pas significative. (p=0,93).

Si l'on compare le groupe des LMMC avec le groupe des thrombocytoses et monocytoses réactionnelles, on ne retrouve aucune différence significative. (p=0,65)

En regroupant certaines cytopénies réactionnelles, on trouve que les témoins sont superposables aux macrocytoses de l'éthylique, post-opératoires, carences vitaminiques et thombopénies périphériques. On trouve une différence significative pour chacun de ces deux ensembles avec les CRDM et avec le groupe des neutropénies associés aux insuffisants rénaux.

Pour les autres groupes, la technique ne semble pas discriminante.

1.1.2 Méthode n°2

Cf. Tableau 5: Résultats de la méthode n°2 dans le sang.

⇒ Le groupe témoin (n=7) :

L'effectif est faible. La répartition des valeurs est assez homogène.

⇒ Les cytopénies réactionnelles (n=24) :

❖ Pour le groupe des **anémies macrocytaires de l'éthylique (n=6) :**

L'effectif est faible. La dispersion est plus importante que pour les autres groupes des cytopénies réactionnelles.

Les résultats sont plus forts que ceux du groupe témoin mais de façon non significative. (p=0,063)

❖ Pour le groupe des **anémies dues à une insuffisance rénale (n=2) :**

Les 2 valeurs retrouvées sont proches et superposables au groupe témoin.

❖ Pour le groupe des **cytopénies post-opératoires ou infectieuses** (n=4) :

L'effectif est faible et présente une grande dispersion dans les résultats. Même si la moyenne est supérieure à celle du groupe témoin, la dispersion importante explique l'absence de différence significative. (p=0,57)

❖ Pour le groupe des **cytopénies par carences vitaminiques** (n=4) :

L'effectif est faible, cependant ce groupe constitue une entité homogène présentant une faible dispersion. Les résultats sont superposables à ceux du groupe témoin. (p=0,70)

❖ Pour le groupe des **neutropénies constitutionnelles ou de margination** (n=4) :

C'est un petit groupe de valeurs assez homogènes et superposable au groupe témoin. (p=1,0)

❖ Pour le groupe des **thrombopénies périphériques** (n=4) :

C'est un petit groupe de valeurs homogènes.

Les valeurs retrouvées sont plus faibles que pour le groupe témoin, mais la différence est non significative. (p=0,25)

En résumé, pour le groupe témoin :

3 groupes (anémies de l'insuffisance rénale, neutropénies constitutionnelle ou de margination, anémies par carence vitaminique) sont superposables : n=10, moy(CD45) = $42,2 \pm 20,9 \cdot 10^6/l$. (p=0,96)

2 groupes (anémies de l'éthylique et anémies post-opératoires ou septicémiques) présentent des taux de cellules exprimant le CD45 plus forts mais de façon non significative, et la dispersion des valeurs est importante : n=10, moy(CD45) = $201,2 \pm 284,1 \cdot 10^6/l$. (p=0,11)

Les thrombopénies périphériques ont des valeurs plus faibles.

⇒ Pour les **thrombocytoses et monocytoses réactionnelles** (n=3) :

L'effectif est faible. La répartition des valeurs n'est pas homogène.

Par rapport au groupe témoin, la moyenne retrouvée est plus élevée.

Méthode n°2	Témoins (n=7)	Ethyliques (n=6)	Ins. Rénale (n=2)	Post-op et états septiques (n=4)	Carences (n=4)	Neutropénies (n=4)	Thrombopénies périphériques (n=4)	Thrombocytoses et monocytoses réac.(n=3)
Moy(%CD45)	0,59±0,44 (0,21-0,84)	1,13±1,12 (0,74-2,19)	0,67 / 0,41	1,95±3,44 (0,49-4,04)	0,93±0,54 (0,48-1,17)	1,66±2,40 (0,17-2,69)	0,51±0,80 (0,11-1,06)	1,02±1,26 (0,51-1,73)
Moy(CD45).10⁶/l	42,79±37,52 (14-66,5)	116,5±169,1 (25,6-254,5)	37 / 30,6	328,2±882,0 (15,3-959,3)	44,35±10,76 (36-50)	44,25±69,42 (6,0-81,0)	28,78±41,12 (5,4-55,0)	424,9±1149,0 (50,8-1087)

Méthode n°2	CRDM (n=12)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=4)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=2)	LMMC (n=5)
Moy(%CD45)	0,98±1,4 (0,16-2,4)	1,17±1,04 (0,38-1,78)	5,94±14,16 (0,87-15,90)	7,8	2,16 / 4,3	1,36±1,8 (0,61-2,50)
Moy(CD45).10⁶/l	37,55±46,7 (5-81)	61,17±69,26 (19-119)	387,95±1062,7 (13,8-1153,0)	373	126 / 109	84,6±153,6 (14-197)

Moyenne ± 2 écarts-type. (mini-maxi)

Tableau 5 : Résultats de la méthode de numération n°2 dans le sang.

⇒ Pour les **cytopénies réfractaires avec dysplasies multilignées** (n=12) :

L'effectif est plus important que pour les autres groupes et la répartition montre des valeurs assez peu dispersées. Les résultats sont superposables à ceux retrouvés dans le groupe témoin. (p=0,45)

Si l'on compare le groupe des CRDM avec les cytopénies réactionnelles, on retrouve uniquement une différence significative avec le groupe des anémies de l'éthylique qui présente des taux plus élevés. (p=0,009)

Si on regroupe certaines cytopénies réactionnelles, on retrouve pour l'ensemble : (anémies de l'éthyliques et anémies post-opératoires ou infectieuses) une différence significative. (p=0,004)

⇒ Pour les **anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne** (n=6) :

Le groupe présente des valeurs assez hétérogènes.

La moyenne retrouvée dans les ARSI est proche de celle du groupe témoin. (p=0,25)

Si l'on compare le groupe des ARSI avec les cytopénies réactionnelles, on ne retrouve aucune différence significative

⇒ Pour les **syndromes 5q-** (n=2) :

Les 2 valeurs retrouvées sont proches. Elles sont plus élevées que celles du groupe témoin.

Quand on compare avec le groupe des thrombocytoses, on ne retrouve pas de différence.

⇒ Pour les **leucémies myélomonocytaires chroniques** (n=5) :

Le groupe, de faible effectif, présente des valeurs assez hétérogènes.

Les deux groupes sont globalement assez superposables. (p=0,63)

Si l'on compare le groupe des LMMC avec le groupe des thrombocytoses et monocytoses réactionnelles, on ne retrouve aucune différence significative. (p=0,29)

En résumé :

Une comparaison de groupes donnent des résultats significatifs : le groupe des CRDM avec les anémies des éthyliques.

En effectuant des regroupements au niveau des cytopénies réactionnelles, on trouve également une différence significative entre les CRDM et l'association des anémies de l'éthylique avec les anémies post-opératoires ou infectieuses.

Les autres groupes présentent parfois de fortes dispersions des résultats avec des zones de chevauchement, nous ne pouvons alors pas discriminer les pathologies tumorales des pathologies réactionnelles.

1.1.3 Méthode n°3

Cf. Tableau 6: Résultats de la méthode n°3 dans le sang.

⇒ Pour le groupe témoin (n=2) :

L'effectif est très faible. Les 2 valeurs sont proches.

⇒ Pour les cytopénies réactionnelles (n= 6) :

❖ L'anémie de l'insuffisance rénale (n=1) :

La valeur est proche de celle du groupe témoin.

❖ Les neutropénies de margination ou constitutionnelles (n=3) :

L'effectif est faible. Les valeurs sont peu dispersées et superposables à celles du groupe témoin. (p=0,56)

❖ Les thrombopénies périphériques (n=2) :

Les 2 valeurs sont très semblables et superposables à celles des témoins.

L'ensemble des cytopénies réactionnelles (n=6, moy(blastes) = $1,28 \pm 0,71.10^6/l$) montrent des taux de blastes similaires à ceux du groupe témoin. (p=0,50)

⇒ La Monocytose réactionnelle (n=1) :

La valeur de blastes est un peu plus forte que le groupe témoin.

Méthode n°3	Témoins (n=2)	Ethylique (n=0)	Ins. Rénale (n=1)	Post-op et états septiques (n=0)	Carence (n=0)	Neutropénies (n=3)	Thrombopénies périphériques (n=2)	Monocytose réac. (n=1)
%Blastes	0,018/0,013	/	0,011	/	/	0,24±0,11 (0,02-0,61)	0,023 / 0,021	0,043
Blastes .10 ⁶ /l	1 / 0,72	/	0,61	/	/	1,61±2 (0,57-2,27)	1,19 / 1,04	3,42

Méthode n°3	CRDM (n=8)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=3)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=2)	LMC (n=3)
%Blastes	0,023±0,01 (0,01-0,04)	0,04±0,02 (0,02-0,07)	0,05±0,06 (0,002-0,12)	0,167	0,042 / 0,072	0,03±0,03 (0,01-0,06)
Blastes .10 ⁶ /l	0,78±0,48 (0,51-1,23)	1,82±1,92 (0,95-3,64)	0,98±1,72 (0,11-1,83)	8	2,46 / 1,82	0,85±0,70 (0,52-1,22)

Moyenne ± 2 écarts-type. (mini-maxi)

Tableau 6 : Résultats de la méthode n°3 dans le sang

⇒ Les cytopénies réfractaires avec dysplasies multilignées (n=8) :

Le groupe est homogène avec une très faible dispersion.

La moyenne retrouvée est très voisine de celle du groupe témoin et nous ne retrouvons pas de différence significative. (p= 0,69)

Les comparaisons avec les cytopénies réactionnelles ne montrent pas de différences significatives.

⇒ Les ARSI (n=6) :

Le groupe présente une faible dispersion des valeurs et les résultats sont semblables à ceux du groupe témoin. On reste encore dans des valeurs inférieures à $5.10^6/l$. (p=0,096)

Les comparaisons avec les cytopénies réactionnelles ne montrent pas de différences significatives.

⇒ Les AREB-1(n=3) :

Le groupe présente des valeurs homogènes proches de celles du groupe témoin. On ne retrouve pas de différences significatives. (p=0,56)

⇒ L'AREB-2 (n=1) :

Ce patient montrait 4% de blastes dans le sang.

Par cette méthode de numération, on retrouve une valeur plus élevée que pour l'ensemble de autres groupes. On peut considérer ce patient comme un témoin de positivité.

⇒ Les syndromes 5q- (n=2) :

Les 2 valeurs sont superposables.

Même si la moyenne semble supérieure à celle du groupe témoin, nous ne retrouvons pas de différence.

⇒ Les LMMC (n=3) :

Le groupe est homogène avec une faible dispersion des valeurs. Les taux de blastes sont superposables à ceux du groupe témoin. (p=1,0)

La monocytose réactionnelle présente un taux de blastes un peu plus fort mais l'effectif ne permet pas de réaliser de test statistique.

L'ensemble des groupes présente des résultats similaires, excepté pour le patient souffrant d'une AREB-2. Il ne semble pas qu'on puisse discriminer les pathologies réactionnelles des pathologies tumorales à l'aide de cette méthode.

1.2 Dans la moelle

L'approche de la numération des blastes dans le sang a été reproduite dans l'échantillon de moelle chaque fois que possible.

1.2.1 Méthode de numération n°1

Cf. **tableau 7 : Résultats de la méthode de numération n°1 dans la moelle osseuse :**

⇒ **Groupe des témoins (n=3) :**

L'effectif est faible. Les trois valeurs sont très proches.

On reste, comme pour les données de la littérature, dans des valeurs inférieures à 3% des cellules nucléées de la moelle. (31,38-40)

⇒ **Groupe des cytopénies réactionnelles (n=6) :**

Ce groupe montre un effectif faible, des données peu dispersées, et la moyenne est superposable à celle du groupe témoin. (p=1)

⇒ **La monocytose réactionnelle (n=1) :**

Le taux de cellules exprimant le CD34 est très faible. Il est diminué par rapport au groupe témoin, mais la comparaison statistique n'est pas possible.

⇒ **Les CRDM (n=8) :**

L'effectif est un peu plus important que pour le groupe témoin. Les valeurs sont peu dispersées et le résultat est superposable à celui du groupe témoin. (p=0,10), de même avec les cytopénies réactionnelles. (p=0,17)

⇒ **Les ARSI (n=5) :**

Le groupe est homogène avec une faible dispersion. La moyenne retrouvée est très voisine de celle du groupe témoin et nous ne retrouvons pas de différence significative. (p=0,88)

Il en est de même avec les cytopénies réactionnelles. (p=1)

⇒ **L'AREB-1 (n=1) :**

Le pourcentage de cellules exprimant le CD34 reste faible, équivalent aux valeurs du groupe témoin ou des cytopénies réactionnelles. Ce patient avait 6% de blastes au myélogramme.

⇒ **L'AREB-2 (n=1) :**

Le pourcentage de cellules exprimant le CD34 est fort. C'est la valeur la plus élevée sur l'ensemble des patients étudiés. Ce patient avait 11% de blastes au myélogramme.

⇒ **Le syndrome 5q- (n=1) :**

La valeur est identique à la moyenne du groupe témoin et des cytopénies réactionnelles.

⇒ **Les LMMC (n=2) :**

Les 2 valeurs sont proches et comparables aux valeurs du groupe témoin. Le pourcentage le plus faible est très voisin de celui de la monocytose réactionnelle.

Les patients présentent des résultats similaires, excepté pour le patient souffrant d'une AREB-2. Les effectifs ne permettent pas toujours de réaliser des tests statistiques, néanmoins il semble que la méthode dans la moelle ne soit pas discriminante.

1.2.2 Méthode de numération n°2

Cf. **tableau 8: Résultats de la méthode de numération n°2 dans la moelle osseuse**

⇒ **Groupe des témoins (n=3) :**

L'effectif est faible. Les trois valeurs sont très proches.

⇒ **Groupe des cytopénies réactionnelles (n=6) :**

Ce groupe montre un effectif faible, des données peu dispersées, et la moyenne est superposable à celle du groupe témoin. (p=0,24)

Méthode n°1 dans la moelle	Témoins (n=3)	Cytopénies réac. (n=6)	Monocytose réac. (n=1)	CRDM (n=8)	ARSI (n=5)	AREB-1 (n=1)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=1)	LMMC (n=2)
Moy(%CD34)	0,50±0,09 (0,42-0,60)	0,52±0,30 (0,08-0,86)	0,07	0,32±0,24 (0,08-0,32)	0,59±0,29 (0,38-1,06)	0,74	10,14	0,5	0,61 / 0,14

Moyenne ± 2 écarts-type. (mini-maxi)

Tableau 7 : Résultats de la méthode n°1 dans la moelle osseuse

Méthode n°2 dans la moelle	Témoins (n=3)	Cytopénies réac. (n=6)	Monocytose réac. (n=1)	CRDM (n=8)	ARSI (n=5)	AREB-1 (n=1)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=1)	LMMC (n=2)
Moy(%CD45)	1,12±0,17 (0,95-1,28)	2,11±1,1 (0,80-3,61)	1,13	1,6±0,73 (0,68-1,60)	3,12±1,31 (1,93-5,18)	1,43	11,52	1,93	4,48 / 0,70

Moyenne ± 2 écarts-type. (mini-maxi)

Tableau 8 : Résultats de la méthode n°2 dans la moelle osseuse

⇒ **La monocytose réactionnelle (n=1)** :

Le taux de cellules exprimant le CD34 est très semblable à la moyenne des témoins.

⇒ **Les CRDM (n=8)** :

L'effectif est un peu plus important que pour le groupe témoin.

Les valeurs sont peu dispersées et le résultat est superposable à celui du groupe témoin.

($p=0,30$), de même avec les cytopénies réactionnelles. ($p=0,30$)

⇒ **Les ARSI (n=5)** :

Le groupe est homogène avec une dispersion un peu plus importante.

La moyenne est supérieure à celle du groupe témoin, de façon significative. ($p=0,02$) Par rapport aux cytopénies réactionnelles, nous ne retrouvons pas de différence significative.

($p=0,20$)

⇒ **L'AREB-1 (n=1)** :

Le pourcentage de cellules se projetant dans la fenêtre CD45 faible/SSC faible reste peu élevé, équivalent aux valeurs du groupe témoin ou des cytopénies réactionnelles. Ce patient avait 6% de blastes au myélogramme.

⇒ **L'AREB-2 (n=1)** :

Le pourcentage de cellules se projetant dans la fenêtre CD45 faible/SSC faible est fort. C'est la valeur la plus élevée sur l'ensemble des patients étudiés. Ce patient avait 11% de blastes dans la moelle en microscopie optique.

⇒ **Le syndrome 5q- (n=1)** :

La valeur est proche de la moyenne du groupe témoin et des cytopénies réactionnelles.

⇒ **Les LMMC (n=2)** :

Les 2 valeurs sont assez différentes et encadrent la valeur de la monocytose réactionnelle.

Il n'y a pas de différence significative par rapport aux témoins.

On reste dans des pourcentages inférieurs à 5%.

Les patients présentent des résultats similaires entre eux et par rapport aux témoins, excepté pour le patient atteint d'une AREB-2. Les effectifs ne permettent pas toujours de réaliser des tests statistiques, néanmoins il semble que la méthode dans la moelle ne soit pas discriminante.

2. Comparaison des méthodes de numération

2.1 Dans le sang

a) Nous avons voulu voir si les résultats obtenus par les différentes techniques de numération étaient corrélés :

Méthode de numération par microscopie optique : dans la majorité des cas, nous n'avons pas observé de blastes. La méthode est peu sensible. Cette technique a donc été exclue des essais de corrélation.

Entre la technique n°1 et la technique n°2 : On obtient un coefficient de corrélation de 0,194 avec $p=0,12$. Les deux techniques présentent donc des résultats discordants.

Entre la technique n°1 et la technique n°3 : On obtient un coefficient de corrélation de 0,523 avec $p=0,002$. La corrélation est significative. Les deux techniques vont dans le même sens.

Entre la technique n°2 et la technique n°3 : On obtient un coefficient de corrélation de 0,825 avec $p<0,001$. La corrélation est significative. Les deux techniques vont dans le même sens.

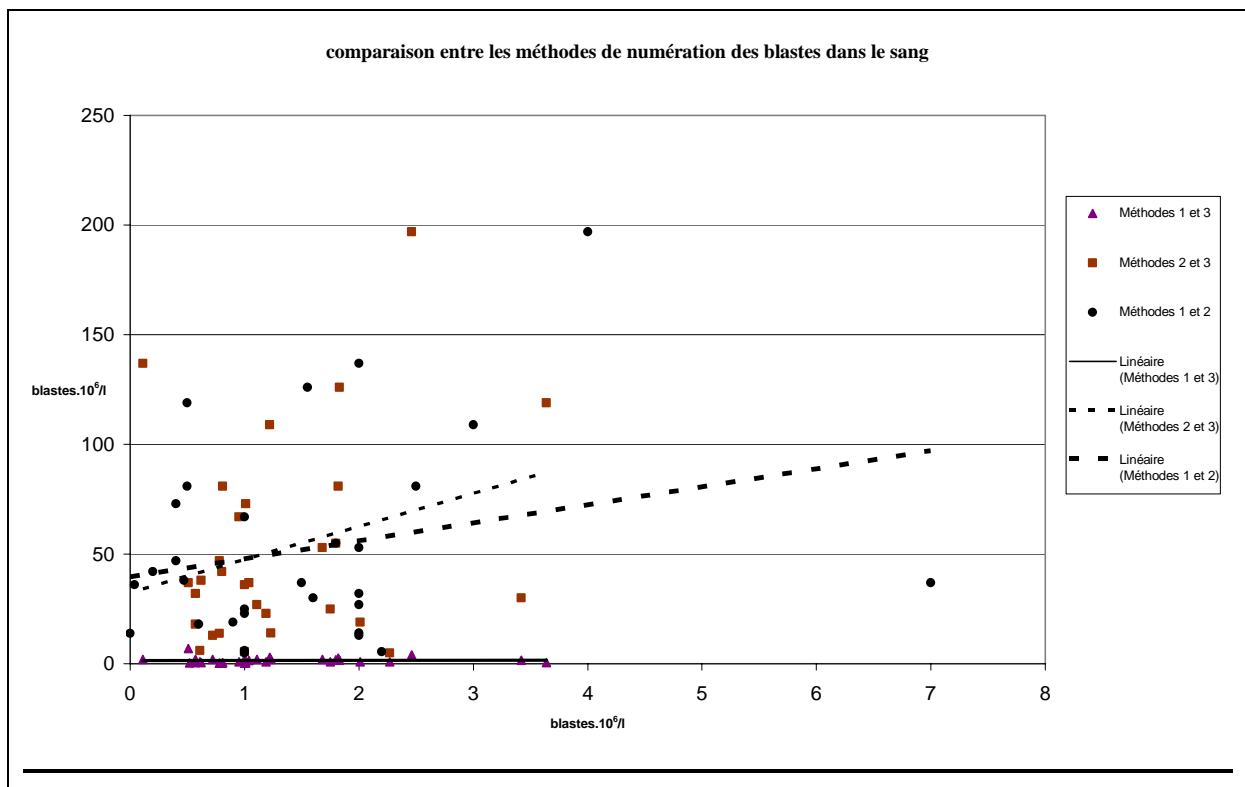
Bien que l'on obtienne 2 corrélations significatives, la force de corrélation est insuffisante pour obtenir un véritable parallélisme entre les 3 méthodes.

La discordance se situe essentiellement entre les taux de cellules exprimant le CD34 et les taux de cellules qui se projettent dans la fenêtre CD45 faible.

Cf. Grappe 1 : Courbes de comparaisons des différentes méthodes de numération des blastes dans le sang

b) Nous avons également voulu savoir si les résultats obtenus par chaque méthode montrent un profil identique ou différent selon les groupes de patients :

Dans l'ensemble, les profils des groupes de patients évoluent dans le même sens quelle que soit la méthode.



Grphe 1

2.2 Dans la moelle

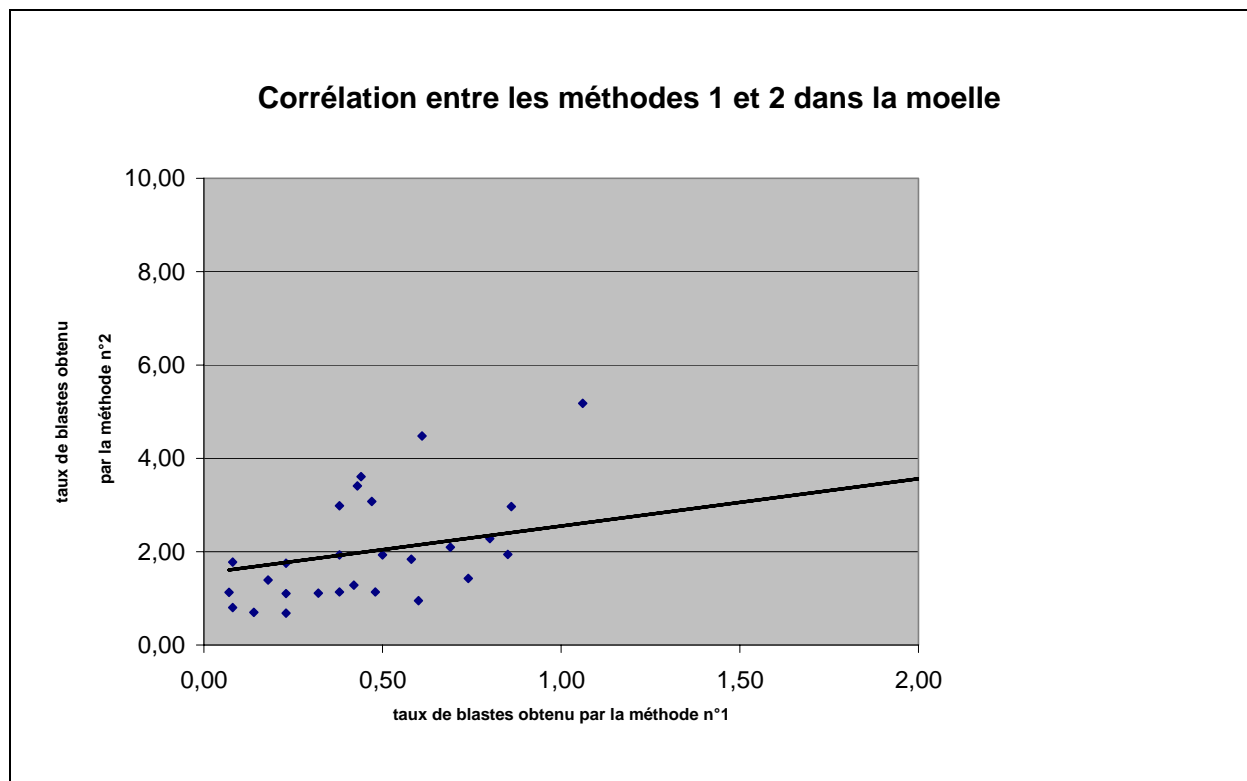
Comme dans le sang, nous avons voulu voir si les résultats obtenus par les différentes techniques de numération étaient corrélés :

Entre les résultats de microscopie optique et la méthode n°1 : on obtient un coefficient de Pearson de 0,765 avec un p significatif ($p < 0,001$). Les résultats sont corrélés et les 2 méthodes vont dans le même sens.

Entre les résultats de microscopie optique et la méthode n°2 : on obtient un coefficient de corrélation de 0,575 avec un p significatif ($p=0,002$). Les résultats sont corrélés et les 2 méthodes vont dans le même sens.

Entre les méthodes de numération n°1 et n°2 : Le coefficient de corrélation est de 0,879, ce qui est significatif avec $p<0,001$. Les 2 méthodes vont dans le même sens.

(Cf. Graphe 2 : Corrélation des méthodes 1 et 2 dans la moelle)



Graphe 2

Contrairement à l'approche sanguine, la corrélation est meilleure entre les 2 techniques de cytométrie en flux.

**RESULTATS DU
PHENOTYPE DES
BLASTES**

VIII. Résultats du phénotype des blastes

1. Dans le sang

Pour chaque antigène, nous avons relevé le pourcentage de cellules projetées dans la fenêtre CD45 faible/SSC faible, l'exprimant ainsi que sa moyenne de fluorescence :

Cf. **Tableau 9 : Expression des antigènes par les cellules fenêtrées en CD45 faible/SSC faible dans le sang**

Tableau 10 : Moyenne de fluorescence pour chaque antigène du panel, dans le sang

⇒ **Pour le groupe des témoins (n=5) :**

Les 5 patients expriment : le CD61, le CD36, le CD13 et HLA-DR.

La présence du CD13 signe la lignée myéloïde et l'antigène HLA-DR marque l'immaturation des cellules. C'est en faveur de progéniteurs myéloïdes.

Par contre, le CD61 (marqueur plaquettaire) et le CD36 (monocytes, érythroblastes et lignée plaquettaire) montrent une contamination de la fenêtre soit par les érythroblastes, soit par les plaquettes ou les deux. Cependant la présence des érythroblastes dans le sang est normalement très faible et par ailleurs, le CD71 et la Glycophorine A, marqueurs érythroblastiques sont absents. La présence de ces deux marqueurs est plutôt due au satellitisme des plaquettes autour des blastes, artéfact fréquemment rencontré en cytométrie en flux.

Le CD34 n'est pas exprimé. Ce résultat justifie de recourir à différentes techniques pour numérer les blastes.

Les trois premiers patients montrent dans leur profil le CD16, le CD15 et le CD10 : c'est en faveur d'une contamination par des granuleux matures ou éventuellement par des lymphocytes. Un mauvais réglage de cytométrie peut expliquer un manque d'étalement des populations et la pollution de la fenêtre blastique.

On note l'absence du CD3 et du CD19, marqueurs lymphocytaires et du CD117 et du CD33 que l'on retrouve habituellement sur les myélo-monoblastes.

**Tableau 9 : Expression des antigènes par les cellules fenêtrées en CD45 faible/SSC faible
dans le sang :**

	Témoins (n=5)	réactionnel (n=10)	CRDM (n=10)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=3)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=2)	LMMC (n=4)
%CD34	4±2% (0/5)	1± 0% (1/10)	4± 6% (0/10)	3± 6% (0/6)	2±4% (0/3)	93% (1/1)	4 / 4%	3± 2% (0/4)
%CD61	37±38% (5/5)	32± 28% (8/10)	36 ±34% (8/10)	46± 44% (5/6)	12±2% (0/3)	21% (1/1)	76 / 86%	29± 78% (3/4)
%CD38	41± 76% (2/5)	61± 52% (9/10)	50 ±62% (7/10)	73±60% (5/6)	44± 50% (3/3)	5% (0/1)	77 / 64%	28 ±59% (4/4)
%CD71	4± 4% (0/5)	2± 4% (0/10)	4± 8% (0/10)	1± 2% (0/6)	5 ±16% (0/3)	37% (1/1)	1 / 2%	5± 4% (0/4)
%CD36	54± 40% (5/5)	49 ± 22% (10/10)	53± 40% (9/10)	51± 36% (6/6)	35± 34% (2/3)	60% (1/1)	70 / 82%	21± 82% (4/4)
%GPA	2± 4% (0/5)	8± 28% (1/10)	10 ±28% (3/10)	11±24% (1/6)	4 ±12% (0/3)	4% (0/1)	0 / 2%	4 ±2% (0/4)
%CD16	37± 48% (4/5)	13±30% (3/10)	24± 44% (5/10)	9± 32% (1/6)	5± 10% (0/3)	1% (0/1)	1 / 6%	10± 12% (0/4)
%CD13	71± 62% (5/5)	57 ± 56% (8/10)	71± 50% (9/10)	69± 64% (5/6)	51± 48% (3/3)	97% (1/1)	64 / 31%	61 ± 42% (4/4)
%CD3	4± 8% (0/5)	13± 40% (2/10)	13± 34% (2/10)	4± 6% (0/6)	13 ± 14% (0/3)	1% (0/1)	3 / 61%	17 ± 12% (2/4)
%CD15	46± 68% (2/5)	40± 56% (8/10)	50 ± 54% (8/10)	46± 44% (5/6)	41± 34% (3/3)	17% (0/1)	43 / 19%	34± 34% (3/4)
%CD10	24 ± 44% (2/5)	8± 26% (2/10)	14 ± 42% (4/10)	3± 6% (0/6)	3 ±2% (0/3)	1% (0/1)	1 / 1%	9± 18% (0/4)
%CD19	7±16% (0/5)	7± 10% (0/10)	10± 24% (1/10)	3±8% (0/6)	8 ± 12% (0/3)	1% (0/1)	5 / 6%	6± 4% (0/4)
%HLA-DR	33± 24% (5/5)	32 ± 28% (8/10)	40 ± 32% (9/10)	19± 14% (2/6)	38 ± 12% (3/3)	94% (1/1)	13 / 44%	6± 4% (0/4)
%CD117	6 ± 8% (0/5)	11± 20% (2/10)	11± 12% (1/10)	20± 28% (4/6)	22 ± 20% (1/3)	93% (1/1)	29 / 8%	16± 20% (2/4)
%CD33	11± 12% (0/5)	23± 32% (6/10)	29± 54% (6/10)	18± 44% (2/6)	39 ± 20% (3/3)	57% (1/1)	3 / 13%	35± 46% (3/4)

Moyenne ± 2 écarts-type. (Nombre de cas positifs/ Nombre total de patients du groupe).

Un patient étant considéré comme positif pour l'antigène recherché quand plus de 20% de la population cellulaire étudiée l'exprime

Tableau 10 : Moyenne de fluorescence pour chaque antigène du panel, dans le sang

Sang	Témoïn (n=5)	Réactionnel (n=10)	CRDM (n=10)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=3)	AREB-2 (n=1)	5Q- (n=2)	LMMC (n=4)
CD34	147± 107 (2/5) ++	299± 324 (7/10) ++	675± 974 (3/10) ++	243± 148 (5/6) ++	70± 16 (3/3) +	421 ++	409 / 630	672 ±591 (3/4) ++
CD61	297 ±159 (5/5) ++	241± 202 (6/10) ++	341± 336 (8/10) ++	169± 112 (4/6) ++	170 ±121 (2/3) ++	170 ++	93 / 150	247± 89 (4/4) ++
CD38	75± 46 (4/5) +	96± 54 (5/10) +	102± 52 (5/10) ++	84± 31 (4/6) +	68±33 (3/3) +	188 ++	50 / 161	126 ±47 (2/4) ++
CD71	104± 34 (2/5) ++	64± 31 (9/10) +	121± 66 (4/10) ++	43± 51 (5/6) +	105± 92 (2/3) ++	53 +	40 / 318	95± 60 (2/4) +
CD36	1393 ±1250 (2/5) ++	631± 502 (8/10) ++	731± 386 (8/10) ++	396± 295 (6/6) ++	274± 110 (3/3) ++	707 ++	883 / 785	480 ±177 (4/4) ++
GPA	44± 10 (5/5) +	84± 123 (9/10) +	82± 82 (8/10) +	76 ±79 (5/6) +	27± 25 (3/3) +	50 +	38 / 37	74± 77 (3/4) +
CD16	76± 51 (3/5) +	49± 20 (10/10) +	66± 43 (8/10) +	62± 40 (5/6) +	71± 18 (3/3) +	86 +	39 / 34	53± 21 (4/4) ++
CD13	451 ±170 (5/5) ++	416± 234 (10/10) ++	480 ±202 (10/10) ++	418± 67 (6/6) ++	497 ±154 (3/3) ++	369 ++	837 / 516	757± 271 (3/4) ++
CD3	64± 26 (5/5) +	157± 158 (5/10) ++	105 ±122 (4/10) ++	50 ±24 (6/6) +	100 ±35 (2/3) +	500 ++	315 / 94	142 ±82 (3/4) ++
CD15	1093 ±1317 (2/5) +++	593 ±831 (8/10) ++	1061± 999 (4/10) +++	696± 721 (5/6) ++	444± 161 (3/3) ++	494 ++	403 / 179	509± 388 (3/4) ++
CD10	158 ±127 (4/5) ++	117± 81 (3/10) ++	271± 267 (6/10) ++	127± 111 (1/6) +	234± 131 (3/3) ++	182 ++	77 / 79	138± 25 (4/4) ++
CD19	63± 43 (4/5) +	115± 78 (5/10) ++	149± 188 (3/10) ++	117± 74 (3/6) ++	107± 82 (1/3) ++	76 +	359 / 206	145± 48 (3/4) ++
HLA-DR	376± 379 (4/5) ++	416± 333 (9/10) ++	416 ±307 (9/10) ++	482± 315 (5/6) ++	364 ±323 (3/3) ++	496 ++	415 / 146	263± 86 (4/4) ++
CD117	127± 95 (3/5) ++	134± 101 (4/10) ++	432± 637 (5/10) ++	174± 104 (5/6) ++	394 ±510 (2/3) +	944 +	71 / 460	152± 65 (3/4) ++
CD33	182± 212 (2/5) ++	433± 772 (5/10) ++	195± 233 (4/10) ++	280 ±307 (4/6) ++	85± 76 (2/3) +	36 +	789 / 342	328± 432 (2/4) ++

+ : Fluorescence entre 1 et 100

++ : Fluorescence entre 101 et 1000

+++ : Fluorescence entre 1001 et 10 000

Moyenne ± 2 écarts-type.

(Nombre de patients correspondant à la fourchette de fluorescence / nombre total de patients).

⇒ **Pour le groupe des patients « réactionnels » (n=10) :**

Nous avons regroupé les cytopénies réactionnelles et la monocytose réactionnelle car elles semblent montrer un profil commun.

Tous les patients présentent le CD36.

Une majorité de patients présentent : le CD61, le CD38, le CD13, le CD15, HLA-DR, le CD33.

HLA-DR et le CD38 sont en faveur de cellules immatures. Quant aux CD33 et CD13, ils marquent la lignée myéloïde. On peut dire que les blastes sont des myéloblastes comme pour les témoins.

Le CD61 et le CD36, comme pour les témoins sont en faveur d'une contamination plaquettaire. Par ailleurs, 2 patients présentant une thrombopénie périphérique, ne montrent pas le CD61 dans leur profil.

Le CD15, retrouvé sur la lignée myéloïde, du promyélocyte au granuleux mature mais aussi sur la lignée monocyttaire est peut-être présent à cause d'une contamination de la fenêtre blastique.

Comme pour les témoins, on note l'absence du CD71, de la glycophorine A, et du CD19 et surtout l'absence du CD34.

⇒ **Pour le groupe des CRDM (n=10) :**

Ils présentent un profil de précurseur myéloïde : CD38, CD13, CD33, HLA-DR.

Comme les deux groupes précédents, on retrouve le CD61, le CD36 et l'absence du CD71 et du CD34. Le patient ne montrant pas de CD61 dans son profil, présente une thrombopénie.

Nous observons quelques aberrations phénotypiques :

- 5 patients expriment le CD16
- 8 patients expriment le CD15 : le marqueur peut être considéré soit comme une aberration phénotypique, soit comme une contamination de la fenêtre blastique par des granuleux dégranulés.
- 1 patient exprime le CD19 (absent dans la population témoin et les cytopénies réactionnelles)
- 2 patients expriment le CD3 (absent dans la population témoin)
- 4 patients expriment le CD10.

⇒ **Pour le groupe des ARSI (n=6) :**

Comme précédemment, nous obtenons un profil de précurseur myéloïde : CD38, CD13, CD117 (absent chez les témoins). Contrairement aux groupes précédents, seuls 2 patients expriment l'antigène HLA-DR.

Le CD36 et le CD61 marquent la population blastique chez la majorité des patients.

On note également l'absence du CD34.

On retrouve chez 5 patients le CD15.

⇒ **Pour le groupe des AREB-1 (n=3) :**

Les blastes ont un profil CD38, CD13, HLA-DR et CD33, en accord avec un profil de précurseurs myéloïdes.

Contrairement aux autres populations, le CD61 ne s'exprime pas.

Le CD36 est retrouvé chez 2 patients sur 3.

Le CD34 n'est pas exprimé.

Le CD15 est présent chez les 3 patients.

⇒ **Pour le patient présentant une AREB-2 :**

C'est le seul patient où le CD34 s'exprime.

La population fenêtrée présente un profil : CD34, CD13, CD33, HLA-DR, CD117, ce qui correspond à la définition du myéloblaste normal selon Wells : un myéloblaste est défini par l'expression hétérogène du CD34, du HLA-DR, du CD117 et du CD33 à forte intensité. Ils ne doivent normalement pas exprimer le CD11b, le CD16 et le CD15 que l'on retrouve à des stades plus matures. (65)

Les antigènes CD71 et CD36 sont certainement dus à la présence de plaquettes.

Nous n'observons pas la présence aberrante d'antigènes appartenant à d'autres lignées.

⇒ **Pour les 2 patients présentant un syndrome 5q- (n=2) :**

Ils présentent seulement quelques caractères myéloblastiques et de progéniteur hématopoïétique : CD13, CD38.

Un seul patient présente le CD117 et l'autre patient présente HLA - DR. Aucun des deux ne présente le CD33.

Les populations blastiques de ces 2 patients expriment le plus fort pourcentage de CD36 et de CD61, ce qui peut s'expliquer par la thrombocytose du syndrome 5q-.

Absence du CD34.

On retrouve des aberrations phénotypiques telles la présence du CD15 ou du CD3.

⇒ **Pour le groupe de patients présentant une LMMC versant dysplasique (n=4) :**

On retrouve le profil de myéloblaste et de progéniteur hématopoïétique : CD38, CD13, HLA-DR, pour 3 patients, CD33, et CD117 pour seulement 2 patients.

On retrouve les mêmes aberrations phénotypiques que celles citées précédemment.

⇒ **Pour les moyennes de fluorescence :**

Il ne nous a pas semblé observer de différences significatives entre les différents groupes qui montrent des profils proches. Cependant pour préciser ces premiers résultats et avec l'aide des moyennes de fluorescence, nous avons choisi de quantifier la fluorescence de l'antigène CD34.

2. Dans la moelle

Nous avons répété quand cela était possible l'approche phénotypique des blastes dans la moelle.

Cf. **Tableau 11 : Expression des antigènes par les cellules fenêtrées en CD45 faible/SSC faible dans la moelle :**

Tableau 12 : Moyenne de fluorescence pour chaque antigène du panel, dans la moelle

**Tableau 11 : Expression des antigènes par les cellules fenêtrées en CD45 faible/SSC
faible dans la moelle :**

Moelle	Témoins (n=3)	réactionnel (n=5)	CRDM (n=8)	ARSI (n=4)	AREB-1 (n=1)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=1)	LMMC (n=2)
%CD34	24±28 (2/3)	22± 16 (3/5)	17± 22 (4/8)	18± 28 (1/4)	56%	84%	38%	16 / 14%
%CD61	21±24 (2/3)	42 ±46 (3/5)	33± 38 (6/8)	47±18 (4/4)	39%	60%	78%	42 / 25%
%CD38	82±14 (3/3)	78± 16 (5/5)	69 ±20 (8/8)	78± 10 (4/4)	45%	31%	75%	70 / 65%
%CD71	43±12 (3/3)	35± 46 (3/5)	44 ±38 (7/8)	48±44 (4/4)	34%	64%	22%	46 / 24%
%CD36	38± 40 (2/3)	47±14 (5/5)	58 ±40 (7/8)	74± 24 (4/4)	65%	87%	75%	68 / 47%
%GPA	4± 10 (0/3)	6± 14 (0/5)	15 ±38 (2/8)	13± 48 (1/4)	0%	5%	1%	26 / 7%
%CD16	22± 32 (2/3)	12± 20 (1/5)	26 ±26 (5/8)	32 ±40 (2/4)	15%	6%	5%	31 / 21%
%CD13	41± 42 (3/3)	45 ±20 (5/5)	67± 18 (8/8)	67± 8 (4/4)	61%	95%	77%	45 / 69%
%CD3	3± 10 (0/3)	3 ±6 (1/5)	9 ±10 (0/8)	2 ±6 (0/4)	1%	1%	2%	15 / 18%
%CD15	31± 36 (2/3)	41± 48 (4/5)	47± 48 (7/8)	65± 16 (4/4)	49%	47%	43%	50 / 54%
%CD10	47± 44 (3/3)	37± 34 (3/5)	11± 20 (1/8)	14± 14 (1/4)	37%	0%	5%	6 / 8%
%CD19	42± 40 (3/3)	35± 34 (3/5)	11± 14 (1/8)	8 ±16 (1/4)	19%	1%	5%	10 / 2%
%HLA-DR	83 ±20 (3/3)	70 ±28 (5/5)	65± 36 (8/8)	78 ±24 (4/4)	71%	89%	43%	79 / 65%
%CD117	21±24 (1/3)	17± 10 (1/5)	14± 16 (2/8)	11 ±20 (0/4)	20%	81%	31%	9 / 12%
%CD33	15±10 (1/3)	16± 8 (3/5)	39 ±38 (7/8)	36± 48 (3/4)	27%	72%	5%	8 / 50%

Moyenne ± 2 écarts-type. (Nombre de cas positifs / nombre de patients dans le groupe).

Un patient étant considéré comme positif pour l'antigène recherché quand plus de 20% de la population cellulaire étudiée l'exprime.

Tableau 12 : Moyenne de fluorescence pour chaque antigène du panel, dans la moelle

Moelle	Témoins (n=3)	réactionnel (n=5)	CRDM (n=8)	ARSI (n=4)	AREB-1 (n=1)	AREB-2 (n=1)	5q- (n=1)	LMMC (n=2)
CD34	121± 124 (2/3) ++	261± 290 (5/5) ++	189± 202 (6/8) ++	124± 66 (3/4) ++	159 ++	419 ++	150 ++	214 / 112 ++
CD61	236± 194 (3/3) ++	527± 778 (4/5) ++	369± 378 (8/8) ++	164± 110 (4/4) ++	418 ++	193 ++	271 ++	469 / 132 ++
CD38	188± 144 (3/3) ++	199 ±270 (3/5) ++	145± 40 (8/8) ++	137 ± 104 (3/4) ++	130 ++	122 ++	87 +	291 / 153 ++
CD71	345± 566 (3/3) ++	940± 2134 (3/5) ++	582± 1364 (7/8) ++	931 ± 1452 (3/4) ++	478 ++	377 ++	119 ++	1405 / 618 +++
CD36	456 ±614 (3/3) ++	637± 862 (4/5) ++	633± 706 (7/8) ++	1235 ± 1828 (2/4) +++	797 ++	655 ++	1304 +++	1088 / 547 ++
GPA	56± 60 (3/3) +	49 ±36 (5/5) +	74 ±72 (7/8) +	261± 634 (2/4) ++	0 +	49 +	39 +	274 / 63 ++
CD16	37 ±34 (3/3) +	39± 16 (5/5) +	66 ±48 (7/8) +	68± 66 (3/4) +	31 +	43 +	27 +	23 / 69 +
CD13	264± 234 (3/3) ++	253 ±234 (5/5) ++	504 ±544 (8/8) ++	311± 222 (4/4) ++	271 ++	748 ++	826 ++	110 / 476 ++
CD3	63± 32 (3/3) +	315± 1114 (0/5) ++	78± 100 (7/8) ++	41± 26 (4/4) +	44 +	83 +	83 +	186 / 106 ++
CD15	220± 350 (2/3) ++	185± 614 (3/5) ++	743± 1222 (6/8) ++	444 ± 1022 (3/4) ++	564 ++	401 ++	328 ++	104 / 661 ++
CD10	355 ±210 (3/3) ++	472± 614 (5/5) ++	247± 258 (7/8) ++	154 ± 300 (2/4) ++	1184 +++	184 ++	240 ++	193 / 189 ++
CD19	82± 60 (2/3) +	112± 100 (2/5) ++	88± 66 (6/8) +	64± 96 (3/4) +	73 +	145 ++	95 +	58 / 82 +
HLA-DR	663± 694 (2/3) ++	632± 938 (4/5) ++	813± 252 (8/8) ++	757± 648 (3/4) ++	889 ++	911 ++	620 ++	832 / 641 ++
CD117	251± 136 (3/3) ++	259 ±206 (5/5) ++	450± 768 (7/8) ++	302± 66 (4/4) ++	656 ++	897 ++	283 ++	515 / 547 ++
CD33	141± 250 (1/3) ++	312± 668 (4/5) ++	128± 176 (4/8) ++	66± 122 (3/4) +	39 +	45 +	18 +	571 / 44 ++

+ : Fluorescence entre 1 et 100

++ : Fluorescence entre 101 et 1000

+++ : Fluorescence entre 1001 et 10 000

Moyenne ± 2 écarts-type.

(Nombre de patients correspondant à la fourchette de fluorescence / nombre total de patient)s.

⇒ **Le groupe des « réactionnels » (n=5) :**

Nous avons regroupé les cytopénies réactionnelles et la monocytose réactionnelle car elles semblent montrer un profil commun.

Comme pour le groupe des témoins, nous retrouvons les marqueurs d'immaturation : CD38 et HLA-DR chez les 5 patients à plus de 70% de la population fenêtrée.

Le CD36 est présent chez les 5 patients, l'origine est plutôt plaquettaire puisque la glycophorine A est absente et le CD61 est présent chez 3 patients.

Le CD13 est présent chez tous les patients.

Le profil serait plutôt myéloïde bien que le CD33 ne soit présent que chez 3 patients sur 5.

Le CD34 est présent chez 3 patients sur 5.

Chez les 3 patients présentant une neutropénie périphérique, les cellules expriment le CD10, le CD19 et le CD15 et le CD61.

⇒ **Le groupe des patients CRDM (n=8) :**

Tous les patients expriment, comme chez les témoins, le CD38, le CD13, le HLA-DR et 7 patients sur 8 expriment en plus le CD33, le CD15, le CD36 et le CD71. Les cellules fenêtrées sont certainement des myéloblastes. Le CD15, présent sur les granuleux plus matures peut correspondre à une contamination de la fenêtre blastique par des granuleux dégranulés présents dans les syndromes myélodysplasiques. Le CD36 et le CD71 peuvent correspondre soit à des érythroblastes soit à des proérythroblastes.

Seulement la moitié des patients expriment le CD34.

Le CD61, présent chez la majorité des patients, peut correspondre à un satellitisme des plaquettes.

⇒ **Le groupe des ARSI (n=4) :**

Les ARSI présentent le même profil que les CRDM. Un plus grand nombre de cellules expriment le CD36 (74% contre 58% dans les CRDM) et la moyenne de fluorescence pour ce même marqueur est beaucoup plus forte dans les ARSI.

Seulement un patient sur 4 exprime le CD34.

Le CD10 et le CD19 sont exprimés par des patients différents.

Aucun n'exprime le CD3 ou le CD117.

⇒ **Le patient AREB-1 et le patient AREB-2 :**

Ils présentent les mêmes antigènes de myéloblastes : CD34, CD38, HLA-DR, CD117 et CD33. Tous ces marqueurs sont retrouvés avec un pourcentage beaucoup plus important dans l'AREB-2. Nous retrouvons également le CD61, le CD71 et le CD36 comme dans les autres groupes. Seul le patient AREB-1 exprime le CD10.

Il ne semble pas y avoir de modification de la moyenne de fluorescence entre les 2 patients.

⇒ **Le syndrome 5q- :**

Nous n'avons qu'un seul patient. Il a le profil suivant : CD34, CD61, CD38, CD71, CD36, CD13, CD15, HLA-DR, et CD117. Le profil correspond à des myéloblastes, avec expression du CD15 (pollution de la fenêtre par des granuleux dégranulés ou expression aberrante de l'antigène ?), présence d'érythroblastes ou satellitisme des plaquettes avec l'expression du CD36, du CD71 et du CD61.

⇒ **Le groupe des LMMC (n=2) :**

Les deux patients expriment le même type d'antigènes que les autres syndromes myélodysplasiques, avec en plus l'expression pour les 2 patients du CD16, antigène que l'on retrouve habituellement sur les lymphocytes mais aussi sur la lignée myéloïde.

⇒ **Pour les moyennes de fluorescence,** nous noterons surtout le déplacement de l'intensité de fluorescence pour le CD36 dans les ARSI et les syndromes 5q-.

Comme pour le sang, les profils des différents groupes sont assez semblables et pour préciser ces résultats, nous avons quantifier la fluorescence d'un des antigènes : le CD34.

**RESULTATS DE LA
QUANTIFICATION DE
FLUORESCENCE DE
L'ANTIGENE CD34**

IX. Résultats de la quantification de fluorescence de l'antigène CD34

1. Dans le sang

Tableau 13 : Quantification de la fluorescence de l'antigène CD34 dans le sang

MESF (Sang)	
Témoins (n=5)	27 016 ± 12 284 (16 351-31 441)
Ethylisme chronique (n=1)	25 229
Ins. Rénale (n=1)	31 052
Post-op ou état septique (n=1)	35 562
Carences vitaminiques (n=4)	31 087 ± 7 116 (26 008-35 747)
Neutropénies (n=4)	21 882 ± 24 264 (13 070-39 684)
Thrombop. périph. (n=2)	39 561/30 027
Monocytose réac. (n=1)	22 563
CRDM (n=12)	20 674 ± 27 958 (1 692-39 765)
ARSI (n=6)	28 413 ± 26 400 (9 995-42 246)
AREB-1 (n=4)	14 573 ± 15 342 (7 781-24 942)
AREB-2 (n=1)	24 757
Syndrome 5q- (n=2)	28 550 / 22 666
LMMC (n=4)	18 432 ± 21 110 (6 960-30 785)

Moyenne ± 2 écarts-type. (Mini-Maxi)

⇒ **Pour le groupe témoin (n=5) :**

L'effectif est faible. Le groupe présente des résultats assez dispersés.

Nous n'avons pas retrouvé de point de comparaison dans la littérature.

⇒ **Pour les cytopénies réactionnelles :**

❖ Pour les anémies dues à un **éthylisme chronique, ou à une insuffisance rénale ou à un état post-opératoire ou septique**, nous n'avons qu'un seul patient par catégorie. La

quantité de fluorescence pour chacun des patients semble entrer dans l'intervalle des valeurs-témoins.

- ❖ **Pour les anémies des carences vitaminiques (n=4)** : le groupe montre des valeurs moins dispersées que le groupe témoin. Même si les valeurs semblent plus fortes, nous n'avons pas retrouvé de différence significative avec le groupe témoin. (p=0,33)
- ❖ **Les neutropénies réactionnelles** présentent 4 valeurs très différentes. La dispersion est trop importante dans le groupe pour retrouver une différence significative avec les témoins même si la moyenne paraît plus faible. (p=0,33)
- ❖ **Les thrombopénies périphériques (n=2)** présentent des valeurs assez éloignées.

⇒ **Pour la monocytose réactionnelle :**

La quantité de fluorescence entre dans l'intervalle des valeurs des témoins mais aussi des LMMC.

⇒ **Les CRDM (n=12) :**

C'est un groupe peu homogène. Du fait de la dispersion des valeurs, et bien que la moyenne semble plus faible que celle des témoins, on ne retrouve pas de différence significative. (p=0,46) De même avec les cytopénies réactionnelles, la moyenne pour le groupe des CRDM semble plus faible mais la faiblesse des effectifs et la dispersion ne permettent pas de conclure.

⇒ **Le groupe des ARSI (n=6) :**

Comme pour les CRDM, le groupe présente des valeurs très dispersées.

La moyenne est proche de celle des témoins. Nous ne retrouvons aucune différence significative, ni avec les témoins (p=0,78) ni avec les cytopénies réactionnelles (avec le groupe des carences, p=1,0, avec les neutropénies, p=0,39, avec les thrombopénies, p=0,74).

⇒ **Le groupe des AREB-1 (n=4) :**

Le groupe a un petit effectif et montre des valeurs assez dispersées.

Les résultats sont significativement inférieurs à ceux du groupe témoin. (p=0,03)

On retrouve cette différence significative avec le groupe des anémies par carence. ($p=0,02$)
C'est la moyenne la plus faible sur l'ensemble des groupes.

⇒ **L'AREB-2** :

La valeur est proche de celles du groupe témoin.

⇒ **Le syndrome 5q- (n=2)** :

Les deux valeurs sont assez proches. Nous n'avons pas retrouvé de différences avec les différents groupes. Nous n'avons pas de patients présentant une thrombocytose pour cette technique qui nous aurait permis de faire le parallèle avec le syndrome 5q-.

⇒ **Le groupe des LMMC (n=4)** :

Le groupe présente des valeurs très dispersées. La moyenne paraît plus faible que celle du groupe témoin, cependant nous ne retrouvons pas de différence significative. ($p=0,22$)

La monocytose réactionnelle se retrouve dans la fourchette de valeurs des LMMC.

La quantification de la fluorescence de l'antigène CD34 a montré des valeurs très différentes au sein des groupes. La dispersion importante n'a pas permis de révéler un profil particulier ni la discrimination entre les pathologies qu'elles soient réactionnelles ou tumorales. Seul le groupe des AREB-1 se distingue par des valeurs nettement plus faibles.

2. Dans la moelle

Cf. Tableau 14 : Quantification de la fluorescence de l'antigène CD34 dans la moelle

⇒ **Pour le groupe des témoins (n=3)** :

Nous n'avons que 3 patients. Les résultats sont modérément dispersés. Nous ne retrouvons pas les mêmes résultats que dans le sang.

⇒ **Pour le groupe des cytopénies réactionnelles (n=6)** :

Les résultats sont très dispersés. Si nous comparons les résultats au groupe des témoins, nous ne retrouvons pas de différence significative. ($p=0,83$)

Tableau 14 : Quantification de la fluorescence de l'antigène CD34 dans la moelle

MESF (moelle)	
Témoins (n=3)	20 483 ± 7584 (16 761-24 204)
Réactionnel (n=6)	24 176 ± 17 646 (7 350-31 585)
Monocytose (n=1)	16 166
CRDM (n=8)	20 808 ± 11 258 (13 440-20 808)
ARSI (n=5)	36 288 ± 41 626 (10 016-26 188)
AREB-1 (n=1)	18 668
AREB-2 (n=1)	48 787
Syndrome 5q- (n=1)	33 840
LMMC (n=2)	25 516 / 17 253

Moyenne ± 2 écarts-type. (Mini-maxi)

⇒ **Pour la monocytose réactionnelle :**

Le résultat est plus faible que la moyenne du groupe témoin. Nous n'avons pas d'autres patients pour confirmer ce résultat.

⇒ **Pour le groupe des CRDM (n=8) :**

L'effectif est un peu plus important. Les résultats sont modérément dispersés. Ils sont superposables au groupe témoin. (p=0,83)

⇒ **Pour le groupe des ARSI (n=5) :**

La moyenne semble beaucoup plus forte par rapport à l'ensemble des autres groupes, cependant la dispersion est telle que nous ne retrouvons pas de différences significative, ni avec les témoins (p=0,45), ni avec le groupe des cytopénies réactionnelles (p=0,35)

⇒ **Pour l'AREB-1 et l'AREB-2 :**

La valeur pour l'AREB-1 est proche du groupe témoin, alors que celle de l'AREB-2 est très forte. Nous ne pouvons pas confirmer ces résultats par des tests statistiques.

⇒ **Le syndrome 5q- :**

Il présente une valeur forte, qui semble très éloignée des valeurs du groupe témoin.

⇒ **Le groupe des LMMC (n=2) :**

Les valeurs sont dans la fourchette du groupe témoin. Nous ne retrouvons de différence ni avec le groupe témoin ni avec les cytopénies réactionnelles.

La quantification de la fluorescence de l'antigène CD34 dans la moelle a montré des valeurs très différentes au sein des groupes. La dispersion importante ainsi que la taille des effectifs n'ont pas permis de révéler un profil particulier ni la discrimination entre les pathologies qu'elles soient réactionnelles ou tumorales.

Nous n'avons pas obtenu de résultats significatifs quant à la quantification de fluorescence de l'antigène CD34. Nous n'avons donc pas poursuivi cette technique pour d'autres antigènes sachant qu'ils présentaient des profils semblables (Cf. tableau 11 et 12)

**RESULTATS DE
LA CULTURE
CELLULAIRE**

X. Résultats de la culture

1. Dans le sang

Tableau 15 : Résultats de la culture cellulaire à partir des cellules mononucléées du sang

Sang	Témoins (n=2)	Cytopénies réactionnelles (n=5)	Monocytose réac. (n=1)	CRDM (n=9)	ARSI (n=6)	AREB-1 (n=3)	AREB-2 (n=1)	LMMC (n=3)
CFU-GM viables	7,87 / 3,3	10,84 ± 13,78 (3-22) 10,02	14,09	2,5 ± 5,06 (0-6,45) 0,60	3,62 ± 4,4 (0,9-6,59) 3,23	2,81 ± 9,74 (0-8,43) 0	0	7,14 ± 6,94 (4,2-12,01) 5,19
CFU-GM totales	11,01 / 11,54	13,66 ± 18,54 (4-30,8) 12,59	16,79	4,47 ± 7,68 (0,3-12,58) 4,55	4,55 ± 6,22 (1,5-10,18) 3,68	10,82 ± 29,28 (1,75-27,71) 3,01	27 855	10,27 ± 6,88 (6-14,41) 10,39
BFU-E viables	24,65 / 41,76	25,11 ± 35,40 (1,35-60,4) 22,40	1,35	7,50 ± 20 (0-30,8) 1,32	6,32 ± 7,64 (1,8-13,96) 5,86	1,48 ± 0,56 (1,2-1,75) 1,5	0	1,13 ± 3,2 (0-3,4) 0
BFU-E totales	40,91 / 51,1	34,52 ± 47,04 (4,2-76,4) 26,06	4,2	11,65 ± 28,64 (0,6-41,25) 3,90	15,15 ± 10,62 (7,8-21,92) 14,86	8,09 ± 13,84 (1,2-15,04) 8,04	0	2,53 ± 3,58 (0-7,6) 0
CFU-MK (J10) matures	3,26 / 1,47	2,65 ± 2,74 (1,6-3,5) 2,75	/	1,31 ± 2,30 (0-3,96) 0,70	1,29 ± 3,90 (0-5,6) 0,42	1,83 ± 3,52 (0-3,5) 2,0	1604	0,6 ± 1,42 (0-1,6) 0,2
CFU-GM: clonogénicité viable	7,5 / 3	19,25 ± 29,22 (5,5-47) 14	47	5,33 ± 12,22 (0-21,5) 2,0	6,50 ± 5,22 (1,5-10) 6,75	1,17 ± 4,04 (0-3,5) 0	0	19,75 ± 0,5 (19,5-20) 19,75
CFU-GM: clonogénicité totale	10,5 / 10,5	24 ± 25,64 (6-56) 16,75	56	11,11 ± 26,58 (0,5-45,5) 7,5	9,00 ± 4,64 (2,5-18,0) 8,0	5,33 ± 10,7 (2-11,5) 2,5	69,5	19,5 ± 4,5 (15-24) 19,5
CFU-GM viable/total	0,71	0,8	0,84	0,48	0,72	0,22	0	1
BFU-E clonogénicité viable	23,5 / 38	36,33 ± 43,26 (4,5-75,5) 33,25	4,5	10,39 ± 24,30 (0-38,50) 4,5	13,92 ± 15,92 (1,5-24,5) 13,25	1,17 ± 2,30 (0,5-2,5) 0,5	0	4,25 ± 8,5 (0-8,5) 4,25
BFU-E clonogénicité totale	39,1 / 46,5	47,92 ± 53,72 (14-95,5) 42,25	14	16,1 ± 29,12 (2,5-47,5) 13,0	30,08 ± 24,28 (17-52) 28,5	7,33 ± 11,94 (0,5-11,5) 10	0	9,5 ± 19 (0-19) 9,5
BFU-E viable/total	0,6	0,75	0,3	0,64	0,46	0,16	0	0,45
CFU-MK clonogénicité totale	4,67 / 1,33	3,25 ± 3,66 (1,67-5) 3,17	/	5,8 ± 12,14 (0-21,33) 2,0	2,06 ± 3,6 (0-4,67) 1,34	2,11 ± 5,18 (0-5) 1,33	4	2,17 ± 3,68 (0,33-4) 2,17
BFU-E/CFU-GM	3,13 / 12,67	3,23 ± 4,02 (0,1-6,2) 3,46	0,1	2,19 ± 3,8 (0-4,81) 2,0	2,49 ± 2,24 (0,27-5,67) 2,33	0,05 ± 0,16 (0-0,14) 0	0	0,22 ± 0,38 (0-0,44) 0,22

Moyenne ± 2 écarts-type. (Mini-Maxi). Médiane

Il nous a semblé intéressant de faire apparaître les médianes dans les résultats pour pouvoir comparer à la littérature.

⇒ **Pour les 2 témoins :**

Les résultats semblent proches en ce qui concerne les granuleux et les mégacaryocytes. Cependant, on note une différence importante pour la lignée érythrocytaire.

Pour le 1^{er} patient, les rapports colonies viables/totalité des colonies pour les BFU-E et les CFU-GM paraissent normaux (en moyenne 70% de colonies viables)

⇒ **Le groupe des cytopénies réactionnelles (n=5) :**

Les résultats sont assez hétérogènes. Ils sont superposables au 1^{er} témoin.

Les rapports (viables/total) sont respectés (75 à 80% de colonies viables) et le rapport BFU-E/CFU-GM est sensiblement normal (3 fois plus de colonies rouges par rapport aux granuleux).

⇒ **La monocytose réactionnelle :**

La lignée granuleuse semble respectée.

Par contre, nous n'obtenons que très peu de colonies de la lignée rouge et sur ce faible nombre de colonies, seules 30% d'entre elles sont viables.

⇒ **Le groupe des CRDM (n=9) :**

Le nombre de colonies obtenues, tant pour la lignée granuleuse que pour les rouges, est très inférieur à celui obtenu, tant chez les témoins que pour les cytopénies réactionnelles. La différence est moins importante pour les CFU-MK.

Par ailleurs, la viabilité des colonies est nettement inférieure : 48% seulement des colonies sont viables pour les granuleux, et 64% pour la lignée rouge.

Le rapport BFU-E/CFU-GM est maintenu puisque les rouges et les granuleux sont touchés.

Nous retrouvons un développement similaire entre témoins et cytopénies réactionnelles, alors que les CRDM se démarquent par un déficit en colonies et une augmentation de leur lyse.

⇒ **Pour le groupe des ARSI (n=6) :**

Comme pour les CRDM, les ARSI montrent un nombre diminué de CFU-GM et de BFU-E, le nombre de CFU-MK étant diminué de façon moins importante.

Le pourcentage de colonies granuleuses viables reste compatible avec la normale, cependant nous remarquons un plus grand nombre de colonies défectueuses pour les BFU-E avec seulement 46% de colonies viables. Le rapport BFU-E/CFU-GM reste équilibré.

⇒ **Le groupe des AREB-1 (n=3) :**

Nous n'obtenons que peu de colonies, qui par ailleurs paraissent en grande majorité défectueuses : seules 16% des colonies rouges et 22% des colonies granuleuses sont viables.

Le rapport BFU-E/CFU-GM est nul.

⇒ **L'AREB-2 :**

Nous obtenons un très grand nombre de CFU-GM et de CFU-MK mais toutes ces colonies sont défectueuses. Les BFU-E ne poussent pas. C'est le mode de pousse leucémique.

⇒ **Le groupe des LMMC (n=3) :**

Les progéniteurs semblent engagés dans la lignée granuleuse : nous obtenons un nombre normal de CFU-GM donnant 100% de colonies viables, tandis que les BFU-E poussent en faible quantité et de façon défectueuse. Les CFU-MK ne sont pas très bien représentés.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus dans la monocytose réactionnelle.

La culture cellulaire semble discriminante entre les cytopénies réactionnelles et les myélodysplasies précoces (CRDM et ARSI) non seulement au niveau du nombre de colonies obtenues mais également par le ratio de lyse, que ce soit pour la lignée granuleuse ou la lignée érythroblastique.

Les AREB 1 et 2 présentent un schéma typique, en particulier un fort ratio de lyse, pour n'obtenir que des colonies défectueuses dans le cadre de l'AREB-2.

2. Dans la moelle

Nous avons répété quand cela était possible la technique de culture cellulaire dans la moelle.

Tableau 16 : Résultats de la culture cellulaire à partir des cellules mononucléées de la moelle

Moelle	Témoins (n=8)	Cytopénies réactionnelles (n=6)	Monocytose réac. (n=1)	CRDM (n=6)	ARSI (n=5)	AREB-1 (n=2)	AREB-2 (n=1)	LMMC (n=4)
CFU-GM viables	181,9±266,8 (12,1-488,5) 182,4	122,1 ± 189,1 (5,7-265,6) 120,7	77,50	74,8 ± 106,2 (4,5-134,4) 84,7	84,3 ± 74,4 (20,5-137,3) 88,5	0 / 0	5513,8	140,4 ± 212,1 (22,5-293,7) 122,8
CFU-GM totales	181,9±266,8 (12,1-488,5) 182,4	151,9 ± 223,2 (5,7-301,8) 135,3	94,60	108,7 ± 139,7 (11,5-190,5) 125,7	137,5± 96,3 (48,7-188,8) 140,0	248,4 / 57,7	40852,1	262,6 ± 365,8 (41,2-468,6) 270,3
BFU-E viables	133,3±167,8 (17,7-321,8) 125,0	99,3± 150,2 (1,5-213,5) 108,4	37,20	61,4 ± 123,8 (0-135,5) 54,6	12,9 ± 38,5 (0-51,2) 5,0	0 / 0	250,6	41,4 ± 49,4 (13-74) 39,3
BFU-E totales	148,7±180,6 (17,6-321,8) 135,3	159,5 ± 227,8 (3,6-260,4) 250,0	58,90	108,2 ± 194,3 (2,3-218,5) 107,8	102,8 ± 97,8 (59-177) 70,0	151,2 / 1355,7	501,2	150,2 ± 179 (65-297) 119,5
CFU-MK (J10) matures	50,1±96,2 (7,9-149,7) 23,0	39,3 ± 68,6 (0,1-78,5) 40,6	/	10,8 ± 32,2 (0-44,8) 4,0	26,9 ± 54,3 (1,7-78,2) 15,0	_ / 6,4	500,8	16,7 ± 34,4 (0-42,5) 12,2
CFU-GM: clonogénicité viable	19,2±21,0 (5,5-42,5) 17,7	16,9 ± 12,2 (9-25,5) 17,5	25,00	14,3 ± 25,8 (0,5-33) 13,7	14,8 ± 21,5 (4-33,5) 15,0	0 / 0	11,0	22,9 ± 25,6 (12,5-44,5) 17,3
CFU-GM: clonogénicité totale	19,2±21,0 (5,5-42,5) 17,7	18,9 ± 16,5 (9-30,5) 20,0	30,50	22,25 ± 28,3 (5-44) 22,5	23,6 ± 26,6 (7-41,5) 28,0	11,5 / 3	81,5	39,2 ± 47,2 (14,5-71) 32,0
CFU-GM viable/total	1	0,89	0,82	0,64	0,63	0	0,13	0,58
BFU-E clonogénicité viable	14,0±13,0 (6-28) 13,7	12,8 ± 10,5 (2,5-20,5) 12,0	12,00	13,7 ± 28,4 (0-31,5) 9,75	3 ± 9,5 (0-12) 1,0	0 / 0	0,5	11,3 ± 16,9 (1-24,5) 9,8
BFU-E clonogénicité totale	14,3±13,0 (6-28) 14,25	21,1 ± 20,8 (6-42) 22,0	19,00	21,9 ± 38,7 (0,5-47) 21,0	18,6 ± 24,2 (3,5-35,5) 12,5	7 / 70,5	1,0	26,2 ± 32,8 (5-45) 28,5
BFU-E viable/total	1	0,6	0,63	0,62	0,16	0	0,5	0,43
CFU-MK clonogénicité totale	5,4±13,2 (1-22) 2,7	4,8 ± 8,5 (0,3-12,7) 4,0	/	136,3 ± 222,5 (4,5-256) 152,5	3,4 ± 8,8 (0,3-7,7) 3,3	_ / 0,3	1,0	3,4 ± 7 (0,3-8,3) 1,7
BFU-E/CFU-GM	0,8±0,4 (0,5-1,2) 0,7	0,8 ± 0,6 (0,3-1,2) 0,8	0,48	0,6 ± 1,0 (0-1,3) 0,8	0,14 ± 0,3 (0-0,4) 0,1	0 / 0	0,05	0,7 ± 1,5 (0,1-2) 0,4

Moyenne ± 2 écarts-type. (Mini-Maxi). Médiane

⇒ **Le groupe de témoins (n=8)** :

Ce sont des donneurs de moelle osseuse en vue de greffe. Nous avons uniquement la moelle.

La dispersion des résultats est assez grande, cependant nous constatons que pour les BFU-E ou les CFU-GM, 100% des colonies sont viables.

Le ratio de référence BFU-E/CFU-GM dans la moelle est évalué à 0,8.

⇒ **Le groupe des cytopénies réactionnelles (n=6)** :

Les résultats sont également très dispersés.

Chaque lignée est bien représentée, toutefois le rapport colonies viables sur la totalité des colonies est relativement faible. Nous ne retrouvons que 60% de colonies viables pour les BFU-E.

Le rapport BFU-E/CFU-GM est conservé.

⇒ **La monocytose réactionnelle** :

Le nombre de colonies est diminué par rapport aux témoins, en particulier pour les BFU-E.

Par ailleurs, le ratio de lyse est augmenté pour les granuleux et davantage pour la lignée rouge pour laquelle on obtient seulement 63% de cellules viables.

Le ratio BFU-E/CFU-GM est diminué également.

⇒ **Le groupe des CRDM (n=6)** :

Nous retrouvons, comme pour le sang, une diminution des 3 lignées, ainsi qu'un pourcentage de lyse augmenté : environ 60% des colonies sont viables, pour les BFU-E mais aussi pour les CFU-GM.

Le rapport BFU-E/CFU-GM est maintenu du fait de la baisse en parallèle des deux lignées.

⇒ **Le groupe des ARSI (n=5)** :

Le nombre de colonies granuleuses et leur ratio de lyse sont superposables au groupe des CRDM et donc inférieur aux témoins et aux cytopénies réactionnelles.

Ce qui est particulièrement intéressant, c'est le rapport des colonies viables BFU-E sur le total des BFU-E : seules 16% des cellules restent viables.

Nous obtenons alors un rapport BFU-E/CFU-GM extrêmement faible.

⇒ **Les AREB-1 (n=2)** :

Les résultats du nombre total de colonies sont proches de ceux retrouvés chez les témoins, cependant la viabilité des colonies est nulle.

⇒ **L'AREB-2** :

Comme dans les AREB-1, toutes les colonies sont lysées, mais le nombre total de colonies pour les 3 lignées est très important. C'est le mode de croissance leucémique.

⇒ **Les LMMC (n=4)** :

Le nombre total de colonies est superposable à celui des témoins. Ce qui différencie les deux groupes, c'est l'augmentation de la lyse des colonies tant pour les granuleux que pour les rouges.

Nous n'observons pas de différence avec la monocytose réactionnelle.

Comme dans le sang, la culture cellulaire semble faire la différence entre témoins sains, cytopénies réactionnelles et les myélodysplasies précoces, non seulement par un nombre diminué de colonies présentes mais aussi par une augmentation de la lyse de ces colonies. Cette lyse est la plus importante pour les BFU-E dans les ARSI avec un ratio BFU-E/CFU-GM très faible.

DISCUSSION

XI. Discussion

1. Numération des blastes

L'objectif de notre étude était de voir si la numération des blastes dans un échantillon de sang permettait la distinction entre une cytopénie d'origine réactionnelle et une cytopénie d'origine dysplasique.

⇒ **A propos des méthodes** :

La microscopie optique montre un seuil de détection de 1 pour 100 cellules analysées. La cytométrie est plus performante avec des seuils de détection, quelle que soit la méthode employée, de 1 cellule pour 10^4 cellules analysées. Cela permet de détecter des événements en l'absence de résultats en microscopie optique.

Dans le cas d'une blastose circulante, on obtient une augmentation des événements détectés en cytométrie en flux, quelle que soit la méthode employée, comme l'ont montré Barosi et Fuchigami. (36,39) Avec cinq patients présentant une blastose circulante, nous n'avons pu confirmer leurs résultats.

En ce qui concerne les méthodes de numération en cytométrie en flux, on note une force de corrélation trop faible pour superposer les 3 méthodes. La discordance entre les cellules qui se projettent dans la fenêtre CD45 faible/SSC faible et les cellules exprimant le CD34 indique que si la méthode n°2 détecte des blastes, alors ces blastes n'expriment pas tous le CD34.

A l'inverse, on pourrait émettre l'hypothèse que tous les blastes expriment le CD34 et que les cellules collectées dans la fenêtre CD45 faible/SSC faible, contiennent à la fois des blastes mais aussi d'autres types de cellules comme des granuleux dégranulés, des monocytes des lymphocytes et même des érythroblastes. Cette méthode n°2 serait moins spécifique, par l'absence d'un marqueur supplémentaire.

En ce qui concerne la technique n°3, il aurait été intéressant de l'appliquer à la moelle pour observer une éventuelle corrélation avec les blastes observés en microscopie optique et valider la méthode. Cependant, la variété beaucoup plus importante des cellules dans la moelle par rapport au sang compliquerait la technique par le nombre de marqueurs qu'il faudrait alors employer.

Seul le patient présentant une AREB-2 et montrant 4% de blastes circulants a permis de voir une élévation du nombre de cellules comptées. Nous avons considéré ce patient comme un témoin de positivité.

Cette méthode est corrélée, même faiblement, aux deux premières techniques.

Pour confirmer ces premiers résultats, il serait intéressant d'employer cette technique dans des cas de blastoses sanguines importantes mais également de pouvoir analyser morphologiquement les cellules récoltées par un trieur.

Dans les 3 cas, nous remarquons la difficulté à fenêtrer des populations minoritaires comme les blastes dans le sang et le nombre très important de cellules à collecter pour obtenir le minimum d'événements requis.

A l'avenir, la cytométrie en flux va permettre d'augmenter la spécificité dans l'identification des cellules en augmentant le nombre de fluorochromes utilisés.

⇒ **A propos des résultats :**

Seule la méthode n°1, méthode de référence dans le cadre des transplantations des cellules souches, a permis une comparaison avec les résultats de la littérature.

Nous avons constaté que les taux retrouvés pour les témoins entrent dans l'intervalle de valeurs proposées par les différentes études (36-39,52).

Nous avons également comparé les valeurs de la littérature dans le cadre des thrombocytémies essentielles à nos valeurs dans les syndromes 5q- mais aussi dans les thrombocytoses et monocytoses réactionnelles.(36,37) Les résultats sont superposables et restent dans l'ensemble inférieurs à $7.10^6/l$, excepté pour un patient qui cumulait à la fois une thrombocytose et une monocytose.

Pour les syndromes myélodysplasiques, l'étude de Fuchigami a été la référence de notre travail. Il a observé que les anémies réfractaires (classification FAB) montraient des moyennes pour les cellules exprimant le CD34 significativement plus faibles que pour le groupe de témoins sains (38). Nous n'avons pas d'anémies réfractaires simples dans notre étude, mais nous pouvons penser que les CRDM, classification OMS, étaient incluses dans les

anémies réfractaires de la classification FAB, et nous retrouvons également une différence significative entre les CRDM et les témoins.

Dans les LMMC, nous obtenons également des résultats superposables (39).

Nous ne retrouvons pas d'éléments comparatifs dans la littérature en ce qui concerne les ARSI, de même pour les cytopénies réactionnelles.

Les résultats de la littérature sont parfois très hétérogènes à la fois dans les techniques employées (utilisation d'anticorps de firmes différentes, utilisation de marqueurs nucléaires pour éliminer les débris, ficoll...), mais aussi dans la taille des échantillons, l'état des populations (avec ou sans traitement, l'âge, l'absence parfois de populations témoins), la classification (OMS ou FAB), le type de prélèvement (sang ou moelle), l'analyse (le fenêtrage et le réglage en cytométrie en flux sont en partie opérateur-dépendant), et enfin l'objectif de l'étude : en général à but pronostique et beaucoup plus rarement à but diagnostique.

La mise en comparaison avec des groupes de cytopénies réactionnelles, nous a permis de discriminer certaines pathologies non tumorales (macrocytoses de l'éthylique, post-opératoires, carences vitaminiques et thrombopénies périphériques) de myélodysplasies précoces comme les CRDM grâce à la méthode n°1.

Pour la 2^{ème} méthode, les différences significatives se situent à d'autres niveaux : entre les témoins et les syndromes 5q-, entre les CRDM et les anémies de l'éthylique, mais aussi, en regroupant les cytopénies réactionnelles, entre les CRDM et l'association des anémies de l'éthylique avec les anémies post-opératoires ou infectieuses.

Par contre les résultats de cette technique peuvent parfois être assez dispersés.

La méthode n°3 n'est pas discriminante entre les pathologies réactionnelles et les pathologies tumorales.

La 1^{ère} méthode semble la plus appropriée pour évaluer le taux de blastes dans le sang : elle paraît la plus discriminante des 3 méthodes, par des résultats plus homogènes, et la possibilité de différencier les CRDM de malades sains mais aussi de certaines pathologies réactionnelles. La présence de 4 marqueurs (CD34/CD45/taille/structure) pour définir les cellules, de nombreuses études utilisant cette technique et une application en routine pour les greffes seraient en faveur d'une plus grande spécificité.

Cependant la méthode n°2 élaborée par Lacombe sert également de référence mais dans le cadre du phénotypage des blastes et non pour leur numération.

Il est alors difficile de savoir quelle méthode est la plus spécifique.

Par ailleurs, l'étude statistique sur de petites séries doit être interprétée avec prudence. Ces résultats demandent à être confirmés voire complétés sur de plus grands échantillons.

2. le phénotype

L'objectif de notre étude était de voir si nous pouvions distinguer un profil immunophénotypique particulier pour les myélodysplasies et ses différents sous-groupes.

2.1. Dans le sang

⊙ A propos de ces sous-groupes :

Nous avons choisi de regrouper les patients présentant des pathologies réactionnelles bien que dans le cadre de certaines pathologies comme les PTI par exemple, (purpura thrombopénique idiopathique), la moelle osseuse est certainement stimulée et peut relarguer en périphérie davantage de progéniteurs appartenant à la lignée mégacaryocytaire. Il nous a semblé cependant que les profils phénotypiques étaient assez homogènes quelle que soit la pathologie réactionnelle.

⊙ Nous avons observé des **caractéristiques communes** pour l'ensemble des patients :

⇒ l'expression absente ou très rare du CD34, qui est pourtant l'antigène de référence dans la méthode de numération des blastes selon l'ISHAGE (méthode de numération n°1).

Ceci confirme l'intérêt de plusieurs méthodes de numération des blastes.

Ce faible pourcentage de cellules exprimant le CD34 au sein de cellules ayant les caractéristiques de blastes rejoint la discordance retrouvée entre les méthodes de numération 1 et 2. On peut alors reprendre les hypothèses déjà émises : soit la fenêtre où se projettent les blastes est contaminée par d'autres cellules comme des granuleux dégranulés, des lymphocytes ou des monocytes, soit les blastes n'expriment pas tous le CD34.

⇒ L'expression quasi constante du CD36 et du CD61 qui marque la présence des plaquettes dans la fenêtre où se projettent les blastes. Elle est certainement due au satellitisme des plaquettes autour des blastes. Certains auteurs proposent une validation de la technique de phénotypage pour un pourcentage de CD36 et de CD11b inférieur à 20%, qui permet de s'affranchir d'une contamination érythroblastique trop importante (64): cette contrainte est très difficile à obtenir et on peut objecter que le CD36 est un marqueur érythroblastique mais aussi monocytaire et plaquettaire. Par ailleurs, nous n'avons pas dans notre panel le CD11b mais nous avons deux autres marqueurs érythroblastiques : le CD71 et la glycopherine A, négatifs sur l'ensemble des patients.

⇒ Les cellules ayant les caractéristiques CD45 faible et granularité faible, expriment des marqueurs de myéloblastes : CD13, et inconstamment le CD33, et de progéniteurs hématopoïétiques : HLA-DR, et plus rarement le CD117 et ce quels que soient les groupes de patients. Nous pouvons donc penser que les cellules fenêtrées correspondent bien à des blastes.

⇒ Expression du CD15 : fréquemment cité comme marqueur aberrant dans les myélodysplasies, nous le retrouvons chez la quasi-totalité des patients. Nous n'arrivons pas à distinguer si c'est une réelle expression par les blastes du CD15, dans ce cas il est retrouvé également chez les témoins et chez les patients présentant des cytopénies réactionnelles, ou si le CD15 est dû à une contamination de la fenêtre blastique (granuleux dégranulés ou réglages du cytomètre ne permettant pas de distinguer correctement les différents nuages de cellules).

⇒ Les marqueurs CD3, CD10, CD19 : également retrouvés dans les études comme marqueurs aberrants dans les myélodysplasies. Si le CD3 et le CD19 sont absents du groupe témoin, nous retrouvons néanmoins le CD3 dans les cytopénies réactionnelles.

Il semble donc que seul le CD19 pourrait être considéré comme marqueur aberrant exprimé par les blastes. Nous ne le retrouvons que chez un seul patient ayant une CRDM.

Nous sommes donc confrontés à deux problèmes : tout d'abord **l'absence de marqueur phénotypique spécifique des blastes**, rendant impossible les études sur des populations purifiées (75). Ogata a tenté de résoudre le problème par une technique de centrifugation en gradient de densité, mais malgré tout, on reste dans l'idée d'une possible contamination de la population blastique (62). Il est donc délicat d'attribuer véritablement un phénotype et surtout la présence d'aberrations phénotypiques à une population dont la pureté n'est pas certaine. Par ailleurs, au sein de cette population blastique **coexistent des cellules hématopoïétiques normales et des cellules appartenant certainement au clone malin**.

Le sang est-il véritablement impliqué dans l'expression du processus pathologique ?

C'est l'étude des blastes de la moelle qui peut permettre de répondre à cette interrogation.

2.2 Dans la moelle

Les témoins présentent une **population blastique hétérogène** avec un mélange de progéniteurs des lignées lymphoïde, myéloïde et érythroblastique.

La population réactionnelle montre une population encore **hétérogène** bien que la population lymphoïde semble moins représentée.

Nous ne retrouvons plus cette composante lymphoïde dans les syndromes myélodysplasiques.

Dans les SMD, les blastes ont un **profil myéloïde**, le CD33 étant particulièrement présent dans les CRDM. Parfois s'expriment soit des clones pathologiques (présence du CD19 ou du CD10) soit des cellules à différents stades de maturation et qui viennent polluer la fenêtre blastique (présence fréquente du CD15).

Les patients myélodysplasiques présentent un profil commun (myéloïde) mais montrent des caractères individuels au sein d'un même groupe (pour certains expression du CD10, pour d'autres, expression du CD19), ce qui explique les profils antigéniques hétérogènes retrouvés par Ottawa (31).

Nous avons regardé la présence de caractères discriminants des profils en fonction du grade de myélodysplasie. Ogata retrouve un profil plus immature dans les SMD de haut grade. Le patient présentant une AREB-2 présente, en plus du profil retrouvé dans les CRDM l'antigène CD117 qui est caractéristique des progéniteurs hématopoïétiques, mais un seul patient ne nous permet pas de conclure quant à davantage d'immaturité dans les AREB-1 ou les AREB-2.

En continuant notre comparaison avec les résultats de la littérature, nous ne retrouvons que chez un seul patient les profils de blastes exprimant le CD15 sans la présence de HLA-DR (32,34).

Les blastes de la moelle chez les patients dysplasiques, semblent se différencier des blastes de patients sains par un profil uniquement myéloïde et présentant parfois l'expression d'antigènes qui peuvent être considérés comme aberrants.

Pour conclure, **nous avons comparé pour chaque patient les profils du sang et de la moelle et nous ne retrouvons pas, contrairement à Ogata (62,63), de profil phénotypique identique.** De même pour l'intensité de fluorescence. Ceci nous amène à penser que les blastes, surtout dans le sang, ne représentent peut-être pas la population « idéale » pour distinguer les myélodysplasies d'autres pathologies, non seulement parce que le nombre d'événements en cytométrie en flux est très restreint mais également parce que les quelques blastes retrouvés ne sont pas représentatifs du clone malin.

3. La quantification de fluorescence de l'antigène CD34

Que ce soit dans le sang ou dans la moelle, les effectifs et la grande dispersion des résultats n'ont pas permis de tirer des conclusions quant à une possible discrimination entre les différents groupes.

Nous notons par contre que les profils entre le sang et la moelle sont nettement différents pour chaque groupe mais aussi pour chaque patient. Les population blastiques ne semblent donc pas être les mêmes dans le sang et dans la moelle, ce qui confirmerait les résultats trouvés à partir de la comparaison des phénotypes entre le sang et la moelle.

4. La culture in vitro des progéniteurs

4.1 Dans le sang

Il nous a semblé que la culture cellulaire sur le sang **permettait de discriminer les cytopénies réactionnelles ou les patients sains, des myélodysplasies précoces.** Non

seulement le nombre de colonies obtenues CFU-GM et BFU-E est diminué dans les CRDM et les ARSI, mais la pousse est défectueuse.

Dans les myélodysplasies de « haut grade », nous obtenons ce qui est classiquement décrit comme un schéma de croissance leucémique, avec une augmentation du nombre de colonies mais non fonctionnelles.

Les LMMC montrent un net engagement des progéniteurs vers la lignée granuleuse, avec une disparition de la ligné érythroblastique. Cependant, il ne nous a pas semblé observer de différences entre les LMMC et la monocytose réactionnelle. Mais les effectifs sont trop faibles pour conclure.

On peut objecter que le milieu utilisé dans cette technique, est habituellement employé pour la moelle et non le sang.

Par ailleurs, nous ne disposons pas de données de la littérature sur la culture cellulaire, en collagène, sur le sang et pour des témoins sains.

Et nous pouvons nous interroger sur le cas d'un des témoins : un bilan de dysplasie a été effectué (hémogramme, myélogramme, caryotype, marqueurs vitaminiques, LDH...) qui n'a retrouvé aucune anomalie. C'est pourquoi il a été placé au sein des témoins. On peut malgré tout constater qu'en culture, il présente une pousse très importante de la lignée érythroblastique.

Il serait donc intéressant d'obtenir davantage de renseignements sur la culture de sangs normaux en augmentant l'échantillon des témoins ainsi que de suivre l'évolution du témoin qui nous pose quelques interrogations.

4.2. Dans la moelle

Nous retrouvons des résultats assez similaires à ceux du sang en ce qui concerne les comparaisons entre les différents groupes.

Les myélodysplasies précoces montrent un nombre et une qualité des colonies bien inférieurs aux témoins et cytopénies réactionnelles. Les ARSI, en particulier, présentent un ratio BFU-E/CFU-GM très faible avec une lyse très importante des rouges.

Les AREB suivent la description du schéma leucémique.

Pour les CFU-MK, nous retrouvons, comme Cox l'a décrit, un nombre inférieur dans les CRDM par rapport au groupe de témoins (68).

Si nous regardons au sein de chaque groupe, l'évolution entre le sang et la moelle, nous obtenons davantage de colonies dans la moelle : le milieu est initialement adapté pour la culture de moelle, mais nous pouvons également supposer que les cellules dans le sang sont encore plus jeunes.

La culture en collagène, avec un nombre fixe de cellules exprimant le CD34 plantées, nous permet d'obtenir d'autres informations, en effet, l'absence de pousse, nous permet d'émettre 2 hypothèses :

- Soit les cellules sont trop immatures et ne trouvent pas un milieu de qualité suffisante pour favoriser leur croissance. (ce qui peut aussi expliquer la différence retrouvée entre le sang et la moelle)
- Soit les cellules exprimant le CD34 ne sont pas fonctionnelles. C'est là tout l'intérêt de la culture : en effet, la cytométrie en flux détecte l'antigène sur la cellule mais ne nous permet pas de connaître sa fonctionnalité.

5. Synthèse

Tableau 17 : Peut-on à partir des résultats de cytométrie en flux et de culture cellulaire, envisager le diagnostic de SMD ou l'exclure ?

Patients	Diagnostic	Numération des blastes exprimant le CD34 selon l'ISHAGE	Numération des blastes selon Lacombe (CD45faible/SSCfaible)	Numération des blastes par méthode d'exclusion	méthode n°1 (moelle)	méthode n°2 (moelle)	phénotype (sang)	phénotype (moelle)	culture cellulaire (sang)	culture cellulaire (moelle)
R1	cirrhose	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R2	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R3	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R4	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R5	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R6	"	NON	NON	/	/	/	NON	/	/	/
R7	insuffisance rénale	NON	NON	NON	/	/	NON	/	/	/
R8	insuffisance rénale	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R9	post-opératoire ou septicémie	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R10	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R11	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R12	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R13	carences vitaminiques	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R14	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R15	"	NON	NON	/	/	/	/	/	OUI	OUI
R16	"	NON	NON	/	/	/	NON	/	/	/
R17	neutropénies	NON	NON	/	NON	NON	NON	/	/	/
R18	"	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
R19	"	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
R20	"	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
R21	thrombopénie	NON	NON	NON	/	/	NON	/	/	/
R22	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R23	"	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R24	"	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
R25	thrombocytose	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R26	thrombocytose	NON	NON	/	/	/	/	/	/	/
R27	réactionnel	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
R28	réactionnel	/	/	/	NON	NON	/	/	/	NON
CRDM1		NON	NON	/	/	/	/	/	OUI	/
CRDM2		NON	NON	/	/	/	/	/	OUI	/
CRDM3		NON	NON	/	/	/	NON	/	NON	/
CRDM4		NON	NON	/	/	/	NON	/	NON	/
CRDM5		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
CRDM6		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	/
CRDM7		NON	NON	NON	/	/	NON	/	/	/
CRDM8		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	/	OUI
CRDM9		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	/	/
CRDM10		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	NON
CRDM11		/	/	/	NON	NON	/	NON	/	O
CRDM12		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
CRDM13		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
ARSI1		NON	NON	NON	NON	NON	NON	/	OUI	NON
ARSI2		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
ARSI3		NON	NON	NON	/	/	NON	/	NON	/
ARSI4		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
ARSI5		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI
ARSI6		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI

Comparaison des résultats avec les valeurs trouvées chez les témoins : le tableau montre pour chaque patient si l'analyse permet ou non d'affirmer qu'il s'agit réellement de la pathologie concernée.

NON signifie que l'on ne peut déterminer par la technique concernée la pathologie du patient.

OUI signifie que l'on peut affirmer le caractère soit réactionnel soit dysplasique du patient.

/ : Absence de résultats

Sur 7 patients présentant une pathologie réactionnelle et ayant bénéficié des techniques de culture à partir du sang ou de la moelle, la culture a permis de confirmer le profil réactionnel pour 5 d'entre eux.

Sur 17 patients présentant un syndrome myélodysplasique de « bas grade » et ayant bénéficié des techniques de culture à partir du sang ou de la moelle, la culture a permis de confirmer le profil dysplasique pour 11 d'entre eux.

Application : Sur 18 patients pour lesquels nous n'avons pas de diagnostic et présentant une ou des cytopénies, la culture a été réalisée pour 7 d'entre eux.

- 4 patients ont un profil correspondant à un type réactionnel.
- 3 patients ont un profil pouvant correspondre à un syndrome myélodysplasique à son début, et demandent une surveillance toute particulière.

CONCLUSION

XII. CONCLUSION

Dans cette étude, les techniques mises en oeuvre nous ont permis de faire des comparaisons entre les différents groupes de patients, mais pas toujours d'établir des profils spécifiques pour chacune des populations. Nous avons montré que **les techniques de numération et de phénotypage ne permettaient pas de porter un diagnostic précoce de syndrome myélodysplasique**. Par contre la **culture cellulaire** réalisée sur les cellules mononucléées du sang et de la moelle montre **des différences significatives dues aux anomalies fonctionnelles** des progéniteurs dans les SMD précoces ou plus tardives et nous permettent d'aider au diagnostic dans les cas difficiles. Sur 7 patients sans diagnostic définitif, la culture cellulaire nous a permis d'éliminer une myélodysplasie dans 4 cas et de suspecter un SMD chez 3 autres patients.

Il serait très intéressant de poursuivre ce travail :

- ❖ Dans le cadre de la numération et de l'immunophénotype, il nous paraît utile d'augmenter le nombre de patients étudiés pour confirmer le caractère non significatif, que ce soit au niveau des témoins ou des différentes pathologies.
- ❖ Pour étudier le phénotype d'autres populations de cellules chez les patients déjà inclus. Le panel étendu d'anticorps le permet.
- ❖ Améliorer la précision des populations cernées en cytométrie en flux par une augmentation du nombre de fluorochromes (intéressant pour les petites populations comme les blastes dans les SMD au stade précoce comme dans l'étude des maladies résiduelles), ou par un trieur de cellules associé au cytomètre en flux.
- ❖ Mettre en évidence les antigènes membranaires ou cytoplasmiques responsables des anomalies fonctionnelles.
- ❖ Au niveau de la culture cellulaire : compléter les observations en augmentant les effectifs des populations, en particulier les témoins pour le sang, et d'autres patients ayant des SMD confirmées ou évoluées (AREB).

Si la numération et le phénotype des blastes ne nous permettent pas d'aider au diagnostic des phases précoces des SMD, les anomalies fonctionnelles que nous retrouvons nous incitent à étudier plus précisément les autres populations cellulaires du sang notamment les granulocytes, les monocytes ou les érythrocytes (antigènes de membrane ou antigènes fonctionnels).

BIBLIOGRAPHIE

- 1) **Mufti GJ.** Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; 17(4):543-557.
- 2) **West RR, Stafford DA, White AD, Bowen DT, Padua RA.** Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occup environmental exposure. *Blood* 2000 Mar 15 ;95(6) :2093-2097
- 3) **Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Andersen MK , Skovby F.** Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia* 2002; 16: 2177-2184.
- 4) **Claessens YE, Fontenay-Roupie M.** Physiopathologie des syndromes myélodysplasiques. *Pathol Biol* 2002 ;50 :261-267
- 5) **Fenaux P.** Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001;73(4):429-437.
- 6) **Lepelley P, Campergue L, Grardel N, Preudhomme C, Cosson A, Fenaux P.** Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes? *Br J Haematol* 1996; 95(2):368-371.
- 7) **Berger G, Hunault-Berger M, Rachieru P, Fontenay-Roupie M, Barnager L, Ifrah N, Zandecki M.** Increased apoptosis in mononucleated cells but not in CD34+ cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes. *Hematol J.* 2001; 2(2): 87-96.
- 8) **Benett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al.** Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-199
- 9) **Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD.** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : Report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Ann Oncol.* 1999 ; 17(12) : 3835-3849
- 10) **Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD.** The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
- 11) **Germing U, Gattermann N, Minning H, Heyll A, Aul C.** Problems in the classification of CMML-dysplastic versus proliferative type. *Leuk Res* 1998; 22(10):871-878.
- 12) **Nösslinger T, Reisner R, Koller E, Gruner H, Tuchler H, Nowotny H, Pittermann E, Pfeilstocker M.** Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization : Comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution . *Blood* 2001;98(10) :2935-2941
- 13) **Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C.** Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes : a retrospective analysis of 1600 patients . *Leuk Res* 2000 ;24(12): 983-992
- 14) **Greenberg P, Cox C, Lebeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J.** International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89(6):2079-2088
- 15) **Lorand-Metze I, Pinheiro MP, Ribeiro E, De Paula EV, Metze K.** Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classification. *Leuk Res* 2004;28(6):587-594.
- 16) **Raynaud SD.** Place de la cytogénétique dans la prise en charge des syndromes myélodysplasiques primaires. *Pathol Biol* 2003 ;51(6) :346-355.
- 17) **Sole F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luno E, Prieto F, Granada I, Hernandez JM, Cigudosa JC, Diez JL, Marques ML, Arranz E, Rios R, Martinez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S.** Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2000;108(2):346-356
- 18) **Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke P, Wattel E, Fenaux P.** Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with 17p deletion, An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and an incidence of P53 mutations. *Leukemia* 1995; 9(3):370-381
- 19) **Wood BL.** Flow cytometric diagnosis of myelodysplasia and myeloproliferative disorders *J Biol Regul Homeost Agents* 2004;18(2):141-145
- 20) www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/smdpourweb.html
- 21) **Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P.** Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 1998 ; 83 :258-275

- 22) **Gold EJ, Conjalka M, Pelus LM, Jhanwar SC, Broxmeyer H, Middleton AB, Clarkson BD, Moore MA.** Marrow cytogenetic and cell culture analyses of the myelodysplastic syndromes: insights to pathophysiology and prognosis. *J Clin Oncol* 1983; 1:627-634.
- 23) **Tennant GB, Bowen DT, Jacobs A.** Colony-cluster ratio and cluster number in cultures of circulating myeloid progenitors as indicators of high-risk myelodysplasia. *Br J Haematol* 1991; 77:296-300.
- 24) **Aul C, Giagounidis A, Germing U.** Application of single and multiple prognostic factors in the assessment of patients with the myelodysplastic syndromes in *The myelodysplastic syndromes*. 2002 edited by **JM Bennett**.
- 25) **Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME.** Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001;98(4):979-987
- 26) **Goasguen JE.** Is it still possible to ameliorate the diagnosis of the refractory anemia? *Leuk Res* 2003;27:201-203.
- 27) **Ramos F, Fernandez-Ferrero S, Suarez D, Bardon M, Rodriguez JA, Gil S, Megido M, Ciuda J, Lopez N, Del Canizo C, Orfao A.** Myelodysplastic syndrome : a search for minimal diagnostic criteria. *Leuk Res* 1999;23(3):283-290
- 28) **Bain BJ.** The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol.* 1996;94(1):206-209
- 29) **Kanter-Lewensohn L, Hellstrom-Lindberg E, Kock Y, Elmhorn-Rosenborg A, Ost A.** Analysis of CD34-positive cells in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and in normal individuals: a comparison between FACS analysis and immunohistochemistry. *Eur J Haematol* 1996; 56: 124-129
- 30) **Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Sharper JH.** Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; 133: 157-165
- 31) **Otawa M, Kawanishi Y, Iwase O, Shoji N, Miyazawa K, Ohyashiki K.** Comparative multi-color flow cytometric analysis of cell surface antigens in bone marrow hematopoietic progenitors between refractory anemia and aplastic anemia. *Leuk Research* 2000;24(4):359-366
- 32) **Del Canizo MC, Fernandez E, Lopez A, Vidriales B, Arroyo JL, Ortuno F, Orfao A, San Miguel JF.** Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2003 April;88(4):402-407.
- 33) **Micheva I.** Impaired generation of bone marrow CD34 derived dendritic cells with low peripheral blood subsets in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2004;126:806-814
- 34) **Arroyo JL, Fernandez ME, Hernandez JM, Orfao A, San Miguel JF, Del Canizo MC.** Impact of immunophenotype on prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. Its value in patients without karyotypic abnormalities. *Hematol J* 2004;5(3) : 227-233.
- 35) **Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M, et al.** Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by GM-CSF or G-CSF : potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1995;85(1):275-282.
- 36) **Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F.** Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34+ cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98(12):3249-3255.
- 37) **Andreasson B, Swolin B, Kutti J.** Patients with idiopathic myelofibrosis show increased cd34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythemia vera and essential thrombocytaemia. *Eur J Haematol.* 2002; 68(4):189-193.
- 38) **Mastrandrea F, Coradduzza G, De Vita L, Minardi A, Scarcia G, Marucci F, Parmiani S.** CD34+ cells in peripheral blood of healthy human beings and allergic subjects : clue to acute and minimal persistent inflammation. *Allergol Immunopathol* 2002 ;30(4) :209-217.
- 39) **Fuchigami K, Mori H, Matsuo T, Iwanaga M, Nagai K, Kuriyama K, Tomonaga M.** Absolute number of circulating CD34+ cells is abnormally low in refractory anemias and extremely high in AREB and AREB-t; novel pathologic features of myelodysplastic syndromes identified by highly sensitive flow cytometry. *Leuk Res* 2000;24(2):163-174.
- 40) **Karakantza M, Cavenagh JD, Gordon-Smith EC, Gibson FM.** Adhesion molecule expression on CD34+ progenitor cells from normal and aplastic anaemia bone marrow , *Br J Haematol* 1995; 91: 800-803

- 41) **Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS.** CD34 :structure, biology, and clinical utility , Blood 1996;87(1):1-13.
- 42) **Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, Krance R, Mirro J Jr, Kalwinski DK, Ayers GD, Behm FG.** Distinctive immunophenotypic features of t(8 ;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. Blood 1992;80(12): 3182-3188
- 43) **Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, Behm FG** Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1993;82(3):889-894
- 44) **Adriaansen HJ, te Boekhorst PA, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ.** Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4E0) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. Blood 1993;81(11):3043-3051
- 45) **Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID.** Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of CD33 and CD34 antigens and light scattering properties. J Exp Med 1989;169(5) :1721-1731
- 46) **ED Zanjani, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M.** Human Bone Marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. Exp Hematol 1998;26(11):1022-1023.
- 47) **Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP.** Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigens exist in multiple species. Nat Med 1997;3(12):1337-1345.
- 48) **Bain BJ.** Basic haematological techniques. In: Practical Haematology. Dacie JV, Lewis SM, eds. Eighth Edition, 1995 : 49-82.
- 49) **Elghetany MT.** Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. Haemaologica 1998; 83(12):1104-1115
- 50) **Thiele J, Wickenhauser C, Baldus SE, Kuemmel T, Zirbes TK, Drebber U, Wirtz R, Thiel A, Hansmann ML, Fischer R.** Characterization of cd34+ human hematopoietic progenitor cells from the peripheral blood: enzyme-, carbohydrate- and immunocytochemistry, morphometry, and ultrastructure. Leuk Lymphoma. 1995;16(5-6):483-491.
- 51) **Soligo A, Oriani A, Annaloro C, Cortelezzi A, Calori R, Pozzoli E, Nosella D, Orazi A, Deliliers GL.** CD34 immunohistochemistry of bone marrow biopsies :prognostic significance in primary myelodysplastic syndromes. Am J Hematol. 1994;46(1):9-17.
- 52) **Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I.** The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996;5(3):213-226
- 53) **Gratama JW, Van der Linden R, Van der Holt B, Bolhuis RL, Van der Winkel JG.** Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study. Cytometry 1997;29(3):213-226
- 54) **Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M, Papa S.** Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. J Biol Regul Homeost Agents 2001;15(1):14-22.
- 55) **Lacombe F, Durrieu F, Briaux A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P.** Flow cytometry CD45 for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. Leukemia 1997 ;11(11) :1878-1886
- 56) **Mundle SD.** Lingering biologic dilemmas about the status of the progenitor cells in myelodysplasia. Arch Med Res. 2003;34(6):515-519
- 57) **Lepelley P, Soenen V, Preudhomme C, Lai JL, Cosson A, Fenaux P.** Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein and its relationship to hematological characteristics and response to treatment in myelodysplastic syndromes. Leukemia 1994;8:998-1004.
- 58) **Sonneveld P, Van Dongen JJM, Hagemeyer A et al.** High expression of the multidrug resistance P-glycoprotein in high-risk myelodysplasia is associated with immature phenotype. Leukemia 1993;7:963-969
- 59) **Mann KP, De Castro CM, Liu J et al.** Neural adhesion molecule (CD56)-positive acute myelogenous leukemia and myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. Am J Clin Pathol 1997; 107: 653-660.
- 60) **Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P, San Miguel JF, and for the standardization committee on clinical**

flow cytometry of the international federation. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies : current status and future directions. *Clin Chem.* 1999; 45: 1708-1717.

- 61) **Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al.** Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001; 98: 979-987.
- 62) **Ogata K, Nakamura K, Yokose N et al.** Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100: 3887-3896.
- 63) **Ogata K, Satoh C, Hyodo H, Tamura H, Dan K, Yoshida K.** Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with the myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2004;28:1171-1175.
- 64) **Maynadie M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, Campos L, Dromelet A, Lepelley P, Jouault H, Imbert M, Rosenwaldj M, Verge V, Bissieres P, Raphael M, Bene MC, Feuillard J; Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL).** Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002; 100(7) : 2349-2356
- 65) **Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ.** Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102(1):394-403.
- 66) **Kussick SJ, Wood BL.** Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med* 2003 ;127 :1140-1147
- 67) **Dobo I, Pineau D, Robillard N, Genevieve F, Piard N, Zandecki M, Hermouet S.** Standardization of the CFU-GM assay : Advantages of plating a fixed number of CD34+ cells in collagen gels. *J Hematother and Stem Cell Res* 2003;12:543-551.
- 68) **Cox CV, Killiick SB, Patel S, Elebute MO, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Gibson FM.** In vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors in patients with aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, and the myelodysplastic syndromes. *Stem Cells* 2000;18:428-434
- 69) **Korthout M, De Bock R, Van Bockstaele D, Peetermans M.** Bone marrow cultures and prognosis in primary myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1990; 14:85-89.
- 70) **Raymakers R, De Witte T, Joziase J, Van Der Lely N, Boezeman J, Haanen C.** In vitro growth pattern and differentiation predict for progression of myelodysplastic syndromes to acute nonlymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1991; 78:35-41.
- 71) **Marisavljevic D, Rolovic Z, Sefer D, Basara N, Boskovic D, Colovic M.** Biological and clinical significance of clonogenic assays in patients with myelodysplastic syndromes. *Med Oncol* 2002;19(4):249-259.
- 72) **Juvonen E, Aimolahti A, Volin L, Ruutu T.** The prognostic value of in vitro cultures of erythroid and megakaryocyte progenitors in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1999; 23:899-894.
- 73) **Kanamaru A, Tamura S.** Application of long-term bone marrow cultures for studying the leukemic transformation of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 1993;11:345-352.
- 74) **Van Lochem EG, Van Der Velden VHJ, Wind HK, Te Marvelde JG, Westerdaal NAC, Van Dongen JJM.** Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004;60B:1-13.
- 75) **Deeg HJ.** What is in a name? Refined diagnostic criteria for prognostic assessment in myelodysplastic syndrome (MDS). *Leuk Res* 2004;28(6):543-544

ANNEXES

Annexe 1 : Lyse des érythrocytes :

- 2 ml de lyse BD (Becton-Dickinson) par tube. On vortexe.
- 10 minutes à 22°C à l'obscurité en vortexant toutes les 5 minutes.
- Centrifugation 5 minutes à 2400tours/minute avec frein.
- lavages au PBS.
- on élimine le surnageant par aspiration.
- On reprend le culot avec 0,5ml de PBS.

Annexe 2 :

On établit 4 cytoigrammes :

- a) **CD45/Structure** : On définit une fenêtre R1 comprenant toutes les cellules CD45⁺. (Elimination des débris et des érythroblastes). Le marquage par le CD45 est un indicateur d'efficacité de lyse des globules rouges et permet également de distinguer les éléments leucocytaires des événements contaminants tels que plaquettes, agrégats, débris.
- b) **CD34/Structure** : les éléments de R1 sont repris dans le cytoigramme CD34/Structure. On définit une fenêtre R2 pour les cellules exprimant le CD34 (dans les deux dernières décades du CD34+).
- c) **CD45/Structure** : les éléments de R2 sont repris dans le cytoigramme CD45 /Structure. On définit une fenêtre R3 structure faible/CD45⁺ faible.
- d) **taille/structure** : les éléments de R3 sont repris dans le cytoigramme taille/structure. On définit une fenêtre R4 : structure faible/taille entre 200 et 800.

La fenêtre R5 est définie dans le 1^{er} cytoigramme, par superposition de R3 dans R1.

L'acquisition s'effectue telle que l'on obtienne environ **100 événements** dans R4.

Rmq : Les monocytes sont exclus car ils sont de grande taille (FSC fort) et expriment fortement le CD45.

Les lymphocytes sont exclus car ils sont de grande taille (FSC fort), expriment fortement le CD45 et sont faiblement granuleux (SSC faible).

Les granuleux sont exclus car ils présentent une structure forte (SSC fort).

En définitive, on retiendra le pourcentage de CD45+ défini par R5 et le pourcentage de CD34+ défini par R4, donnés par le logiciel CellQuestPro.

En rapportant au nombre de leucocytes, on obtient les valeurs absolues.

Annexe 3 :

C'est un fenêtrage séquentiel basé sur la soustraction des cellules non blastiques :

CD14+/CD11b+ marque les monocytes

CD14-/CD11b+ marque les cellules promonocytaires

CD45+fort/SSC faible marque les lymphocytes

CD16+/CD11b+ marque les cellules granuleuses matures

CD16+/SSC faible marque les cellules NK

CD16-/CD11b+ marque les granuleux immatures (métamyélocytes et band cells)

CD16-/CD11b- marque les myélocytes et promyélocytes

On fait l'acquisition d'au moins 100 éléments blastiques.

Annexe 4 :

Les billes fluorosphères sont retenues en raison de leur meilleur étalement de fluorescence dans les valeurs basses et pour leur performance dans la quantification de l'intensité des marquages fluorescents à la surface des cellules.

On acquière 5 000 événements.

Les billes négatives sont analysées dans un premier temps, afin de définir une fenêtre sur FSC/SSC(taille/structure) éliminant ainsi les débris.

L'autofluorescence des billes doit sortir avant la première décade.

Sur le graphe monoparamétrique, la mesure de fluorescence lue est celle correspondant au demi-pic centré sur le maximum de chaque pic.

La moyenne de fluorescence de chaque bille pour le photomultiplicateur PE est relevée et utilisée pour tracer une courbe de calibration et établir l'équation correspondante (utilisation du logiciel Excel). L'équation permet ainsi de calculer pour chaque échantillon, le nombre de MESF pour l'antigène CD34.

Titre de la Thèse : LE NOMBRE ET LES FONCTIONS DES BLASTES DU SANG PERIPHERIQUE PERMETTENT-ILS D'AIDER AU DIAGNOSTIC DE LA PHASE PRECOCE DES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES ?

Résumé de la Thèse :

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies dont le diagnostic est difficile au stade précoce. Caractérisés le plus souvent par des cytopénies périphériques, leur diagnostic différentiel avec les cytopénies réactionnelles est souvent délicat.

Les SMD se présentent avec un nombre variable de blastes médullaires, et après une période de 2 à 5 ans, environ 70% d'entre eux évoluent vers une authentique leucémie aiguë. Après avoir analysé les données récentes de la littérature, nous avons cherché à préciser l'implication du sang périphérique dans le processus de myélodysplasie par diverses méthodes. Dans un premier temps, nous avons cherché à préciser l'existence de blastes sanguins par méthodes phénotypiques. La numération des blastes dans le sang a été réalisée selon 3 méthodes (utilisation de l'expression de l'antigène CD34 selon l'ISHAGE, identification des blastes par les caractères CD45⁺ faible/granulosité faible, exclusion des cellules non blastiques), l'immunophénotypage des blastes a également été réalisé dans le sang. Nous avons voulu préciser le caractère fonctionnel des cellules du sang périphérique en utilisant la technique de culture in vitro des progéniteurs (sur milieu collagène).

L'étude a été réalisée chez 27 patients présentant une pathologie réactionnelle et 25 patients présentant une SMD. La numération des blastes et leur phénotype n'ont pas montré de profils discriminants permettant de différencier syndrome myélodysplasique et cytopénies réactionnelles. La technique de cytométrie en flux se heurte sans doute au faible effectif de la population blastique et à l'absence de marqueur spécifique.

A l'inverse La culture des progéniteurs sanguins et médullaires permet de séparer les patients : dans un groupe de 7 patients cytopéniques n'ayant pas de diagnostic définitif, les techniques de culture identifient 3 patients avec un profil pathologique.

Si la numération et le phénotype des blastes ne nous permet pas d'aider au diagnostic précoce des SMD, les anomalies fonctionnelles que nous retrouvons nous incitent à étudier plus précisément les autres populations cellulaires du sang, notamment les granulocytes neutrophiles et les érythrocytes (antigènes de membrane ou antigènes fonctionnels).

MOTS CLES : Syndromes myélodysplasiques, diagnostic, blastes sanguins, cytométrie en flux, culture cellulaire.

JURY

PRESIDENT : **Mr Jacques Aubry**, Professeur d'Immunologie
Faculté de Pharmacie de Nante

DIRECTEUR : **Mr Franck Geneviève**, PH d'Hématologie biologique,
Laboratoire d'Hématologie, CHU d'Angers

ASSEESSEURS : **Mr Charles Foussard**, PH d'Hématologie Clinique
Service des Maladies du Sang, CHU d'Angers

Mme Mathilde Hunault-Berger, PU-PH, Professeur d'Hématologie clinique
Service des Maladies du Sang, CHU d'Angers

Mr Marc Zandecki, PU-PH, Professeur d'Hématologie biologique
Laboratoire d'Hématologie, CHU d'Angers
