

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le Lundi 9 mai 2022  
Par Monsieur Benjamin Podvin**

---

**Apport de l'immunophénotypage monocytaire et du  
séquençage de nouvelle génération au diagnostic de  
leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) : étude  
rétrospective monocentrique du CHU de Lille**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH, CHU de Lille

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Claude Preudhomme, PU-PH, CHU de Lille

Monsieur le Professeur Bruno Quesnel, PU-PH, CHU de Lille

Monsieur le Docteur Florent Dumézy, PH, CHU de Lille

**Directeur de thèse :** Monsieur le Docteur Nicolas Duployez, MCU-PH, CHU de Lille



**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



## **Remerciements**

A ma présidente de jury :

**Madame le Professeure Stéphanie Poulain**  
*Professeurs des Universités – Praticien Hospitalier*  
*Laboratoire d'Hématologie*  
*Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse après m'avoir enseigné l'hématologie sur les bancs de la faculté. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A mes juges :

**Monsieur le Professeur Bruno Quesnel**  
*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*  
*Service des Maladies du sang*  
*Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et pour l'intérêt porté à ce travail. Recevez ici le témoignage de mon profond respect et toute ma considération.

**Monsieur le Professeur Claude Preudhomme**  
*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*  
*Chef de service du Laboratoire d'Hématologie*  
*Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Je vous remercie pour votre aide et votre soutien sur ce projet, ainsi que sur les autres. Merci de partager votre enthousiasme pour notre discipline ainsi que pour la confiance que vous m'accordez depuis l'externat. Merci également pour votre bienveillance et votre humanité tout au long de mon parcours, c'est un honneur de compter parmi vos étudiants. Soyez assuré de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Florent Dumézy**  
*Praticien Hospitalier*  
*Laboratoire d'Hématologie*  
*Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Un grand merci d'évaluer ce travail qui je l'espère, satisfera tes attentes. Je te remercie pour ton partage de connaissance, tant en cytologie qu'en cytométrie. Merci de m'avoir accueilli et pour ces échanges stimulants sur l'hématologie, j'espère que nous continuerons ainsi encore longtemps. Je te suis profondément reconnaissant.

A mon directeur de thèse :

**Monsieur le Docteur Nicolas Duployez**

*Maitre de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier*

*Laboratoire d'Hématologie*

*Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Tout d'abord, je tiens à te remercier pour m'avoir confié ce projet, c'est un plaisir et un honneur de travailler à tes côtés. Je te remercie ensuite pour ton encadrement depuis mon premier jour en tant qu'externe dans le service. Merci également pour ces moments d'échanges et la transmission de ta vision de l'hématologie. Enfin d'un point de vue personnel, je tiens à te remercier pour ton humanité et pour toute l'aide que tu m'apportes au quotidien ; ainsi que pour les discussions stimulantes. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps. Soit assuré de tout mon respect et mon amitié. Je te dédie cette phrase, de quelqu'un que nous connaissons bien tous les deux :

*« Il est doux et facile d'être reconnaissant ; mais plus difficile de remercier »*

*Marie-Thérèse Daniel*

Je remercie également :

Je remercie le Professeur Thierry Brousseau, pour sa confiance lors de ma sortie du concours de l'internat. Ma passion pour l'hématologie n'aurait pas pu naître sans votre aide, je vous remercie.

L'ensemble du personnel du laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille.

Je remercie Olivier, Christophe, Elise, Laurène, Nathalie, Gauthier, Alice et Valérie ; pour les échanges toujours intéressants dans cette vaste discipline qu'est l'Hématologie ! Un grand merci pour votre confiance également lors de mes passages dans le secteur.

Merci à Catherine, Agnès, Hélène pour votre apprentissage et l'encadrement en cytogénétique hématologique ; merci pour la confiance accordée.

Enfin, je souhaite dédier cette thèse :

*A mes chers parents,*

Un grand merci pour votre soutien durant ces longues années d'études. Merci de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même. Tout ceci n'aurait pas pu aboutir sans vous, je vous suis éternellement reconnaissant.

*A mes sœurs,*

Charlotte, Alexandra ; merci de me soutenir depuis bien longtemps.

*A ma famille,*

Papy Eugène, Papy René, Mamie, Parrain, les cousins (Thomas, Thibaud, Eloïse, Maxence), Lukas, Manu, Juliette, Mémé, Emeline, Anne-Céline; pour m'avoir toujours soutenu et encouragé.

*A mes amis,*

Jean, Corentin-san, Xavier, Quentin, Coco, Thibaud, Benoit ; pour toutes ces années depuis le collège et pour les suivantes !

Alexis, Alexander, Geoffrite, Maxstane, Lucas, Tasnim, Jean-Baptiste, Lucile, Corentin, Ludovic, Xavier, Simon, Henri, Alex, Julien, Mathilde ; pour ces années de fac, on s'est bien marrés !

Pierre, Vincent, Myriam pour votre soutien !

Geoffrey, Nico G, Adrien, Malo, François, Gatien, Mael, Maximilien, Ben Lima, Marion, Doriane, Sophie, Alex W, Jordane, Alex B, Caro D, Caro K, Lulu, Thibaut, Claire L, Pauline R, Ambroise, Cocoag, Alex G, KB9, Claire T, Pauline P, Laurine, Léa, Apolline, Amélie, Marie-Amélie, Mélanie, Zoé, David, Jules, Pierre, Laura, Augustin, Angèle, Alex R, Sarah B, Loïc B, Guillaume E, Guillaume C, Rémi, Nico G, Pauline C ; merci pour ces semestres, merci pour ces soirées, merci pour ces années !

Merci également à Gilles, Pascale, Julie, Rémi, Bernard, Sylvie, Nathalie après toutes ces années. Ainsi qu'à Sylvie, Gregory, Caroline, Marine, Jacqueline, Albert durant les années de fac.

Merci aux équipes de l'ilot et de CrossFit Vauban ces moments de détente, si importants au cours de nos études.

*A Adélaïde,*

Quelques mots ne suffiraient pas à te remercier pour tout. Merci pour ces années ainsi que pour les nombreuses années à venir. Je t'aime.

A tous ceux que j'ai omis et qui me sont chers.

A tous mes maîtres et professeurs avec mon éternelle reconnaissance.





## Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université de Lille

Président :	Régis BORDET
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Christophe MONDOU
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-présidente relations internationales :	Kathleen O'CONNOR
Vice-président formation continue et alternance :	Vincent COCQUEMPOT
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Delphine ALLORGE
1 <sup>er</sup> Assesseur et assesseur en charge des études :	Benjamin BERTIN
Assesseur aux Ressources et Personnels :	Stéphanie DELBAERE
Assesseur à la vie de la Faculté :	Emmanuelle LIPKA
Assesseur à la santé et l'accompagnement :	Anne GARAT
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Honoré GUISE
Assistante de direction :	Audrey HENNEBELLE

### Liste des Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie – Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie – Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie – Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle

M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie – Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences – Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mr	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie – Virologie
-----	------	-----------------	---------------------------

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie – Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie – Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie – Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique

Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie – Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique

Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie – Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie – Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé – mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES – mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie,
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie,
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	DESVAGES	Maximilien	Hématologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
-----	-------	---------	---

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie – Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## Sommaire

I. La leucémie myélomonocytaire chronique.....	23
A. Définition .....	23
B. Epidémiologie.....	24
C. Physiopathologie .....	25
1. Physiologie de la lignée monocyttaire .....	25
2. Oncogenèse de la leucémie myélomonocytaire chronique. ....	28
D. Diagnostic.....	35
1. Clinique.....	35
2. Hémogramme .....	36
3. Myélogramme .....	38
4. Immunophénotypage.....	39
5. Caryotype .....	42
6. Biologie moléculaire .....	43
E. Scores pronostiques .....	44
F. Prise en charge .....	45
1. Traitements symptomatiques .....	45
2. Traitements spécifiques .....	47
3. Traitement curatif .....	48
II. Matériel et méthodes.....	49
A. L'immunophénotypage .....	49
1. Principe de la cytométrie en flux.....	49
2. Immunophénotypage monocyttaire .....	50
B. Analyse de biologie moléculaire : panel NGS-SMD.....	52
1. Panel NGS-SMD .....	52
2. Isolement, amplification, séquençage .....	53
3. Analyse des données .....	55
III. Etude rétrospective monocentrique au CHU de Lille.....	57
A. Contexte et objectif de l'étude .....	57
B. Patients .....	57
1. Recueil de données.....	57
2. Analyse de la distribution.....	58

3.	Analyse statistique .....	60
C.	Résultats.....	61
1.	Cytométrie et séquençage concordants.....	61
2.	Cytométrie négative, séquençage concordant.....	64
3.	Cytométrie et séquençage négatifs .....	66
4.	Cytométrie concordante, séquençage négatif.....	68
IV.	Discussion.....	71
A.	Orientation diagnostique si séquençage compatible, phénotypage négatif.....	71
B.	Orientation diagnostique si phénotypage positif, séquençage incompatible ....	72
C.	Stratégie diagnostique des leucémies myélomonocytaires chroniques.....	73
V.	Conclusion.....	75
VI.	Bibliographie.....	77
VII.	Annexes .....	84

## Table des illustrations

**Tableau 1** : Critères diagnostiques de la LMMC adaptés selon la classification OMS 2016.

**Tableau 2** : Caractéristiques des mutations de la LMMC. D'après Patel A. et al.

**Tableau 3** : Classification LMMC selon l'OMS.

**Tableau 4** : Mutations de la LMMC, adapté de Such et al.

**Figure 1** : Schéma de la monocytopenie

**Figure 2** : Schéma des mutations somatiques de la LMMC. D'après Patel A. et al.

**Figure 3** : Aspect de monocytes sanguins dystrophiques.

**Figure 4** : Cytométrie en flux des sous-populations monocytaires caractérisés par les CD14 et CD16.

**Figure 5** : Courbes ROC de la sensibilité et de la spécificité du pourcentage de monocytes classiques.

**Figure 6** : Graphiques en stratégie d'exclusion des lymphocytes T, B et NK.

**Figure 7** : Graphique CD14/CD16 avec 99.167% de MO1 compatible avec une LMMC.

**Figure 8** : Schéma de la distribution de la cohorte étudiée selon l'immunophénotypage et le NGS.

**Figure 9** : Fréquence des catégories de gènes mutés dans la cohorte LMMC.

**Figure 10** : Fréquences des gènes mutés de la cohorte LMMC avec CMF et NGS-SMD concordants.

**Figure 11** : Carte mutationnelle des patients atteints d'une LMMC ou d'une LMMC oligomonocytaire avec un immunophénotypage négatif.

**Figure 12** : Carte mutationnelle des monocytozes réactionnelles.

**Figure 13** : Proposition d'algorithme décisionnel au diagnostic de LMMC.



## Liste des abréviations

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AMM** : autorisation de mise sur le marché

**ANSM** : agence nationale de sécurité du médicament

**ARN** : acide ribonucléique

**BOM** : biopsie ostéo-médullaire

**CFU-GEMM** : colony forming unit – granulocytic erythroblastic megakaryoblastic monocytic

**CFU-GM** : colony forming unit – granulocytic monocytic

**CFU-M** : colony forming unit – monocytic

**CHIP/CHOP** : clonal hematopoiesis of indeterminate potential / oncogenic potential

**CHU** : centre hospitalier universitaire

**CMF** : cytométrie en flux

**CMUS** : clonal monocytosis of undeterminate potential

**CPA** : cellule présentatrice d'antigène

**CPSS** : CMML-specific prognostic scoring system

**CRP** : protéine C-réactive

**CSH** : cellule souche hématopoïétique

**dNTPs** : desoxyribonucléotide triphosphates

**EDTA** : acide éthylène diamine tétra-acétique

**FAB** : French-American-British

**G-CSF** : granulocyte – colony stimulating factor

**GM-CSF** : granulomonocyte – colony stimulating factor

**HLA** : human leukocyte antigene

**IMUS** : idiopathic monocytosis of unknown <sup>21</sup>additional<sup>21e</sup>

**IPPS** : international prognostic scoring system

**LAM** : leucémie aigüe myéloïde

**LMMC** : leucémie myélomonocytaire chronique

**LMMJ** : leucémie myélomonocytaire 22ddition

**MDAPS** : MD Anderson prognostic scoring system

**NA** : non-applicable

**NGS** : séquençage de nouvelle génération

**NR** : non-renseigné

**O-CMML** : oligomonocytaire – leucémie myélomonocytaire chronique

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**PCR** : polymerase chain reaction

**RC** : rémission complète

**RT-PCR** : reverse transcription – polymerase chain reaction

**SAB** : sérum albumine-bovine

**SFGMTC** : société Française de greffe de moelle osseuse et thérapie cellulaire

**SMD** : syndrome myélodysplasique

**SMD/NMP** : syndrome myélodysplasique / néoplasie myéloproliférative

**SMD-RS** : syndrome myélodysplasique *ring sidéroblastes*

**SMP** : syndrome myéloprolifératif

**VAF** : variation allele frequency

**VEXAS** : Vacuoles Enzyme X-linked Auto-inflammatoire Somatique

# I. La leucémie myélomonocytaire chronique

## A. Définition

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie myéloïde clonale affectant la cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette pathologie a tout d'abord été décrite comme appartenant au groupe des syndromes myélodysplasiques lors de la classification cytologique du groupe French-American-British (FAB) établie en 1976 (1). En intégrant les données cytogénétiques, l'OMS classe en 2001 la LMMC parmi les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (2). Ce groupe est renommé néoplasies myélodysplasiques/myéloprolifératives (SMD/NMP) par la classification OMS 2008, révisée en 2016 (3).

D'autres pathologies figurent parmi ce groupe : la leucémie myéloïde chronique atypique ; la leucémie myélomonocytaire chronique juvénile ; les SMD/NMP avec sidéroblastes en couronnes et thrombocytose ; les SMP/NMP inclassables.

Les critères permettant de catégoriser la LMMC, d'après l'OMS, sont basés sur la cytologie sanguine et médullaire (morphologie, cytochimie, taux de blastes et de monocytes) ainsi que sur les techniques de biologie moléculaire (*Tableau 1*).

## Critères diagnostiques de la LMMC selon l'OMS 2016

- O. Monocytose persistance  $\geq 1\text{G/L}$  et représentant  $\geq 10\%$  des leucocytes sanguins.
2. Absence de transcrite de fusion BCR-ABL, d'antécédents ou de critères diagnostiques de leucémie myéloïde chronique, thrombocytémie essentielle, polyglobulie de Vaquez ou de myélofibrose primitive.
  3. En cas d'hyperéosinophilie, absence de réarrangement de PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , FGFR1 et de translocation PCM1-JAK2.
  4. Moins de 20% de blastes dans la moelle osseuse et dans le sang (blastes, myéloblastes, monoblastes, promonocytes).
  5. Dysplasie sur au moins une des lignées myéloïdes. Si la myélodysplasie est absente, au moins 1 des critères suivants :
    - Anomalie clonale cytogénétique ou moléculaire acquise dans la lignée hématopoïétique (*TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *SETBP1*).
    - Monocytose persistant > 3 mois.
    - Les autres causes de monocytose ont été exclues.

**Tableau 1** : Critères diagnostiques de la LMMC adaptés selon la classification OMS 2016.(3)

### B. Epidémiologie

La LMMC est une pathologie du sujet âgé dont l'âge médian de diagnostic varie entre 65 et 75 ans, avec une prédominance masculine (sex-ratio : 2). C'est le plus fréquent des SMD/NMP, représentant 10% des SMD et 2% des hémopathies malignes de l'adulte (4). L'incidence de la pathologie est de 0.5 / 100 000 cas par an (tout âge confondu), celle-ci augmente avec l'âge et atteint 3 / 100 000 cas par an chez les sujets de plus de 60 ans.

L'étiologie est souvent inexpliquée. Selon les antécédents, elle peut être secondaire à une chimiothérapie ou radiothérapie dans le traitement d'un cancer. Certains facteurs environnementaux peuvent également être incriminés : benzène, hydrocarbures aromatiques ; ainsi que l'usage de produits phytosanitaires : pesticides.

## C. Physiopathologie

La LMMC résulte d'une anomalie clonale de la CSH entraînant une expansion de la lignée granulo-monocytaire dans la moelle osseuse, le sang périphérique et la rate ; contrastant avec une anémie et une thrombopénie. L'expansion de la lignée granulo-monocytaire est expliquée par une sensibilité augmentée au *Granulo-Monocyte Cell Stem Factor* (GM-CSF).

Les récents progrès de la biologie moléculaire appliquée aux hémopathies malignes ont permis une meilleure compréhension de la physiopathologie et de l'oncogénèse de la LMMC. Les analyses par séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis la mise en évidence d'anomalies moléculaires récurrentes dans cette pathologie. Ces altérations génétiques fréquentes touchent notamment :

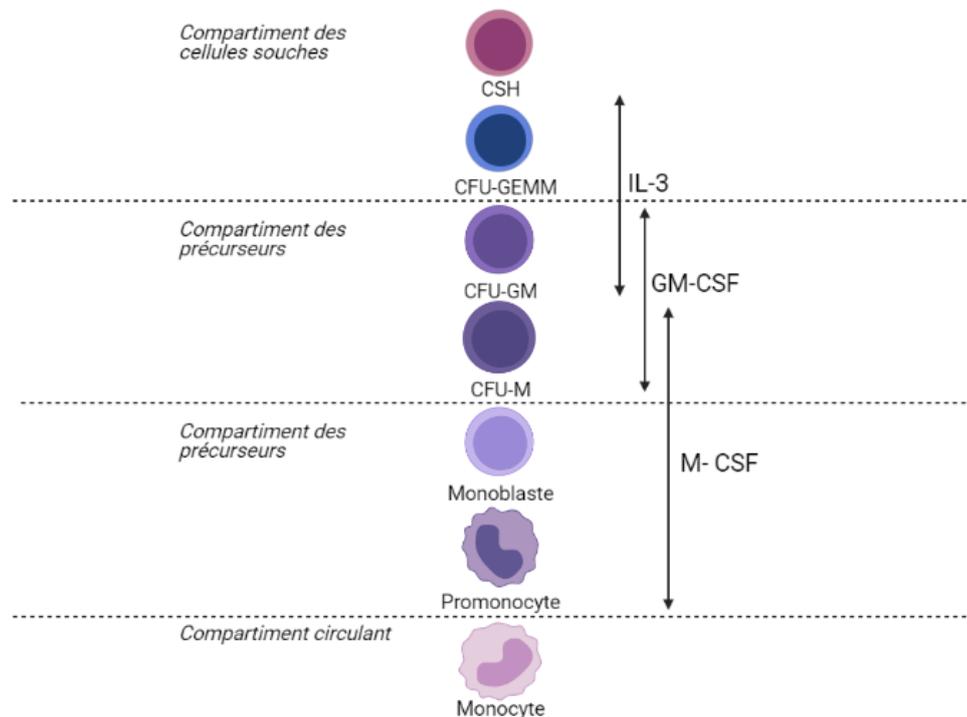
- La méthylation de l'ADN (*TET2*)
- La modification des histones (*ASXL1*)
- Le splicéosome (*SRSF2*)
- La voie de signalisation du GM-CSF (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*)

### 1. Physiologie de la lignée monocyttaire

Les premières techniques de coloration ont permis l'identification des différentes cellules du sang puis la description des monocytes sanguins nommés autrefois « cellules transitionnelles » par Paul Erlich en 1879. Le terme « monocyte » est apparu en 1910, proposé par Arthur Pappenheim (5). Les découvertes ont permis de suggérer que les macrophages dérivent des monocytes ayant migrés du compartiment sanguin vers les tissus. En 1972 Ralph van Furth et Zanvil Cohn publient « *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells* » (6) déterminant ainsi l'origine médullaire des monocytes, la transition sanguine puis la migration tissulaire (7).

La monocytopoïèse s'effectue en plusieurs étapes dans le compartiment médullaire. Une cellule souche hématopoïétique se différencie en cellule souche myéloïde, correspondant au progéniteur commun Colony Forming Unit-Granulocyte Erythroblastic Megacaryocytic and Monocytic (CFU-GEMM). Sous l'influence du micro-environnement médullaire et de cytokines telles que le GM-CSF et l'IL-3, la différenciation est orientée en progéniteur granulo-monocytaire CFU-GM.

L'action du M-CSF permet d'orienter le progéniteur granulomonocytaire commun CFU-GM en CFU-M. La différenciation monocyttaire aboutit à partir du monoblaste au promonocyte puis au monocyte (6). (Figure 1)



**Figure 1 :** Schéma de la monocytopoïèse.

Les monocytes circulants ont une durée de vie moyenne de 24h en conditions homéostatiques (8). La cytométrie en flux a permis à l'équipe de Gunnar Heine en 2011 de démontrer la présence de 3 sous-types de monocytes :

- Les monocytes classiques (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>) : ces monocytes ne quittent pas la circulation. Ils constituent une étape intermédiaire dans la différenciation

monocytaire, avant de migrer dans certains tissus comme l'intestin, le cerveau, le poumon, le foie, le derme etc... Après migration dans un tissu, les monocytes classiques sont capables de se différencier en monocytes intermédiaires ou de constituer un pool de monocytes classiques intra-tissulaires qui pourra être monopolisé en cas de syndrome inflammatoire et ainsi revenir dans la circulation sanguine. (9)

- Les monocytes intermédiaires (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup>) : sous-type de monocytes hétérogènes ; une partie dérive des monocytes classiques et une autre d'un progéniteur indépendant. On retrouve les monocytes intermédiaires uniquement dans les compartiments tissulaires. En cas de syndrome inflammatoire entraînant une monocytose réactionnelle, une expansion des monocytes intermédiaires peut être observée.
- Les monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) : leur durée de vie est de 7 jours en conditions homéostatiques, celle-ci peut être de deux semaines lorsqu'un syndrome inflammatoire monopolise les monocytes classiques. La conversion de monocyte classique à non classique s'opère via la reconnaissance d'un motif delta-like 1 (DLL1) des cellules endothéliales par le motif NOTCH2 des monocytes classiques. (8)

Les monocytes exercent deux fonctions principales : une fonction immunitaire et une fonction réparatrice via la phagocytose. Les monocytes différenciés en macrophages tissulaires sont responsables de l'immunité innée par leur capacité de phagocytose de la matrice extra-cellulaire lors de son renouvellement, ainsi que des débris tissulaires. Lors d'un syndrome inflammatoire, le monocyte est activé pour exercer son rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA) qui permet de déclencher la réponse immunitaire adaptative. Son activation nécessite un

environnement inflammatoire induit par différentes cytokines : IL-6, IL-4, GM-CSF etc... (8)

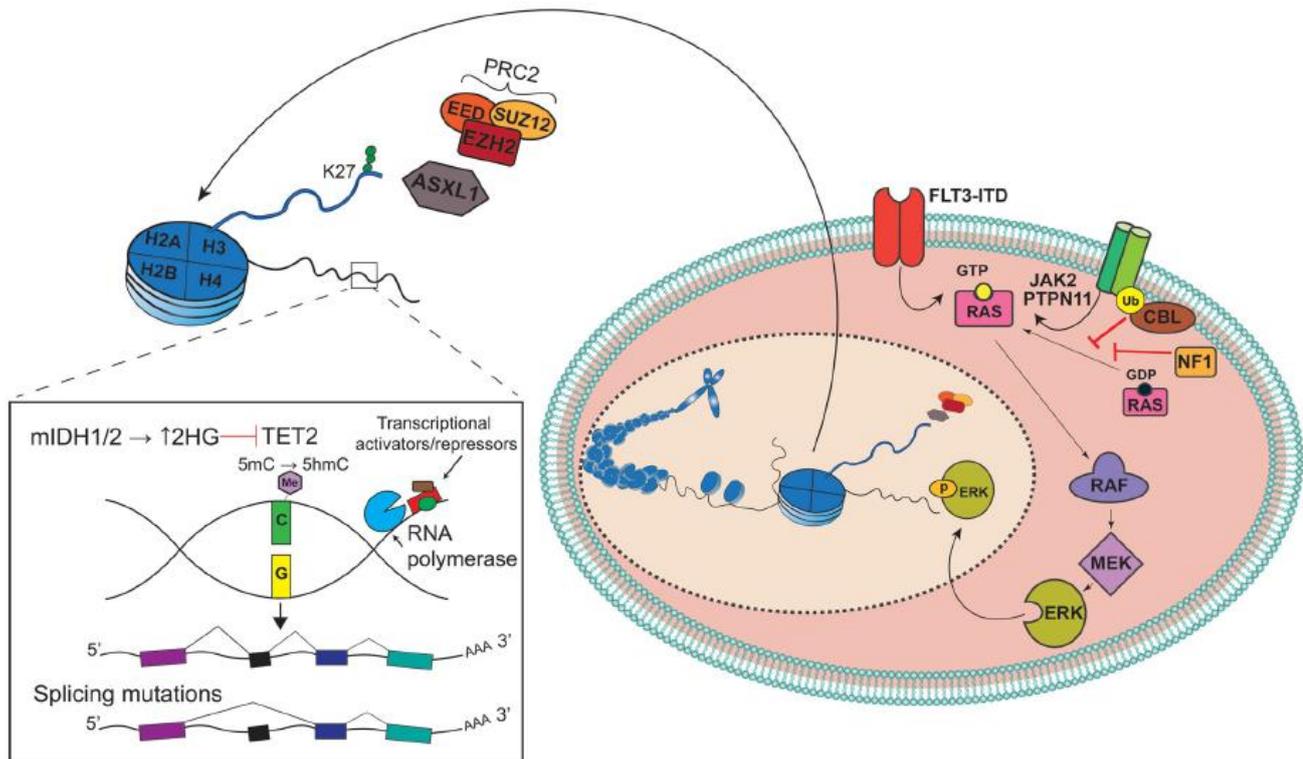
## 2. Oncogénèse de la leucémie myélomonocytaire chronique

La physiopathologie de la LMMC reste partiellement expliquée à ce jour. L'hypothèse évoquée est celle d'une hypersensibilité des progéniteurs hématopoïétiques CFU-GM au GM-CSF, comme dans la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ), forme de prolifération des lignées granulomonocytaire chez l'enfant. Cependant, aucune mutation spécifique de la LMMC n'a été mise en évidence, contrairement à la LMMJ pour laquelle des mutations récurrentes de la voie de signalisation du GM-CSF ont été identifiées (10). Les récentes données génétiques ont permis d'établir l'architecture clonale de la pathologie (11).

Des études menées par *whole genome sequencing* (WGS) ont démontré que la LMMC présente environ 500 mutations somatiques (substitution ou insertions/délétions) dont environ 15 présentes dans des régions codantes : l'exome (12). Les principaux gènes mutés peuvent être rassemblés en 4 familles d'oncogènes :

- Gènes de méthylation de l'ADN : *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*
- Gènes de modification des histones : *ASXL1*, *EZH2*, *KDM6A*
- Gènes du splicéosome : *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*
- Gènes de transduction du signal GM-CSF : *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *CBL*, *RIT1*

D'autres gènes peuvent être touchés, notamment *RUNX1* dans 20-25% des cas, souvent associé à des thrombopénies (13).



**Figure 2 :** Schéma des mutations somatiques de la LMMC. D'après Patel A. et al.

(14)

a) Gènes de méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique de contrôle de l'expression génique. Plusieurs protéines régissent cette voie de contrôle, avec des mécanismes différents.

- TET (*ten eleven translocation*) :

La famille de gènes TET comporte trois membres : *TET1*, *TET2* et *TET3*. L'oncogène *TET2* est situé sur le chromosome 4 et code pour une oxydase dépendante du 2-oxoglutarate et du fer (Fe II). L'enzyme convertit le 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine, permettant la régulation de la méthylation de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes, notamment les gènes de l'hématopoïèse.

Les mutations ciblant *TET2* sont des mutations perte de fonctions. Ce sont des évènements précoces lors de la leucémogénèse. Cependant, les mutations de *TET2* ne sont pas spécifiques de la leucémogénèse, plusieurs études ayant démontré que celles-ci s'intègrent dans les processus d'hématopoïèse clonale physiologique au vieillissement (15). Les mutations de *TET2* sont les plus fréquentes dans la LMMC : 60% (11).

- IDH (*isocitrate deshydrogénase*) :

La famille des gènes IDH codent pour des protéines enzymatiques du cycle de Krebs. Ces enzymes catalysent la réaction de transformation de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate. Il existe trois isoformes d'IDH : *IDH1* (chromosome 2), *IDH2* (chromosome 15) et *IDH3*. Ces isoformes varient par leur localisation cellulaire : *IDH1* est cytoplasmique alors qu'*IDH2* est mitochondrial.

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* sont des mutations gains de fonctions, permettant la conversion de l'alpha-cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate, qui dispose d'un rôle oncométabolite ; ce métabolite permet l'inhibition des fonctions de *TET2*. Ces mutations permettent donc une hyperméthylation de l'ADN aboutissant à une inhibition de la différenciation des CSH.

- DNMT (*DNA methyl-transferase*) :

Le gène *DNMT3A* est situé sur le bras court du chromosome 2, il code pour une protéine exerçant une activité méthyl-transférase sur les cytosines des dinucléotides CpG de l'ADN. Ces îlots sont en amont des gènes et leur hyperméthylation permet la répression de la transcription. La mutation la plus fréquemment retrouvée est R882H, ciblant le domaine catalytique de la protéine.

### b) Gènes de modification des histones

La modification des histones est un mécanisme épigénétique permettant la répression de la transcription par des mécanismes d'enroulement de la chromatine. Plusieurs protéines interviennent dans la régulation des histones.

#### - ASXL1 (*31dditional Sex Comb Like 1*):

Ce gène est situé sur le bras court du chromosome 20, il code pour une protéine membre du complexe polycomb PRC2 et trithorax trxG. Ces complexes interviennent dans le remodelage de la chromatine, permettant de moduler l'expression de certains gènes cibles. Lors de la leucémogénèse, les mutations de ce gène sont des évènements précoces. L'évènement le plus fréquemment retrouvé est une duplication de guanine entraînant un décalage du cadre de lecture. Il en résulte un effet perte de fonction et un complexe polycomb PRC2 incomplet.

#### - EZH2 (*histone-Lysine N-méthyltransférase*) :

Le gène *EZH2* est situé sur le bras court du chromosome 7 ; il code également pour une protéine du complexe polycomb PRC2. Le complexe intervient dans la méthylation des lysines 27 et des histones 3 (H3K27), conduisant à la répression des gènes cibles.

La présence de mutations sur le gène *EZH2* induit un effet perte de fonction pour la protéine, entraînant une dérégulation du système de régulation des gènes.

### c) Gènes du splicéosome

Le splicéosome est un complexe d'épissage : assemblage de 5 protéines (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *U2AF65*) nécessaires pour passer d'un ARN pré-messager contenant des introns (non-codants) et exons (codants) à un ARN messager ne contenant que des exons.

#### - SRSF2 (*Serine/Arginine riche splicing factor*):

Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 17. La protéine sélectionne le site d'épissage en 3' de l'ARN pré-messager, assemble le complexe puis effectue l'épissage conventionnel et alternatif.

Les mutations de ce gène sont parmi les mutations les plus fréquemment retrouvées dans la LMMC. Leur apparition est précoce lors de la leucémogénèse et souvent associés à d'autres mutations : *RUNX1*, *ASXL1* ou *IDH* (11).

- SF3B1 :

Le gène est situé sur le bras long du chromosome 2, ce gène code pour la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3B ; il permet l'ancrage du complexe d'épissage à l'ARN pré-messager. Les mutations de *SF3B1* sont le plus souvent associée à un sous-type de SMD : les SMD avec sidéroblastes en couronnes ou *ring sideroblast* (SMD-RS). Les LMMC mutées *SF3B1* sont plus souvent de type myélodysplasique que myéloprolifératives (16).

- U2AF1 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor*):

Le gène est situé sur le bras long du chromosome 21. La protéine U2AF1 forme avec U2AF2 un hétérodimère capable de se lier au dinucléotide accepteur en 3'AG de l'intron cible de l'ARN pré-messager.

Selon le site de mutation, on peut observer des effets gains ou pertes de fonction entraînant un défaut de splicing. Ces mutations sont le plus souvent associée à *ASXL1* ou *DNMT3A*.

d) *Gènes de transduction du signal*

La fixation d'un récepteur à son ligand entraîne une cascade d'évènements ayant pour but d'activer la cellule. La transduction du signal est médiée par de nombreuses protéines. Lors de la découverte de la LMMC, la recherche de mutation spécifique de la voie de signalisation du GM-CSF entraînant une prolifération

granulomonocytaire était l'hypothèse privilégiée. Aujourd'hui on retrouve des mutations sur la voie de transduction dans la plupart des LMMC, sans qu'aucune de ces mutations ne soit spécifique.

- RAS :

La famille des protéines RAS contient de nombreuses protéines membranaires capables de réguler les signaux de divers récepteurs : GM-CSF, FLT3, c-KIT etc... Ces protéines ont un rôle d'activité GTPasique, capable de moduler l'activation de ces récepteurs. Il existe notamment 3 gènes fonctionnels : *NRAS*, *KRAS*, *HRAS* ; mis en causes lors d'hémopathies mais aussi de nombreux cancers solides.

Les mutations des gènes *NRAS* et *KRAS* ont un effet perte de fonction sur ces protéines : l'activité GTPase n'étant pas active, une transduction continue du signal entraîne une prolifération de la lignée granulomonocytaire.

- JAK2 (*Janus Kinase*) :

La famille des protéines JAK est activée lors de la dimérisation du récepteur. La transduction du signal est alors effectuée par la voie JAK-STAT, entraînant une prolifération cellulaire et un signal de survie. Le gène *JAK2* est situé sur le bras court du chromosome 9 ; de nombreuses mutations de ce gène sont retrouvées dans la LMMC mais surtout dans d'autres syndromes myéloprolifératifs : la polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive.

Les mutations de *JAK2* sont associées à une perte de fonction, entraînant une perte de l'effet auto-inhibiteur du domaine JH2. Ces mutations confèrent un avantage de survie et de prolifération aux cellules leucémiques.

- CBL :

Le gène *CBL* est situé sur le bras long du chromosome 11. La protéine CBL est responsable de la transduction du signal dans le cytoplasme. Elle dispose d'un rôle

E3-ubiquitine ligase, régulateur négatif des voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les mutations du gène *CBL* sont plus fréquemment situées sur les exons 8 et 9, codants pour le domaine RING. Les mutations sont de type non-sens, entraînant une perte de fonction de la protéine.

L'étude de la LMMC par NGS a permis d'établir l'ontogénèse de la maladie : une CSH ayant développé une mutation clonale (*TET2*) au cours du temps sera susceptible de développer des mutations secondaires : *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* ; entraînant un phénotype cytologique de myélodysplasie. L'acquisition de mutations supplémentaires de la voie de signalisation : *CBL*, *JAK2* ; apporte une capacité de prolifération : la LMMC sera alors catégorisée en stade myéloprolifératif. Des mutations additionnelles peuvent amener une incapacité de différenciation associée à une capacité de prolifération, entraînant une évolution de la LMMC vers une leucémie aiguë myéloïde (14).

Gene	Mutation frequency (%)	Type	Involved residue(s)/mutation
<i>TET2</i>	40–60	LOF	Various
<i>SRSF2</i>	40–50	GOF	Pro95
<i>ASXL1</i>	30–50	LOF/GOF	Various
<i>RUNX1</i>	20–25	LOF	D171, various
<i>NRAS</i>	15–25	GOF	Codons 12, 13, and 61
<i>CBL</i>	15–20	LOF	Linker: 352-380; Ring: 381–419
<i>KRAS</i>	10–15	GOF	Codons 12, 13, and 61
<i>SETBP1</i>	5–15	GOF	Residues 868–871
<i>U2AF1</i>	5–10	GOF	S34, Q157
<i>EZH2</i>	5–10	LOF	Various
<i>JAK2</i>	7–8	GOF	V617F
<i>SF3B1</i>	5–7	GOF	K666, K700
<i>DNMT3A</i>	2–10	LOF	Various, R882
<i>BCOR/BCORL</i>	3–10	LOF	Various
<i>ZRSR2</i>	3–8	LOF	Various
<i>PHF6</i>	3–7	LOF	Various
<i>IDH2</i>	5	GOF	R140
<i>CUX1</i>	<5	LOF	Various
<i>FLT3</i>	<5	GOF	FLT3-ITD, FLT3-TKD
<i>BRAF</i>	<5	GOF	V600
<i>PTPN11</i>	<5	GOF	Various
<i>NF1</i>	<5	LOF	Various
<i>TP53</i>	1–3	LOF	Various
<i>IDH1</i>	<1	GOF	R132

LOF: loss-of-function; GOF: gain-of-function.

**Tableau 2** : Caractéristiques des mutations de la LMMC. D'après Patel A. et al.

(14).

## D. Diagnostic

### 1. Clinique

Le tableau clinique de la LMMC est hétérogène et non-spécifique, varie d'un patient à un autre. Des symptômes liés aux cytopénies sont le plus souvent présents : syndrome anémique, susceptibilité aux infections, manifestations hémorragiques (11). La présence de symptômes généraux peut également être décrite : perte de poids, altération de l'état général parfois accompagnés de sueurs nocturnes. Une splénomégalie plus ou moins importante est classiquement décrite, avec une hépatomégalie et de rares adénopathies. D'autres symptômes liés à la

LMMC ont été décrits : épanchement péricardique et des séreuses (17), manifestations auto-immunes de type vascularite ou maladie de Horton (18). Des glomérulopathies et atteintes rhumatismales peuvent être observées secondairement à une hyperuricémie, une hémossidérose ou encore une infiltration synoviale par les monocytes (19). Il est également possible d'observer une atteinte cutanée initiale ; l'infiltrat dermique n'étant pas habituel, il est considéré comme un signe de progression vers la leucémie aigüe (20).

## 2. Hémogramme

La leucocytose sanguine au diagnostic est variable (3 – 100 G/L) selon le stade évolutif de la maladie : une forme myélodysplasique si les leucocytes sont inférieurs à 13 G/L ou myéloproliférative si les leucocytes sont supérieurs à 13 G/L (3). La monocytose sanguine est toujours supérieure à 1 G/L, avec une moyenne située entre 2 et 8 G/L ; pouvant atteindre 80 G/L. Elle représente toujours au moins 10% des leucocytes. Les monocytes ont un aspect dystrophique au frottis sanguin, avec présence d'atypies nucléaires ou cytoplasmiques. Tous les stades de maturation peuvent être présents : monocyte mature et immature, promonocyte, monoblaste. La blastose sanguine est toujours inférieure à 20%, elle permet de catégoriser la LMMC selon l'OMS : LMMC-1 (blastes <5% ), LMMC-2 (blastes 5-19%) (3).

Les polynucléaires neutrophiles sont le plus souvent supérieurs à 1.8G/L, dans les formes myélodysplasiques qui concernent 60% des patients au diagnostic, il est important de noter la dysgranulopoïèse fréquemment observée : aspect pseudo-Pelger, hypogranulation.

Les polynucléaires éosinophiles peuvent être modérément augmentés. S'ils sont supérieurs à 1.5G/L, il faut s'orienter vers un syndrome myéloprolifératif avec éosinophilie et anomalies génétiques spécifiques.

La myélémie peut être présente, représentant moins de 10% de la formule leucocytaire. Si celle-ci représente plus de 10%, il est possible de s'orienter vers une leucémie myéloïde chronique atypique.

Une anémie peut être observée chez 50 à 60% des patients, avec une hémoglobine médiane de l'ordre de 10 g/dL ; une thrombopénie est souvent présente entre 80 et 100 G/L (21).

Les automates de cytologie utilisés pour la réalisation des numérations formules sanguines et numérations globulaires sont une aide pour le diagnostic de LMMC. Sur les automates XN10-Sysmex®, un score a été établi par Schillinger et al. en 2018 pour confirmer le diagnostic de LMMC et écarter une monocytose réactionnelle : le score « mono-dysplasie ». Ce score fait intervenir trois variables : la monocytose, le ratio neutrophile / monocytes ainsi que le Ne-WX, qui est un paramètre obtenu par analyse du nuage des polynucléaires neutrophiles par la fluorocytométrie en flux du XN-10 (22). Ce score dispose d'une sensibilité de 97% et d'une spécificité de 98% pour le diagnostic de la LMMC.



***Figure 3*** : Aspect de monocytes sanguins dystrophiques.

### 3. Myélogramme

Le myélogramme est systématiquement réalisé en cas de suspicion de LMMC. Il permet de confirmer et catégoriser la maladie ; l'étude du caryotype sera également réalisée à visée pronostique. La richesse médullaire est le plus souvent normale ou augmentée. Une dysgranulopoïèse est souvent présente (au moins 10% des cellules de la lignée) : hypogranulation, hypersegmentation, anomalies pseudo-Pelger du noyau, présence de caryoschizes etc... On peut également observer des signes de dysmégacaryopoïèse : noyau hypolobé, de petite taille, ou un noyau séparé du cytoplasme associé ou non à la présence de micromégacaryocytes. Une dysérythropoïèse peut également être observée : anomalie de fragmentation du noyau et du cytoplasme, parfois associées à un aspect mégaloblastique ou la présence de sidéroblastes en couronnes. On note également une hyperplasie de la lignée monocytaire ( $\geq 5\%$  des éléments médullaires) inconstante ; un contingent monocytaire limite n'étant pas défini dans la moelle, à l'inverse du sang périphérique ( $\geq 10\%$ ) (23) . La distinction cytologique entre les monocytes et les précurseurs granuleux peut s'avérer difficile compte-tenu des aspects dystrophiques et prolifératifs de ces lignées. Une coloration par les estérases permet de différencier la lignée monocytaire, celle-ci n'est pas toujours réalisée. L'évaluation de la blastose médullaire comprend : blastes indifférenciés, myéloblastes, monoblastes et promonocytes (24). Son évaluation permet de catégoriser la LMMC selon l'OMS (*Tableau 3*).

	<b>LMMC-0</b>	<b>LMMC-1</b>	<b>LMMC-2</b>
Blastes sang périphérique	<2%	2 à 4%	5 à 19%
Blastes moelle osseuse	Et <5%	Et/ou 5 à 9%	Et/ou 10 à 19%
Corps d'Auer	Et Absence	Et Absence	Et/ou Présence

**Tableau 3** : Classification LMMC selon l'OMS (2).

En France, la biopsie ostéoméduillaire (BOM) n'est pas réalisée systématiquement, uniquement en cas de fibrose médullaire. Elle met en évidence des nodules monocytaires marqués par un anticorps anti-CD123. La BOM montre une moelle riche, un rapport des lignées myéloïde/érythroïde élevé, une augmentation des cellules myélomonocytaires et une localisation anormale des précurseurs immatures évalués par une immunohistochimie : CD117 et CD34 (25).

#### 4. Immunophénotypage

##### a) *Immunophénotypage monocyttaire*

L'immunophénotypage des monocytes est réalisé par cytométrie en flux (CMF). Cette technique est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de lignées couplés à des fluorochromes, afin d'étudier leurs spectres d'émissions lors du passage du laser. Cependant, seuls quelques marqueurs sont spécifiques de la lignée monocyttaire, et il est difficile de déterminer un stade de maturation donné. La caractérisation précise de la cellule nécessite des combinaisons d'anticorps regroupés au sein de panels d'analyse. Les monocytes circulants sont caractérisés par leur expression du CD14, marqueur spécifique des monocytes classiques ; ainsi que les marqueurs CD13, CD33, CD11b, CD18, CD4

et CD64. Chacun des marqueurs correspond aux différentes fonctions des monocytes. D'autres marqueurs peuvent être étudiés pour :

- Leur capacité d'adhérence : CD54, CD49d
- Leur état d'activation : CD68, CD69, HLA-DR
- Les récepteurs aux chimiokines : CCR1, CCR2, CCR3, CCR4 et CCR5.

Le rôle de l'immunophénotypage des monocytes sanguins est multiple. La classification OMS 2016 a permis de donner une place à la cytométrie dans le diagnostic de la LMMC, au même titre que la cytogénétique ou la biologie moléculaire (3).

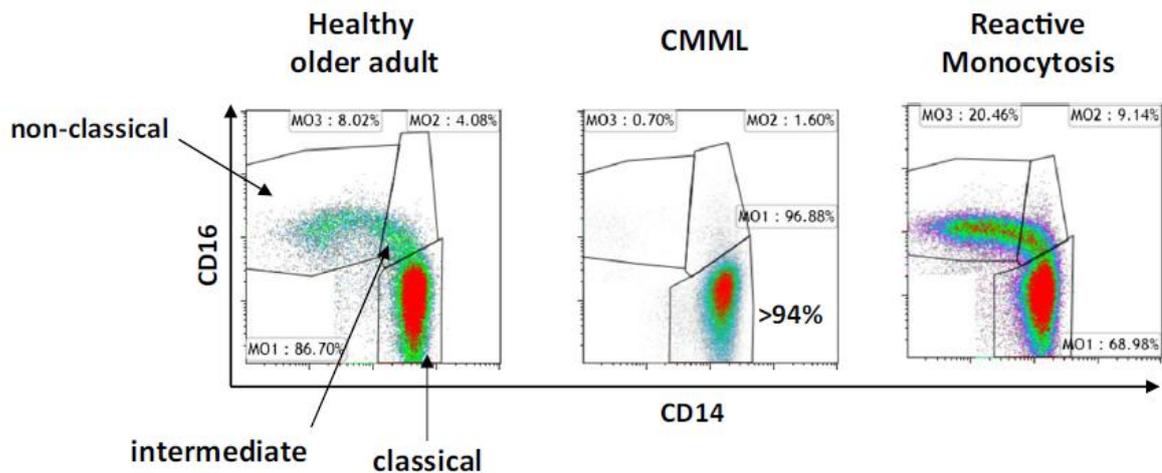
*b) Immunophénotypage des monocytes sanguins dans la LMMC*

Une étude menée par Selimoglu et son équipe publiée en 2015 a permis de caractériser les sous-populations monocytaires dans la LMMC (26). On distingue alors 3 populations :

- Monocytes classiques (MO1) CD14+ / CD16-
- Monocytes intermédiaires (MO2) CD14+ / CD16+
- Monocytes non-classiques (MO3) CD14<sup>low</sup> / CD16+

Le CD14 est un co-récepteur du lipopolysaccharide bactérien et le CD16 est un récepteur de faible affinité pour les IgG (Fcγ-III receptor).

La stratégie d'identification de ces populations repose sur un fenêtrage d'exclusion : exclusion des populations CD14- / CD16- n'étant pas composée de monocytes (*Figure 4*).



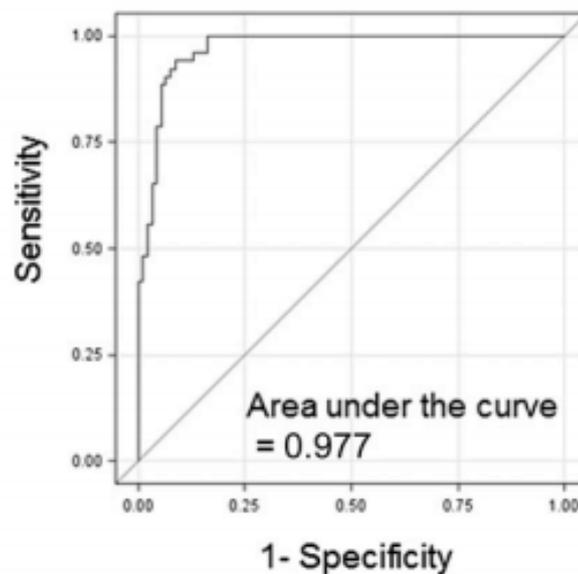
**Figure 4 :** Cytométrie en flux des sous-populations monocytaires caractérisées par les CD14 et CD16. D'après Itzykson, adapté de Selimoglu. (11).

L'aspect caractéristique de la LMMC en « bulbe d'oignon » peut parfois être masqué par une monocytose réactionnelle lors d'un état inflammatoire. Lorsque l'immunophénotypage est difficile, le marqueur Slan peut être utilisé : ce marqueur est présent uniquement sur les monocytes, et plus spécifiquement sur les monocytes non-classiques (MO3). Les monocytes non-classiques sont diminués au cours de la LMMC, ainsi les MO3 exprimant le marqueur Slan ne doivent pas excéder 1.7% d'après une étude récente (27).

Les résultats de l'étude de Selimoglu et al. a montré pour 96.6% des patients atteints de LMMC une augmentation de la sous-population des monocytes classiques CD14+ / CD16- par rapport aux patients non-LMMC. Le seuil de significativité est de 94% de monocytes MO1 alors que les sous-populations de monocytes intermédiaires et non-classiques sont diminuées.

L'analyse par courbe ROC sur la cohorte d'essai a démontré que l'utilisation du pourcentage de monocytes classiques (MO1) pour contribuer au diagnostic de LMMC (Figure 5). En ciblant les patients répondant aux critères de monocytose périphérique chronique :  $\geq 1G/L$  sur plus de 3 mois ainsi que le critère

d'augmentation des MO1 au-dessus de 94%, l'étude a obtenu une spécificité de 100% et une sensibilité de 90.4%.



**Figure 5 :** Courbe ROC de la sensibilité et de la spécificité du pourcentage de monocytes classiques sur un panel de patients LMMC étudiés. D'après Selimoglu et al. (26).

## 5. Caryotype

Le caryotype est systématiquement réalisé au diagnostic de LMMC, même si 70% des patients ont un caryotype normal (21). Aucune anomalie cytogénétique spécifique n'a été retrouvée dans la LMMC. Cependant, le caryotype permet une évaluation pronostique de l'évolution de la maladie dans certains scores tels que l'IPSS ou CPSS. Le score IPSS définit le caryotype normal, la délétion du chromosome 20q, Y et 5q comme le groupe à faible risque ; le groupe de haut risque est constitué de patients avec un caryotype complexe ou des anomalies du chromosome 7 ; le groupe intermédiaire comporte les autres anomalies du caryotype (28).

En 2011, Such *et al.* proposent un score « *CMML-specific cytogenetic risk classification* » établi à partir d'une cohorte rétrospective de 414 patients. Ce score présente l'avantage d'être spécifique de la LMMC, il détermine trois groupes :

- Risque faible : caryotype normal, délétion Y
- Risque intermédiaire : autres anomalies du caryotype
- Risque élevé : trisomie 8, anomalies du chromosome 7, caryotype complexe.

Cette classification permet de donner un pronostic de survie et d'acutisation (29).

## 6. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de la LMMC. Elle est utilisée pour exclure les autres pathologies, mais également pour établir un pronostic. Les critères de l'OMS pour le diagnostic de la LMMC incluent une recherche de transcrite BCR-ABL négative pour éliminer une leucémie myéloïde chronique. D'autre part, une recherche de mutations *JAK2* et *CALR* négative pour éliminer les autres syndromes myéloprolifératifs : la myélofibrose primitive, polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle (2). La recherche de réarrangements de *PDGFR $\alpha$*  et *PDGFR $\beta$*  spécifiques de néoplasies myéloïdes associés à une hyperéosinophilie doivent également être recherchés en cas d'hyperéosinophilie. D'autres mutations génétiques peuvent être recherchées dans les laboratoires spécialisés utilisant une technique de *next-generation sequencing* (NGS). Un panel élargi de 50 gènes est utilisé, celui-ci est commun au diagnostic des leucémies aiguës et aux syndromes myélodysplasiques (30).

Ces mutations peuvent être utiles pour établir le pronostic de la maladie (31) ; cependant, au vu de leur manque de spécificité, elles n'apportent pas de critère diagnostique (11).

Les données moléculaires participent au pronostic de la maladie et à sa prise en charge thérapeutique (32). Cependant à l'heure actuelle il n'existe aucun modèle pronostique intégrant les données cytogénétiques et moléculaires.

En août 2018, un groupe d'experts internationaux a établi des consensus diagnostiques grâce à l'apport de la biologie moléculaire. Les travaux sont publiés en 2019 par Peter Valent (33) et apportent un éclairage diagnostique pour les monocytoses (*Annexe 1*).

#### E. Scores pronostiques

De nombreux scores pronostiques ont été pensés pour évaluer la progression de la LMMC, cependant les difficultés diagnostiques ont souvent mené à une mauvaise classification de la maladie. En 2015, une étude menée par Calvo et al (34) compare 3 scores pronostiques : le MD Anderson prognostic score (MDAPS) (35), le CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) (36) et le Mayo prognostic model (37). Cette étude a mis en évidence une légère supériorité du CPSS notamment en termes de survie globale et du risque d'acutisation en leucémie aigüe. De plus, le regroupement de l'ensemble des paramètres constituant les 3 scores a permis de démontrer par analyse multivariée la supériorité des paramètres utilisés pour le score CPSS : leucocytose, blastose, caryotype et dépendance transfusionnelle.

	<b>LMMC-0</b>	<b>LMMC-1</b>	<b>LMMC-2</b>
<b>Classification OMS</b>	LMMC-1 : <5% blastes dans le sang ou <10% de blastes dans la moelle.	LMMC-2 : 5-19% blastes dans le sang ou 10-19% de blastes dans la moelle.	-
<b>Classification FAB</b>	LMMC-MD (<13G/L)	LMMC-MP (≥13G/L)	-
<b>Risque cytogénétique</b>	Faible	Intermédiaire	Elevé
<b>Dépendance transfusionnelle</b>	Non	Oui	-

**Tableau 4** : Adapté de Such et al. (Blood 2013) (36).

Le score est interprété de la façon suivante :

- Risque faible : score = 0
- Risque intermédiaire 1 : score = 1
- Risque intermédiaire 2 : score = 2 ou 3
- Risque élevé : score = 4 ou 5

La probabilité d'acutisation en LAM est corrélée à l'augmentation du score CPSS ; ainsi les probabilités d'acutisation à 2 ans sont respectivement de 7%, 14%, 37%, 73% pour les risques faible, intermédiaire 1, intermédiaire 2 et élevé.

## F. Prise en charge

### 1. Traitements symptomatiques

La décision de traitement dépendra du stade de la LMMC (myélodysplasique ou myéloproliférative), de l'âge du patient et de sa capacité à recevoir une

chimiothérapie. Pour la LMMC de faible risque, au vu du faible risque d'évolution en LAM, le traitement repose sur la prise en charge des cytopénies. Des thérapies non toxiques seront privilégiées pour améliorer la qualité de vie du patient. Ces traitements de support sont également utilisés pour les LMMC de haut risque dans le but de corriger les cytopénies iatrogènes. (38)

#### *a) Traitements de l'anémie*

L'anémie sera traitée par transfusion de culots globulaires principalement. L'ANSM recommande la transfusion au deçà de 8g/dL d'hémoglobine. En cas de transfusions répétées, l'utilisation de chélateur du fer peut être envisagée pour pallier à l'hémochromatose secondaire. Une surveillance d'apparition d'allo-immunisation est également à prévoir. La thérapie pourra alors être basée sur des agents stimulants de l'érythropoïèse : érythropoïétine ou un dérivé de synthèse d'action prolongée. Cependant, ces molécules n'ont pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans le cadre de la leucémie myélomonocytaire chronique (38).

#### *b) Traitements de la thrombopénie*

La dysmyélopoïèse caractéristique de la LMMC entraîne parfois une thrombopénie. En cas de découverte d'une thrombopénie sévère (<20G/L), une transfusion de plaquettes pourra être envisagée, cependant ce cas ne concerne que 3% des LMMC (38). La thrombopénie est présente chez 20% des patients au diagnostic.

#### *c) Traitements de la neutropénie*

Le traitement des neutropénies est basé sur une antibioprophylaxie à large spectre. En dehors des chimiothérapies, l'utilisation de facteurs de croissance

granulocytaire (G-CSF) tels que le filgrastim ou lénograstim n'ont pas d'AMM en France pour le traitement de la neutropénie (38).

## 2. Traitements spécifiques

Le traitement le plus utilisé dans la LMMC est un agent hypométhylant : le Vidaza® (5-azacytidine), analogue de la pyrimidine dont le mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. Son mécanisme reposerait sur plusieurs actions : une incorporation à l'ADN, entraînant l'inactivation des ADN méthyl-transférases ; ainsi qu'un mécanisme cytotoxique lors de la synthèse d'ADN et d'ARN. L'hypométhylation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire entraîne une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et de leurs fonctions. Il existe un autre agent hypométhylant : la décitabine ; celui-ci ne dispose pas de l'AMM en France, il est cependant utilisé aux USA. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de l'azacitidine dans le traitement de la LMMC, notamment une étude d'Adès et al. (2013) : les patients ont été suivis entre 2004 et 2009 dans trois programmes et recevaient au moins un cycle de traitement (75mg/m<sup>2</sup>/jour pendant 5 à 7 jours tous les 28 jours) ; cette étude a permis d'inclure 76 patients atteints de LMMC. Le traitement a permis une rémission chez 43% des patients dont 17% de rémission complète (39). Cependant, chez les patients répondeurs, 11 d'entre eux ont acutisé en LAM un an après le début du traitement. Une autre étude réalisée aux USA par Costa et al. (2011) a permis un taux de réponse global de 39% chez 36 patients. Cette molécule semble disposer d'un effet notable sur la pathologie, cependant elle doit être évaluée sur de plus grandes cohortes.

Le traitement entraîne des effets indésirables pouvant mener à une altération de la qualité de vie du patient notamment cytopénies et asthénie. Plus récemment, au congrès de l'ASH 2020 ; Itzykson et al. ont présenté les résultats de l'étude

DACOTA qui a permis d'évaluer l'intérêt des agents hypométhylants avec l'hydroxyurée myélofénateur versus l'hydroxyurée seule dans les LMMC myéloprolifératives ( $\geq 13\text{G/L}$ ). Les données suggèrent la non-supériorité des agents hypométhylants en comparaison au groupe hydroxyurée seul pour les LMMC myéloprolifératives préalablement non-traitées (40).

### 3. Traitement curatif

A ce jour, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue le seul traitement curatif de la LMMC mais rarement la première ligne de traitement (30). L'allogreffe est décidée en fonction de : la classification pronostique, les facteurs de risques associés à la maladie et au patient, l'âge et les comorbidités du patient, la disponibilité d'un donneur HLA, la réponse aux traitements de chimiothérapie.

En 2013, Park et al., avec la Société Française de Greffe de Moelle osseuse et de Thérapie Cellulaire (SFGMTC), ont publié les résultats de l'allogreffe chez 73 patients atteints de LMMC en France (41). La survie globale à 3 ans est de 32%, la mortalité sans rechute est de 35%. Les facteurs de risques identifiés sont la splénomégalie et la présence d'une infection avant greffe ; alors que le caryotype n'a pas d'influence sur la survie globale des patients greffés. L'étude montre également la non-supériorité des patients greffés en rémission complète (RC) en comparaison aux patients greffés sans RC ( $p=0.89$  pour la comparaison RC VS non-RC) sur la survie globale (41).

### III. Matériel et méthodes

#### A. L'immunophénotypage

##### 1. Principe de la cytométrie en flux

Le principe de la cytométrie en flux repose sur le marquage des cellules d'intérêt par des anticorps couplés à des fluorochromes suivi d'une analyse par un cytomètre. Les cellules marquées sont soumises à un passage par un liquide de gaine en haut-débit devant une source laser. Cette source va permettre un classement des cellules en fonction de leur taille (lumière dans l'axe direct du laser) et de leur structure (lumière diffusée à 90°C) ainsi que leur composition antigénique extracellulaire (par émission de fluorescence). La lumière ainsi que la fluorescence diffusée vont être captées par des détecteurs et interprétées par un ordinateur. Les données seront analysées par un logiciel de traitement spécifique (Kaluza®) pour les présenter sous forme d'histogrammes ou de graphiques.

La cytométrie en flux repose sur trois systèmes :

- Le système fluide : il permet une focalisation hydrodynamique, c'est un flux laminaire permettant aux cellules en suspension de passer l'une après l'autre devant le faisceau laser.
- Le système optique : il est composé d'un ou plusieurs lasers. Le laser correspond à un faisceau lumineux monochromatique qui excite un fluorochrome à une longueur d'onde déterminée. Les fluorochromes excités vont alors émettre une radiation de longueur d'onde supérieure (longueur d'onde d'émission) lors du retour à l'état fondamental. Les signaux sont séparés par des filtres et collectés par des photomultiplicateurs pour être amplifiés, numérisés et analysés.
- Le système électronique : les signaux lumineux sont transformés en signaux électriques puis digitaux. Un logiciel d'analyse dédié va permettre d'analyser ces

données grâce à des représentations en histogrammes et graphiques bi-paramétriques.

## 2. Immunophénotypage monocytaire

### a) Etape pré-analytique

L'analyse est réalisée sur un échantillon sanguin dans un tube EDTA. La première étape consiste à réaliser une numération leucocytaire de l'échantillon. On prend un volume de sang contenant  $10 \times 10^6$  leucocytes, puis on réalise une lyse macrovolume des globules rouges. Un lavage est ensuite réalisé dans du PBS avec 1% de SAB (5 minutes, 430G à 20°C), on reprend alors les cellules dans du PBS + 1% SAB pour une quantité de 500  $\mu$ L.

En parallèle, on prépare un tube d'anticorps : 50  $\mu$ L de PBS +1% SAB avec 10  $\mu$ L d'anticorps dilué. On distribue alors 100  $\mu$ L de suspension cellulaire dans le tube d'anticorps. On réalise ensuite une incubation de 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ; puis un lavage en PBS 5 minutes à 430G. On reprend les cellules marquées dans 500  $\mu$ L de PBS. Lors du passage sur le cytomètre (Navios®), il est nécessaire d'acquérir au moins 40 000 monocytes.

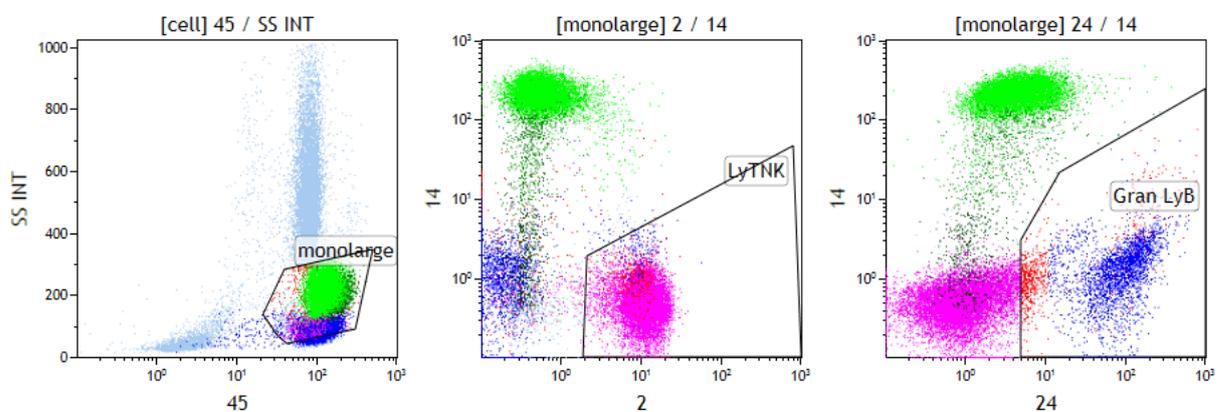
### b) Immunophénotypage monocytaire : stratégie et analyse

Pour l'étude des monocytes sanguins, nous disposons d'un panel de 7 anticorps.

Fluorochrome	FITC	PE	PC	APC	AA75	PB	KO
			5.5		0		
Marqueur	SLA	CD	CD2	CD5	CD14	CD1	CD4
	N	2	4	6		6	5

Les anticorps utilisés dans ce panel permettent de sélectionner les monocytes sanguins, ainsi que les lymphocytes NK (CD56), les polynucléaires neutrophiles et

la myélémie (CD16, CD24). Le gating CD45, SSC va permettre de sélectionner une fenêtre monocytes large, cependant celle-ci peut être contaminée par d'autres cellules. Une cytométrie d'exclusion est alors réalisée : les CD2 et CD56 vont permettre d'exclure respectivement les lymphocytes T et NK ; les CD16 et CD24, selon leur niveau d'expression, vont permettre d'exclure la myélémie et les polynucléaires neutrophiles ; en accord avec les stratégies établies par Tarfi et al. (27).

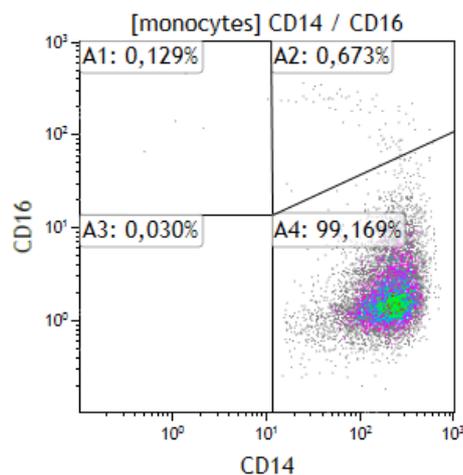


**Figure 6 :** Graphiques en stratégie d'exclusion des lymphocytes T, NK et B.

L'étude des monocytes sanguins se fera donc avec le marquage CD16 et CD14, définissant ainsi les trois sous-populations monocytaires :

- CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup> : MO1, monocytes classiques
- CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup> : MO2, monocytes intermédiaires
- CD14<sup>low</sup>, CD16<sup>+</sup> : MO3, monocytes non-classiques

Le seuil fixé par l'équipe de Selimoglu et al. (26) pose le seuil de MO1 ≥ 94% pour conclure à une LMMC. Cependant, notre protocole local contient un lavage supplémentaire après incubation avec les anticorps en comparaison au protocole proposé ; notre seuil d'analyse est donc fixé tel que les MO1 ≥ 95%.



**Figure 7** : Graphique CD14/CD16 avec 99,169% de MO1 compatible avec une LMMC.

## B. Analyse de biologie moléculaire : panel NGS-SMD

### 1. Panel NGS-SMD

Lors du diagnostic des SMD, l'ELN recommande la recherche de mutations portant sur 23 gènes fréquemment mutés dans les myélodysplasies (42) : *SF3B1*, *TET2*, *RUNX1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *TP53*, *U2AF1*, *NRAS/KRAS*, *DNMT3A*, *ZRSR2*, *EZH2*, *IDH1/IDH2*, *ETV6*, *CBL*, *NPM1*, *JAK2*, *SETBP1*, *SF3A1*, *SF1*, *U2AF65*, *PRPF40B*.

Le panel étudié comprend 36 gènes : *ASXL1* (exons 11 et 12), *BCOR* (exons 2 à 5), *BCORL1* (exons 1 à 12), *CALR* (exon 9), *CBL* (exons 8 et 9), *CSF3R* (exon 14), *DNMT3A* (exons 2 à 23), *ETV6* (exons 1 à 8), *EZH2* (exons 1 à 8), *FLT3* (exon 20), *GATA2* (exons 2 à 6), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *JAK2* (exons 12 et 14), *KIT* (exons 8 et 17), *KRAS* (exons 2 et 3), *MPL* (exon 10), *NIPBL* (exons 2 à 47), *NPM1* (exon 11), *NRAS* (exons 2 et 3), *PHF6* (exons 2 à 10), *PTPN11* (exons 3 et 13), *RAD21* (exons 2 à 14), *RIT1* (exons 2 à 6), *RUNX1* (exons 1 à 9), *SETBP1* (exon 4), *SF3B1* (exons 13 à 18), *SMC1A* (exons 1 à 25), *SMC3* (exons 1 à 29), *SRSF2*

(exon 1), *STAG2* (exons 3 à 35), *TET2* (exons 3 à 11), *TP53* (exons 2 à 11), *U2AF1* (exons 2 à 6), *WT1* (exons 7 et 9), *ZRSR2* (exons 1 à 11).

## 2. Isolement, amplification, séquençage

### *a) Isolement*

Les culots pour l'extraction de l'ADN sont préparés à partir de prélèvements de moelle osseuse ou de sang périphérique récupérés sur tube EDTA. La première étape associe la lyse des globules rouges et l'isolement des cellules mononuclées par gradient Ficoll. A la suite de l'isolement, une numération est réalisée sur un aliquot de 200µL. L'ADN des culots est ensuite extrait avec une colonne QIAmp® (DNA Mini Kit) de Qiagen®. Cette méthode permet de purifier l'ADN (élimination des inhibiteurs et des protéines) sans le détériorer et l'obtention de fragments jusqu'à 50kb (principalement 20-30kb). Chaque culot est repris dans 200µL de PBS, 20µL de protéinase K (dégrade les membranes cellulaires et nucléaires) et 200µL de tampon. Après vortex et centrifugation, on ajoute 200µL d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN ; l'ensemble de la solution est transféré sur une colonne en suivant les recommandations du fabricant. La dernière étape consiste à récupérer l'ADN après élution dans 200µL de tampon AL chauffé à 70°C. La conservation des aliquots est réalisée à -20°C.

### *b) Amplification*

L'étape d'amplification débute par une préparation de la librairie au préalable. Les ADN sont dosés par la méthode Picogreen : une molécule fluorescente intercalante de l'ADN permet une mesure de la concentration en ADN. Les ADN sont dilués pour obtenir 112.5ng d'ADN dans un volume de 22.5µL. Seize enzymes de restriction vont ensuite digérer l'ADN en de nombreux fragments. Le design permet une coupe franche ce qui assure une meilleure couverture et profondeur de

lecture possible. L'ADN digéré est hybridé avec des sondes Ampliseq®. Ces sondes disposent de deux zones de reconnaissance à l'ADN, spécifique de la région choisie via les enzymes de restriction, coupées par un index (un index correspond à 8 acides-aminés spécifiques du patient analysé). Chaque sonde est associée à une molécule de biotine en 5'. Le processus est alors divisé en deux étapes : une étape de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 10 minutes) et une dégradation des enzymes de restriction, suivie d'une étape d'hybridation et de circularisation de l'ADN (54°C pendant 3h).

Ces hybrides ADN/sondes sont capturées par des billes magnétiques marquées à la streptavidine par liaison non-covalente entre la streptavidine et la biotine. L'ADN est couplé à l'index par une ADN-ligase. L'ajout d'hydroxyde de sodium permet une dénaturation de la liaison streptavidine-biotine, entraînant l'élution des hybrides sans impact sur l'ADN. On obtient alors un ADN libre, circulaire et dépourvu de bille magnétique.

L'amplification de l'ADN est réalisée par PCR (polymerase chain reaction). Cette réaction permet d'augmenter de façon exponentielle un fragment d'ADN d'intérêt. Cette technique est basée sur l'utilisation de deux amorces spécifiques délimitant la zone à amplifier et d'une enzyme de polymérisation thermostable (Taq-polymérase) en présence de désoxyribonucléosides (dNTPs) et de MgCl<sub>2</sub>. Chaque cycle PCR se compose de trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN à 98°C
- Hybridation des amorces aux extrémités à une température de 50-60°C
- Elongation par incorporation des dNTPs à 72°C

Après chaque cycle, les brins d'ADN servent de matrice pour les brins suivants. A la suite de ces réactions, on purifie les amplicons obtenus : élimination des

amplicons ou des débris de taille < 150pb. La quantification des amplicons est réalisée sur TapeStation d'Agilent Technologies®. On regroupe les solutions afin de composer la librairie finale à séquencer ; celle-ci est normalisée et quantifiée sur Bioanalyzer d'Agilent Technologies®.

### *c) Séquençage*

La librairie préalablement constituée sera séquencée sur le séquenceur IonS5® (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) et amplifiée afin de générer des clusters d'amplicons. Le séquençage Ion Torrent est une méthode basée sur la détection d'ions hydrogènes libérés durant la polymérisation de l'ADN. C'est une méthode de séquençage par synthèse durant laquelle un brin complémentaire est créé à partir d'une matrice. L'ajout d'un dNTP à un polymère d'ADN libère un ion hydrogène, entraînant une variation de pH, elle-même détectée au niveau de la couche mince (technologie semi-conductrice) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrits sous forme d'ionogrammes. A l'issue du run de séquençage, le fichier .DAT regroupant les données sera analysé. Cette technique de séquençage possède une limite technique, le séquençage de ASXL1 (c.1934dupG) est donc réalisé en technique Sanger. Au vu de la sensibilité du séquençage Sanger, nous considérons que la VAF est supérieure à 10% en cas de mutation.

### 3. Analyse des données

Les données sont récupérées sur deux pipelines : Torrent Browser (Thermo Fisher) et SeqNext (JSI Medical System, Los Angeles, CA, USA) ; qui permettent l'alignement des séquences et la comparaison avec une séquence de référence. Chaque anomalie détectée est analysée pour éliminer les artéfacts de séquençages.

Les variants sont analysés selon plusieurs règles afin d'affirmer ou non leur caractère somatique :

- Les variants doivent avoir une profondeur de lecture suffisante (50 reads minimum),
- Les mutations non-sens et les insertions ou délétions entraînant la formation d'un codon stop sont considérés comme mutations somatiques,
- Les mutations faux-sens et autres insertions/délétions *in frame* doit disposer de certains critères :
  - Être décrites comme mutation somatique dans la base de données COSMICS,
  - Être décrites comme un polymorphisme dans les bases de données eXac et dbSNP,
- La prédiction des conséquences fonctionnelles des variants est étudiée via des logiciels d'analyses dédiés (MAPP, PhD-SNP, PolyPhen...) et chaque VAF (variant allele frequency) est pris en compte pour établir le SNP ou la mutation somatique.
- Une analyse bibliographique est réalisée pour les variants non-décrits.

Certaines anomalies doivent être vérifiées par une seconde technique de séquençage haut-débit ou par séquençage Sanger. Le caractère somatique de certaines anomalies est confirmé par une disparition ou diminution notable de la VAF sur un prélèvement de suivi en RC.

## V. Etude rétrospective monocentrique au CHU de Lille

### A. Contexte et objectif de l'étude

La LMMC est une pathologie clonale de la cellule souche hématopoïétique ciblant le sujet âgé. Classée en 1982 comme syndrome myélodysplasique par le groupe FAB, elle a finalement été reclassée en SMD/SMP en 2001 par l'OMS ; la présentation hétérogène de la maladie, à la fois sur le plan biologique et clinique, rend son diagnostic difficile.

Nous avons ainsi réalisé une étude rétrospective monocentrique au laboratoire d'hématologie du CHU de Lille sur une période de trois ans (2017-2020). Dans un premier temps, nous avons recueilli les résultats des différents immunophénotypages réalisés devant une suspicion de LMMC. Dans un second temps, nous avons confronté ces résultats aux données suivantes : NGS myéloïde, numération formule sanguine et exploration médullaire lorsque celle-ci était réalisée. L'ensemble de ces données a ensuite été confronté au diagnostic retenu. L'objectif final de cette étude est donc l'obtention d'une conduite à tenir en cas de discordance entre les résultats des différents examens biologiques réalisés.

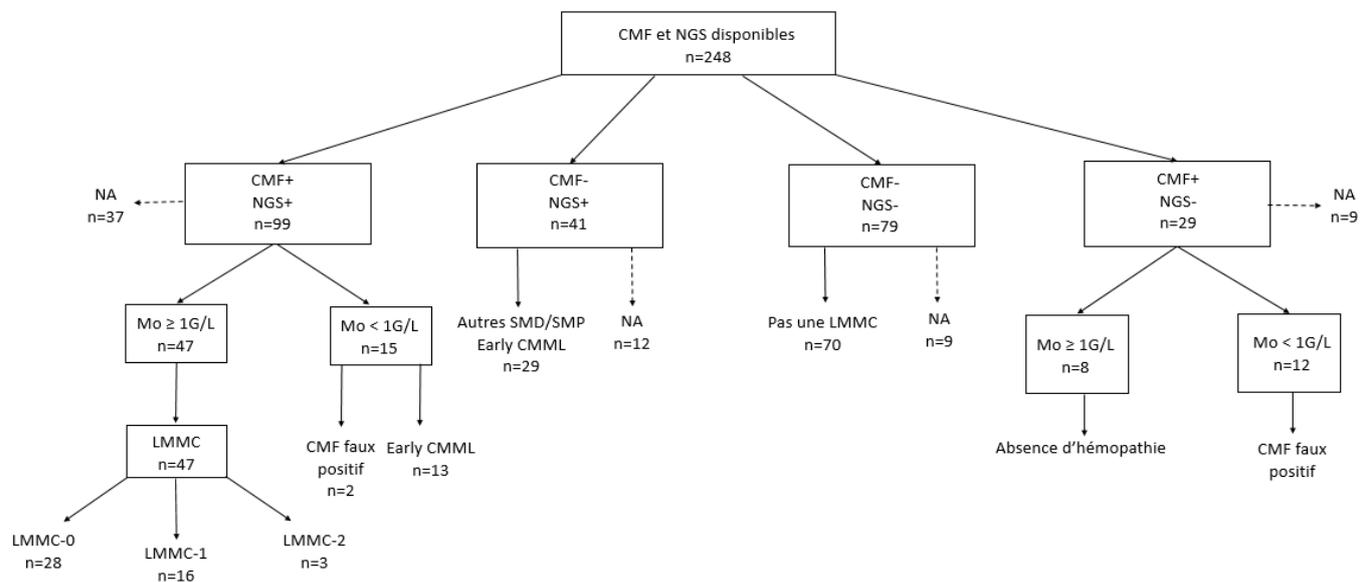
### B. Patients

#### 1. Recueil de données

Cinq cent quatre-vingt-un immunophénotypages ont été réalisés pour suspicion de leucémie myélomonocytaire chronique au CHU de Lille sur une période de trois ans (janvier 2017 – décembre 2020) ; 248 patients (43%) ont bénéficié d'un NGS-SMD en parallèle. Pour les 333 autres demandes (57%) : 125 n'ont pas eu de demande de NGS-SMD mais de l'ADN a été congelé, 208 n'ont pas eu de demande.

Nous avons ainsi restreint notre étude aux 248 patients pour lesquels nous disposons de l'immunophénotypage et d'un résultat de NGS-SMD. Cependant, 67 patients sont issus de centres extérieurs pour lesquels nous avons réalisé les analyses ; ne disposant pas de renseignements cliniques pour ces patients, ils seront exclus de leurs groupes respectifs lors de l'analyse.

## 2. Analyse de la distribution



**Figure 8 :** Schéma de la distribution de la cohorte étudiée selon l'immunophénotypage et le NGS. (NA= Non-acquis)

Nous disposons de 248 patients avec à la fois des résultats d'immunophénotypage (CMF) et de NGS-SMD.

L'immunophénotypage est considéré comme positif si le taux de monocytes classiques (Mo1 : CD14+ CD16-) est supérieur ou égal à 94% comme recommandé (Mo1 ≥ 94%). Pour les résultats de biologie moléculaire, nous avons précédemment détaillé la complexité des mutations présentes lors des différents stades de la LMMC ; le but ici étant d'éviter les faux négatifs, nous considérons comme « NGS

positif » le fait d'avoir au moins une mutation compatible avec un aspect de LMMC : *TET2, ASXL1, SRSF2, CBL, ZRSR2* ; avec une VAF > 10%.

A partir des résultats, nous avons établi 4 groupes :

- Phénotypage positif, NGS positif : n = 99 patients

Ce groupe désigne des patients avec un aspect mutationnel et immunophénotypique compatible avec une LMMC. 37 patients proviennent de centres extérieurs, nous n'avons pas accès à l'ensemble des données clinico-biologiques pour notre étude. Nous avons appliqué aux 62 patients de notre centre les critères OMS 2016 : monocytes  $\geq 1\text{G/L}$  et  $\geq 10\%$  de la numération leucocytaire sanguine. On obtient alors deux sous-groupes : celui avec des monocytes  $\geq 1\text{G/L}$  (n=47) et celui où les critères OMS ne sont pas respectés (monocytes < 1G/L (n=15)). Un patient présente une monocytose supérieure à 1G/L mais pas de monocytose relative (monocytes < 10%).

- Phénotypage négatif, NGS positif : n = 41 patients

Ce groupe représente les patients sans aspect de LMMC d'un point de vue immunophénotypique, mais avec une ou plusieurs mutations au NGS. 12 patients proviennent d'autres centres, les données fournies sont insuffisantes pour notre étude. Nous allons donc nous intéresser aux 29 patients provenant de notre centre.

- Phénotypage négatif, NGS négatif : n = 79 patients

Ce groupe désigne les patients pour lesquels les profils n'évoquent pas une LMMC. 9 patients proviennent d'autres centres dont les données fournies ne permettent pas l'inclusion à notre étude. Les 70 patients provenant de notre centre ont un profil évoquant une monocytose dans un contexte réactionnel.

- Phénotypage positif, NGS négatif : n = 29 patients

Ce groupe désigne les patients pour lesquels le profil mutationnel n'évoque pas une LMMC, mais le profil immunophénotypique est en faveur de la maladie. 9 patients proviennent d'autres centres et ne seront pas intégrés à l'étude. Parmi les 20 patients de notre centre, nous appliqueront les critères OMS 2016 : 8 patients présentent une monocytose  $\geq 1$  G/L et 12 patients n'ont pas de monocytose.

### 3. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Les comparaisons entre les groupes ont été testées par les tests de Mann-Whitney ou le test de Student pour les variables continues et par le test du khi-deux ou test exact de Fisher pour les variables catégorielles. La significativité des tests est évaluée à 5%.

Les statistiques descriptives de la cohorte sont disponibles en annexe 2.

## D. Résultats

### 1. Cytométrie et séquençage concordants

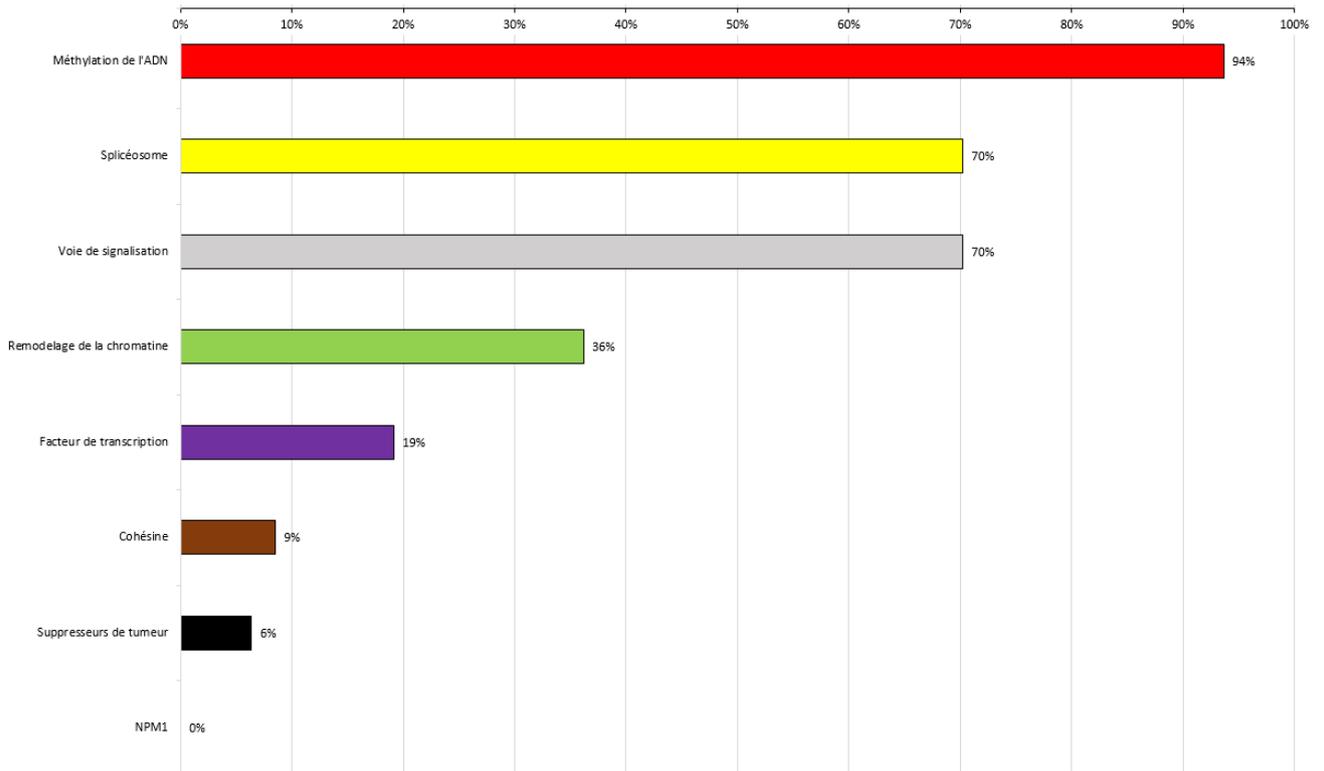
#### a) *Monocytes* $\geq 1G/L$ : patients LMMC

Cette catégorie regroupe les patients qui répondent aux critères diagnostiques OMS de la LMMC évoqués dans le Tableau 1, avec un immunophénotypage montrant un excès de monocytes classiques. Les patients sont divisés en 3 sous-groupes : LMMC-0, LMMC-1 et LMMC-2 selon les critères OMS.

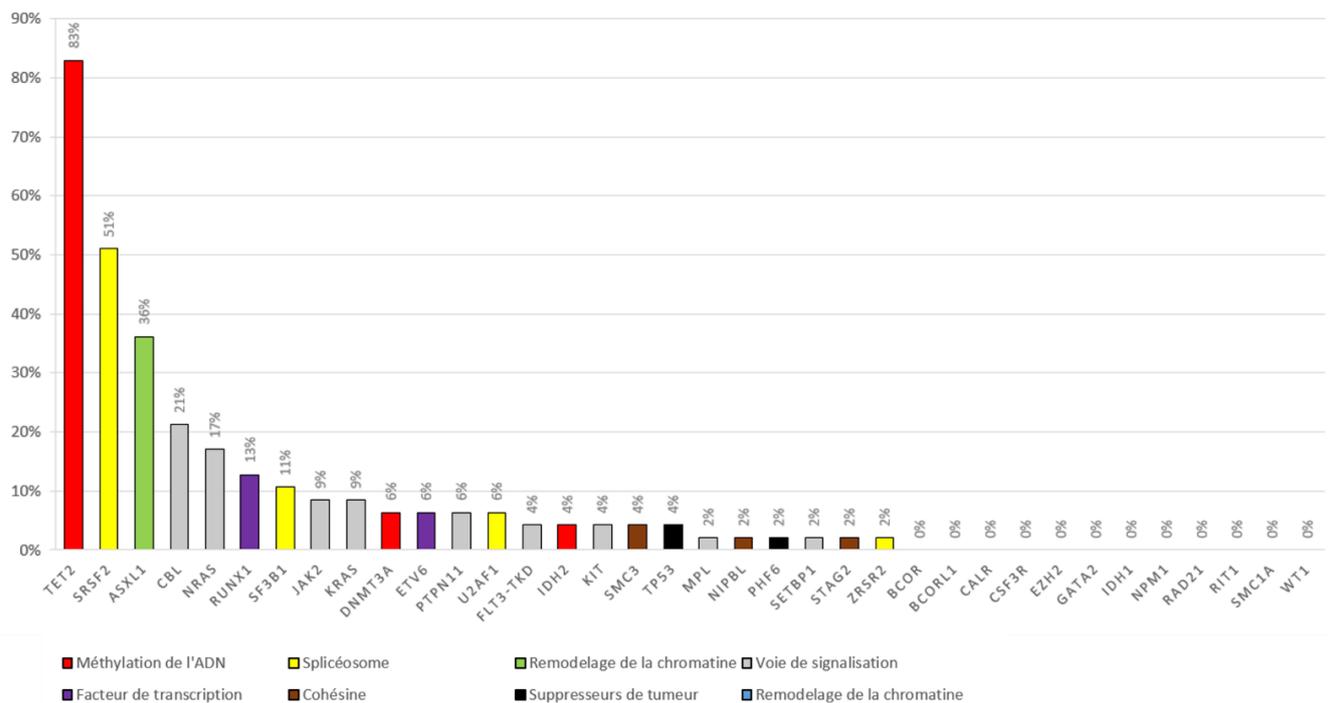
Nos données sont semblables à celles de la littérature concernant l'épidémiologie de la LMMC ; on retrouve également des fréquences mutationnelles similaires à celles précédemment décrites, avec une prédominance des mutations de *TET2*, *SRSF2* et *ASXL1* (Figure 9, 10). On retrouve parfois des mutations évocatrices de LAM, notamment pour 2 patients mutés FLT3-TKD : un patient a évolué en LAM, le sous-clone étant probablement à l'état émergent au moment du diagnostic ; et une autre patiente présente une VAF à 1% évocatrice d'une CHIP, sans signes d'évolution 4 ans plus tard.

Pour les 2 patients avec mutation de TP53 : un patient avait une VAF à 1% suggérant une CHIP. L'autre patient présente une VAF à 9% : il est décédé d'une leucémie aigüe myéloïde 3 ans après le diagnostic.

Un patient ne présente aucune anomalie des 3 gènes les plus fréquemment mutés (*TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*), mais présente une mutation sur 3 gènes codant des protéines de la voie RAS : *CBL*, *NRAS*, *PTPN11*, mutations fréquentes dans la LMMC, ainsi que deux mutations de *RUNX1*.



**Figure 9 :** Fréquences des catégories de gènes mutés dans la cohorte LMMC.



**Figure 10 :** Fréquences des gènes mutés dans la cohorte LMMC avec CMF et NGS-SMD concordants.

b) *Monocytes < 1G/L*

Ce groupe est composé de 15 patients pour lesquels le NGS-SMD ainsi que le phénotype sont compatibles avec un aspect de LMMC ; cependant au diagnostic les critères OMS ne sont pas respectés : les monocytes sont  $< 1\text{G/L}$  et/ou  $< 10\%$  de la formule leucocytaire.

Six patients ont présenté une monocytose  $\geq 1\text{G/L}$  de manière chronique dans l'année suivant le diagnostic, ce qui a permis de les classer en LMMC (*Annexe 3*). Ces patients présentaient par ailleurs un taux de monocytes  $\geq 10\%$  de la formule leucocytaire, ce qui pourrait correspondre à l'évolution de l'état d'oligo-monocytaire LMMC vers une LMMC (23).

Neufs patients n'ont pas de monocytose  $\geq 1\text{G/L}$  à ce jour mais toujours une monocytose relative  $\geq 10\%$  des leucocytes sanguins. On peut donc s'interroger sur le devenir de ces patients et une éventuelle évolution vers une LMMC. Une des patientes présente une mutation germinale de *TET2* décrite (43), elle est toujours en phase oligomonocytaire à ce jour.

Un patient présente un immunophénotypage positif avec  $400\text{ monocytes/mm}^3$  représentant  $3,3\%$  de la formule leucocytaire ; ce patient présente une maladie de Horton traitée par corticoïdes, or il a déjà été démontré que le traitement par corticoïdes peut donner un faux positif sur l'immunophénotypage (44). Cependant, ce patient présente également 2 mutations *TET2* et une mutation *SRSF2* à des VAF  $\geq 10\%$  : le profil moléculaire est donc positif selon nos critères. Il est fréquent que des manifestations auto-immunes accompagnent une leucémie myélomonocytaire chronique (17). On peut penser que ce patient présente un clone d'aspect compatible avec une LMMC, mais les traitements anti-inflammatoires jouent un rôle freinateur sur la progression de la maladie.

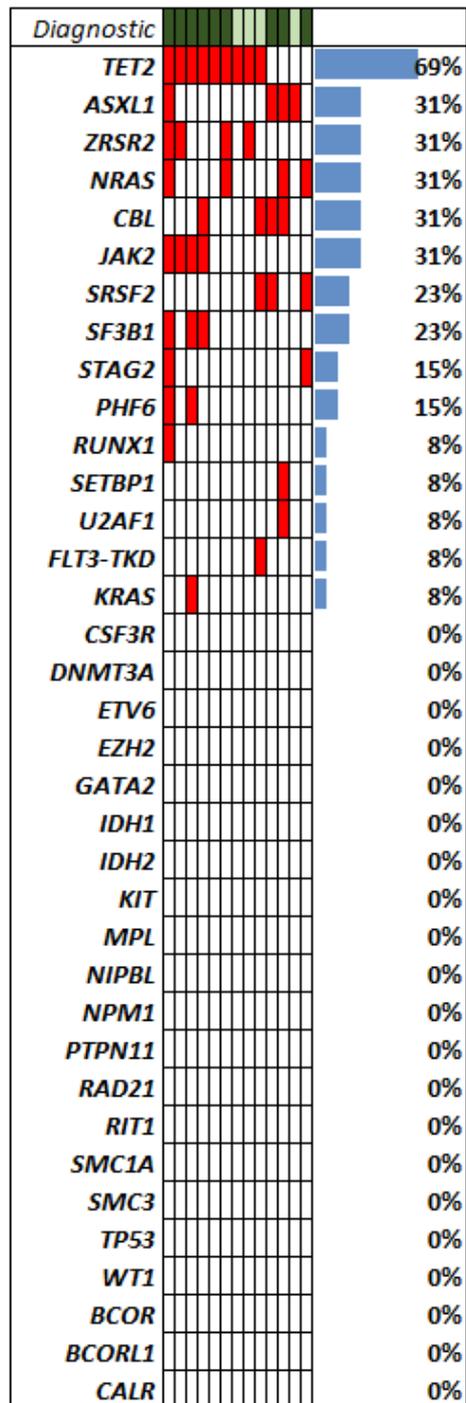
## 2. Cytométrie négative, séquençage concordant

Vingt-neuf patients ont un immunophénotypage négatif avec un NGS-SMD concordant avec une LMMC. Ces patients présentent une certaine hétérogénéité sur le plan mutationnel et diagnostique :

- 9 patients présentent une leucémie myélomonocytaire chronique
- 8 patients ont un syndrome myélodysplasique
- 6 patients présentent un état oligomonocytaire d'une LMMC
- 2 patients présentent un syndrome myéloprolifératif
- 2 patients ont une leucémie aigüe myéloïde
- 1 patient présente une hémopathie lymphoïde avec envahissement médullaire
- 1 patient présente une mutation isolée d'*ASXL1* (VAF : 16%)

Chez les 14 patients présentant une LMMC ou un état oligomonocytaire, le profil mutationnel est identique à celui des patients décrits avec un immunophénotypage positif (*Figure 10*). On remarque cependant que les mutations de *ZRSR2* sont plus fréquentes et plus nombreuses. Le taux de monocytes classique est de  $88,2 \pm 6,2\%$  ; il est possible que ces patients correspondent à des faux-négatifs sur le phénotype. Il est décrit qu'un état inflammatoire associé à la LMMC peut entraîner un faux-négatif (26) ; chez ces patients, le test a été renouvelé uniquement chez 4 d'entre eux et un seul est positif au second test (Mo1 : 96%).

Pour un des patients, 2 ans après le diagnostic initial de LMMC-0, le clone portant une  $t(1 ; 1)(q36 ; q21)$  a acquis un chromosome Philadelphie  $t(9 ; 22)(q34 ; q11)$  avec un transcrit *minor*-BCR (p190).



**Figure 11** : Carte mutationnelle des patients atteints d'une LMMC (vert foncé) ou d'une LMMC oligomonocytaire (vert clair) avec un immunophénotypage négatif.

Les deux patients atteints de syndromes myéloprolifératifs présentent une polyglobulie de Vaquez et une leucémie myéloïde chronique atypique. Chez le

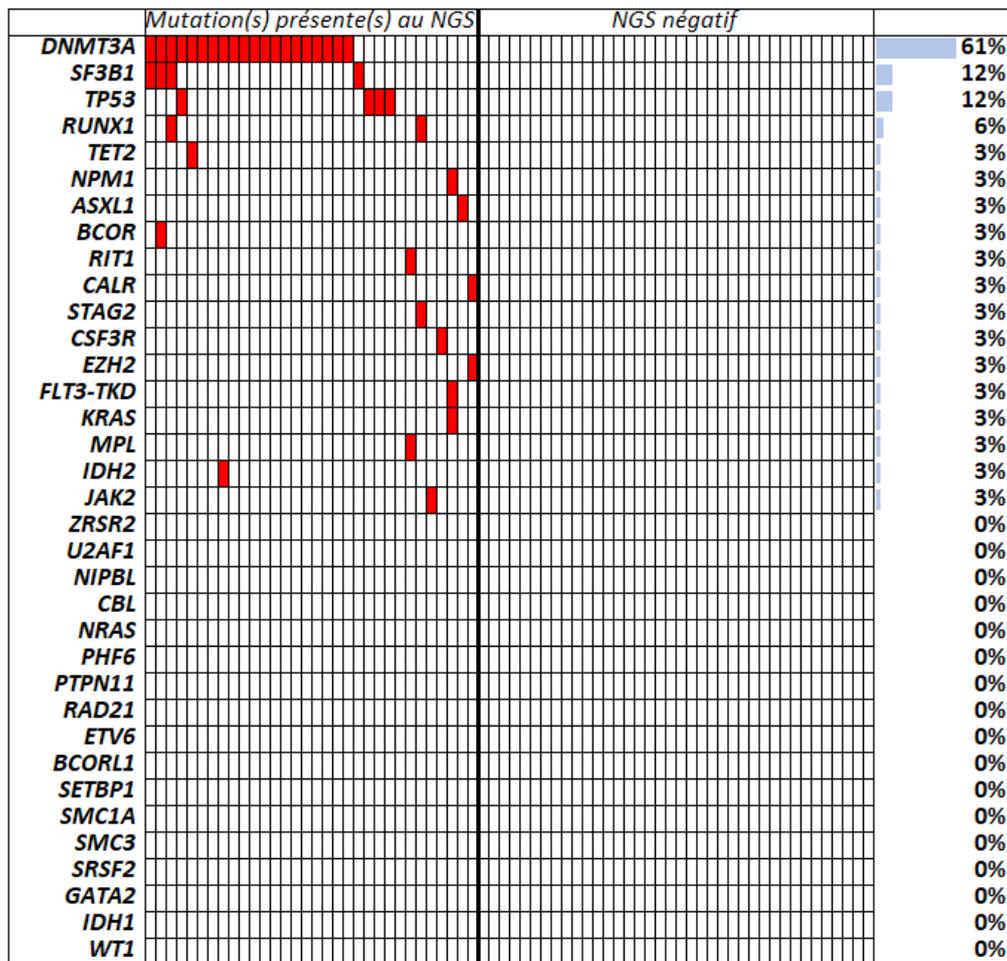
patient atteint d'une polyglobulie de Vaquez, on retrouve une mutation *JAK2 V617F* caractéristique de la maladie (45), associée à une mutation de *TET2*. D'autre part, le patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique atypique présente des mutations d'*ASXL1*, *CBL* et *TET2* ; l'aspect moléculaire seul peut évoquer une LMMC, mais les critères OMS ne permettent pas de poser le diagnostic. Pour ces deux cas, d'après les critères de Valent et al. (33), on peut parler d'une LMMC variante, correspondant à une LMMC secondaire se développant en contexte myéloprolifératif.

Le patient atteint d'une hémopathie lymphoïde (myélome multiple) présente une mutation de *TET2* (VAF 39%) ainsi qu'une faible mutation de *TP53* (VAF 1%). Les explorations médullaires ne permettent pas de poser le diagnostic de syndrome myélodysplasique.

Un patient présente une mutation isolée d'*ASXL1* (VAF 16%) ; on retrouve chez ce patient une monocytose chronique en accord avec les critères OMS 2016 : le diagnostic de LMMC peut être posé.

### 3. Cytométrie et séquençage négatifs

Cette catégorie peut être divisée en deux sous-groupes : 38 patients ont une absence de mutation ; en fonction du contexte et de la chronicité de la monocytose, une conclusion sera établie sur son caractère réactionnel. Dans le cas contraire, en absence de cytopénies on pourra conclure à une *idiopathic monocytosis of undetermined significance* (IMUS).



**Figure 12** : Carte mutationnelle des monocytoses réactionnelles.

Les 32 patients porteurs d'au moins une mutation présentent des profils moléculaires très hétérogènes :

- 14 CHIP (11 CHIP *DNMT3A*; 1 CHIP *DNMT3A* et *TET2*; 1 CHIP *DNMT3A* et *TP53*; 1 CHIP *TP53*)
- 9 syndromes myélodysplasiques
- 3 syndromes myéloprolifératifs (1 myélofibrose primitive, 1 syndrome myéloprolifératif avec t(8 ;13)(p11 ;q12) et 1 leucémie myéloïde chronique (46))
- 2 leucémies aigües myéloïdes
- 1 hyperéosinophilie idiopathique
- 1 profil oligomonocytaire de leucémie myélomonocytaire chronique

- 1 hémopathie lymphoïde (leucémie lymphoïde chronique)
- 1 patient présente un variant de signification indéterminée de *TET2* associé à un syndrome myélodysplasique

Un seul patient de ce groupe présentant un profil oligomonocytaire de LMMC, a évolué en LMMC. Le profil mutationnel du clone est atypique : *DNMT3A*, *RUNX1*, *SF3B1* ; il n'a pas acquis de mutations supplémentaires lors de l'évolution de la maladie et l'immunophénotypage monocytaire sanguin a montré un excès de monocytes classiques 6 mois plus tard, permettant de caractériser la LMMC.

#### 4. Cytométrie concordante, séquençage négatif

Les 20 patients retrouvés dans cette catégorie peuvent être répartis en 4 sous-groupes :

- 15 patients ne présentent aucune mutation au séquençage
- 2 patients présentent une CHIP
- 2 patients ont un syndrome myélodysplasique
- 1 patient présente une LMMC avec une seule mutation d'*U2AF1*

Pour les 15 patients ne présentant pas de mutations, 2 patients ont présenté une monocytose  $\geq 1\text{G/L}$  et  $\geq 10\%$  pendant plus de 3 mois sans qu'aucun argument de séquençage ne soit identifié ; on peut formuler l'hypothèse que les mutations seraient atypiques et non identifiables sur notre panel de 36 gènes. En absence de mutation, nous concluons sur une IMUS. Les treize patients ne présentant pas de monocytose ni d'arguments moléculaires posent la question de faux positifs à l'immunophénotypage ; ces faux positifs sont décrits comme pouvant survenir en sortie d'aplasie, traitement par corticoïdes ou immunoglobulines intraveineuse (48) et en cas d'infection, notamment à la Covid-19 (49).

Deux patients présentent une CHIP : *CBL*, *DNMT3A* et *TET2* ; ces anomalies n'expliquent pas le phénotype positif. De même, deux patients présentent un syndrome myélodysplasique avec mutation de *SF3B1*, orientant le diagnostic vers un syndrome myélodysplasique avec excès de sidéroblastes en couronnes (50).

Un patient a été identifié rétrospectivement comme porteur d'une anomalie du gène *UBA1* caractérisant un syndrome Vexas (47) ; la pathologie ayant été décrite récemment, il est possible que cette anomalie clonale amène un excès de monocytes classiques.

Un patient (#175) présente une mutation isolée d'*U2AF1* (VAF : 43%) avec monocytose, ces critères orientent vers une LMMC. A l'exclusion de ce patient présentant une LMMC, les résultats de l'ensemble des patients de cette catégorie sont récapitulés en *Annexe 4*.

En s'intéressant au nombre d'évènements acquis sur le cytomètre pour ces patients, on s'aperçoit que la fenêtre CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> contient moins de 10 000 évènements. Les travaux de Selimoglu et al. considèrent le phénotype comme positif si la fenêtre de MO1 comprend 50 000 évènements, seuil difficilement atteignable en routine de laboratoire. Cependant, il serait intéressant pour ces cas au diagnostic difficile d'augmenter le seuil d'acquisition.



## VIII. Discussion

### A. Orientation diagnostique si séquençage compatible, phénotypage négatif

Dans notre étude, le résultat de séquençage compatible inclut des mutations de *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *ZRSR2* et *CBL* avec une fréquence allélique  $\geq 10\%$ . D'après Valent et al., un résultat de phénotypage négatif exclut le diagnostic de LMMC et reclasse le patient dans la catégorie CMUS. En pratique, il est indispensable de renouveler le résultat de l'immunophénotypage pour s'assurer de la concordance de la pathologie avec les résultats biologiques. Des faux négatifs peuvent s'observer en cas d'état inflammatoire, et il n'est pas rare d'observer également des manifestations auto-immunitaires ou des infections au moment du prélèvement pouvant amener à un résultat faussement négatif de l'immunophénotypage. D'autre part, l'étude de Selimoglu-Buet et al. a démontré que le taux de monocytes classiques augmente avec le stade de la maladie (LMMC-0, LMMC-1 et LMMC-2) ; notre étude décrit certains patients avec une monocytose relative  $\geq 10\%$  mais  $< 1\text{G/L}$ , ainsi il est possible que le séquençage puisse détecter ces états pré-LMMC de manière plus sensible par rapport à l'immunophénotypage. D'autres études sont nécessaires pour étayer cette hypothèse et notamment l'évolution associée à ces états pré-LMMC. Dans notre cohorte, nous avons également un patient présentant une mutation isolée d'*ASXL1* avec une VAF à 16% et monocytose chronique respectant les critères OMS, nous pouvons ici conclure à une LMMC ; le nombre de gènes mutés n'ayant pas d'importance pour établir le diagnostic.

## B. Orientation diagnostique si phénotypage positif, séquençage incompatible

Un résultat de phénotypage positif sans argument moléculaire doit amener à considérer la possibilité d'un faux-positif à l'immunophénotypage. Lors de la demande d'examen, il est important de prendre en considération les maladies non-hématologiques du patient (maladies auto-immunes, infection etc...) ainsi que certains traitements (corticoïdes, immunoglobulines IV...) pouvant amener à une anomalie de la distribution des monocytes sanguins. Plus récemment, il a été montré qu'une infection par Covid-19 peut entraîner un faux positif à l'examen (49), d'autres infections pourraient avoir le même effet. De plus, nous avons vu que les patients de cette catégorie avaient souvent un nombre d'évènements acquis par le cytomètre limité : augmenter l'acquisition pour ces cas pourrait permettre une estimation plus précise des MO1.

Le résultat de séquençage incompatible avec une LMMC dite « classique » ne veut pas dire qu'aucune mutation n'est présente. Nous avons par exemple mis en évidence un cas de mutation isolée d'*U2AF1* avec une fréquence allélique de 43% et monocytose s'intégrant dans les critères OMS. Même si cette mutation n'est pas la plus fréquente dans la LMMC (5-15% d'après Itzykson et al. (51)), la monocytose chronique et l'argument de clonalité suffisent à classer ce patient en LMMC. Nous avons vu que parmi les patients avec un phénotypage positif sans argument de clonalité, aucun n'a développé de LMMC ou d'hémopathie.

## C. Stratégie diagnostique des leucémies myélomonocytaires chroniques

Le diagnostic d'un état de prolifération myélomonocytaire chronique peut être envisagé dès lors que la monocytose relative est  $\geq 10\%$  de la formule leucocytaire de manière chronique et après avoir exclu une cause réactionnelle. Si la monocytose est  $\geq 1\text{G/L}$ , on pourra évoquer une IMUS, un CMUS ou une LMMC. Dans le cas contraire, on pourra penser à un CMUS ou une CHIP.

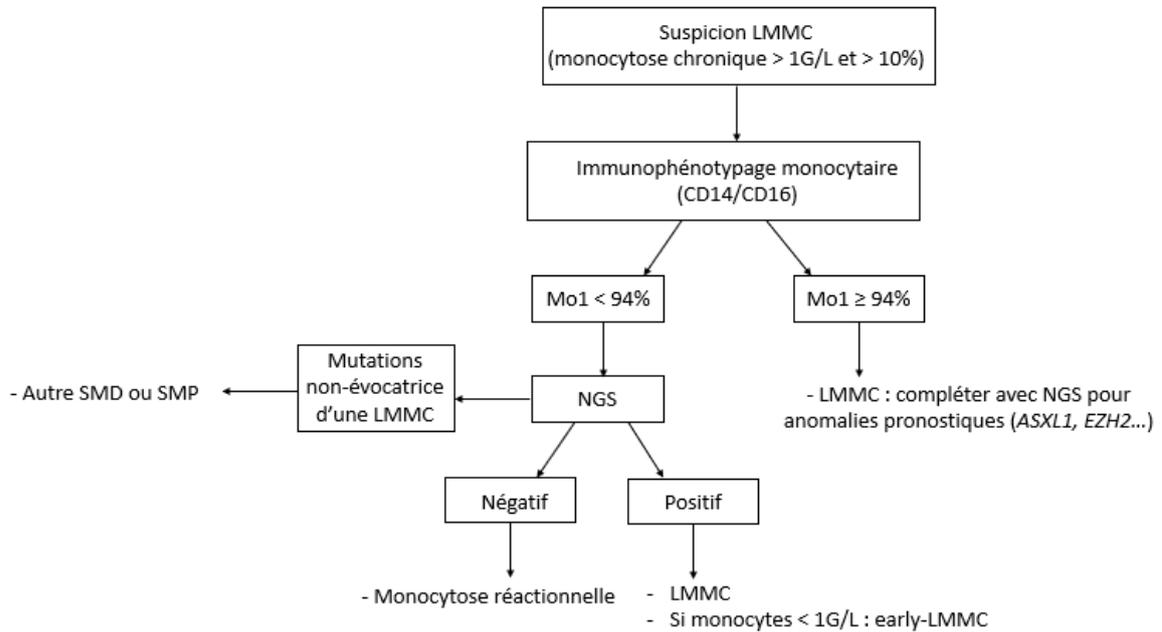
L'examen du frottis sanguin peut nous donner une indication sur la présence éventuelle de dysplasie, celle-ci pouvant être retrouvée dans les états de LMMC oligomonocytaire ou de LMMC. En parallèle, un immunophénotypage monocytaire sanguin peut être réalisé, celui-ci orientera vers une LMMC ou son semblable oligomonocytaire ; cependant un interrogatoire doit être effectué, notamment sur les traitements éventuels en cours, et une CRP doit être réalisée pour écarter toute infection pouvant mener à un faux positif. Un séquençage par NGS peut être réalisé sur le sang ; cependant si un avenir thérapeutique est envisagé chez le patient, il est préférable de réaliser un myélogramme, permettant ainsi la réalisation du caryotype, du NGS et du frottis médullaire pour poser formellement le diagnostic et pronostic.

En cas d'absence d'anomalie au phénotype et d'une CHIP au séquençage, on parlera de CHIP ou de CMUS selon le taux de monocytes.

En cas d'anomalies présentes au phénotype, au séquençage et d'une monocytose  $\geq 1\text{G/L}$ , le diagnostic de LMMC peut être posé. Si la monocytose est comprise entre 0.5 et 1G/L, la pathologie sera considérée comme une LMMC oligo-monocytaire.

En cas d'anomalie au phénotype mais sans anomalie au séquençage, il faudra répéter l'examen immunophénotypique, en excluant notamment les conditions

pouvant amener à un faux-positif. Nous proposons l'algorithme décisionnel de la figure 13.



**Figure 13 :** Proposition d'algorithme décisionnel au diagnostic de la LMMC.

En cas d'absence d'anomalie au phénotype mais de présence d'anomalie au séquençage, il faudra répéter le phénotype pour exclure un faux-négatif ; cette situation peut être délicate dans les cas de manifestations auto-immunes associées à une LMMC. Cependant, d'autres marqueurs peuvent être utilisés en cytométrie pour établir l'argument phénotypique : le Slan, marqueur monocyttaire présent sur les monocytes de type 3. Ce marqueur est significativement moins présent sur les MO3 (seuil de MO3 Slan+ : 1,7%) lors d'une LMMC. Ce marqueur peut donc apporter une aide précieuse pour certains cas d'immunophénotypage douteux (27).

## X. Conclusion

La leucémie myélomonocytaire chronique est une hémopathie myéloïde clonale très hétérogène sur le plan clinique et diagnostique. Les critères OMS 2016 n'étant pas toujours respectés, il peut exister différents états de la pathologie. Il est nécessaire de déterminer si celle-ci survient *de novo* ou en accompagnement d'un autre syndrome myéloprolifératif : polyglobulie, mastocytose... La cytologie sanguine sert de point de départ : lorsqu'une monocytose chronique concernant  $\geq 10\%$  de la formule leucocytaire est mise en évidence, il est nécessaire de réaliser des examens complémentaires. Ces pathologies touchant le sujet âgé, la réalisation du myélogramme est parfois difficile compte-tenu de l'état du patient ou de sa volonté. L'immunophénotypage monocytaire peut être réalisé sur prélèvement sanguin, ainsi que le séquençage ; ces deux éléments permettent de classer la pathologie lors de leur concordance. En cas de discordance, il est important de regarder la fréquence allélique des mutations au séquençage afin d'écartier une CHIP ou de poser le diagnostic de CMUS ; il faut également répéter l'immunophénotypage en cas de discordance, pouvant notamment être expliquée par un traitement, un état infectieux ou auto-inflammatoire.

Dans un premier temps, nous avons montré que dans 73% des cas, le résultat de l'immunophénotypage et du séquençage concordent, ce qui permet de poser ou d'écartier le diagnostic. De plus, le séquençage permet d'établir pour chaque patient le pronostic de la maladie en fonction des gènes mutés.

Dans un second temps, il est apparu que certains patients présentent une monocytose relative  $\geq 10\%$  des leucocytes sans monocytose  $\geq 1\text{G/L}$ , avec myélodysplasie, argument clonal mais sans argument phénotypique ; ces patients posent la question d'un état pré-LMMC peu caractérisé dans la littérature. L'avenir

de ces patients est hétérogène : certains évoluent en authentique LMMC alors que d'autres non. La classification ainsi que le pronostic de ces patients restent en suspens à ce jour et d'autres études sont nécessaires.

Finalement, nous avons montré que le diagnostic de la LMMC nécessite des approches multidisciplinaires : implication des cliniciens et des biologistes, avec une bonne coopération pour une meilleure interprétation des résultats (traitements, états infectieux et inflammatoires...) ; ainsi qu'une diversité de techniques pour établir au mieux le diagnostic et le pronostic du patient.

## XII. Bibliographie

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton D a. G, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451-8.
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 1 oct 2002;100(7):2292-302.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
4. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology*. 2020;95(1):97-115.
5. E.Solary. Différenciation monocyttaire, du normal au pathologique. *Correspondances en onco-hématologie*. Avril 2020: 2.
6. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 1972;46(6):845-52.
7. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the Origin of the Term "Stem Cell". *Cell Stem Cell*. 7 juin 2007;1(1):35-8.
8. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 12 juin 2017;214(7):1913-23.

9. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell R-R, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 22 sept 2011;118(12):e50-61.
10. Liu X, Sabnis H, Bunting KD, Qu Ck. Molecular Targets for the Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Adv Hematol*. 2012;2012: 308252.
11. Itzykson R, Duchmann M, Lucas N, Solary E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int J Hematol*. 1 juin 2017;105(6):711-9.
12. Merlevede J, Droin N, Qin T, Meldi K, Yoshida K, Morabito M, Chautard E. Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nat Commun*. 2016 Feb 24;7:10767
13. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Aceto N, Remy V. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer*. 2008 Oct 16;8:299.
14. Patel AB, Deininger MW. Genetic complexity of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 18 déc 2020;0(0):1-22.
15. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2488-98.
16. Wudhikarn K, Loghavi S, Mangaonkar AA, Al-Kali A, Binder M, Carr R, et al. SF3B1-mutant CMML defines a predominantly dysplastic CMML subtype with a superior acute leukemia-free survival. *Blood Advances*. 20 nov 2020;4(22):5716-21.
17. Ambinder AJ, Miller J, DeZern AE. Autoimmune disease in CMML-the chicken or the egg? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 1 juin 2020;33(2):101136.

18. Fain O, Braun T, Stirnemann J, Fenaux P. Manifestations systémiques et auto-immunes des syndromes myélodysplasiques. *La Revue de Médecine Interne*. 1 sept 2011;32(9):552-9.
19. Mekinian A, Grignano E, Braun T, Decaux O, Liozon E, Costedoat-Chalumeau N. Systemic inflammatory and autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia: a French multicentre retrospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 2016 Feb;55(2):291-300.
20. Mathew RA, Bennett JM, Liu JJ, Komrokji RS, Lancet JE, Naghashpour M, et al. Cutaneous manifestations in CMML: Indication of disease acceleration or transformation to AML and review of the literature. *Leukemia Research*. 1 janv 2012;36(1):72-80.
21. Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. 1. 1 juill 2007;92(7):974-7.
22. Schillinger F, Sourdeau E, Boubaya M, Baseggio L, Clauser S, Cornet E, et al. A new approach for diagnosing chronic myelomonocytic leukemia using structural parameters of Sysmex XNTM analyzers in routine laboratory practice. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 3 avr 2018;78(3):159-64.
23. Valent P, Orazi A, Savona MR, Patnaik MM, Onida F, van de Loosdrecht AA, Haase D et al. Proposed diagnostic criteria for classical chronic myelomonocytic leukemia (CMML), CMML variants and pre-CMML conditions. *Haematologica*. 2019 Oct;104(10):1935-1949.
24. Xubo G, Xingguo L, Xianguo W, Rongzhen X, Xibin X et al. The role of peripheral blood, bone marrow aspirate and especially bone marrow trephine

- biopsy in distinguishing atypical chronic myeloid leukemia from chronic granulocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2009 Oct;83(4):292-301.
25. Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, Czader M, Allen SL et al. Chronic myelomonocytic leukemia: the role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol.* 2006 Dec;19(12):1536-45.
26. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 4 juin 2015;125(23):3618-26.
27. Tarfi S, Badaoui B, Freynet N, Morabito M, Lafosse J, Toma A, et al. Disappearance of slan-positive non-classical monocytes for diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia with an associated inflammatory state. *Haematologica.* 2019 Aug 14;haematol.2019.219782.
28. Solary E, Itzykson R. How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2017 Jul 13;130(2):126-136.
29. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespi T, Luño E, Collado R et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2011 Mar;96(3):375-83
30. John Libbey Eurotext - Hématologie - Consensus français sur les syndromes myélodysplasiques et la leucémie myélomonocytaire chronique : diagnostic, classifications, traitement Mise à jour 2015 par le Groupe francophone des myélodysplasies (GFM)
31. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer Journal.* févr 2016;6(2):e393-e393.

32. Sallman DA, Padron E. Transformation of the Clinical Management of CMML Patients Through In-Depth Molecular Characterization. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 1 juin 2015;15:S50-5.
33. Valent P, Orazi A, Savona MR, Patnaik MM, Onida F, Loosdrecht AA van de, et al. Proposed diagnostic criteria for classical chronic myelomonocytic leukemia (CMML), CMML variants and pre-CMML conditions. *Haematologica*. 1 oct 2019;104(10):1935-49.
34. Calvo X, Nomdedeu M, Santacruz R, Martínez N, Costa D, Pereira A, et al. Comparison of three prognostic scoring systems in a series of 146 cases of chronic myelomonocytic leukemia (CMML): MD Anderson prognostic score (MDAPS), CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model. A detailed review of prognostic factors in CMML. *Leukemia Research*. 1 nov 2015;39(11):1146-53.
35. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*. 1 févr 2002;99(3):840-9.
36. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):3005-15.
37. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia*. juill 2013;27(7):1504-10.
38. Merlat A, Picard F, Dreyfus F. Syndromes myélodysplasiques et leucémies secondaires. *EMC Hématologie*. Janvier 2000.

39. Adès L, Sekeres MA, Wolfromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leukemia Research*. 1 juin 2013;37(6):609-13.
40. Itzykson R. Decitabine Versus Hydroxyurea for Advanced Proliferative CMML: Results of the Emsco Randomized Phase 3 Dacota Trial. In ASH; 2020.
41. Park S, Labopin M, Yakoub-Agha I, Delaunay J, Dhedin N, Deconinck E, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *European Journal of Haematology*. 2013;90(5):355-64.
42. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 24 oct 2013;122(17):2943-64.
43. Duployez N, Goursaud L, Fenwarth L, Bories C, Marceau-Renaut A, Boyer T, et al. Familial myeloid malignancies with germline TET2 mutation. *Leukemia*. mai 2020;34(5):1450-3.
44. van Sleen Y, Wang Q, van der Geest KSM, Westra J, Abdulahad WH, Heeringa P, et al. Involvement of Monocyte Subsets in the Immunopathology of Giant Cell Arteritis. *Sci Rep*. 26 juill 2017;7(1):6553.
45. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018 May;32(5):1057-1069.

46. Podvin B, Goursaud L, Roynard P, Nibourel O, Duployez N, Fenwarth L. Chronic myeloid leukaemia presenting with monocytosis. *Br J Haematol.* janv 2022;196(1):8.
47. Beck DB, Ferrada MA, Sikora KA, Ombrello AK, Collins JC, Pei W, et al. Somatic Mutations in UBA1 and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 31 déc 2020;383(27):2628-38.
48. Tjon ASW, Metselaar HJ, te Boekhorst PAW, van Hagen PM, Kwekkeboom J. High-dose intravenous immunoglobulin does not reduce the numbers of circulating CD14+CD16++ monocytes in patients with inflammatory disorders. *Clinical Immunology.* 1 oct 2012;145(1):11-2.
49. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet A-G, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell.* 17 sept 2020;182(6):1401-1418.e18.
50. Malcovati L, Cazzola M. Refractory anemia with ring sideroblasts. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 1 déc 2013;26(4):377-85.
51. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2013 Jul 1;31(19):2428-36.



## XV. Annexes

**ANNEXE 1 :** Tableau récapitulatif du diagnostic de monocytose adapté de Valent et al.(33)

	<b>IMUS</b>	<b>CHIP</b>	<b>CMUS</b>	<b>O-CMML</b>	<b>CMML</b>
<i>Monocytose ≥ 0.5 G/L</i>	+	+/-	+	+	+
<i>Monocytose ≥ 1G/L</i>	+/-	-	+/-	-	+
<i>Monocytose relative ≥ 10%</i>	+	-	+	+	+
<i>Dysplasie</i>	-	-	-	+	+
<i>Cytopénie(s)</i>	-	-	-	+/-	+/-
<i>Blastes médullaires</i>	< 5%	< 5%	< 5%	< 20%	< 20%
<i>Excès de MO1</i>	-	+/-	-	++	++
<i>Anomalie cytogénétique</i>	-	+/-	-	++	++
<i>Anomalie moléculaire*</i>	-	+	+	++	++

IMUS : *idiopathic monocytosis of undetermined significance*

CHIP : *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*

CMUS : *clonal monocytosis of undetermined significance*

O-CMML : *oligomonocytic-CMML*.

(\*) Une VAF ≥2% est significative pour établir le diagnostic de CHIP ou de CMUS mais pour être considérée comme un critère au diagnostic de LMMC, celle-ci doit être ≥10%.

## ANNEXE 2 : Statistiques descriptives de la cohorte

	LIMMC (n=47)	FC+NGS+, non-LIMMC (n=15)	FC-NGS+ (n=29)	FC-NGS- (n=70)	FC+NGS- (n=20)	p-value
Age médian (étendue)	78 (50-93)	65 (35-91)	69 (47-88)	68,94 (34-93)	54 (18-83)	< 0,001 ¥
Sexe (H/F)	24 / 23	11 / 4	25 / 4	42 / 28	11 / 9	0,026 £
Leucocytes médian x10 <sup>9</sup> (étendue)	7,8 (3,08-118,27)	5,34 (2,61-12,68)	9,2 (2,62-38,79)	11,08 (3,02-63,94)	12,53 (11,19-3,65)	0,213 ¥
Hémoglobine médiane (étendue)	11,6 (7,2-16,1)	12,9 (7,3-14,4)	10,4 (7,9-15)	12,15 (7,7-18,9)	11,6 (7-15,4)	0,031 ¥
Plaquettes x10 <sup>9</sup> médiane (étendue)	135 (7-415)	187 (27-356)	186 (32-1048)	274 (33-593)	373 (104-777)	< 0,001 ¥
Monocytes x10 <sup>9</sup> médiane (étendue)	1,8 (1-6,92)	0,7 (0,4-0,9)	0,8 (0-30,5)	0,8 (0-37,1)	0,75 (0,3-2,8)	0,191 ¥
% Monocytes médian (étendue)	23,3 (9,2-59)	14,1 (3,3-32,2)	10,7 (0-78,6)	8,1 (1,3-58)	5,8 (2,6-32,3)	< 0,001 ¥
Monocytes type 1 médian (%)	97 (94-99,1)	96,3 (94,3-98,5)	89,1 (64,7-93,9)	89,1 (58-93,7)	96,4 (94-98,8)	< 0,001 ¥
Patients mutés ASXL1 (%)	16 (34%)	4 (27%)	11 (38%)	1*	0	< 0,001 £
Nombre moyen mutations ASXL1	0,43 [0,24 ; 0,61]	0,27 [0,01 ; 0,52]	0,38 [0,19 ; 0,57]	NA	NA	
Patients mutés SRSF2 (%)	23 (49%)	7 (47%)	4 (13%)	0	0	< 0,001 £
Nombre moyen mutations SRSF2	0,55 [0,38 ; 0,72]	0,47 [0,18 ; 0,75]	0,14 [0 ; 0,27]	NA	NA	
Patients mutés TET2 (%)	39 (83%)	13 (87%)	19 (65%)	1*	1*	< 0,001 £
Nombre moyen mutations TET2	1,68 [1,36 ; 2]	1,53 [1,07 ; 2]	1,31 [0,77 ; 1,85]	NA	NA	

Tableau statistique de la cohorte.

(\*) : Mutation présente mais VAF < 10% : ne peut être considéré comme NGS positif selon nos critères d'étude.

(¥) : Test de Mann-Whitney

(£) : Test du Khi-2

**ANNEXE 3 :** Tableau des patients en état pré-LMMC avec cytométrie positive

Patients	Monocytes (G/L)	Monocytes (%)	MO1 (%)	Mutations	Evolution en LMMC
#48	0,9	13,4	96,2	ASXL1 (44%), JAK2 (2%), KIT (38%), SRSF2 (43%) et TET2 (88% et 2%)	Oui
#49	0,7	16,7	97,4	SRSF2 (40%) et TET2 (44% et 43%)	NR
#50	0,8	32,2	96,9	TET2 (43%-46%), ZRSR2 (50%-28%), CBL (2%).	Non
#51	0,7	17,1	95,7	ASXL1 (19%), EZH2 (23%), TET2 (37%), ZRSR2 (50%)	Oui
#53	0,7	14,1	95,6	SRSF2 (29%) et TET2 (43% et 30%).	Oui
#54	0,8	14,8	96,7	TET2 (32% et 34%)	Oui
#55	0,7	12,6	95,2	KRAS (28%) et TET2 (35%)	Oui
#56	0,6	10,2	97,1	RUNX1 (2%-9%), SRSF2 (36%) et TET2 (50% et 48%)	Non
#57	0,9	14,7	96	TET2 (41%, 47% et 2%)	Oui
#58	0,4	12	94,5	ASXL1 (3%), CBL (32%), SRSF2 (47%), TET2 (92%)	Non
#59	0,9	10,1	96,5	ASXL1 (13%)	Non
#60	0,9	24,3	96,25	JAK2 (12%), SF3B1 (37%) et TET2 (25% et 42%)	Non
#62	0,7	14,7	98,5	SRSF2 (32%) et TET2 (46%)	Non

**ANNEXE 4 :** Tableau des patients CMF positive, séquençage négatif

Patient	CRP	MAI	Monocytes	Monocytes (%)	MO1	Conclusion CMF	Mutations	Conclusion
#162	< 3	Non	1	32	98	Positif	Aucune	IMUS
#163	148	Oui	2	8,6	97	Faux positif (CRP)	Aucune	Absence
#164	< 3	Oui	1	7,5	97	Faux positif (MAI)	Aucune	Absence
#165	58	Oui	1	14	97	Faux positif (CRP)	<i>DNMT3A (3%) TET2</i>	CHIP
#166	23	Non	1	5,5	98	Faux positif (CRP)	Aucune	Absence
#167	19	Oui	0	4	99	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence
#168	< 3	Oui	1	4,1	98	Faux positif (MAI)	Aucune	Absence
#169	< 3	Non	1	11	94	Négatif	Aucune	Absence
#170	<3	Oui	3	12	97	Faux positif (MAI)	Aucune	IMUS
#171	73	Oui	0	4,9	96	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence
#172	23	Non	1	4,8	96	Faux positif (CRP)	Aucune	Absence
#173	< 3	Oui	1	6,1	95	Faux positif (MAI)	Aucune	Absence
#174	28	Oui	1	7,3	95	Négatif	Aucune	Absence
#176	14	Oui	1	2,7	95	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence
#177	64	Oui	3	5,4	96	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence
#178	< 3	Non	0	2,6	99	Faux positif	<i>SF3B1 (47%) KIT (7%)</i>	SMD-RS
#179	14	Oui	0	2,7	94	Négatif	<i>MPL (18%) SF3B1</i>	SMD-ULD
#180	5	Oui	1	9,8	95	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence
#181	280	Oui	1	5	96	Faux positif (CRP,	Aucune	Absence

**CRP** : protéine C-réactive

**MAI** : maladie auto-immune

**MO1** : Monocytes de type 1 (monocytes classiques)

**CMF** : cytométrie en flux (CD14/CD16 des monocytes sanguins)

Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2021/2022

**Nom :** Podvin

**Prénom :** Benjamin

**Titre du mémoire/thèse :** Apport de l'immunophénotypage monocytaire et du séquençage de nouvelle génération au diagnostic de leucémie myélomonocytaire chronique : étude rétrospective monocentrique du CHU de Lille.

**Mots clés :** leucémie myélomonocytaire chronique, immunophénotypage, séquençage

---

### Résumé

**Introduction :** La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une pathologie clonale de la cellule souche hématopoïétique s'intégrant parmi les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/SMP). Dans cette étude, nous avons évalué l'apport de l'immunophénotypage monocytaire et du séquençage de nouvelle génération (NGS) dans la prise en charge diagnostique de la LMMC.

**Méthodes :** Le recueil de données s'est étendu sur une période de 3 ans (2017-2020). Au total, 181 patients étudiés de manière prospective lors du diagnostic (ou suspicion) d'hémopathie ont été inclus dans ce recueil. L'immunophénotypage monocytaire était considéré comme positif pour un taux de MO1  $\geq$  94%. Un panel NGS incluant 36 gènes fréquemment mutés dans les hémopathies myéloïdes a été réalisé en parallèle. D'après les données de la littérature, nous avons considéré le résultat comme pouvant correspondre à une LMMC en cas de mutation clonale (VAF  $\geq$  10%) parmi les gènes *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *ZRSR2*.

**Conclusion :** Nos résultats montrent que dans 73% des cas, le résultat du séquençage concorde avec celui de l'immunophénotypage. Dans les cas où l'immunophénotypage est positif sans argument moléculaire il est important de répéter l'examen ultérieurement pour éliminer un faux positif (contexte auto-immun associé, infection ou traitement en cours).

---

#### **Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie Poulain,  
Université de Lille, CHU de Lille

**Assesseur(s) :** Monsieur le Professeur Claude Preudhomme,  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur le Professeur Bruno Quesnel,  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur Florent Dumézy, CHU de Lille

**Directeur de thèse :** Monsieur Nicolas Duployez,  
Université de Lille, CHU de Lille