



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2016

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 16 juin 2016

par MANENQ Christine
née le 03 décembre 1989

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

**Evaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires
de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique**

Membres du Jury

Président :	Mme Béatrice Faivre	PU, <i>Biologie cellulaire, hématologie</i> - Université de Lorraine.
Juges :	Mme Véronique Latger-Cannard M. Julien Broséus M. Pascal Chastagner M. Jean-Louis Merlin	PH, CHRU de Nancy (directeur de thèse) AHU, <i>Hématologie</i> -Université de Lorraine - CHRU de Nancy (co-directeur) PU-PH, <i>Pédiatrie</i> - Université de Lorraine - CHRU de Nancy PU-PH, <i>Biologie cellulaire</i> - Université de Lorraine- ICL Vandœuvre-lès-Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2015-2016**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsables des échanges internationaux

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Francine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAV	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
-----------------	----	---------------------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

*** Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES À LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Béatrice FAIVRE, président du jury

PU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma considération.

À Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD, directeur de thèse

PH, Service d'hématologie biologique, CHRU de Nancy

Je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce travail, pour votre soutien, votre gentillesse et tout le temps que vous m'avez consacré.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Julien BROSEUS, co-directeur de thèse

AHU, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine – Service d'hématologie biologique, CHRU de Nancy

Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce beau projet, en espérant qu'il sera à la hauteur de tes espérances.

Tu m'as accompagné dans mes premiers pas d'interne et tu m'as fait découvrir et aimer l'hématologie, et je t'en remercie très sincèrement. Je suis très heureuse de pouvoir continuer à travailler encore un peu à tes côtés.

À Monsieur le Professeur Pascal CHASTAGNER

PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine – Service d’oncologie pédiatrique, CHRU de Nancy

Vous m’avez fait l’honneur d’accepter de juger ce travail. Je vous remercie pour votre écoute, vos conseils avisés, et votre soutien de notre projet.

Veillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

À Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN

PU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine - Service Biologie des tumeurs, ICL

Je vous remercie de l’honneur que vous me faites en acceptant de juger notre travail.

Je vous exprime ici mon plus profond respect.

À Monsieur le Docteur Frédéric MASSIN

Service d'hématologie biologique, CHRU de Nancy

Je te remercie très sincèrement pour tes précieux conseils, ta disponibilité et ta patience qui m'ont permis de mieux « apprivoiser » la cytométrie en flux.

Que ce travail soit le témoignage de ma grande admiration et de ma sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Ludovic MANSUY

PH, Service d'oncologie pédiatrique, CHRU de Nancy

Je vous remercie pour votre aide et votre disponibilité tout au long de ce travail.

À l'ensemble du personnel du laboratoire d'Hématologie

Et en particulier aux techniciennes de la plateforme de cytométrie sans qui rien n'aurait été possible. Je vous remercie très sincèrement pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Au laboratoire d'anatomo-pathologie de Brabois

Pour leur accueil et leur disponibilité et tout particulièrement Charlie pour sa précieuse aide.

À ma famille,

À mes parents

Pour votre présence à mes côtés et d'avoir toujours cru en moi. Votre soutien a été d'une aide précieuse tout au long de mes études et de ma vie.
Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui.

À ma sœur

Pour m'avoir écouté et supporté, dans les bons et mauvais moments. Et pour tes précieux conseils, relectures et corrections. Merci !

À mes grands-mères

Toujours d'un soutien inconditionnel.

À mon grand-père

Qui aurait été tellement fier. Tu nous manques.

Et à tout le reste de ma famille.

À mes amis,

À Marie

Une belle rencontre qui m'a accompagné tout le long de mes années de fac et même lors de quelques beaux voyages ! Merci pour ton amitié très précieuse.

À Christelle

Merci pour tes nombreux conseils, ton soutien et ta bonne humeur constante (malgré la fatigue de ces derniers mois)

À Pierre, JuJu et Nini

Ces quatre années sans vous à mes côtés auraient été bien tristes.

À Valentin

Merci pour nos folles soirées Verdunoise, nos footing (sans chute ou presque) et nos petits resto ! Et ce n'est qu'un début.

À Lucile

Ton franc-parler agrémenté de l'accent qui va bien a mis un peu de soleil et de chaleur dans notre ciel lorrain ! Merci pour tout et aussi pour ton canapé qui m'a accueilli quelques fois ! À bientôt dans le sud.

À mon petit Seb

À tous mes co-internes

Avec qui j'ai partagé quelques mois de stage, des pauses cafés ou encore quelques parties de billards. Merci à tous pour les bons moments passés à vos côtés.

Et à tous ceux que j'ai pu croiser tout le long de mon internat, techniciens, biologistes qui m'ont permis d'apprendre mon futur métier. Et tous les autres que je n'oublie pas.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES FIGURES	16
TABLE DES TABLEAUX	17
ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION.....	19
LE NEUROBLASTOME.....	20
I. Découverte	20
II. Epidémiologie	20
III. Etiologie	21
IV. Présentation clinique	23
a. Formes localisées.....	23
b. Formes métastatiques	24
c. Formes spontanément résolutive.....	25
V. Diagnostic.....	26
a. Diagnostic positif.....	26
b. Bilan d'extension.....	26
VI. Anomalies moléculaires et génétiques	27
a. Amplification de l'oncogène MYCN	28
b. Autres anomalies	29
VII. Classifications	30
VIII. Pronostic.....	32
IX. Prise en charge	35
a. Neuroblastome de risques bas et intermédiaire	35
b. Neuroblastome de haut risque	35
c. Evaluation de la réponse au traitement.....	36
DETECTION DE L'INFILTRATION MEDULLAIRE DU NEUROBLASTOME	37
I. Intérêt	37
II. Méthodes de détection.....	37
a. Microscopie optique	37
b. Immunohistochimie.....	40
c. Détection par RT-PCR du transcrit de la tyrosine hydroxylase	42

III. Cytométrie en flux.....	44
a. Généralités.....	44
1. Histoire de la cytométrie en flux.....	44
2. Principe de la cytométrie en flux	44
b. Caractéristiques des cellules de neuroblastome.....	46
1. Application de la CMF au neuroblastome	46
2. Antigènes sélectionnés dans notre protocole	49
OBJECTIF DU TRAVAIL	51
MATERIELS ET METHODES.....	52
I. Recrutements des patients et prélèvements.....	52
a. Patients.....	52
b. Prélèvements.....	52
II. Echantillons témoins négatifs.....	52
III. Cytomètre et anticorps	53
a. Marquage membranaire.....	53
b. Préparation/Réalisation.....	54
1. Préparation de l'échantillon	54
2. Réglage des cytomètres.....	55
3. Analyse à l'aide du cytomètre.....	57
IV. Exploitation des résultats	58
RESULTATS	59
I. Bilan des témoins négatifs et établissement du seuil de positivité.....	60
II. Expression des marqueurs par les cellules métastatiques de NB.....	61
III. Expression des résultats en fonction de l'indication du prélèvement.	63
a. Au diagnostic initial ou de rechute	65
b. Lors des bilans de suivi systématiques	66
IV. Performance du couple analytique CMF/MOp comparativement à la BOM.....	70
DISCUSSION	72
I. Apport de la CMF	72
II. Pertinence de l'utilisation de tous ces marqueurs ?.....	73
III. Comment optimiser notre méthode ?	74
IV. Utilisation en routine dans les CHRU	75
CONCLUSION	76

BIBLIOGRAPHIE	77
ANNEXES	85

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Formation des cellules de la crête neurale (<i>Neural crest cells</i>) lors de la neurulation d'après Gammill <i>et al</i> [13].....	21
Figure 2: Mécanisme de développement d'un cancer pédiatrique embryonnaire d'après Maris et Denny [21].....	23
Figure 3 : Localisation de la tumeur primitive.....	24
Figure 4 : Présentation clinique du neuroblastome [5]	25
Figure 5 : Aspiration de moelle osseuse [31].....	27
Figure 6: Implication du gène <i>MYCN</i> d'après Vita et Henriksson [36].....	28
Figure 7 : Taux de survie sans événement des patients atteint de NB en fonction de leur classification en risque, de 1986 à 2001 d'après le <i>COG</i> [3].....	34
Figure 8 : Survie sans événement selon le stade INSS [53].....	34
Figure 9 : Amas métastatique de NB sur un frottis de MO au MGG (x10) et (x63)	38
Figure 10 : Myéloblaste sur frottis de MO, coloré au MGG.....	39
Figure 11 : Hémoblaste sur frottis de MO, coloré au MGG	39
Figure 12 : Ostéoblastes disposés en amas, frottis de MO coloré au MGG (x50).....	40
Figure 13 : BOM infiltrée par un neuroblastome colorée à l'HES (x10).....	40
Figure 14 : Observation d'amas diffus sur une BOM infiltrée par un neuroblastome, coloration HES (x40)	41
Figure 15 : BOM infiltrée par un neuroblastome, marquage à la synaptophysine (x10).....	41
Figure 16 : Immunohistochimie avec CgA de la BOM (x20).....	42
Figure 17 : Synthèse des catécholamines d'après Daubner [63].....	43
Figure 18 : Système fluidique, d'après BD Biosciences	45
Figure 19 : Principe de diffraction de la lumière	45
Figure 20 : Représentation du détecteur et des PMT pour le laser bleu sur le FACSCanto™ II (BD Biosciences).....	46
Figure 21 : Exemple de chevauchement des spectres de d'émission de fluorescence entre FITC et PE, d'après BD Biosciences.....	56
Figure 22: Spectre d'excitation et d'émission de la PE d'après BD Biosciences.....	56
Figure 23 : Stratégie de mise en évidence des cellules malignes par CMF	58
Figure 24 : Nombre d'événements GD2+ ≤ 7 chez un patient négatif pour le NB	60
Figure 25 : Représentation de la distribution des autres marqueurs sur la population GD2+..	61
Figure 26 : Exemple d'expression des autres marqueurs sur la population GD2 faible	62
Figure 27 : Infiltration par des hémotogones de la MO du patient M, coloration au MGG (x63)	65
Figure 28 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient F au cours des différents bilans	67
Figure 29 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient K au cours des différents bilans	67
Figure 30 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient E au cours des différents bilans.....	67
Figure 31: Cellules isolées sur frottis de MO (bilan S2 du patient F), coloration au MGG (x63)	69
Figure 32 : Amas métastatique sur le frottis de MO (bilan S2 du patient E), coloration au MGG (x10).....	70

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification du NB selon les stades INSS d'après Brodeur <i>et al</i> et Reynolds CP [45]	30
Tableau II : Classification INRGSS d'après Monclair <i>et al</i> [47]	31
Tableau III : Classification du risque pronostique des neuroblastomes d'après le COG [52].	33
Tableau IV : Contribution de l'immunophénotypage dans la caractérisation des tumeurs solides pédiatriques d'après Ferreira-Facio [67].....	48
Tableau V : Récapitulatif des principales études	48
Tableau VI : Panel d'anticorps utilisés	54
Tableau VII : Spectre d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés.....	56
Tableau VIII : Caractéristiques des patients au diagnostic et lors de l'évolution	59
Tableau IX : Tableau de synthèse des résultats en fonction de l'indication clinique du bilan.	63
Tableau X : Comparaison des résultats entre la MOp et la CMF obtenus sur les échantillons de suivi	66
Tableau XI : Comparaison des résultats bruts obtenus par CMF et par étude de la BOM	70
Tableau XII: Comparaison des résultats après relecture obtenus entre BOM et le couple analytique CMF/MOp	71

ABBREVIATIONS

ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Allophycocyanin-Hilite7
BOM	Biopsie ostéo-médullaire
BV421	Brillant Violet 421
CD	<i>Cluster de Différenciation</i>
CgA	Chromagranine A
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
CMF	Cytométrie en flux
DS	Déviation standard
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EIPS	Epine iliaque postéro-supérieure
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GD2	DisialoGanglioside de type 2
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
IL-2	Interleukine 2
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification System</i>
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MIBG	Metaiodobenzylguanidine
MKI	<i>Mitosis karyorrhexis index</i>
MO	Moelle osseuse
MOp	Microscopie optique
MRD	Maladie résiduelle minimale
NB	Neuroblastome
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP-Cy5.5	<i>Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5</i>
PHOX2B	<i>Paired-like Homeobox 2b</i>
PMT	Photomultiplicateur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
TDM	Tomodensitométrie
TH	Tyrosine Hydroxylase
V500	Violet 500

INTRODUCTION

Le neuroblastome (NB) est une tumeur maligne du système nerveux sympathique, développée à partir des cellules de la crête neurale. Cette tumeur se caractérise par une atteinte des chaînes ganglionnaires sympathiques para-vertébrale de l'abdomen, du pelvis, du thorax et du cou.

Il s'agit de la tumeur solide extra-crânienne la plus courante chez l'enfant, soit environ 8 à 10% de l'ensemble des cancers pédiatriques, et elle est la plus fréquente des tumeurs détectées *in utero*. [1,2] Cette pathologie possède une très grande hétérogénéité, de par sa présentation clinique, sa localisation, ses caractéristiques biologiques et génétiques, et son évolution. La probabilité de guérison varie considérablement selon l'âge au moment du diagnostic (avec un seuil fixé à 18 mois), l'étendue de la maladie, et la biologie de la tumeur. Un sous-ensemble de tumeurs régressent spontanément tandis que d'autres vont évoluer malgré un traitement intensif.

Plus de la moitié des patients présentent au moment du diagnostic une forme disséminée avec infiltration médullaire. [3] La mise en évidence de métastases ainsi que leur localisation est essentielle lors du diagnostic avec un impact pronostique et thérapeutique, mais aussi au moment des rechutes et lors du suivi des traitements. Malgré l'évolution des technologies et des appareils mis à notre disposition, la détection des métastases, notamment au niveau de la moelle osseuse (MO) peut s'avérer parfois très compliquée.

Peu d'études évaluent exactement l'apport de l'utilisation en routine de la cytométrie en flux (CMF), en complément des techniques cytologiques ou anatomo-pathologiques, pour la détection des métastases médullaires de NB. La construction et l'évaluation du panel d'anticorps sont des points critiques afin de permettre une spécificité et une sensibilité analytique satisfaisante.

Ce travail a pour objectif de répondre à cette question et de montrer ainsi, les possibilités d'amélioration du diagnostic positif ou d'exclusion, du suivi, de l'approche de la maladie résiduelle minimale (MRD) et de la prise en charge du NB. Une étude prospective a donc été réalisée entre 2013 et 2016 sur 13 enfants atteints ou suspects de NB.

LE NEUROBLASTOME

I. Découverte

Les premiers cas de NB sont décrits dès le XIX^{ème} siècle, bien que le terme neuroblastome ait été introduit pour la première fois en 1910 par le Dr. Wright, lorsqu'il démontra que les cellules tumorales étaient des cellules nerveuses plus ou moins indifférenciées, d'origine embryonnaire. [4]

II. Epidémiologie

Le NB reste une pathologie du jeune enfant avec un âge médian au diagnostic proche de 19 mois. Les cancers de l'enfant sont heureusement rares, mais le NB représente le cancer le plus diagnostiqué pendant la première année de vie, et 90% sont diagnostiqués avant l'âge de 5 ans. [5,6] Le NB néonatal (diagnostic avant l'âge de 30 jours) représente moins de 5% des cas de NB et sont en général de pronostic favorable. [7] Cependant, le NB est responsable de 15% des décès par cancer chez les enfants de moins de 15 ans. [2,3]

La survenue de cas pendant l'adolescence ou chez l'adulte est extrêmement rare et présente un pronostic très défavorable. [8] Il existe aussi des formes anténatales, dont l'incidence a augmenté avec l'amélioration des échographies obstétricales.

D'après le registre national des tumeurs solides de l'enfant, environ 130 à 150 nouveaux cas de NB sont diagnostiqués chaque année en France. La prévalence estimée se situe entre 1/8000 et 1/10.000 naissances, soit une incidence de 12,9 cas pour 1 million d'enfants. Le *sex ratio* du NB en France est proche de 1. [9] Selon les critères de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en Europe, toute pathologie dont la prévalence est inférieure à 5/10 000 habitants est considérée comme une maladie rare, ce qui est le cas du NB.

Le dépistage de masse du NB, par le dosage des catécholamines dans les urines dans la première année de vie, voir jusqu'à l'âge de 60 mois selon certaines études, a été expérimenté dans plusieurs pays comme l'Allemagne, le Japon ou encore le Québec. Elles ont mis en évidence une sous-estimation de la prévalence principalement des formes à régression spontanée ou à pronostic favorable qui passent inaperçues. Le dépistage de masse n'a pas permis une diminution de l'incidence des NB de stade avancé, ni montré une diminution significative de la mortalité. Dans ce contexte, son utilité et son bénéfice/risque sont discutables compte-tenu du risque d'exposer ces enfants à un traitement par chimiothérapie, non indispensable. [10-12]

III. Etiologie

Le NB est une tumeur embryonnaire se développant à partir des cellules de la crête neurale, formées lors de l'étape de neurulation (**Figure 1**). Les cellules de la crête neurale sont pluripotentes et sont à l'origine de différentes structures, dont les neurones du système nerveux sympathique, et les cellules de soutien comme les cellules de Schwann.

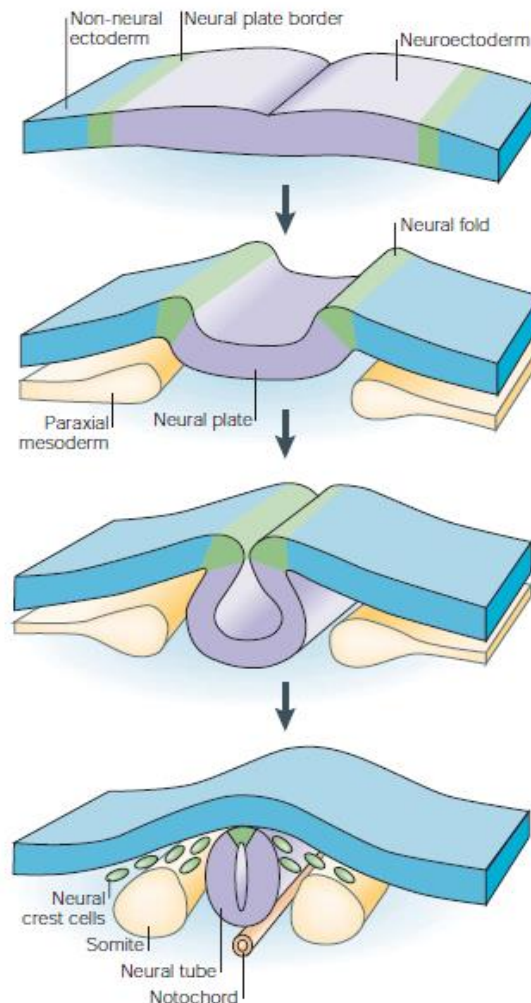


Figure 1 : Formation des cellules de la crête neurale (*Neural crest cells*) lors de la neurulation d'après Gammill et al [13]

Le système nerveux sympathique est composé de chaînes ganglionnaires transmettant le signal de la moelle épinière jusqu'aux organes. Les neurones pré-ganglionnaires utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur, tandis que les neurones post-ganglionnaires sécrètent des catécholamines, principalement la noradrénaline. Les deux glandes médullosurrénales font aussi partie du système sympathique, et sont situées juste au-dessus des reins. La médullosurrénale est composée de cellules chromaffines sécrétant des catécholamines : dopamine, adrénaline et noradrénaline. Le NB va se développer au niveau des chaînes ganglionnaires du système nerveux sympathique et de la médullosurrénale.

De nombreuses études ont essayé de mettre en lumière les facteurs de risques de développement du neuroblastome, sans permettre aujourd'hui d'élucider totalement son étiologie exacte. (**Figure 2**) La consommation d'alcool, de drogues telles que le cannabis ou encore de certains médicaments (hormones sexuelles, diurétiques,...) pendant la grossesse a été mise en cause, tandis que la supplémentation vitaminique maternelle aurait un effet protecteur. Dans les études, les femmes prenaient souvent un cocktail multi-vitaminique contenant entre autre de l'acide folique, mais ne permettant pas d'identifier la ou les vitamines et le mécanisme responsable. [14,15]

Dès 1972, Knudson et Strong essayent de mettre en évidence des prédispositions génétiques au développement du NB. Il apparaît dans la majorité des cas de façon sporadique et seuls 1 à 2% des patients ont des antécédents familiaux de NB. Les formes familiales diffèrent des formes sporadiques par le fait que leur diagnostic est plus précoce et qu'elles sont fréquemment découvertes à un stade déjà métastatiques. [16,17]

Deux gènes de prédispositions ont été identifiés : *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) et *PHOX2B* (*Paired-like Homeobox 2b*). Ils sont impliqués dans 80% des NB héréditaires. Pour le gène *ALK*, situé en 2p23, il s'agit de substitutions d'une seule base dans des régions clés du domaine de la kinase entraînant une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase, menant à une dérégulation de la signalisation cellulaire et à la prolifération incontrôlée des neuroblastes *ALK*-mutants. Ces mutations sont acquises également dans 5 à 15% des NB sporadiques. [5] Des aberrations sur le gène *ALK* sont retrouvées dans les différentes présentations cliniques du NB, ce qui en fait un bon candidat pour une thérapie ciblée. [18]

Le gène *PHOX2B*, localisé en 4p12, subit des mutations inhibitrices présentes dans environ 5% des cas familiaux. Il code pour un facteur de transcription essentiel au développement du système nerveux autonome périphérique, dérivant de la crête neurale, dans les phases précoces de la gestation. [19,20]

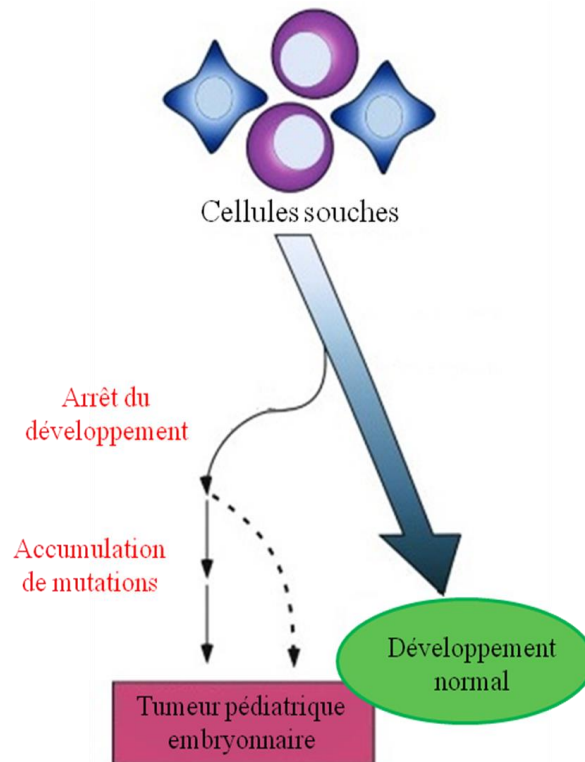


Figure 2: Mécanisme de développement d'un cancer pédiatrique embryonnaire d'après Maris et Denny [21]

IV. Présentation clinique

La présentation clinique est variable en fonction de la localisation de la tumeur primaire, mais aussi de la présence ou non de métastases. La présence d'une masse abdominale est le signe le plus courant au diagnostic de NB.

a. Formes localisées

Les formes localisées représentent environ 40% des NB au diagnostic et sont généralement découvertes de manière fortuite.

Les tumeurs primaires peuvent se développer tout le long du système nerveux sympathique (**Figure 3**). Environ 65 à 70% vont se situer au niveau de l'abdomen, dont la moitié est issue de la médullosurrénale. La tumeur primitive peut aussi être localisée au niveau du cou, du thorax ou encore des hanches. [3]

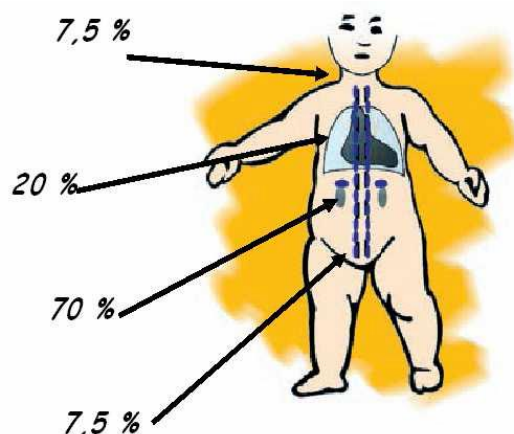


Figure 3 : Localisation de la tumeur primitive

Les signes cliniques vont être variables en fonction de la localisation et de la taille de la tumeur primaire. Les tumeurs abdominales vont être à l'origine de douleurs et de signes de compression digestive. Les tumeurs localisées au niveau du cou et du thorax, c'est-à-dire au niveau des fibres nerveuses innervant l'œil et la face, peuvent provoquer le syndrome de Horner, correspondant à un ensemble de signes cliniques comprenant la diminution de la transpiration du côté atteint, un affaissement de la paupière ou ptosis, un myosis et une enophtalmie. [22] Les tumeurs situées le long de la colonne vertébrale peuvent entraîner des compressions de la moelle épinière et par conséquent engendrer différentes paralysies ou des déficits moteurs (**Figure 4**). Son aspect en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) lui vaut le nom dans ce cas, de NB en sablier. [5]

Les formes localisées restent cependant généralement de bon pronostic.

b. Formes métastatiques

Environ 60% des NB se présentent sous forme métastatique dès le diagnostic initial. La proportion des diagnostics avec cette présentation augmente chez les enfants de plus de 18 mois. Ces formes sont de mauvais pronostic et le taux de survie global à 5 ans se situe entre 40 et 50%, malgré une augmentation importante de l'intensité des chimiothérapies. [19,23]

Les métastases du NB peuvent avoir différentes localisations et provoquer ainsi une multitude de signes cliniques. Les métastases de NB infiltrant préférentiellement certains sites, comme la moelle osseuse et les os.

Le Dr. Pepper a décrit pour la première fois en 1901, une importante hépatomégalie chez une patiente souffrant d'un NB, ce qu'on appelle aujourd'hui le syndrome de Pepper. Ce dernier est dû à l'infiltration hépatique par les métastases provoquant une insuffisance respiratoire par compression. [24] Le syndrome de Hutchison correspond quant à lui à des ecchymoses péri-orbitaires avec une exophtalmie. Il est dû à la présence de métastases osseuses orbitaires. [25] Les métastases ostéo-médullaires sont à l'origine de douleurs osseuses, provoquant ainsi des boiteries ou des difficultés à la marche. L'envahissement médullaire par les métastases est responsable d'une insuffisance médullaire entraînant une anémie, une thrombopénie voir une pancytopénie. Ces cytopénies expliquent l'altération de

l'état général associée ou non à des ecchymoses, signes cliniques très fréquent au moment du diagnostic.

Les signes cliniques du NB chez les adolescents (entre 10 et 18 ans) sont similaires à ceux retrouvés chez les enfants, à une exception près. L'envahissement de la moelle osseuse, chez les patients en stade IV, est moins fréquent chez les adolescents (77%) que chez les enfants (94%). Cependant chez les adolescents, il y a une augmentation de la fréquence des métastases dans des sites plus inhabituels comme le poumon ou le cerveau. [26]

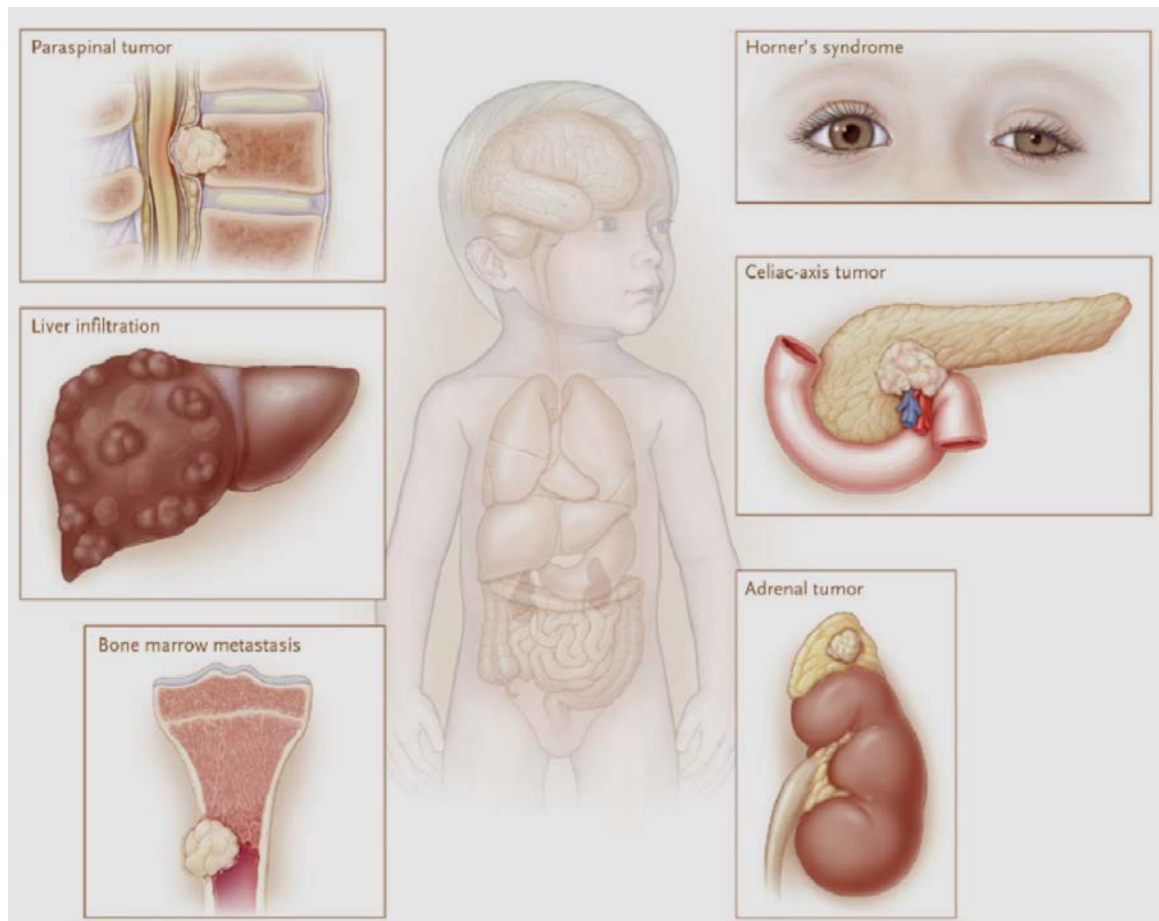


Figure 4 : Présentation clinique du neuroblastome [5]

c. Formes spontanément résolutive

La régression spontanée est définie comme la diminution ou disparition de la tumeur primitive ou métastatique sans intervention thérapeutique. Les mécanismes responsables de la régression spontanée ne sont pas totalement élucidés et la prévalence exacte reste à ce jour difficile à déterminer. Sur la base d'un dépistage systématique, plusieurs études menées notamment au Japon et au Québec, ont montré une forte augmentation de l'incidence du NB chez les enfants de moins de 1 an, sans diminution chez les enfants de plus de 1 an. Cette augmentation était due en majorité aux formes à régression spontanée. [11, 19, 27]

V. Diagnostic

a. Diagnostic positif

Les signes d'appel du cancer pédiatrique sont aspécifiques, et généralement d'apparition et d'évolution rapide, tandis que l'enfant garde un bon état général. Les signes devant faire évoquer un NB sont variables :

- Au niveau de la tête : Exophtalmie, « bosse sur le crâne », hématome péri-orbitaire
- Au niveau du cou : Tuméfaction dure, torticolis, adénopathie
- Au niveau de l'abdomen : Voussure douloureuse
- Au niveau des membres : Boiterie, douleurs osseuses
- Syndrome de Kinsbourne (ou syndrome opsonie-myoclonie)

Le diagnostic de NB doit être évoqué sur la convergence d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Une concentration urinaire élevée en catécholamines ou leurs métabolites (l'acide homovanillique provenant de la dopamine et l'acide vanylmandélique dérivant de la noradrénaline et de l'adrénaline) est un élément indispensable. L'augmentation des LDH (Lactates DésHydrogénases), de la ferritine ou des chromagranines (glycoprotéines acides) peuvent être aussi des arguments orientant vers le diagnostic de NB, mais leur élévation reste non spécifique.

L'échographie est souvent le premier examen réalisé lors de la découverte d'une masse abdominale. Il permet l'orientation diagnostique. La tomodensitométrie (TDM) reste la méthode de choix pour la mise en évidence des tumeurs de l'abdomen, du bassin et du médiastin. L'IRM présente surtout un intérêt dans la mise en évidence des NB dit en sablier.

L'affirmation du diagnostic s'effectue par une analyse histologique et sur la mise en évidence de tissus ou cellules cancéreuses dans une biopsie tumorale ou une ponction de moelle osseuse. L'analyse histologique entre également en compte dans la classification de la tumeur.

b. Bilan d'extension

Tout diagnostic de NB doit être accompagné d'une évaluation de l'extension tumorale.

La MIBG (MetaIodoBenzylGuanidine) ou Iobenguane est un produit radiopharmaceutique qui a la particularité d'être transporté au travers des membranes des cellules dérivées de la crête neurale. Ces dernières expriment le transporteur de la norépinephrine (NET). La MIBG, analogue structural de la noradrénaline, est activement absorbée dans les cellules neuroendocrines par l'intermédiaire du transporteur de la NET et est stocké dans les granules neurosécrétoires, ce qui entraîne une concentration spécifique dans ces tumeurs, contrairement aux cellules des autres tissus. Il a été récemment montré que les cellules de NB exprimaient également les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT) et que leur avidité pour le MIBG était corrélée à l'expression du VMAT-2. [28, 29]

La scintigraphie au MIBG est par conséquent un examen de choix des tumeurs des tissus dérivés de la crête neurale tels que le neuroblastome, les phéochromocytomes, les paragangliomes et les chémodectomes. Cet examen est donc important dans la détection, classification et suivi après traitement des NB. Étant donné que la MIBG est sélectivement concentrée dans plus de 90% des neuroblastomes, la scintigraphie au MIBG est une méthode très spécifique pour l'évaluation de la tumeur primaire et des métastases, et permet ainsi de faire une véritable cartographie des atteintes tumorales. Cependant, on ne retrouve pas d'accumulation de MIBG dans environ 10% des NB prouvés histologiquement. Il est alors conseillé pour ces patients, d'effectuer des tests complémentaires comme le TEP-scan (Tomographie par Emission de Positrons). [3, 30]

L'inconvénient de la scintigraphie au MIBG est qu'elle ne distingue pas l'atteinte médullaire de l'atteinte corticale. La recherche d'un envahissement médullaire est systématique et repose donc sur un myélogramme avec prélèvements multiples bilatéraux, accompagné de biopsies osseuses (**Figure 6**). Cette recherche est primordiale pour la classification en groupes pronostiques et repose sur la morphologie et l'immunohistochimie. D'autres techniques comme la CMF et la recherche en biologie moléculaire du transcrit de la tyrosine hydroxylase (TH) non utilisées en routine, sont développées pour venir compléter l'arsenal diagnostique. Toutes ces méthodes seront développées plus bas.

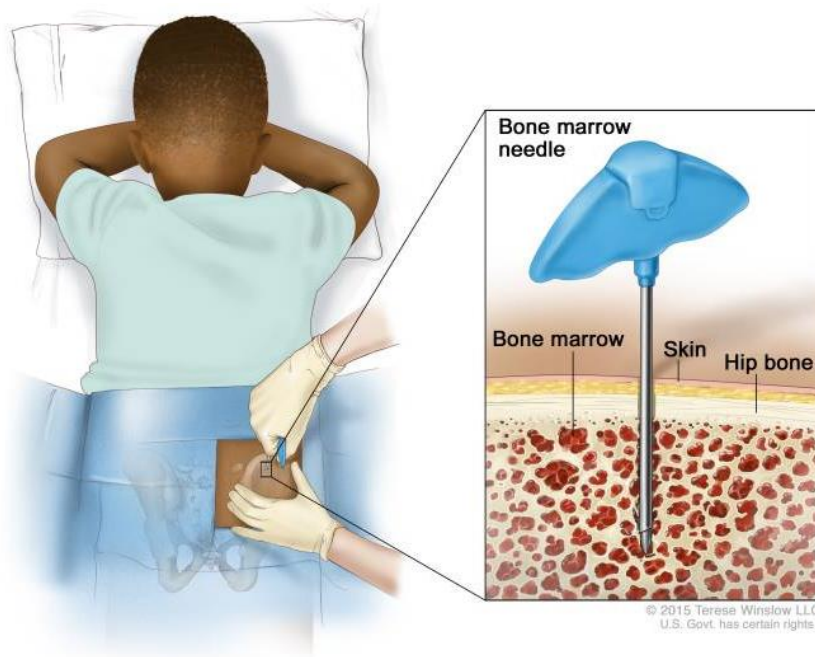


Figure 5 : Aspiration de moelle osseuse [31]

VI. Anomalies moléculaires et génétiques

Les caractéristiques moléculaires et génétiques sont des éléments pronostiques indispensables, qui vont influencer la propagation des cellules malignes du NB. Ils résultent

d'événements somatiques acquis conduisant à la surexpression de gènes (oncogènes), et inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ou altération de leur expression.

a. Amplification de l'oncogène MYCN

L'amplification du proto-oncogène *MYCN*, situé sur le chromosome 2 (locus 2p24), est un facteur pronostique majeur, marqueur fiable du comportement agressif de la tumeur. Elle est l'anomalie génétique la plus fortement associée à un pronostic péjoratif et elle est corrélée avec un stade avancé, une progression tumorale rapide et une mauvaise réponse au traitement avec un risque élevé de rechute. Elle est retrouvée dans environ 20 à 22% des tumeurs primitives de NB. [19, 32, 33]

Le produit du gène *MYCN* est une protéine de liaison à l'ADN jouant un rôle dans la régulation de la transcription de gènes impliqués notamment au niveau de la croissance et la division cellulaire (**Figure 5**). La dérégulation du gène *MYCN* va favoriser la promotion de gènes conduisant à la dissémination métastatique. L'amplification du gène *MYCN* dans les cellules de NB va entraîner un dérèglement de l'activité de la protéine kinase C, à l'origine de la croissance et de la prolifération des cellules de NB. [34, 35]

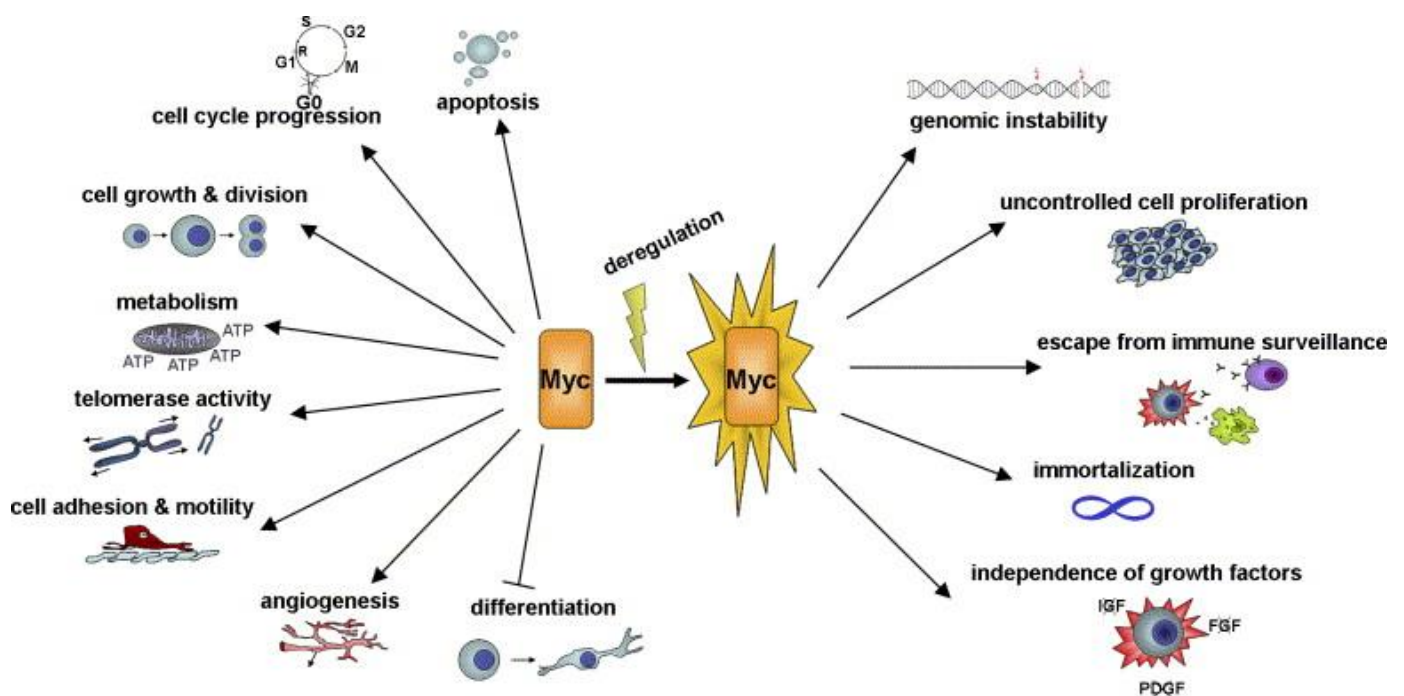


Figure 6: Implication du gène *MYCN* d'après Vita et Henriksson [36]

L'amplification de l'oncogène *MYCN* peut être déterminée soit par FISH (*Fluorescence based In Situ Hybridisation*), soit par MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

b. Autres anomalies

Aucun autre oncogène n'a été fréquemment rencontré dans le NB avec un tel impact pronostique.

De grandes études génomiques ont trouvé quelques mutations récurrentes notamment au niveau du gène *ATRX* avec une augmentation de la fréquence avec l'âge au diagnostic. [37]

La délétion du bras court du chromosome 1 ou del(1p), souvent corrélée avec l'amplification du gène *MYCN*, est identifiée dans 20-25% des NB. [3]

La délétion de la région 11q est observée dans 35 à 45% des cas et elle est rarement observée dans les tumeurs avec amplification du gène *MYCN*. Elle représente un marqueur pronostique important, et reste associée à un mauvais pronostic [38].

Les translocations déséquilibrées au niveau des chromosomes 1 ou 11 peuvent être à l'origine d'un gain de matériel génétique au niveau du 17q, et sont corrélées avec un phénotype plus agressif. [39]

Une cellule humaine diploïde contient 2 copies de ses 22 chromosomes et de 2 chromosomes sexuels, soit 46 chromosomes. Environ 55% des tumeurs primaires contiennent entre 58 et 80 chromosomes, on parle alors de tumeurs avec hyperploïdie. [40]

Les différentes études suggèrent que les anomalies de type numérique, comme la triploïdie, sont associées à un bon pronostic. Les anomalies segmentaires comme la perte ou gain régional de matériel chromosomique, sont associées à un pronostic plus péjoratif. [41]

Les études d'association génétique pangénomiques (*Genome-Wide Association Study* ou GWAS) ont permis d'identifier des facteurs de susceptibilité génétiques de maladies multifactorielles, notamment du NB. Elles consistent à comparer la fréquence de centaines de milliers de variants génétiques distribués sur l'ensemble des chromosomes entre un groupe de cas atteints de la maladie et un groupe de témoins, en utilisant des technologies de génotypage à haut débit. [42] Certains variants sont associés au NB de haut risque comme celui lié au gène *BARD1* (*BRCA1-Associated Ring Domain 1*) en 2q35, montrant que les variations associées à la maladie sont en corrélation avec l'expression accrue de l'isoforme oncogène, *BARD1β*. [43] D'autres variations sont au contraire associées à des formes moins agressives comme celles impliquant le gène *DUSP12* (*Dual Specificity Phosphatase 12*) en 1q23.3. [44]




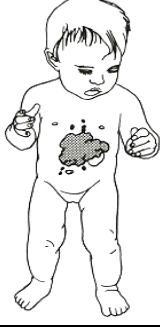
Les récepteurs aux neurotrophines Trk (*Tropomyosin receptor kinase*) ont un rôle crucial dans le développement et la régulation des systèmes nerveux central et périphérique, mais également dans la pathogénèse du NB. Un haut niveau d'expression des récepteurs TrkA est associé à un phénotype favorable, avec un âge au diagnostic plus jeune ou encore une absence d'amplification de *MYCN*. A l'inverse, une forte expression des récepteurs TrkB est associée à des caractéristiques cliniques et biologiques défavorables.



L'absence d'activation du TrkA par son ligand va entraîner une apoptose des cellules, tandis que l'association du TrkB avec son ligand BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) joue un rôle dans l'infiltration métastatique et la résistance aux traitements [19].

VII. Classifications

La classification INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), proposée pour la première fois en 1988, puis révisés en 1993, est basée sur des critères internationaux afin de permettre une harmonisation entre les pays européens et nord-américains (**Tableau I**). [45] Elle permet de classer les NB selon le stade d'extension tumorale, il s'agit d'une classification clinique post-chirurgicale.

Tableau I : Classification du NB selon les stades INSS d'après Brodeur *et al* et Reynolds CP [45]

Stade	Description	Représentation
1	Tumeur localisée avec une exérèse complète macroscopiquement, avec ou sans maladie résiduelle microscopique. Ganglions homolatéraux histologiquement négatifs. (Les ganglions inclus dans la tumeur et enlevés avec elle peuvent être positifs)	
2A	Tumeur localisée sans une exérèse complète. Ganglions homolatéraux non adhérents non envahis	
2B	Tumeur localisée avec ou sans exérèses complète. Ganglions homolatéraux non adhérents envahis. Ganglions controlatéraux non envahis	
3	Tumeur unilatérale non résécable dépassant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire régional, ou tumeur unilatérale avec ganglions controlatéraux envahis, ou tumeur avec envahissement ganglionnaire bilatéral	

4	Tumeur primaire avec diffusion à des ganglions à distance, la moelle osseuse, l'os, le foie, la peau et/ou d'autres organes (exception des stades 4S)	
4S	Tumeur primaire localisée chez les enfants de moins de 12 mois (tel que défini dans les stades 1, 2A et 2B) avec une dissémination limitée à la peau, le foie et ou la moelle osseuse (<10% de cellules malignes)	

Les stades 1, 2 et 4S sont généralement favorables. Le stade 4S souvent associé à une tumeur primitive de petite taille avec une dissémination limitée au foie, à la peau et à la moelle osseuse est de bon pronostic avec une régression spontanée possible. Les patients de stade 4S représentent 7 à 10% des NB, avec un taux de survie global estimé entre 70 et 90%. [19, 46]

La classification INSS est un système de classification post-chirurgicale contrairement à l'INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), qui est une classification clinique préopératoire basée sur une combinaison de marqueurs pronostiques cliniques et biologiques. Ce système permet de stratifier les patients au moment du diagnostic, avant tout traitement (**Tableau II**). [47]

Tableau II : Classification INRGSS d'après Monclair *et al* [47]

Stade	Description
L1	Tumeur localisée à un seul compartiment du corps (cou, cage thoracique, abdomen ou pelvis). N'intègre pas de structure vitale et ne présente pas de facteur de risque à la chirurgie.
L2	Tumeur locorégionale avec présence d'un ou plusieurs facteurs de risques à la chirurgie
M	Présence de métastases à distance de la tumeur primaire (sauf stade MS)
MS	Tumeur métastatique chez les enfants de moins de 18 mois (547 jours) avec des métastases limitées à la peau, au foie et / ou à la moelle osseuse (<10% de métastases dans la moelle osseuse et scintigraphie au MIBG négative dans la moelle et les os)

L: Localised

M: Metastatic

S : Special

Le stade MS de cette dernière classification est semblable au stade 4S de la classification INSS.

Shimada et ses collègues décrivent en 1984 un système de classification des tumeurs neuroblastiques, reposant sur des critères histologiques : le degré de différenciation des neuroblastes et la présence de stroma Schwannien. [48] Cette classification décrit 4 catégories de tumeurs : les NB (pauvres en stroma Schwannien), les ganglioneuroblastomes mixtes (riches en stroma Schwannien), les ganglioneuromes (stroma Schwannien prédominant avec des grosses cellules ganglionnaires différenciées) et les ganglioneuroblastomes nodulaires (composés de parties riches et de parties pauvres en stroma Schwannien). [49] Cette classification n'est plus utilisée aujourd'hui par les cliniciens.

La classification INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification System*) établie en 1999 [50] puis revue en 2003, dérive de la classification histologique de Shimada. L'INPC prend en compte le degré de différenciation neuroblastique, l'index mitotique et caryorrhexique (MKI : *mitosis karyorrhexis index*¹) et l'âge du patient au diagnostic. En combinant tous ces facteurs, elle permet la classification pronostique des tumeurs en 2 groupes : favorable et défavorable. [3] Le ganglioneuroblastome mixte et le ganglioneurome ont une histologie favorable. Le ganglioneuroblastome nodulaire depuis la révision de l'INPC de 2003, est divisé en deux groupes pronostiques, l'un favorable, l'autre défavorable. [49]

VIII. Pronostic

Le pronostic des patients atteints de NB est basé sur une somme de facteurs cliniques et biologiques, qui va guider la prise en charge. Les principaux facteurs pronostiques identifiés à ce jour sont : l'histologie de la tumeur, l'âge avec un *cut off* ramené à 18 mois (12 mois auparavant), le risque chirurgical, le stade (INSS ou INRG), le statut mutationnel de *MYCN* et le profil génomique.

Dans un effort pour guider et harmoniser la prise en charge, des groupes coopératifs pédiatriques ont développé des systèmes de classification basés sur la combinaison des marqueurs pronostiques cités ci-dessus.

Le *Children's Oncology Group* (COG) a établi une classification pré-thérapeutique en tenant compte de la classification INSS, de l'âge du patient au diagnostic, de l'amplification du gène *MYCN*, de la classification de Shimada et des anomalies génétiques, avec le calcul du *DNA index* qui est le rapport entre le nombre de chromosomes présents dans les cellules tumorales et le nombre de chromosomes attendus. Les patients sont alors répartis en 3 groupes pronostiques : bas, intermédiaire ou haut (**Tableau III**). [3]

¹ Le MKI représente le nombre de mitoses et de caryorrhexie pour 5000 cellules, où la caryorrhexie représente la fragmentation destructrice du noyau au cours de la mort cellulaire. Trois classes de MKI sont fixées : bas, intermédiaire et élevé.

Tableau III : Classification du risque pronostique des neuroblastomes d'après le COG [52]

Stade INSS	Age	MYCN statue	Catégorie histologique selon Shimada	DNA index	Risque
1	0-21 jours	/	/	/	Bas
2A/2B	<365 jours	/	/	/	Bas
	≥365j – 21 ans	Normal	/	/	Bas
	≥365j – 21 ans	Amplifié	Favorable	/	Bas
	≥365j – 21 ans	Amplifié	Défavorable	/	Haut
3	<365 jours	Normal	/	/	Intermédiaire
	<365 jours	Amplifié	/	/	Haut
	≥365j – 21 ans	Normal	Favorable	/	Intermédiaire
	≥365j – 21 ans	Normal	Défavorable	/	Haut
	≥365j – 21 ans	Amplifié	/	/	Haut
4	<365 jours	Normal	/	/	Intermédiaire
	<365 jours	Amplifié	/	/	Haut
	≥365j – 21 ans	/	/	/	Haut
4S	<365 jours	Normal	Favorable	>1	Bas
	<365 jours	Normal	/	= 1	Intermédiaire
	<365 jours	Normal	Défavorable	/	Intermédiaire
	<365 jours	Amplifié	/	/	Haut

En 2004, un groupe de travail coopératif entre plusieurs pays a été créé afin de développer un algorithme de risque pré-thérapeutique unique (*International Neuroblastoma Risk Group Pretreatment Classification Schema*), de manière à pouvoir comparer ensuite les résultats des différentes études cliniques. Ce dernier est basé sur l'analyse des données de 8800 patients recueillies entre 1990 et 2002 en Amérique du Nord, Europe, Japon et Australie. Les risques « très faible », « faible », « intermédiaire » et « haut » ont été établis sur la base de la survie sans événement à 5 ans et prend en compte les facteurs pronostiques suivant : classification INRGSS, âge au diagnostic, histologie de la tumeur, l'amplification du gène *MYCN*, l'aberration 11q et la ploïdie. [51]

Le taux de survie sans événement varie considérablement entre les NB classés de risque bas ou intermédiaire et ceux de haut risque, d'où la prise en charge spécifique qui en découle. (**Figures 7 et 8**)

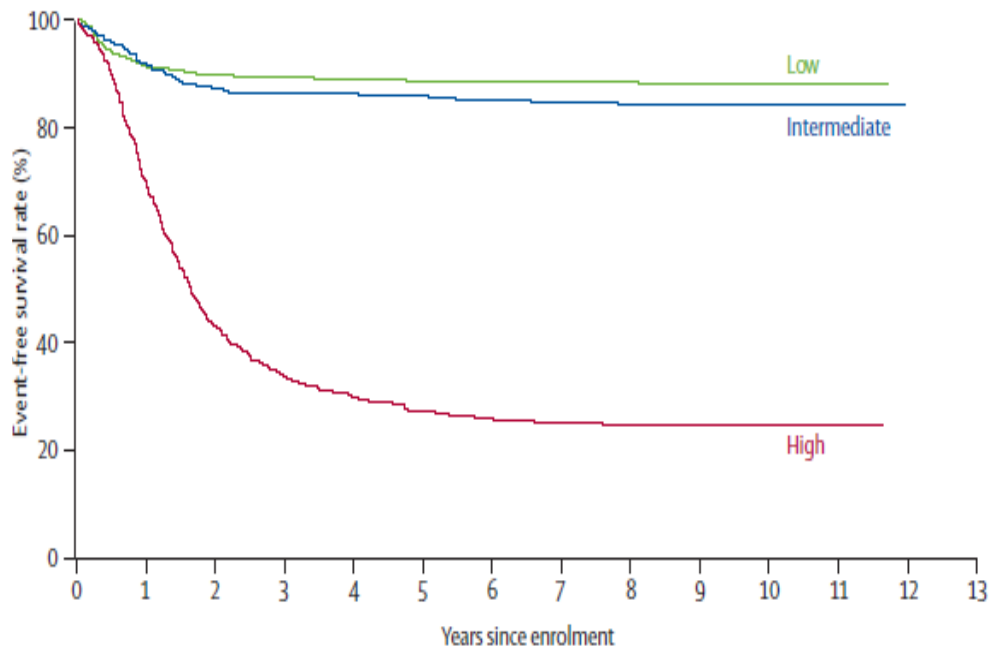


Figure 7 : Taux de survie sans événement des patients atteints de NB en fonction de leur classification en risque, de 1986 à 2001 d'après le COG [3]

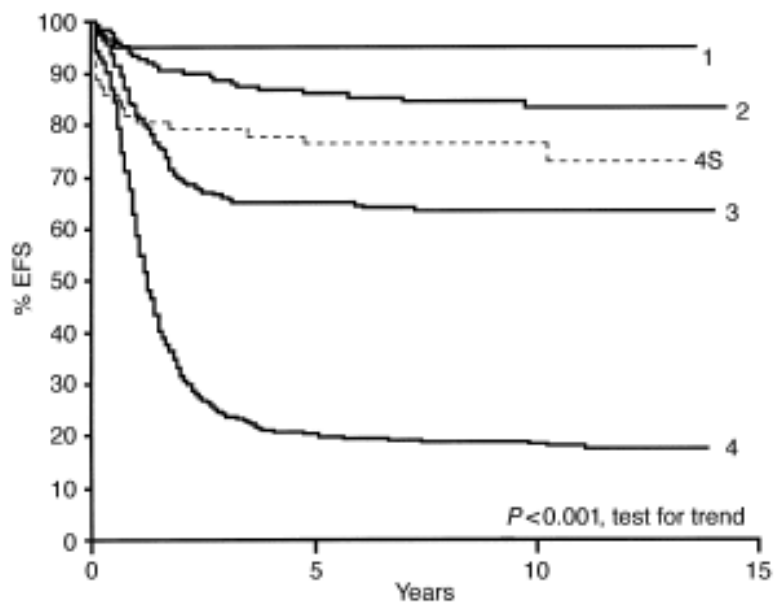


Figure 8 : Survie sans événement selon le stade INSS [53]

Les tumeurs de bas risque sont de très bon pronostic comme le suggèrent les dernières études menées par l'équipe de Strother en 2012, qui montraient à 5 ans un taux de survie globale et sans événements respectivement de $97 \pm 1\%$ et $89 \pm 1\%$. [54]

Les NB métastatiques ou à haut risque sont de très mauvais pronostic et ont un taux de survie relativement faible. Dans une récente étude menée aux États-Unis, le taux de survie sans événements à 5 ans chez les patients de stade IV (INSS) était de $35 \pm 1\%$, et le taux global de survie à 5 ans de $42 \pm 1\%$. [55]

IX. Prise en charge

La grande variabilité clinique et pronostique du NB implique des stratégies thérapeutiques adaptées. Ces dernières peuvent inclure une chirurgie, une polychimiothérapie, de la radiothérapie, et depuis quelques années, on voit apparaître de nouveau protocole incluant notamment des anticorps monoclonaux anti-GD2. Dans certaines situations bien précises de tumeur à faible risque, une simple surveillance est préconisée. [3]

Les protocoles thérapeutiques actuellement étudiés par la société internationale d'oncologie pédiatrique se basent principalement sur la classification INRGSS pour les traitements des patients de risque bas ou intermédiaire (protocole LINES) et sur la classification INSS pour les tumeurs de haut risque (protocole HR-NBL/SIOPEN).

a. Neuroblastome de risques bas et intermédiaire

D'une manière générale, le traitement des tumeurs localisées de bas risque (INSS 1, 2A et 2B) est basé uniquement sur une résection chirurgicale, tandis que les tumeurs locorégionales d'un stade plus avancé (INSS 3) ou non opérables nécessitent une chimiothérapie néo-adjuvante, avant l'intervention chirurgicale. [40]

b. Neuroblastome de haut risque

Les NB métastatiques ou de haut risque (avec amplification du gène *MYCN*) constituent un défi thérapeutique et nécessitent un traitement de forte intensité, incluant chimiothérapie pré-opératoire, chirurgie, chimiothérapie myéloablatrice et radiothérapie.

La prise en charge se divise en 3 phases : une phase d'induction, une phase de consolidation puis une phase d'entretien de la rémission dont l'objectif est l'éradication de la MRD et l'évitement de toute rechute.

La phase d'induction est composée de différents cycles de chimiothérapie comprenant généralement des sels de platine comme le carboplatine ou le cisplatine, des poisons du fuseau tels que la vincristine, des anti-topoisomérases de type II, comme l'étoposide, et des agents alkylants, tels que le cyclophosphamide.

La phase de chimiothérapie initiale est suivie de la résection chirurgicale de la tumeur lorsqu'elle est possible.

La phase de consolidation comprend une chimiothérapie myéloablatrice associant deux agents alkylants tels que le busulfan et le melphalan, suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques et d'une radiothérapie. Cette dernière joue surtout un rôle important dans le contrôle local de la tumeur. [5, 56]

L'isotrétinoïne (13-cis-RA) a montré son efficacité lors de la phase d'entretien, pour la prise en charge de la MRD. Cette molécule induit une différenciation des neuroblastes et l'apoptose *in vitro*. Il en résulte une diminution de la prolifération des cellules de NB *in vivo*.

Depuis plusieurs années, on a vu apparaître les anticorps monoclonaux dirigés contre les disialogangliosides de type 2 (GD2) utilisés seuls ou en association avec le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et l'interleukine 2 (IL-2). Ces associations montrent un réel intérêt dans la prévention des rechutes du NB.

Une fois la rémission obtenue, le principal obstacle reste la maladie réfractaire résiduelle qui échappe aux méthodes actuelles de détection. [57]

c. Evaluation de la réponse au traitement

L'évaluation de la réponse au traitement repose sur des arguments cliniques, biologiques et scintigraphiques. La régression voir même la disparition de la tumeur primitive, la diminution du taux de catécholamines urinaires et une disparition de l'infiltration ostéo-médullaire à l'issue de la phase d'induction orientent vers une bonne réponse au traitement et est de bon pronostic. Lorsque ces critères ne sont pas réunis, une chimiothérapie de rattrapage peut être envisagée.

Le suivi régulier de la diminution ou de la disparition de l'infiltration médullaire par la réalisation de myélogrammes ou de BOM (Biopsie Ostéo-Médullaire) et le suivi par scintigraphie au MIBG permet la réévaluation précoce du traitement. Par exemple, l'autogreffe n'est réalisée que lorsque le bilan ostéo-médullaire est négatif et que l'on observe moins de 3 *spots* lumineux en scintigraphie par MIBG.

En cas de NB réfractaire ou en rechute, différentes lignes de traitements peuvent être proposées. Actuellement, le protocole BEACON évalue dans ce contexte, l'association du bévécizumab (anticorps anti-VEGF) avec l'irinotecan et le temozolomide.

DETECTION DE L'INFILTRATION MEDULLAIRE DU NEUROBLASTOME

I. Intérêt

Le NB doit être éliminé, devant toute tumeur du jeune enfant pouvant le faire évoquer cliniquement. Une recherche d'envahissement médullaire (site de prédilection d'infiltration du NB) est effectuée afin d'argumenter la confirmation ou l'infirmerie du diagnostic et de répondre à la question de la dissémination métastatique.

La mise en évidence et la quantification d'une infiltration médullaire par des cellules métastatiques de NB sont des étapes critiques entrant dans la classification au moment du diagnostic, et déterminantes pour le choix de la stratégie thérapeutique. Mais son intérêt ne s'arrête pas là, puisque la détection d'un très petit nombre de cellules tumorales dans la MO, est importante pour l'évaluation de la réponse au traitement et au management de la MRD.

Les techniques de recherche des métastases de NB pourraient aussi se révéler utiles pour éliminer la présence de cellules tumorales dans le greffon de cellules souches hématopoïétiques, avant autogreffe, si ce traitement a été envisagé.

II. Méthodes de détection

La technique de détection idéale doit être adaptée et réalisable sur le jeune enfant, sensible mais aussi spécifique afin d'éviter la génération de faux positifs qui pourrait conduire à un sur-traitement et à l'inverse de faux négatifs dont la prise en charge serait alors inadaptée.

a. Microscopie optique

Le neuroblastome fait partie des tumeurs à petites cellules rondes, avec un cytoplasme peu abondant. [58] Les cellules de NB présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que les neuroblastes sympathiques dont l'une des principales est leur agencement en rosette autour d'un centre fibrillaire, comme décrit pour la première fois en 1910 par James Homer Wright. [25, 59, 60]

La détection morphologique des cellules métastatiques du NB se fait en microscopie optique (MOp) sur des prélèvements médullaires multiples (**Figure 9**). Les frottis de moelle osseuse sont généralement obtenus après ponction au niveau des deux crêtes iliaques et étalés au lit du malade. Des frottis sont également étalés à partir d'un pool des différents prélèvements puis colorés au May-Grünwald-Giemsa (MGG).

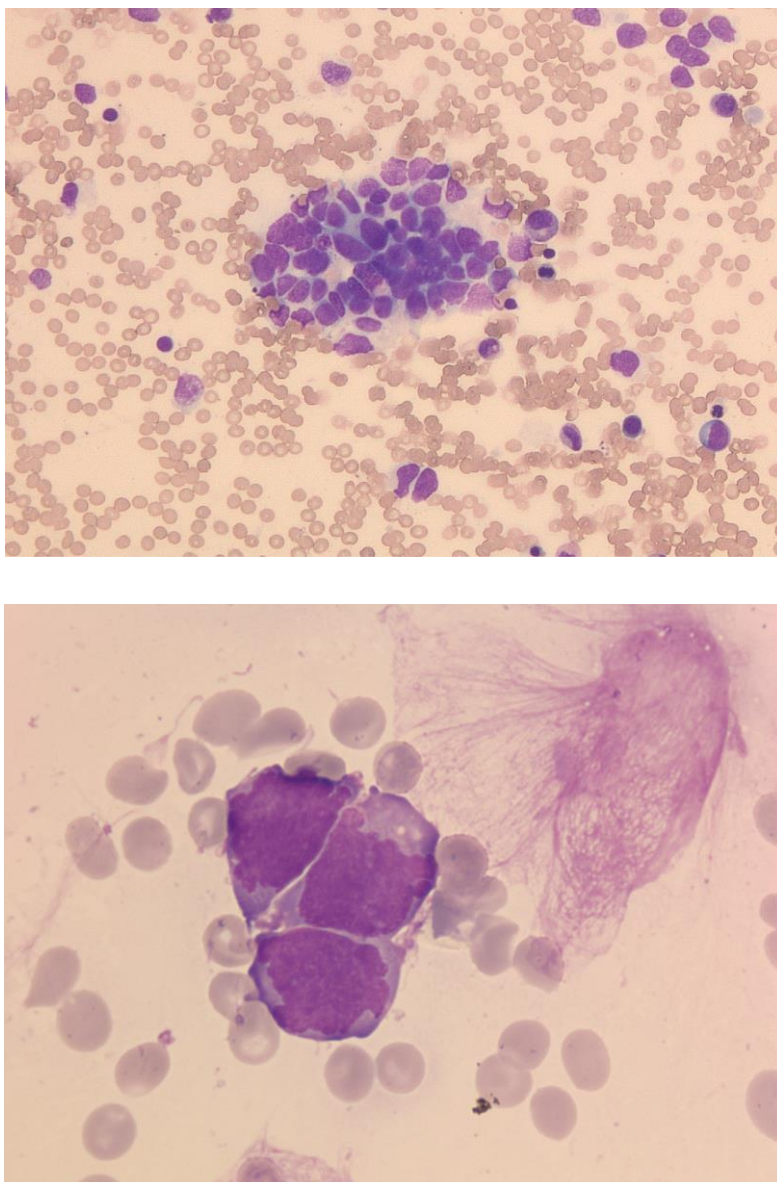


Figure 9 : Amas métastatique de NB sur un frottis de MO au MGG (x10) et (x63)

La lecture de la totalité des lames pour chaque site de prélèvement est nécessaire pour permettre un résultat fiable et éviter tout faux négatif. Cette méthode nécessite une expertise approfondie en onco-pédiatrie de la part des cytologistes.

La lecture des myélogrammes est grevée de plusieurs difficultés. D'une part, sa sensibilité est faible (1 cellule sur 500). La qualité des étalements est importante, et la présence d'artéfacts peut venir compliquer la mise en évidence et l'identification de cellules non hématopoïétiques. D'autre part, l'organisation en amas cellulaires est inconstante. Un amas métastatique quant à lui peut parfois être confondu avec celui formé par des ostéoblastes.

L'aspect morphologique d'une cellule de NB isolée est souvent peu spécifique et peut aisément être confondu avec celui d'un myéloblaste (**Figure 10**), d'un hémoblaste (**Figure 11**) et/ou d'un hémotogone, fréquent chez les enfants.

Un amas métastatique peut parfois être confondu avec celui formé par des ostéoblastes (**Figure 12**).

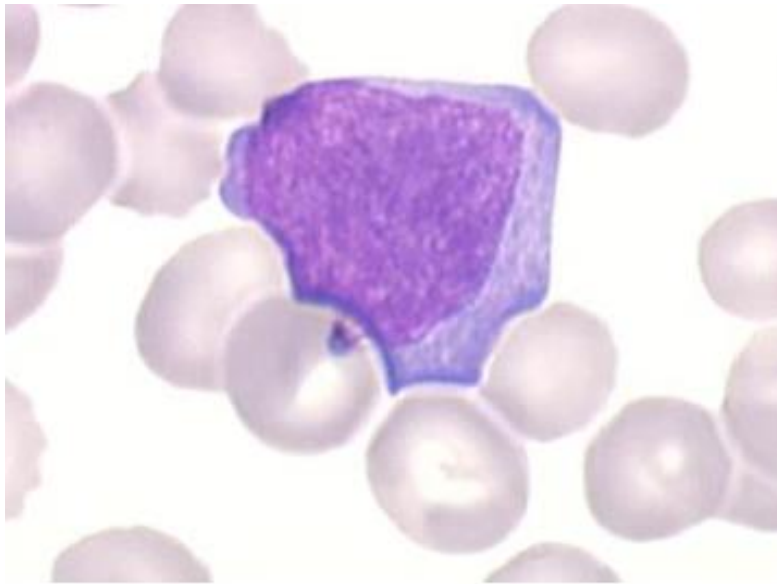


Figure 10 : Myéloblaste sur frottis de MO, coloré au MGG
 (<http://hematocell.univ-angers.fr>)

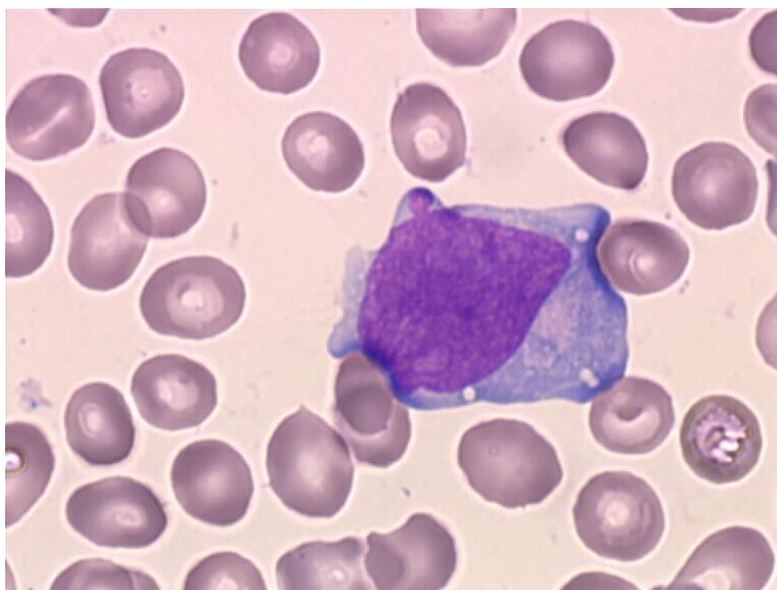


Figure 11 : Hémoblaste sur frottis de MO, coloré au MGG
 (<https://facmed.univ-rennes1.fr>)

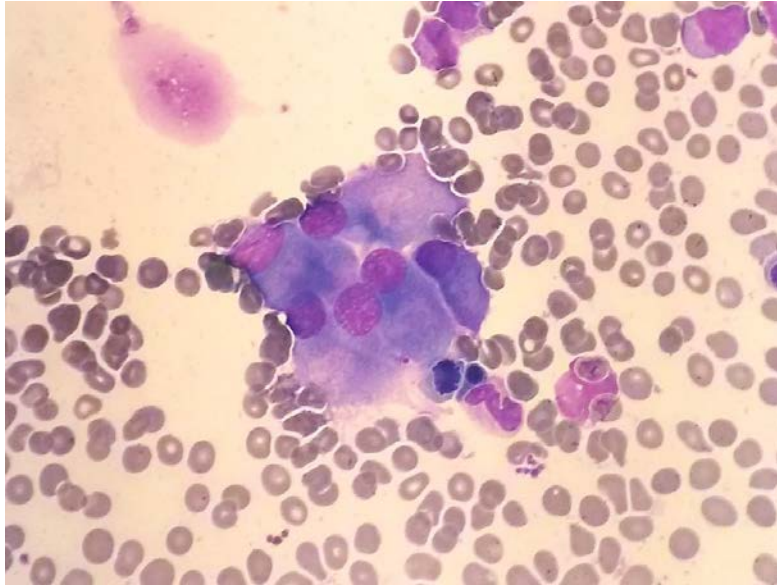


Figure 12 : Ostéoblastes disposés en amas, frottis de MO coloré au MGG (x50)

b. Immunohistochimie

L'analyse histologique de référence pour la détection des métastases de neuroblastome repose sur la coloration et l'immunomarquage d'une BOM. La coloration par HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) est une technique simple d'observation des tissus, utilisée en routine (**Figures 13 et 14**). Utilisée seule, elle ne possède pas une très grande sensibilité, d'où l'intérêt de l'associer à l'utilisation d'immunomarqueurs.

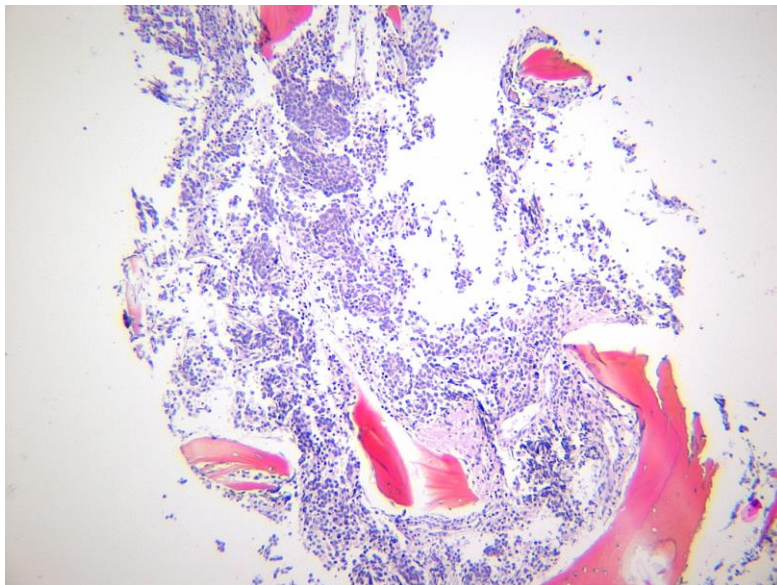


Figure 13 : BOM infiltrée par un neuroblastome colorée à l'HES (x10)

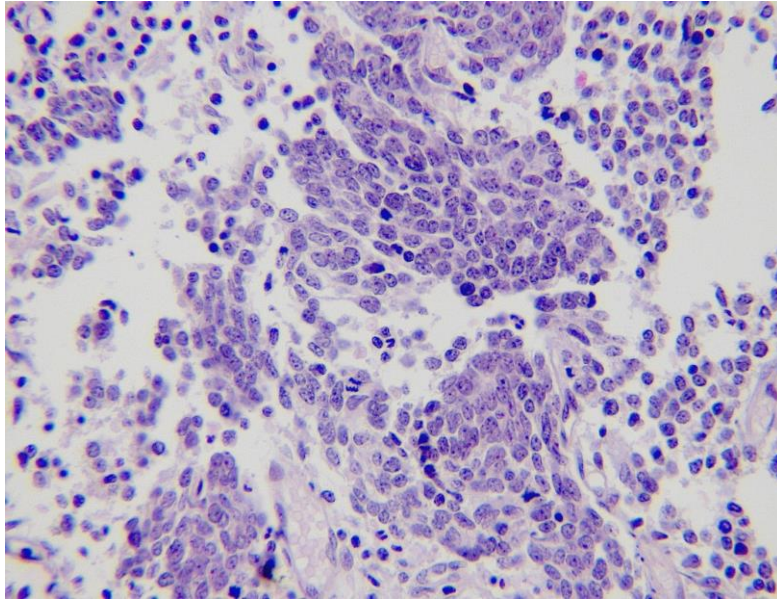


Figure 14 : Observation d'amas diffus sur une BOM infiltrée par un neuroblastome, coloration HES (x40)

Différents marqueurs peuvent être utilisés comme le GD2, la synaptophysine (**Figure 15**), la tyrosine hydroxylase (TH), la chromogranine A (CgA ; **Figure 16**) ou encore la *Protein Gene Product 9.5* (PGP) [61]

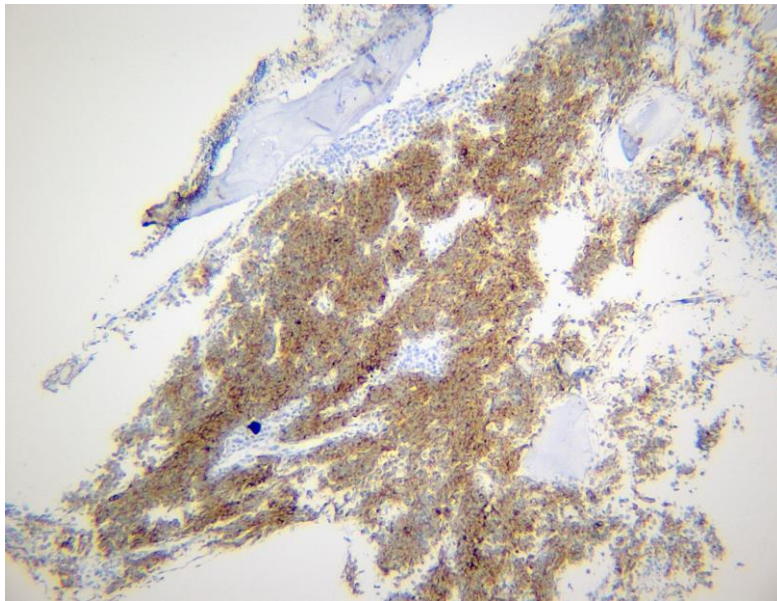


Figure 15 : BOM infiltrée par un neuroblastome, marquage à la synaptophysine (x10)

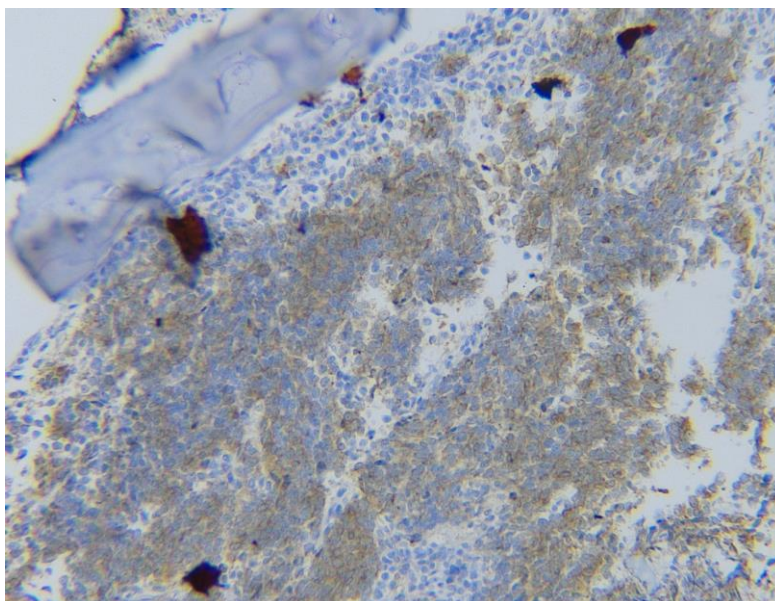


Figure 16 : Immunohistochimie avec CgA de la BOM (x20)

Johnson et ses collègues ont décrit une capacité de détection de 1 cellule tumorale pour 10^5 cellules normales. Mais il existe une possibilité de faux positifs avec l'immunohistochimie, par l'intermédiaire de réactions croisées ou la présence des antigènes tumoraux sur les cellules immunitaires de l'hôte. [62]

La BOM présente également d'autres limites. En effet, sa réalisation n'est pas systématique et n'est pas effectuée chez les enfants de moins de 1 an. De plus, il s'agit d'un acte invasif technique qui peut être non contributif lorsque le prélèvement n'est pas de bonne qualité. La répartition hétérogène des métastases dans la MO peut être à l'origine de faux négatif.

c. Détection par RT-PCR du transcrit de la tyrosine hydroxylase

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) en temps réel est une méthode sensible pour l'évaluation de la MRD par la recherche des cellules tumorales circulantes, mais aucun ARNm spécifique de la tumeur neuroblastique n'a été identifié. La cible la plus évaluée dans ce contexte est la tyrosine hydroxylase.

La TH est la première enzyme de la voie de synthèse des catécholamines (**Figure 17**).

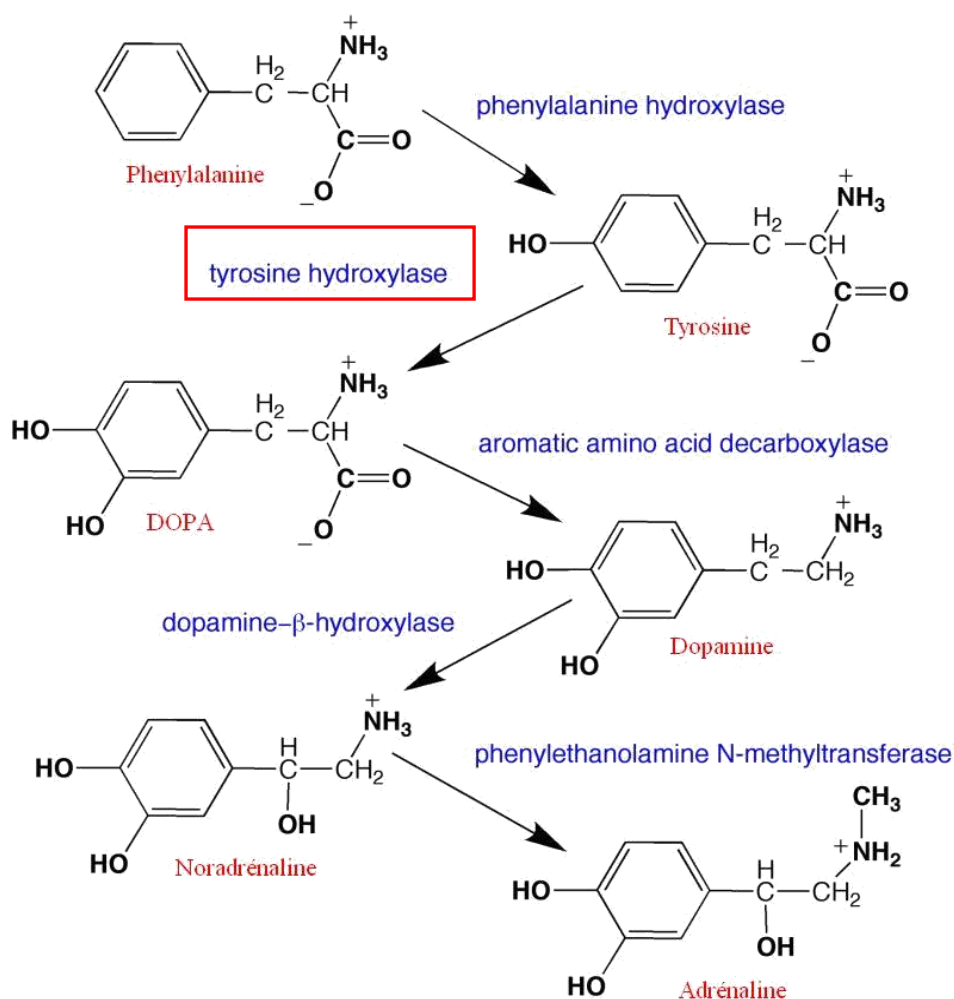


Figure 17 : Synthèse des catécholamines d'après Daubner [63]

La détection du transcrit de la TH n'est pas une détection des métastases à proprement parler, mais oriente vers l'existence de cellules tumorales circulantes. La présence du transcrit de la TH dans le sang périphérique ou la MO est un signe de mauvais pronostic. La méthode décrite par Burchill *et al* correspond à l'amplification de l'ARNm de la TH par RT-PCR. Elle permet une sensibilité de détection entre 1 à 10 cellules de NB dans 10^6 cellules sanguines normales. [64] Aucune transcription n'a été retrouvée dans le tissu hématopoïétique du sujet sain, ce qui atteste d'une bonne spécificité de la technique et lui confère une forte valeur prédictive positive. [62]

Cependant deux problèmes se posent : la difficulté pour isoler un million de cellules et l'existence de faux négatifs du fait de l'inconstance de l'expression de cette protéine par le NB.

III. Cytométrie en flux

a. Généralités

1. Histoire de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est née à Montréal en 1934 lorsque Moldavan décrit pour la première fois un appareil capable de compter individuellement les cellules, après leur passage dans un fin capillaire où elles sont détectées par un capteur photo électrique. Le compteur devient un analyseur de cellules à partir de 1949, avec l'apparition d'un système fluidique. La notion de variation d'impédance lors du passage de la cellule devant le laser, a permis de mesurer le volume cellulaire.

La notion de fluorochrome est apparue en 1941, puis en 1950 Coons et Kaplan décrivent le premier couplage d'anticorps avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). En 1972, Herzenberg et son équipe de Stanford mettent au point un trieur de cellules, le FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), conçu pour compter et isoler les sous-populations lymphocytaires à l'aide d'anticorps fluorescents. Shapiro et ses collaborateurs conçoivent un cytomètre équipé de plusieurs lasers, et capable de réaliser une analyse multiparamétrique. [65].

2. Principe de la cytométrie en flux

La CMF est une technique rapide et précise qui permet une analyse multiparamétrique et individuelle de cellules présentes dans un milieu liquide. Ces dernières sont mises en suspension puis soumises à un flux liquide qui les entraîne jusqu'à une source lumineuse d'excitation (faisceau laser).

Le système fluidique est indispensable au principe de focalisation hydrodynamique, qui permet l'analyse individuelle et rapide des cellules, par un défilement des cellules les unes derrière les autres (**Figure 18**). La pression exercée sur le liquide de gaine est plus faible que celle exercée sur l'échantillon créant ainsi un flux. Plus la pression exercée sur l'échantillon est forte, plus le diamètre de passage des cellules s'élargit, avec un risque de passage simultané d'éléments. On parle alors d'un passage en mode haute pression ou vitesse rapide. Pour plus de précision, on peut utiliser le mode en basse pression ou vitesse lente.

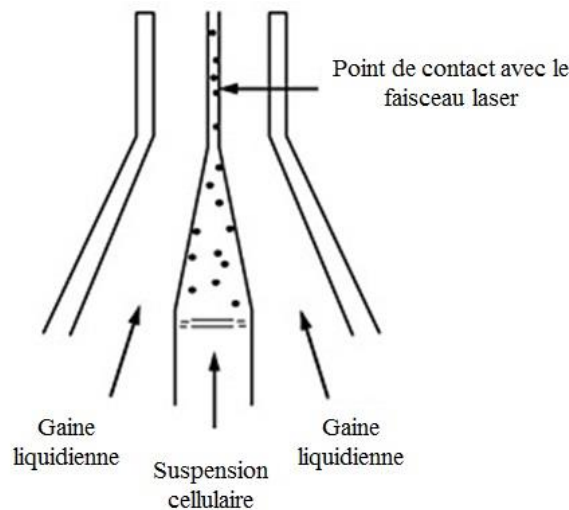


Figure 18 : Système fluide, d'après BD Biosciences

Le deuxième élément indispensable au principe de cytométrie en flux est l'excitation lumineuse. En effet, après l'hydrofocalisation, l'analyse des cellules est rendue possible par l'utilisation d'une source lumineuse. La diffraction lumineuse, lors du passage de la cellule devant le laser, permet sa caractérisation en fonction de sa taille et de sa structure (granularité et rapport nucléo-cytoplasmique) (**Figure 19**). L'excitation des fluorochromes permet une émission de fluorescence et une mise en évidence de la fixation des anticorps marqués. [66]

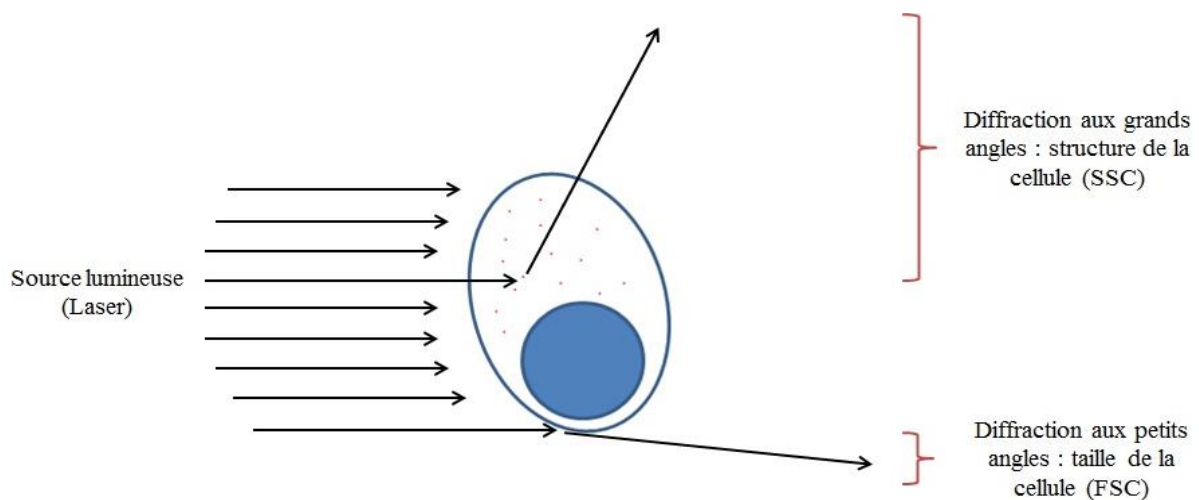


Figure 19 : Principe de diffraction de la lumière

Le troisième élément indispensable est le système optique. Les signaux lumineux émis lors du passage des cellules devant la source lumineuse sont collectés par le système optique pour être amenés jusqu'aux photomultiplicateurs (PMT).

Le système optique est composé de filtres et de miroirs permettant de diviser la lumière pour ensuite sélectionner et diriger les différentes longueurs d'onde d'intérêt vers les détecteurs correspondants.

Comme expliqué précédemment, l'étude des sous-populations cellulaires se fait grâce à la mise en évidence de marqueurs de surface ou intracellulaires caractéristiques, à l'aide

d'anticorps couplés à un fluorochrome. L'expression de ces marqueurs est variable selon la population de cellules étudiée. Les signaux optiques détectés sont séparés, amplifiés et convertis en signaux électroniques à l'aide des PMT (**Figure 20**).

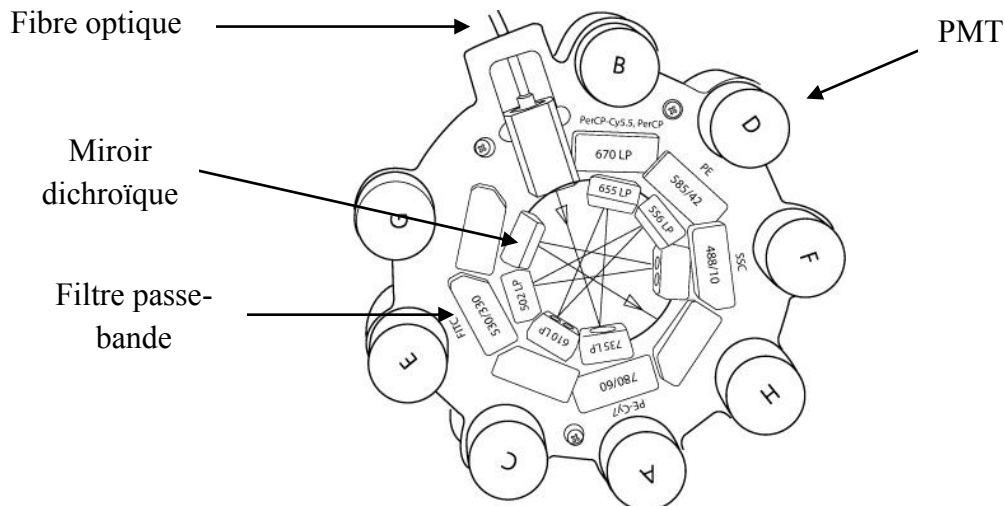


Figure 20 : Représentation du détecteur et des PMT pour le laser bleu sur le FACSCanto™ II (BD Biosciences)

b. Caractéristiques des cellules de neuroblastome

L'utilisation de la CMF pour la recherche de métastases de NB dans la moelle osseuse a débuté à la fin des années 90.

Comme dans beaucoup de cancers neuroendocrines, les cellules de NB n'expriment pas le *cluster* de différenciation (CD) 45, exprimé de façon différentielle par l'ensemble des cellules hématopoïétiques leucocytaires, et expriment fortement le CD56. En revanche, elles expriment de manière spécifique et homogène le GD2. [67] Cet antigène présente un fort intérêt pour la détection des cellules de NB, d'autant plus qu'il n'est pas exprimé par les cellules hématopoïétiques normales et ne présente pas de réaction croisée avec les échantillons de moelle osseuse. [68, 69]

De nombreux marqueurs ont été identifiés à la surface des cellules de NB, comme le CD24, et *a contrario*, d'autres antigènes absents tels que le CD40 qui serait responsable d'une action inhibitrice des cellules dendritiques. [70, 71] D'autres études ont également essayé de mettre en évidence des marqueurs pronostiques comme le CD133 qui serait associé à une chimiorésistance *via* l'activation de la voie de signalisation AKT (Protéine kinase B). [72]

1. Application de la CMF au neuroblastome

Nous reprenons ci-dessous les principales études qui ont marqué l'histoire de la CMF dans la recherche des cellules de NB, et qui nous ont permis d'élaborer notre protocole.

L'équipe de Komada a commencé par évaluer la détection des cellules de NB dans le sang périphérique et la moelle osseuse par CMF en combinant 3 marqueurs : le CD45 couplé à la PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein*), le CD56 conjugué au PE (*Phycoerythrin*) et le CD9 couplé au FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), avec un total de 10^6 événements par acquisition. Ce travail a permis d'identifier une population CD45-/CD56+/CD9+ dans les prélèvements positifs pour le NB, qui n'était pas retrouvée dans les échantillons des donneurs sains. [73]

Nagai *et al.*, ont ensuite optimisé cette technique de CMF trois couleurs à partir de lignées cellulaires de NB, en remplaçant le CD9 par le CD81. En effet, dans leur étude, le CD9 était faiblement positif contrairement au CD81. [74]

Quelques années plus tard, Warzynski *et al.* ont noté une expression très forte du CD56 (conjugué également au PE) sur les cellules du NB, non observée sur d'autres tumeurs également CD45-, comme le mélanome ou le carcinome à petites cellules. Après plusieurs essais avec différents panels, l'anticorps dirigé contre le GD2, couplé au CD81, CD56 et CD45, permet une amélioration importante de la sensibilité. [75]

En 2004, Swerts *et al.* ont réussi à obtenir une sensibilité de 1 cellule de neuroblastome pour 10^4 à 10^5 cellules mononucléées normales, en utilisant la combinaison de 5 marqueurs : CD9 (clone P1/33/2 marqué au FITC), CD81 (clone JS-81 conjugué au PE), CD56 (clone N901 couplé à l'APC = *allophycocyanin*), CD45 (clone 2D1 marqué avec la PerCP) et GD2 (clone 14G2a). Au minimum 10 000 événements étaient acquis puis analysés. [76]

En 2013, Ferreira-Facio avait pour objectif de proposer un tableau complet de marqueurs destinés au diagnostic différentiel et à la distinction des différents types de tumeurs solides de l'enfant (**Tableau IV**). Il a rajouté un nouveau marqueur de différenciation, le CD90, fortement positif dans le neuroblastome. Le GD2 est fortement positif uniquement dans le NB, et absent des autres tumeurs solides, hormis dans les tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET) où il n'est exprimé que faiblement, ce qui en fait un marqueur de choix pour la détection des cellules de NB. [67]

L'ensemble de ces études est récapitulé dans le **tableau V**.

Tableau IV : Contribution de l'immunophénotypage dans la caractérisation des tumeurs solides pédiatriques d'après Ferreira-Facio [67]

Disease Category	Immunophenotypic Markers															
	CD56	CD90	CD99	CD9	CD81	CD57	MYOD1	Myogenin	Epcam	CD271	GD2	CD117	CD34	CD58	CD10	NG2
Neuroblastoma	Strong expression	Strong expression	Negative	Strong expression	Strong expression	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Negative	Dim positive	Strong expression	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
PNET	Heterogeneous expression	Strong expression	Strong expression	Strong expression	Strong expression	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Negative	Strong expression	Dim positive	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
Rhabdomyosarcoma	Dim positive	Strong expression	Negative	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Strong expression	Strong expression	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
Wilms Tumor	Strong expression	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
Adrenal Carcinoma	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
Nasopharyngeal Carcinoma	Strong expression	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Negative	Negative	Strong expression	Strong expression	Negative	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Negative	Negative
Germ Cell Tumor	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression	Negative	Heterogeneous expression	Dim positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Heterogeneous expression	Heterogeneous expression
Hemangiopericytoma	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Strong expression	Strong expression	Negative	Negative

Negative

Dim positive

Positive

Heterogeneous expression

Strong expression

* p value < 0.05

Tableau V : Récapitulatif des principales études

Référence	Anticorps/ fluorochrome	Clone	Prélèvement utilisé	Nombre d'échantillons (NB)	Nombre d'événements acquis
Komada <i>et al</i>- 1998	CD45-PerCP CD56-PE CD9-FITC	2D1 MY31 P1/33/2	Sang périphérique MO	40	10 ⁶
Nagai <i>et al</i>- 2000	CD45 CD56 CD81 CD9		Tissu tumoral	21	
Warzynski <i>et al</i>- 2002	CD45-PerCP CD56-APC CD81-PE GD2-FITC	2D1 MOC-1 8.S.077ouGMR7	Lignée cellulaire	NA	50 000 (dans la zone où se placent les cellules de NB)
Swerts <i>et al</i>- 2004	CD45-PerCP CD56-APC CD9-FITC CD81-PE GD2	2D1 N901 P1/33/2 JS-81 14G2a	Tissu tumoral MO Cellules souches périphériques	43	10 000
Ferreira- Facio <i>et al</i>- 2013	CD45-PacO CD56- PECy7 CD90-PE CD9-PePerCPCy5.5 CD81-PE GD2- PePerCPCy5.5	HI30 N901/NKH1 5E10 M-L13 JS-81 14.G2a	Tissu tumoral MO Sang périphérique Autres liquides	12	NR

NR : Non renseigné / NA : Non applicable

2. Antigènes sélectionnés dans notre protocole

- **CD45**

L'antigène CD45 est un marqueur de surface pan-leucocytaire, non exprimé sur les précurseurs érythroblastiques et plaquettaires. Il est impliqué dans la prolifération et l'activation des lymphocytes. Ce marqueur est absent des cellules de NB.

- **GD2**

Les gangliosides ont été mis en évidence en 1942 par Klenk à partir de cerveau de bœuf. [77] Ces constituants membranaires sont des glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acide sialique. Ils sont largement exprimés à la surface des tissus des mammifères, et principalement retrouvés au niveau de la membrane plasmique des cellules du système nerveux. Les gangliosides diffèrent entre eux par leur structure (nombre de chaînes et de résidus acide), ce qui leur confère des propriétés distinctes. [78]

L'expression des gangliosides GD2 est très rarement retrouvée dans les tissus sains adultes (uniquement au niveau des neurones, mélanocytes et fibres nerveuses à l'état de trace), mais est retrouvée en très grandes quantités dans certains cancers, notamment dans le neuroblastome. Le GD2 est le ganglioside majeur exprimé à la surface des cellules de NB. [79, 80]

- **CD9 et CD81**

Le CD9 (MPR1 : *Motility Related Protein-1*) et le CD81 (TAPA-1 : *Target of Anti Proliferative Antibody 1*) appartiennent à la superfamille des tétraspanines. Ces dernières constituent un ensemble de glycoprotéines de surface à quatre domaines transmembranaires. Les tétraspanines sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la différenciation, la migration ou encore dans la signalisation. [81]

Le CD9 est exprimé sur de nombreuses cellules du système hématopoïétique, mais aussi dans de nombreux cancers. Il jouerait un rôle important dans la mobilité des cellules cancéreuses et les métastases. Le CD9 est un marqueur ubiquitaire.

Le CD81 est une petite protéine de surface de 26 kDa retrouvée sur un groupe diversifié de cellules, comme les cellules de la lignée lymphoïde, les cellules mésenchymateuses ou encore neuroectodermiques. [82]

- **CD56**

Le CD56 est une glycoprotéine de membrane proche d'une immunoglobuline, et est connu pour être fortement exprimé par les cellules Natural killer (NK). Il est également

retrouvé dans le tissu neuronal et les cellules musculaires striées fœtales ainsi que dans la plupart des tumeurs solides pédiatriques, mais son expression est variable.

Il est impliqué en outre dans les phénomènes d'adhésion des cellules neuronales. Son profil d'expression est comparable à celui de la molécule d'adhésion NCAM [67, 83, 84]

- **CD90**

Le CD 90 (ou THY1) est une glycoprotéine de surface, faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Il est ancré à la surface des cellules via le GlycosylPhosphatidylInositol (GPI), et est impliqué dans l'adhésion et la communication cellulaire, notamment au niveau des cellules des systèmes immunitaire et nerveux.

La très faible proportion des cellules CD90+ dans la MO normale (<0.1%) en fait un bon marqueur pour la mise en évidence des cellules de NB. [85]

OBJECTIF DU TRAVAIL

Bien que l'incidence des NB soit rare, la recherche d'un envahissement métastatique médullaire pose régulièrement problème au diagnostic et lors des bilans de suivis successifs. L'identification morphologique en microscopie optique est parfois difficile, en particulier lorsque les cellules sont isolées, sans disposition en amas.

L'intérêt de la CMF a été démontré depuis de nombreuses années pour l'immunophénotypage des hémopathies malignes. L'utilisation de cette technologie reste encore peu développée dans le domaine des cancers solides. La CMF représente un intérêt dans la rapidité de rendu des résultats comparativement à l'analyse histologique, qui constitue la technique de référence.

Dès 1998 avec l'équipe de Komada [73], on voit apparaître des publications sur la recherche des métastases de NB dans la MO par CMF. Ces études ont montré des sensibilités variables, et elles utilisaient des marqueurs, anticorps monoclonaux et fluorochromes différents. Avec l'aide des données de la littérature, nous avons établi un protocole standardisé de CMF multiparamétrique.

Les objectifs de cette étude sont multiples.

Dans un premier temps, il est nécessaire d'évaluer les performances de notre méthode dans la détection des cellules métastatiques de NB dans la MO, mais aussi en terme de sensibilité et de spécificité.

Dans un second temps, nous souhaitons évaluer les performances du couple analytique cytologie optique et cytométrie en flux à la fois pour le diagnostic positif et pour le diagnostic différentiel du NB, particulièrement lors d'infiltrations par des cellules atypiques.

Par la suite, nous évaluerons l'apport de cette approche dans le suivi des formes métastatiques et nous aborderons les perspectives de ce travail, en particulier, l'utilisation potentielle de cette approche dans l'évaluation de la MRD.

Enfin, nous discuterons l'interférence potentielle de cette méthodologie par les immunothérapies innovantes ciblées de type anticorps anti-GD2.

L'objectif est la mise en place d'un protocole d'analyse par la CMF multiparamétrique standardisé, applicable en routine au laboratoire et de manière transversale inter-laboratoires.

MATERIELS ET METHODES

I. Recrutements des patients et prélèvements

a. Patients

Il s'agit d'une étude prospective ayant débutée en novembre 2013. Les patients inclus sont soit suspects de NB, soit déjà diagnostiqués positif pour le NB. Les prélèvements, dans ce dernier cas, peuvent être effectués soit dans le cadre d'un bilan d'extension, soit lors des différentes étapes de suivi.

b. Prélèvements

L'immunophénotypage par CMF a été réalisé à partir d'échantillons de MO prélevés au niveau des crêtes iliaques, sur un tube contenant un anticoagulant, l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique)-K3.

En parallèle du tube contenant la MO, le prescripteur nous transmet des étalements de moelle directement réalisés au moment du prélèvement. Selon les cas, différents sites de ponction sont prélevés pour augmenter la sensibilité. Chaque frottis de MO est coloré au MGG et analysé dans les heures suivant la réception.

Les prélèvements de MO destinés à la recherche de métastases de NB sont acheminés au laboratoire d'hématologie et vers la plateforme de Cytométrie en Flux du CHRU de Nancy, à température ambiante, et sont conservés à 4°C jusqu'à réalisation de l'analyse. Tous les immunophénotypes ont été réalisés dans un délai maximal de 48h après la réalisation du prélèvement. Si plusieurs tubes ont été envoyés, il a été choisi de réaliser l'immunophénotypage sur la localisation identifiée comme riche ou douteuse en MOp, et à défaut sur le pool médullaire.

II. Echantillons témoins négatifs

Afin d'évaluer et d'éliminer le bruit de fond de notre méthode, nous avons étudié un panel de moelles de patients exempts de NB. Pour cela, nous avons choisi 10 prélèvements médullaires issus d'adultes entre novembre 2015 et avril 2016. Ils ont été analysés selon le même protocole que les moelles issues d'enfants dans lesquelles on recherche la présence de métastases de NB. Le choix de moelles d'adultes à titre de témoins négatifs est dû à la certitude de l'absence de NB à cet âge.

III. Cytomètre et anticorps

La plate-forme de CMF du CHRU de Nancy est équipée de deux FACSCanto™ II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), permettant l'analyse simultanée de 10 paramètres. Chaque cytomètre est équipé de 3 lasers d'excitation fonctionnant simultanément, à des longueurs d'ondes bien distinctes : bleu (488 nm), rouge (633 nm) et violet (405 nm).

a. Marquage membranaire

Le protocole repose sur un marquage membranaire à l'aide d'un panel de 6 anticorps ciblant respectivement : CD9, CD45, CD56, CD81, CD90 et GD2. Ces anticorps ciblent uniquement des antigènes de surface, et ont été choisis en fonction des données de la littérature.

Le ciblage initial permet d'isoler la population de cellules CD45 négatives. Par la suite, l'identification et le décompte des cellules malignes reposent sur l'étude de la co-expression de CD9, CD56, CD81, CD90 et GD2. Feirrer et son équipe avaient noté une forte expression pour ces 5 marqueurs, par les cellules de NB. [67]

Nous ciblons l'enregistrement des cellules GD2+. Avec une quantification par rapport au nombre total d'événements.

Chaque anticorps sélectionné est couplé à un fluorochrome. Le choix des différents fluorochromes est primordial pour permettre l'analyse simultanée des différents paramètres recherchés. Les anticorps utilisés sont fournis par BD Biosciences, et le choix du fluorochrome dépend notamment de la disponibilité commerciale du couple anticorps-fluorochrome.

Il existe quelques règles à suivre pour le choix du fluorochrome :

- Le spectre d'excitation doit être compatible avec les lasers du cytomètre.
- Les spectres d'émission des fluorochromes doivent se chevaucher le moins possible.
- Associer le fluorochrome le plus brillant, c'est à dire celui émettant le signal le plus fort, à l'antigène le plus faiblement exprimé par la cellule.

Pour des raisons pratiques nous avons privilégié les couples anticorps-fluorochrome déjà utilisés en routine au sein du laboratoire, comme pour le CD45, couplé au V500 (Violet 500) (**Tableau VI**).

Tableau VI : Panel d'anticorps utilisés
(BD Biosciences)

Epitope-cible	Fluorochrome	Référence	Clone	Expression
CD45	V500	560779	HI30	Cellules hématopoïétiques
GD2	PE	562100	14.G2A	Tumeurs d'origine neuro-ectodermique Mélanome, neuroblastome, gliome
CD9	PerCP-Cy5.5	561329	M-L13	Plaquettes, lymphocytes B et T, éosinophiles, basophiles, monocytes Neuroblastome
CD56	APC	341025	NCAM16.2	Lymphocytes NK. Myélome Tumeurs dérivées du tissu neural
CD81	APC-H7	646791	JS-81	Cellules hématopoïétiques Neuroblastome
CD90	BV421	562556	5E10	Tumeurs primitives neuro-ectodermiques Rhabdomyosarcome, neuroblastome

b. Préparation/Réalisation

1. Préparation de l'échantillon

La CMF repose sur une analyse de cellules individualisées. Afin de dissoudre au maximum tous les amas métastatiques présents dans l'échantillon de MO, ce dernier est mélangé par la technique d'aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette, puis est vortexé.

Le marquage membranaire des cellules de la moelle osseuse est réalisé à l'aide de 100µL de prélèvement qui sont incubés avec un volume d'anticorps défini par le fabricant, soit 5µL, pendant 15 minutes, à l'abri de la lumière à température ambiante. Toutes les incubations suivantes seront réalisées dans ces mêmes conditions.

Une lyse des hématies est ensuite réalisée par une incubation pendant 10 minutes avec 2 ml de FACS™ *lysing solution* (BD Biosciences). Les hématies sont présentes de manière majoritaire dans le prélèvement et leur élimination permet de limiter les interférences. L'étape de centrifugation de 5 minutes à 314g, permet ainsi d'isoler les cellules mononucléées et d'augmenter la proportion de notre population d'intérêt dans l'échantillon.

Le lavage des cellules restantes permet d'éliminer les anticorps non fixés et donc de limiter les interférences. Deux lavages consécutifs sont réalisés dans 2 ml de tampon isotonique, le *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Les cellules sont ensuite suspendues dans 0,5 ml de PBS.

Le prélèvement ainsi préparé est analysé sur le cytomètre de flux, à vitesse lente, à faible pression. Le nombre d'événements-cible est de un million de cellules, bien qu'il n'ait pas été atteint pour plusieurs échantillons.

2. Réglage des cytomètres

Les résultats des différents échantillons, passés indifféremment sur l'un ou l'autre des deux cytomètres de la plateforme, doivent être comparables entre eux. Il est donc impératif d'obtenir une fiabilité en termes de reproductibilité dans le temps et aussi entre appareils.

Pour effectuer la standardisation de nos 2 appareils, nous avons utilisé des billes *rainbow* 8 pics. Ces dernières correspondent à un mélange de particules de taille similaire mais d'intensités de fluorescence différentes. Chaque bille émet à plusieurs longueurs d'ondes, ce qui permet de les utiliser sur les différents canaux.

Le voltage est défini arbitrairement sur le premier cytomètre, à partir d'un prélèvement positif en MOP. Le passage des billes permet de déterminer les intensités de fluorescence correspondantes. Ces mêmes billes sont ensuite passées sur le second cytomètre. Les voltages sont ajustés pour obtenir les mêmes intensités de fluorescence sur les différents canaux que celles retrouvées sur le premier appareil.

Chaque jour des billes CS&T (*Cytometer Setup and Tracking*), fournies par BD[®], sont passées sur chaque cytomètre. Il s'agit de billes de qualification du système. Au moment de l'installation du système et à chaque changement de lots des billes, une « *baseline* » est déterminée. Leur passage quotidien permet d'évaluer la variation des voltages pour chaque PMT comparativement aux précédents. On peut suivre dans le temps cette évolution grâce à des courbes de *Levey-Jenning*.

Plus le voltage est important, plus le signal est fort, plus il y a un risque d'interférence entre les différents fluorochromes. Le choix des couples anticorps-fluorochrome doit donc tenir compte : des risques d'interférence, du niveau d'expression des antigènes membranaires (les fluorochromes de forte brillance sont réservés aux antigènes faiblement exprimés et inversement), et enfin de la gamme d'anticorps commerciaux disponibles. Tout ceci dans le but de limiter au maximum les interférences entre les différents fluorochromes et donc les compensations à mettre en place.

Il existe un chevauchement possible entre les spectres d'émission des fluorochromes utilisés simultanément. Il est donc essentiel, pour ne pas surévaluer le niveau d'expression des différents marqueurs, de ne prendre en compte que le signal propre à chaque fluorochrome. Pour ceci, on retranche la quantité de fluorescence correspondant à chaque chevauchement, ce qui correspond à des compensations (**Figure 21**). Ces dernières diffèrent sur chaque appareil. La procédure décrite a été utilisée sur nos deux cytomètres.

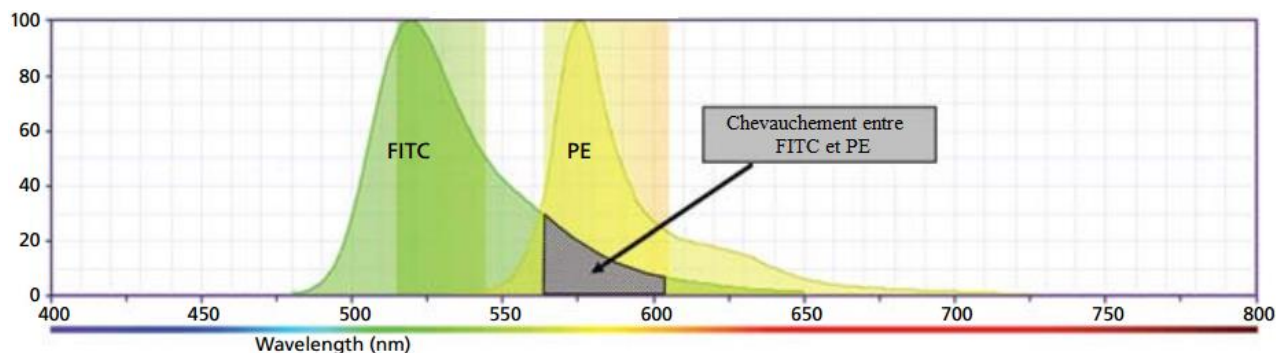


Figure 21 : Exemple de chevauchement des spectres de d'émission de fluorescence entre FITC et PE, d'après BD Biosciences

Chaque anticorps utilisé dans notre protocole de CMF est mis en contact avec des billes dites blanches, c'est-à-dire ne fixant pas les anticorps; et des billes positives monomarquées, c'est à dire fixant les anticorps.

Les billes blanches présentent une auto-fluorescence proche de celle des cellules non marquées. Le signal détecté correspond au bruit de fond. La deuxième étape correspond au passage successif des billes monomarquées, et à l'observation du spectre d'émission exact et l'intensité de fluorescence (**Tableau VII** et **Figure 22**).

Tableau VII : Spectre d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés

Fluorochrome	Excitation max	Laser	Emission max
V500	415 nm	Violet	500 nm
PE	496 nm	Bleu	578 nm
PerCP-Cy5.5	482 nm	Bleu	695 nm
APC	650 nm	Rouge	660 nm
APC-H7	496 nm	Rouge	785 nm
BV421	407 nm	Violet	421 nm

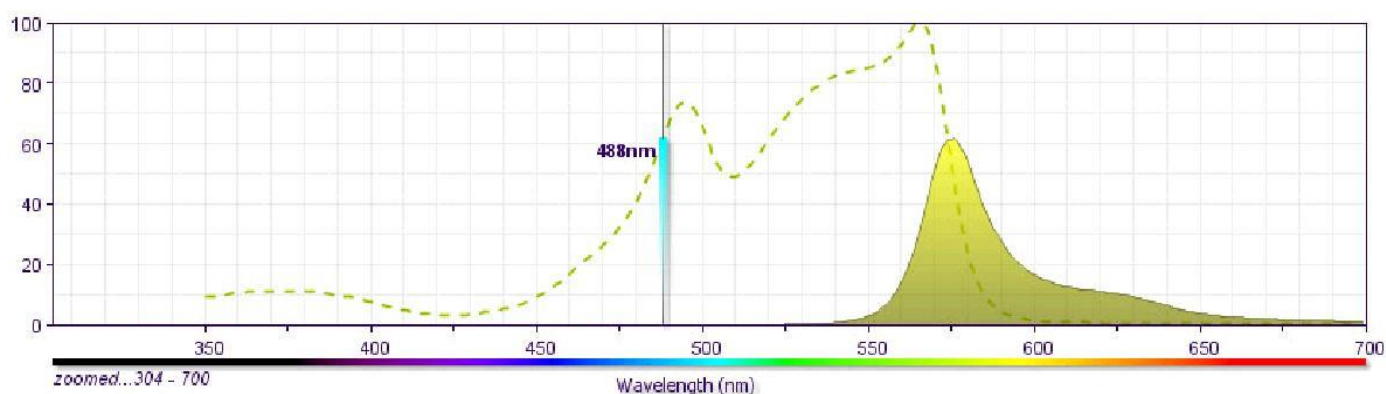


Figure 22: Spectre d'excitation et d'émission de la PE d'après BD Biosciences

3. Analyse à l'aide du cytomètre

L'acquisition des données a lieu le même jour que le marquage des cellules. Toutes les analyses ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel BD FACSDiva™ software. L'utilisation d'un masque unique est un élément essentiel pour une standardisation des résultats.

Le nombre d'événements retenus dans notre étude correspond au nombre total de cellules analysées par le cytomètre, avant élimination des débris cellulaires, avant sélection des cellules isolées, et avant sélection des cellules non leucocytaires (CD45-).

Nous recherchons l'expression de l'antigène GD2 sur les cellules CD45-. La population de cellules ainsi mises en évidence, est classée selon le niveau d'expression du GD2 (faible ou fort). La limite est fixée à 10^3 conformément aux travaux réalisés par l'équipe de Feirrer. [67]

Nous avons étudié l'expression des antigènes CD56, CD81, CD9 et CD90 sur les deux populations de cellules exprimant le GD2, la présence de GD2 étant spécifique des cellules de NB (**Figure 23**).

Les événements considérés comme positifs, sont ceux associés à une forte expression du GD2. Le seuil à partir duquel nous considérons l'échantillon comme infiltré par des cellules de NB sera déterminé à l'aide des témoins négatifs.

Pour estimer notre seuil de positivité, le passage de nos témoins négatifs nous permet de calculer l'écart-type (DS) exprimé en nombre d'événements GD2+. La limite de détection d'une méthode peut être calculée selon la formule suivante : limite de détection = 3 x DS. Pour les méthodes qualitatives, la limite de détection correspond au seuil de positivité. [86]

L'acquisition totale de 10^6 événements à débit normal a pour objectif d'atteindre un seuil de sensibilité proche d'1 cellule pour 100 000.

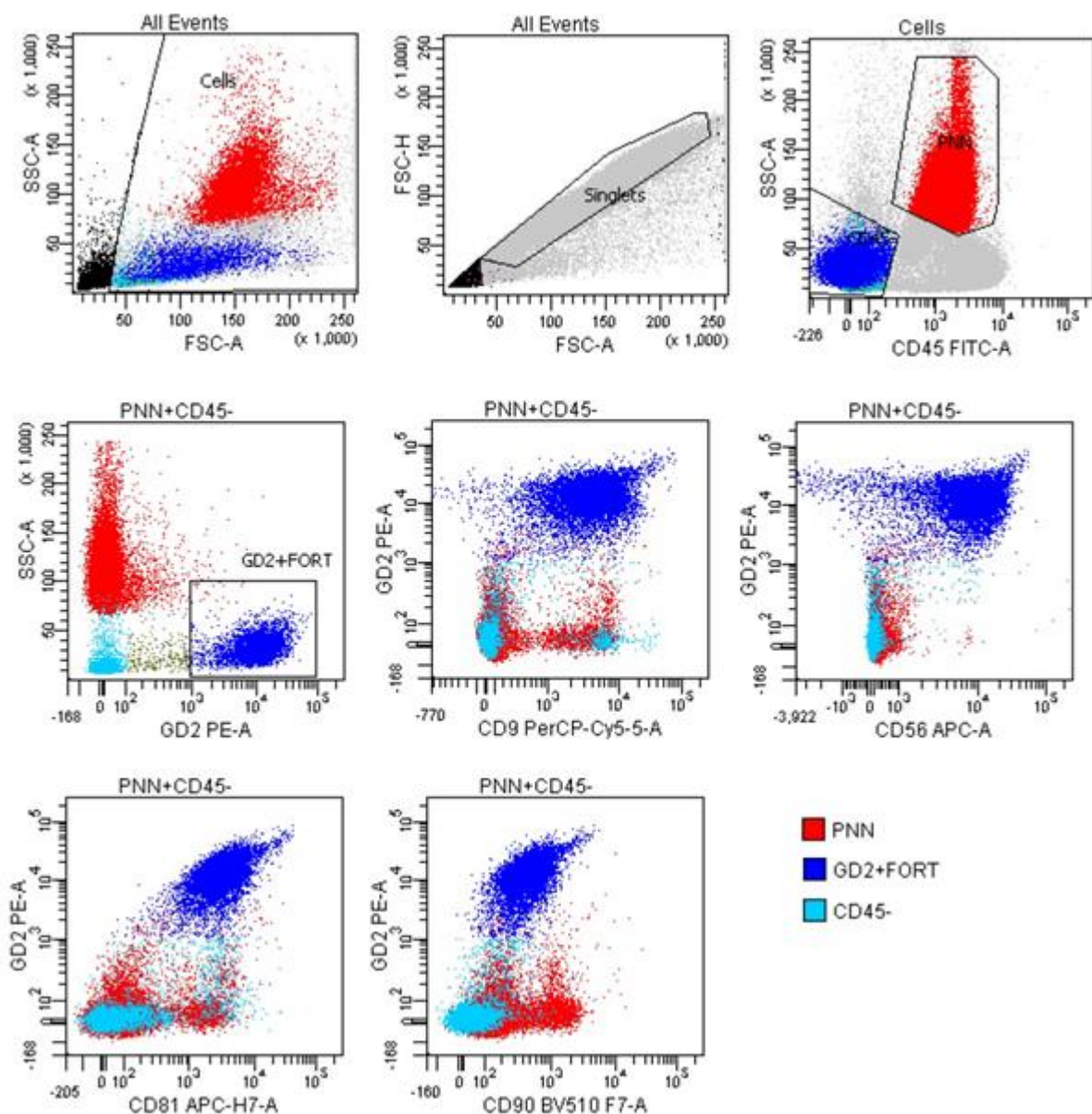


Figure 23 : Stratégie de mise en évidence des cellules malignes par CMF

IV. Exploitation des résultats

Les résultats des différents échantillons sont ensuite comparés aux résultats des myélogrammes et des BOM lorsque celles-ci ont été réalisées. Les BOM réalisées au CHRU de Nancy sont analysées par le laboratoire d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Brabois. Dans un premier temps, elles sont observées en MOp par une coloration HES, puis analysées par immunohistochimie à l'aide de différents marqueurs comme l'anti-synaptophysine et l'anti CD56.

RESULTATS

Au total 13 enfants ont été inclus, dont 8 au moment du diagnostic initial, 2 au moment du diagnostic de rechute et 3 uniquement dans le cadre du suivi de la maladie. Parmi ces patients, 7 étaient en stade IV (INSS) au moment de leur diagnostic, 4 avaient une forme localisée et 2 étaient atteints, non pas d'un NB, mais d'un sarcome hépatique pour le premier et d'une tumeur cérébrale pour le second. L'âge médian lors du diagnostic positif de NB était de 15 mois, proche des données couramment retrouvées dans la littérature, avec un ratio H/F de 4,5.

Nous avons reçu entre novembre 2013 et janvier 2016, 36 demandes qui ont été analysées aussi bien en CMF qu'en MOp. Parmi ces échantillons, 10 ont été adressés dans le cadre du diagnostic initial ou de rechute, et les 26 autres, dans le cadre des bilans de suivi de la prise en charge. Les bilans de suivi concernent 7 patients (sont exclus les formes localisées et ceux dont le diagnostic initial est négatif pour le NB).

Les patients inclus ont entre 0 et 86 mois au moment de leur inclusion dans notre protocole. Les caractéristiques des patients ainsi que leur évolution au cours de l'étude, sont résumées dans le **tableau VIII**.

Tableau VIII : Caractéristiques des patients au diagnostic et lors de l'évolution

Patient	Sexe	Diagnostic	Age (mois)	Stade (INSS)	Pronostic	Evolution
A	F	SH	0	NA	NA	NA
B	M	NB	3	IV	I	RP
C	M	NB	47	IV	HR	Décès
D	F	NB	15	II A	BR	RP
E	M	NB	39	IV	HR	Rechute
F	M	NB	34	IV	HR	Rechute
G	M	NB	6	II-A	BR	RP
H	F	NB	37	IV	IV	Rechute
I	M	NB	10	II-A	BR	RP
J	M	NB	1	II-A	BR	RP
K	M	NB	7	IV	HR	RC
L	M	NB	35	IV	HR	Décès
M	M	TC	44	NA	NA	NA

F: Féminin; **M** : Masculin; **SH** : Sarcome hépatique ; **NB** : Neuroblastome; **TC** : Tumeur cérébrale; **NA** : Non Applicable; **I** : Intermédiaire; **HR** : Haut risque; **BR** : Bas risque; **RP** : Rémission partielle ; **RC** : Rémission complète

I. Bilan des témoins négatifs et établissement du seuil de positivité

Afin de s'assurer de la spécificité et de déterminer la sensibilité de notre méthode d'analyse par CMF, nous avons analysé les MO de 10 patients adultes. Ces MO sélectionnées à titre de témoin négatif dans notre étude, devaient être de cellularités normales, équilibrées et sans infiltration. L'âge moyen de ces témoins est de 39,5 ans avec un ratio H/F de 2,3.

L'analyse cytométrique des 10 prélèvements médullaires normaux identifie entre 0 et 7 événementsGD2+ avec un écart-type de 2,28, et un nombre moyen d'événements totaux acquis de 957787, proche de notre objectif fixé de 1 million. Notre seuil de détection pour cette étude est donc de 7 événements (selon la formule 3DS justifiée plus haut). **(Figure 24)** Tout échantillon > 7 événements GD2+ est considéré comme positif.

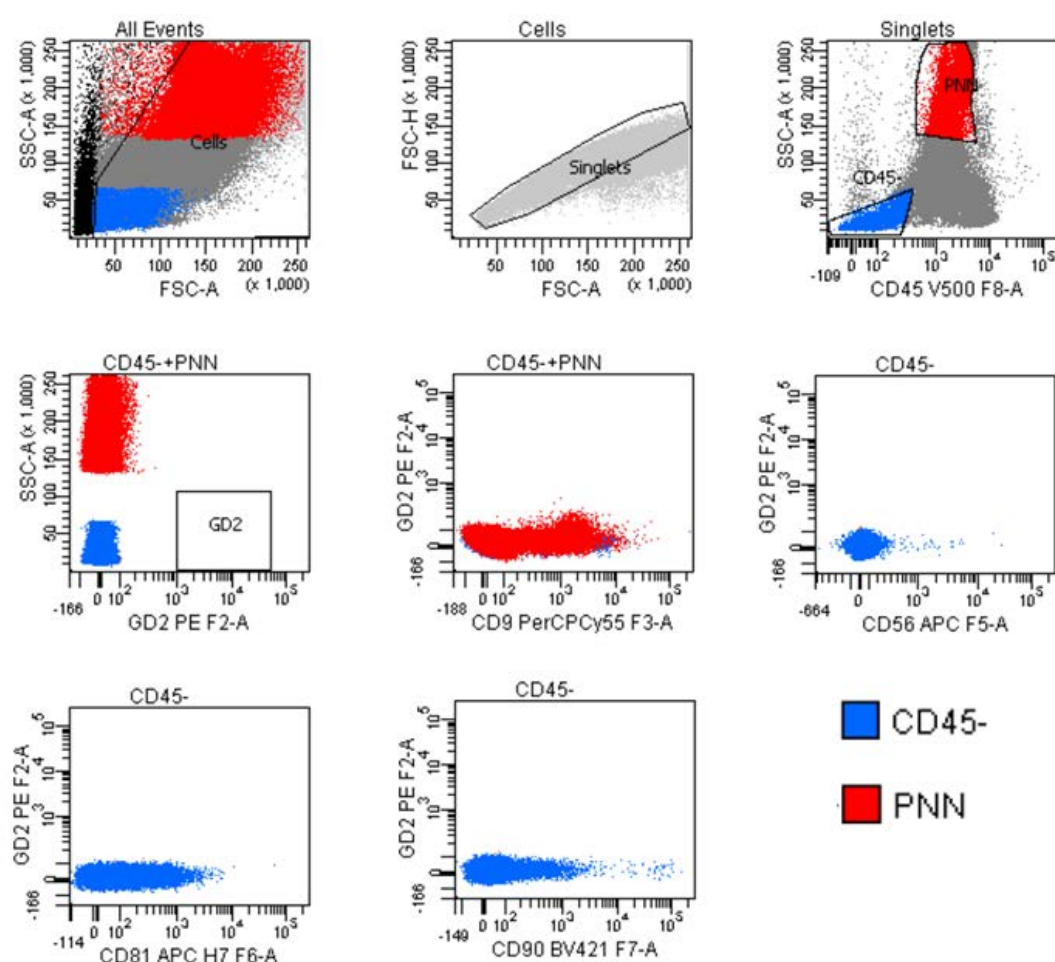


Figure 24 : Nombre d'événements GD2+ ≤ 7 chez un patient négatif pour le NB
PNN : Polynucléaires Neutrophiles

Le seuil de positivité déterminé précédemment n'est applicable que si le nombre d'événements totaux acquis est proche de l'objectif de 1 million, ce que nous avons respecté dans la mesure du possible, pour l'analyse des patients.

II. Expression des marqueurs par les cellules métastatiques de NB

L'analyse cytométrique identifie une infiltration métastatique du NB pour 10 cas. (**Annexe 1**)

Les événements GD2+ co-expriment dans tous les cas les marqueurs CD9, CD56, CD81 et CD90 (excepté pour 1 cas).

L'analyse des graphes cytométriques a montré, une hétérogénéité d'expression du CD9 parmi les événements GD2+, avec une expression le plus souvent partielle.

Les événements GD2+ montrent une forte expression du CD56 et du CD81.

Dans un cas, le CD90 s'est révélé négatif sur la population GD2+. Nous nous sommes posé la question d'une erreur technique, plutôt qu'un réel défaut d'expression. Le point correspondant a été éliminé de notre étude statistique. La distribution des marqueurs étudiés sur la population GD2+, est représentée dans la **figure 25**.

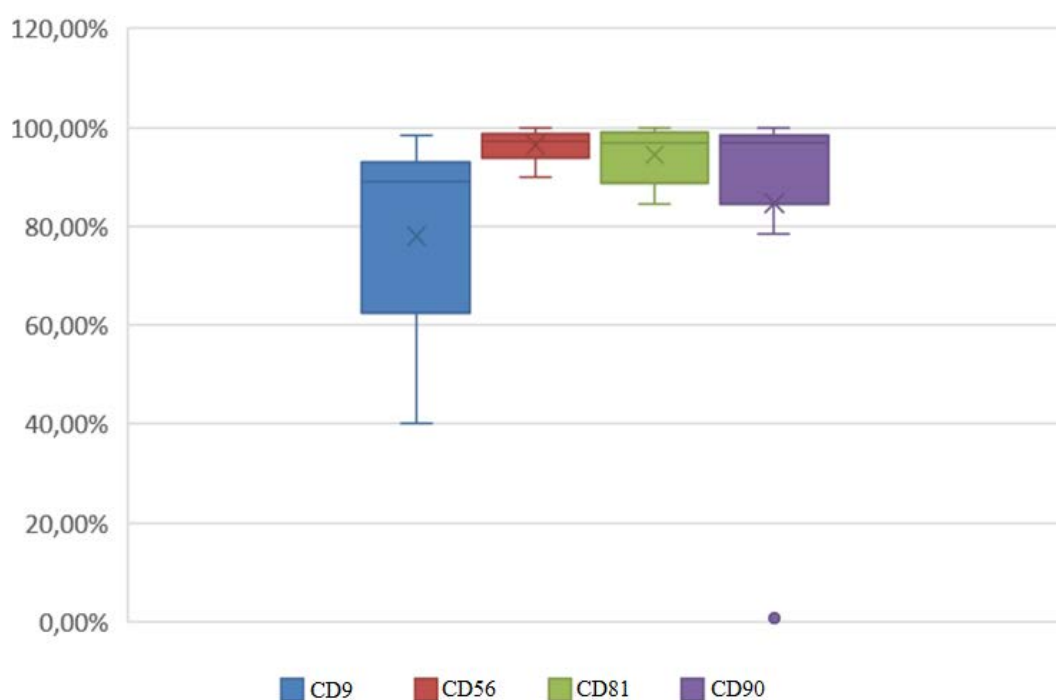


Figure 25 : Représentation de la distribution des autres marqueurs sur la population GD2+

Nous avons noté la présence d'événements GD2+ faible ($<10^3$) dans les échantillons de MO positifs mais aussi dans certains prélèvements négatifs. Nous avons regardé si ces cellules co-exprimaient également les autres marqueurs et si nous devions en tenir compte dans le rendu de nos résultats (**Figure 26**).

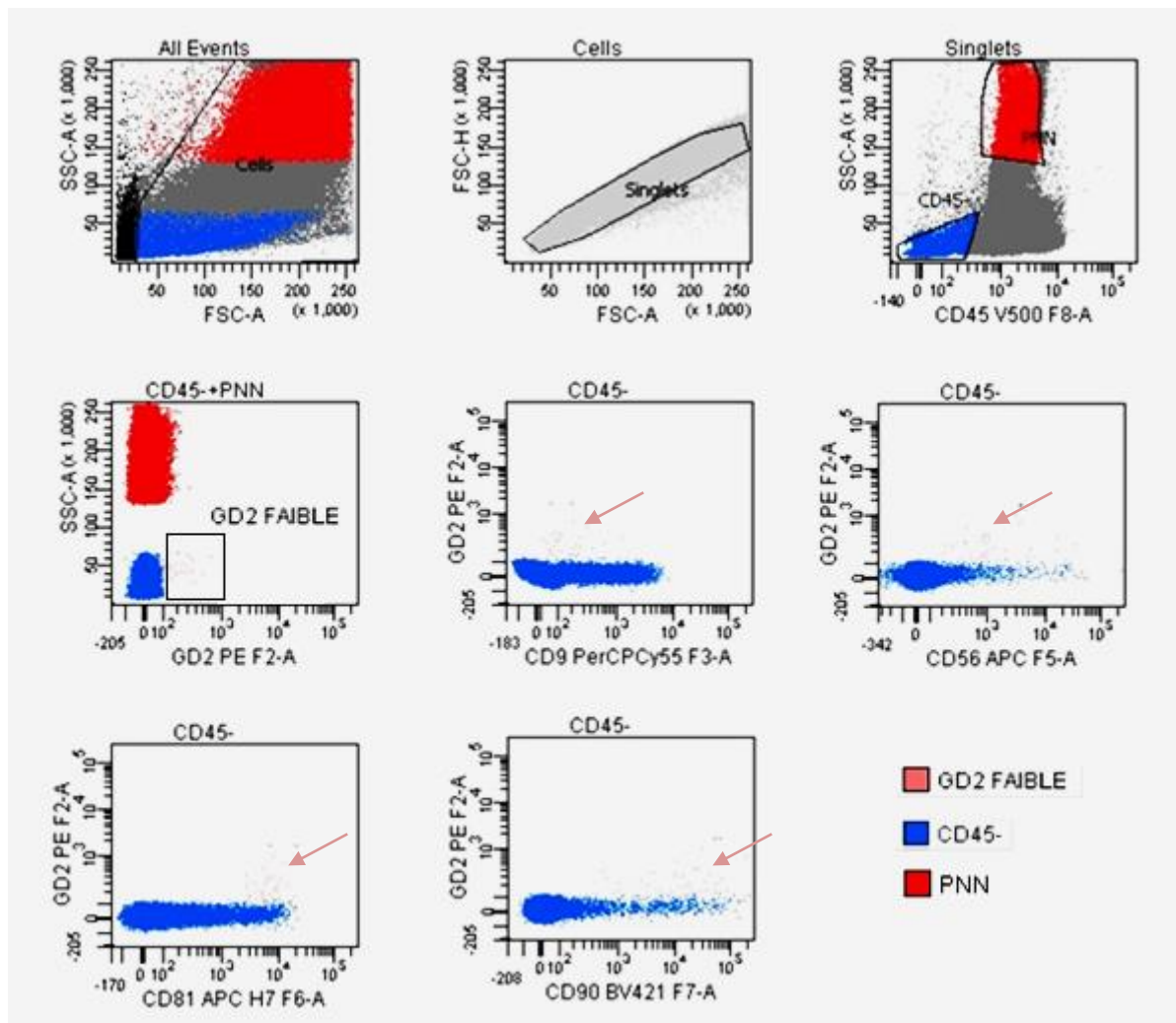


Figure 26 : Exemple d'expression des autres marqueurs sur la population GD2 faible

Les cellules GD2+ faible ne co-expriment pas toujours les autres marqueurs étudiés. Leur présence n'a pas été identifiée comme un facteur prédictif de rechute ou d'infiltration médullaire (en comparaison avec les données de la BOM).

III. Expression des résultats en fonction de l'indication du prélèvement.

Tableau IX : Tableau de synthèse des résultats en fonction de l'indication clinique du bilan

		Diagnostic initial ou de rechute	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Commentaire
A	MOp	-										Sarcome hépatique
	CMF	-										
	BOM	-										
	MIBG	NR										
B	MOp	+	-									
	CMF	NR	-									
	BOM		-									
	MIBG		+									
C	MOp	+	-	+								
	CMF	NR	-	-								
	BOM		+	+								
	MIBG		NR	+								
D	MOp	-										Forme localisée
	CMF	-										
	BOM	-										
	MIBG	-										
E	MOp	+	+ /pool -	+ /pool -	+	-	+	-	-			
	CMF	+	-	-	-	+	-	-	-			
	BOM	+	NR	+	+	+	-	+	-			
	MIBG	++	NR	++	+	+	+	NR	+			
F	MOp	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
	CMF	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	BOM	NC	NR	NC	+	-	+	-	-	-	NR	
	MIBG				NR	+	+	NR	+		NR	

G	MOp	-										Forme localisée
	CMF	+										
	BOM	NC										
	MIBG	-										
H	MOp	+	+									CMF à partir de 2015 = rechute
	CMF	+	+									
	BOM	+	+									
	MIBG											
I	MOp	-										Forme localisée
	CMF	-										
	BOM	-										
	MIBG	-										
J	MOp		-									Forme localisée.
	CMF		+									
	BOM		NR									
	MIBG		-									
K	MOp	+	-	-	-	-	-					
	CMF	+	-	-	-	-	-					
	BOM	NR	NR	NR	NR	NR	NR					
	MIBG											
L	MOp	+										Recherche NR au CHRU au diag. Rechute avant décès.
	CMF	+										
	BOM	+										
	MIBG											
M	MOp	-										Cellules atypiques en MOp (hématogone)
	CMF	-										
	BOM	NR										
	MIBG											

NR : Non réalisé / NC : Non contributif

S : Suivi

a. Au diagnostic initial ou de rechute

Au total, 10 échantillons ont été analysés simultanément en MOp et CMF, dans le cadre soit du bilan d'extension d'un NB déjà connu, soit d'une recherche d'infiltration d'une tumeur non encore étiquetée, ou encore pour vérifier l'hypothèse d'une rechute éventuelle.

Chez deux patients (A et M), la recherche par CMF d'un envahissement médullaire métastatique par le NB s'est révélée négative et *a posteriori*, le diagnostic même de NB a été exclu. Pour le patient M, atteint d'une tumeur cérébrale, les frottis de MO examinés en MOp révèlent une infiltration importante (proche de 25% des cellules médullaires) par des cellules isolées indifférenciées. L'utilisation du panel de marqueurs spécifiques du NB a permis d'exclure la présence de métastase de NB dans la MO de ce patient. L'utilisation d'un panel spécifique a permis de démontrer qu'il s'agissait d'hématogones, c'est-à-dire de précurseurs lymphoïdes B normaux (**Figure 27**).

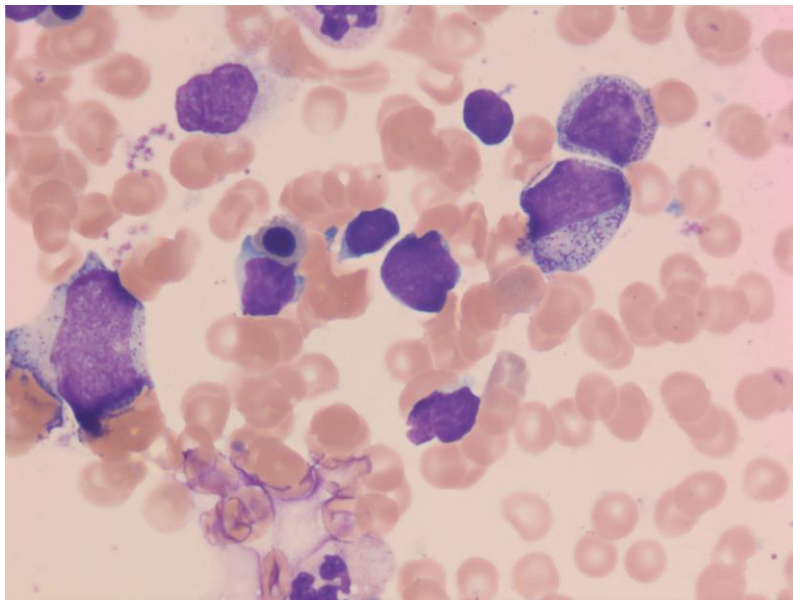


Figure 27 : Infiltration par des hématogones de la MO du patient M, coloration au MGG (x63)

Lorsque le diagnostic positif de NB, ou de rechute avec infiltration médullaire a été posé, la CMF et la MOp étaient cohérentes dans 100% des cas (5 patients). Le nombre d'événements GD2+ fort moyen était de 2954,8 dans les 5 échantillons correspondants.

Les patients D et I ont été diagnostiqués positifs pour un NB localisé, sans mise en évidence de métastase par MOp et CMF.

Pour le patient G, seule la CMF multiparamétrique a permis de mettre en évidence la présence de cellules métastatiques de NB dans la MO, avec un faible nombre d'événements GD2+ positif, 72. Dans ce cas, la MOp n'avait pas permis d'identifier la présence de ces cellules et la BOM était non contributive pour ce patient. Le patient Ga été pris en charge comme une forme localisée.

b. Lors des bilans de suivi systématiques

Au total, 26 échantillons issus de 7 patients différents, ont été analysés dans le cadre des bilans de suivi de traitement (**Tableau X**).

Tableau X : Comparaison des résultats entre la MOp et la CMF obtenus sur les échantillons de suivi

MOp	CMF	Total
+	+	2
-	-	16
-	+	2
+	-	6

Les résultats ont été concordants dans 18 cas et discordants pour 8 échantillons.

Pour les 2 prélèvements positifs dans les deux techniques, le nombre moyen d'événements GD2+ est de 21428,5.

Ci-dessous nous avons représenté l'évolution du nombre d'événements GD2+ en fonction des différents bilans de diagnostic et de suivi pour 3 patients (ceux pour lesquels le nombre de bilans était supérieur à 2). Nous avons fait apparaître les discordances lorsqu'elles étaient présentes (**Figures 28 à 30**). Un nombre élevé d'événements positifs est en faveur d'une forte infiltration métastatique compatible avec l'observation microscopique.

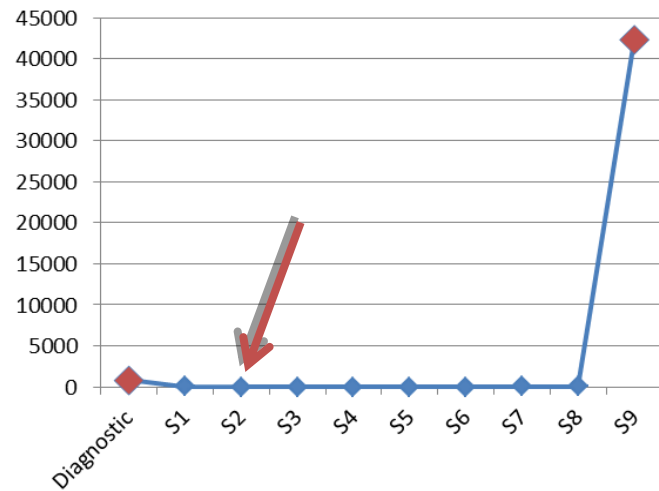


Figure 28 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient F au cours des différents bilans

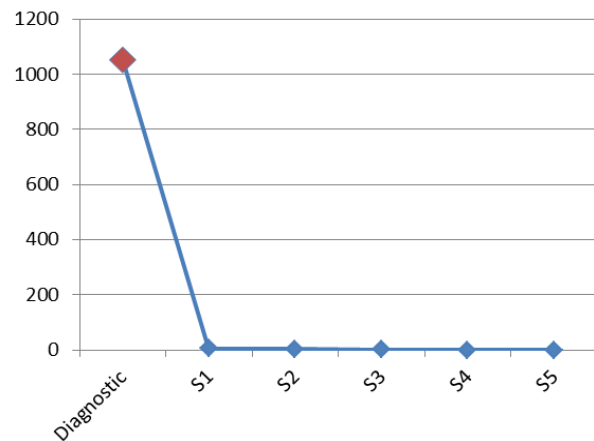


Figure 29 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient K au cours des différents bilans

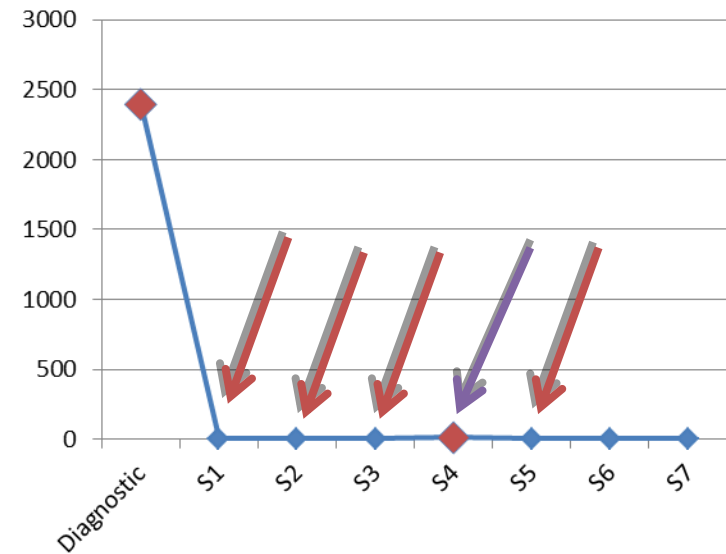
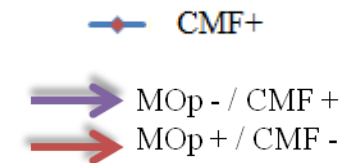


Figure 30 : Nombre d'événements GD2+ chez le patient E au cours des différents bilans



Reprise des cas discordants

La CMF a permis de détecter une très faible infiltration métastatique pour deux échantillons, non détectée par la microscopie optique.

Pour le bilan de suivi S4 du patient E, lors de la réalisation du prélèvement l'échantillon a été scindé en deux, avec un pool de moelle prélevée en épine iliaque postéro-supérieure (EIPS) gauche et un pool de moelle prélevée en EIPS droite. L'analyse indépendante des deux échantillons par CMF a permis de montrer une très faible infiltration à droite et à gauche. Nous sommes en effet à la limite du seuil de positivité (10 et 13 événements respectivement à gauche et à droite). Cette infiltration a été confirmée par la BOM. Dans cette situation précise, l'analyse par CMF a permis de suppléer la MOp.

Pour le bilan de suivi S1 du patient J, une présence très faible de cellules tumorales a également été détectée (76 événements positifs). Au vue du très jeune âge du patient, la BOM n'a pas été réalisée. Ce prélèvement a été réalisé devant la présence d'une augmentation de la masse tumorale, quelques mois après le diagnostic initial alors que le patient de très bon pronostic était en simple surveillance thérapeutique. Ici, nous sommes donc dans un cas de circulation de cellules tumorales dans une forme localisée de NB.

Difficultés d'interprétation devant des cellules atypiques

Afin de mieux analyser ces discordances entre la morphologie et l'approche phénotypique, nous avons analysé à nouveau les frottis de MO des différents patients rendus positifs initialement en MOp alors que le pool a été trouvé négatif en CMF. La réanalyse par MOp a été réalisée en double aveugle par 3 biologistes dans les cas de discordances.

Pour 2 des 6 cas, la réanalyse a objectivé une absence d'amas métastatiques avec présence uniquement de cellules atypiques isolées (bilans S2 des patients C et F). L'analyse par CMF était négative, nous permettant d'éliminer une infiltration médullaire par le NB. Cette situation illustre la difficulté cytologique à orienter le diagnostic en cas de cellules indifférenciées isolées chez un patient suspect de présenter un NB (**Figure 31**).

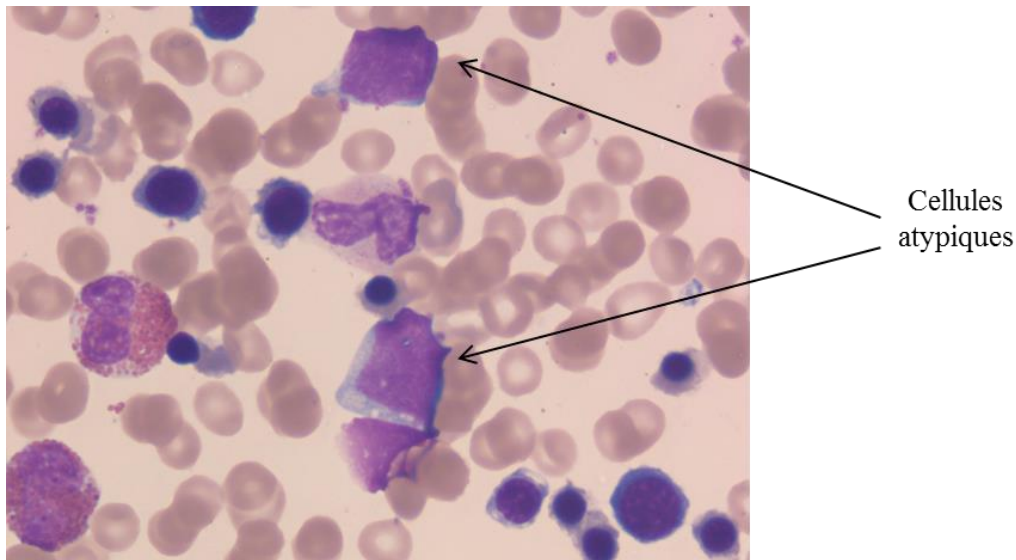


Figure 31: Cellules isolées sur frottis de MO (bilan S2 du patient F), coloration au MGG (x63)

A la fin de cette relecture, il nous reste donc 4 cas discordants, avec une MOp mettant en évidence des cellules métastatiques, contrairement à la CMF. Tous ces échantillons sont issus du patient E.

Origine du prélèvement différent entre CMF et MOp

Lors du bilan médullaire, plusieurs ponctions sont réalisées à partir de différents sites, à droite comme à gauche. Le mélange de ces différents prélèvements constitue un pool de MO, à partir duquel nous réalisons l'analyse par CMF. Sur les 4 prélèvements discordants restants, entre la CMF et la MOp, seuls 2 pools ont également été analysés en microscopie optique, en parallèle des prélèvements à localisation précise (S1 et S2 du patient E). Dans ces deux cas, les pools de moelle étudiés en MOp n'ont pas retrouvé d'amas ou de cellules métastatiques, contrairement aux prélèvements locaux.

Le fait de rassembler les prélèvements en un pool unique entraîne par conséquent une dilution des cellules métastatiques, du fait de l'hétérogénéité de l'infiltration. Cette dernière devient alors indétectable autant en CMF qu'en MOp.

Présence d'amas non dissociés et non analysés par CMF

La présence d'amas métastatiques est indiscutable sur les frottis correspondants aux 4 suivis positifs du patient E. Cependant, la CMF n'a pas permis de les mettre en évidence. Cela pose la question de la dissociation des amas en cellules individualisées dans notre protocole.

L'analyse cytométrique seule manque de sensibilité en cas d'absence de cellules métastatiques isolées (**Figure 32**).

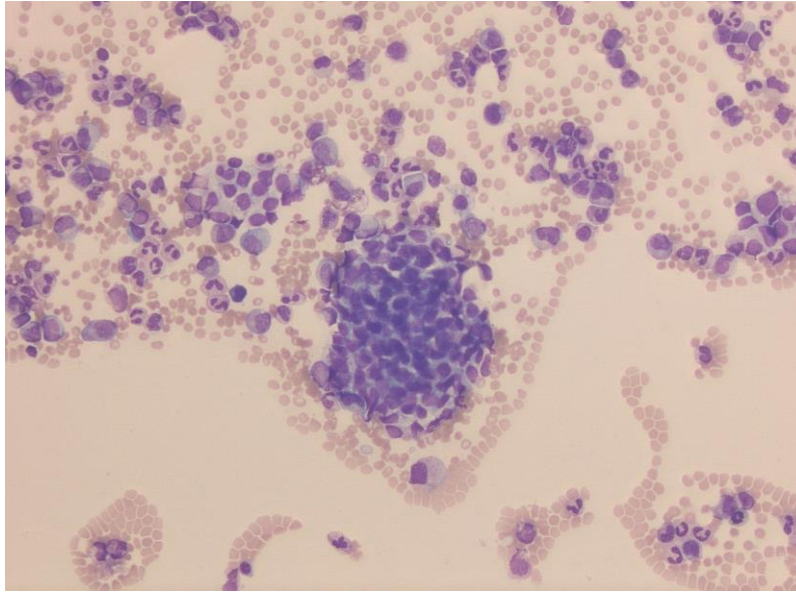


Figure 32 : Amas métastatique sur le frottis de MO (bilan S2 du patient E), coloration au MGG (x10)

IV. Performance du couple analytique CMF/MOp comparativement à la BOM

Sur ces 36 prélèvements, nous avons pu récupérer 25 résultats de BOM effectuées lors de la même exploration. Dans 3 cas, la BOM était non contributive. Nous avons donc pu comparer nos résultats de CMF et de MOp pour uniquement 22 échantillons, soit 61% des prélèvements inclus dans notre étude. (**Tableaux XI et XII**).

Tableau XI : Comparaison des résultats bruts obtenus par CMF et par étude de la BOM

		CMF	
		Positif	Négatif
BOM	Positif	5	7
	Négatif	0	10

Tableau XII: Comparaison des résultats après relecture obtenus entre BOM et le couple analytique CMF/MOp

		CMF/MOp	
		Positif	Négatif
BOM	Positif	7	5
	Négatif	1	9

Dans un cas, la MOp a permis de mettre en évidence des amas métastatiques, contrairement à la BOM, discordance liée aux limites de la technique. En effet, comme expliqué précédemment, la dissémination métastatique est hétérogène. Si la biopsie est effectuée dans une région infiltrée, le résultat sera positif, cependant si la BOM est réalisée quelques centimètres plus loin, dans une zone dépourvue de métastases, le résultat du prélèvement sera négatif. Il est malheureusement impossible de prédire exactement la localisation des métastases au sein de la MO.

Il faut rappeler que la BOM reste un acte invasif et qu'elle n'est pas réalisée chez les nourrissons. Lors de notre étude, seuls 69 % des bilans médullaires étaient accompagnés d'une BOM, soit 11/36 bilans qui ne sont pas accompagnés d'une BOM. Nous avons noté que 6 des bilans sans BOM ou avec une BOM non contributive, se sont révélés positifs, avec une infiltration métastatique mise en évidence par CMF et/ou MOp.

Sensibilité-Spécificité et valeurs prédictives

Pour évaluer les performances de la MOp seule ou associée à la CMF, nous avons comparé nos résultats à la technique de référence : la BOM.

Ce travail effectué sur 22 prélèvements analysés conjointement en MOp, CMF et en anatomo-pathologie a permis de révéler une sensibilité de la MOp seule était de 54%, avec une spécificité de 89%. L'ajout de la CMF à la MOp permet d'obtenir une sensibilité de 62% avec une spécificité de 100%.

Le couple analytique CMF/MOp permet d'obtenir une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 64%.

DISCUSSION

Avant toute chose, il faut noter que la taille de notre cohorte de patients est faible (13 patients), avec un petit nombre d'échantillons.

I. Apport de la CMF

Ces résultats préliminaires illustrent les performances de l'analyse par CMF multiparamétrique pour détecter l'infiltration métastatique du NB. Pour 75% (27/36) des cas, les résultats de l'analyse cytométrique étaient concordants avec ceux de l'analyse cytologique, même quand l'infiltration était faible. Il est important de souligner que l'analyse cytométrique a permis de détecter une infiltration non observée cytologiquement pour 8% (3/36) des cas.

Cependant, la constatation de 17% (6/36) de faux négatifs par CMF, nous a amené à analyser à nouveau les lames discordantes. La relecture à l'aveugle des lames par différents biologistes nous a permis de montrer que l'analyse cytologique garde sa part de subjectivité puisqu'elle a été influencée par le contexte de la demande, et que la présence de cellules atypiques indifférenciées isolées a été dans ce contexte, attribuée à une infiltration par le NB. La vérification par CMF multiparamétrique permet donc de lever le doute sur un envahissement métastatique, lorsque des cellules atypiques isolées sont observées, en particulier dans un contexte de NB connu. La présence d'amas métastatiques non identifiés par la CMF implique la nécessité de coupler la cytométrie à la microscopie optique, il s'agit ici d'un couple analytique indissociable.

L'apport de la CMF en complément des techniques déjà en place pour la détection des métastases de NB dans la MO, est multiple.

Au moment du diagnostic initial et des rechutes, la CMF multiparamétrique permet:

- La confirmation du diagnostic positif avec une sensibilité et une spécificité de 100% en comparaison avec la BOM.
- Le rattrapage des cas négatifs en MO.
- L'élimination du diagnostic de NB devant des infiltrations atypiques notamment en cas de présence de cellules indifférenciées isolées (hématogones, autre tumeur de l'enfant).

La CMF présente donc un réel intérêt notamment au niveau du diagnostic différentiel et d'exclusion.

L'équipe de Corrias en 2008 a montré qu'il était possible de retrouver des cellules issues de la tumeur primitive en circulation dans le sang périphérique et la MO, dans les formes localisées de NB. Leur étude portait sur une cohorte de 145 patients diagnostiqués avec un NB localisé. Pour 19 d'entre eux, il a été mis en évidence une circulation de cellules

GD2+ avec un nombre d'événements compris entre 1 et 155 pour une acquisition totale de 10^6 événements. Le taux de survie sans événement à 5 ans est de 62,2% pour ces 19 patients contre 89,9% pour les 126 patients sans détection de cellules GD2+. [87]

Cette faible circulation de cellules GD2+ est à prendre en compte et doit inciter à une surveillance accrue des patients, car elle serait associée à un mauvais pronostic. Dans notre étude, deux patients atteints d'un NB localisé ont montré une circulation d'une faible population de cellules GD2+ (respectivement 76 et 72 événements), non mise en évidence par la MOp. Lorsqu'une infiltration métastatique médullaire est réelle et significative, notre nombre d'événements GD2+ est bien supérieure avec une moyenne de 2954,8. La CMF présente donc un fort intérêt dans ce contexte.

Lors des bilans de suivi au cours du traitement, la CMF permet :

- Une approche semi-quantitative de l'infiltration médullaire
- Une détection des cellules GD2+ même lorsque que l'infiltration est très faible

L'association de la CMF à la MOp permet donc de mettre en évidence de très faibles infiltrations avec une sensibilité et une spécificité plus importante que la MOp seule. Cette sensibilité implique une analyse d'un nombre d'événements acquis important, de 10^6 pour un seuil de détection placé à 7 événements, soit une sensibilité de comprise entre 10^{-5} et 10^{-6} .

La plus grande proportion de détection des métastases médullaires par analyse de la BOM vis à vis du couple analytique CMF/MOp montre une réelle supériorité de l'anatomopathologie. Cependant l'association de la CMF et de la MOp montre un réel intérêt lorsque la BOM n'est pas réalisée ou lorsque celle-ci n'est pas contributive, soit 39% dans notre étude. En effet, sur les 3 résultats non contributifs de la BOM, ce couple analytique a permis de détecter la présence de cellules de NB.

La CMF associée à la MOp constitue une approche combinée présentant de nombreux intérêts pour la mise en évidence des métastases médullaires du NB, et permet une puissance statistique de l'analyse liée à l'enregistrement de milliers d'événements.

II. Pertinence de l'utilisation de tous ces marqueurs ?

Nous avons trouvé une co-expression des marqueurs GD2, CD9, CD56, CD81 et CD90 par les métastases médullaires, concordant avec les données de la littérature. [67, 73-76] Nous avons choisi d'exprimer les résultats en nombre d'événements positifs et non en intensité de fluorescence car cette dernière est sensible à de nombreux paramètres en fonction du protocole d'analyse choisi (choix du clone, du fluorochrome, du cytomètre,...)

Cependant, les événements GD2+ faible ($<10^3$) ne doivent pas être pris en compte dans le protocole d'analyse des résultats. En effet, leur présence n'a pas été reliée à un quelconque facteur prédictif de rechute ou d'infiltration médullaire. Nous confirmons donc les données de la littérature, où seul les événements GD2+ $>10^3$ doivent être pris en compte. [67]

L'expression du GD2 par les cellules du NB est nécessaire pour permettre leur détection par CMF multiparamétrique selon notre protocole. L'absence d'expression du GD2 par les cellules du NB est rare mais a été décrite notamment au moment du diagnostic ou lors des récurrences chez des patients traités par des anticorps anti-GD2. [88]

Les tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET) expriment également le CD9, le CD81, le CD90 et le CD56. Seule l'expression forte du GD2 dans notre panel permet de différencier le NB de cette grande catégorie de tumeurs. Cependant, nous avons noté une expression forte du CD56 dans notre étude, comme il avait déjà été rapporté dans la littérature. [75] Inversement ce marqueur est exprimé de manière hétérogène dans les PNET. Une comparaison future de ces 2 catégories de tumeurs serait intéressante pour déterminer si notre panel, sans le GD2, serait capable de les distinguer, notamment pour étudier la sensibilité de notre panel dans le cas de NB GD2-. [67] (**Tableau IV**)

Comme le montre la représentation en diagramme en boîte, la distribution d'expression du marqueur CD9 est hétérogène, ce qui est contradictoire avec les résultats de Feirrer *et al.* de 2013, malgré l'utilisation du même clone et du même fluorochrome (issus du même fournisseur). Cependant, Nagai *et al.* en 2000, avait déjà signalé une faible expression de ce marqueur, ce qui lui avait valu son remplacement par le CD81. [74] De plus comme nous l'avons signifié auparavant le CD9 est un marqueur ubiquitaire, peu discriminant pour la distinction des cellules de NB. Son apport est minime dans ce contexte, la pertinence de ce marqueur dans notre panel, est donc à discuter.

III. Comment optimiser notre méthode ?

Après discussion avec les cliniciens sur la réalisation des prélèvements de moelle, nous avons constaté que la partie du prélèvement la plus riche (la première aspiration) était réservée à la réalisation des frottis et qu'une seconde aspiration était nécessaire pour réaliser le tube de pool de MO. Par conséquent, le pool consacré à la CMF est hémodilué par rapport à la MOp, ce qui diminue la sensibilité de notre protocole de cytométrie.

Nous avons pu noter également que lorsque les prélèvements étaient divisés en pool gauche et droite, la CMF permet d'obtenir une détection de plus faibles infiltrations. En effet, l'infiltration médullaire métastatique est hétérogène et tous les sites de prélèvement ne sont pas infiltrés dans les mêmes proportions. Le mélange de MO envahie et non envahie est tout aussi responsable d'une perte de sensibilité.

L'étude par MOp permet d'avoir une notion du site de l'infiltration (iliaque, tibia, gauche, droite,...). Le fait de rassembler les prélèvements en un pool unique fait perdre cette notion.

Une modification des modalités de prélèvement est à étudier avec les cliniciens pour permettre une amélioration de la sensibilité de notre technique par CMF. Cela implique cependant des contraintes supplémentaires au préleveur, avec une nécessité de prélever une quantité suffisante de moelle à chaque site.

Une des grandes difficultés de notre méthode par CMF est la détection des amas cellulaires. La lyse mécanique par vortexage n'est pas suffisante et il est nécessaire de l'améliorer. Une lyse enzymatique des amas par trypsine est une approche à étudier. Il faudra cependant s'assurer de l'absence de dénaturation des cellules et des antigènes de surface.

Afin de pouvoir répondre à tous les objectifs que nous nous étions fixés, une augmentation des cas est nécessaire, ce qui implique une étude plus large, multicentrique, selon un protocole clinico-biologique standardisée.

IV. Utilisation en routine dans les CHRU

Un des grands avantages de la CMF par rapport aux autres méthodes actuellement utilisées pour la détection de l'infiltration médullaire du NB (microscopie optique ou immuno-histochimie) est sa rapidité de rendu des résultats. L'immunomarquage représente une période d'une heure, l'analyse cytométrique est évaluée à une demi-heure, si bien que le délai prélèvement-rendu du résultat est généralement inférieur à une demi-journée, soit en temps réel pour la prise en charge du patient. Une utilisation en routine de ce protocole a donc un réel intérêt clinique.

Actuellement cette étude repose sur un partenariat avec la société BD[®] qui nous offre les anticorps utilisés dans notre protocole. Le coût réactif de la technique est donc limité pour le moment. Son coût de mise en place en routine reste à évaluer.

CONCLUSION

Grâce à cette étude, nous avons pu montrer que la CMF multiparamétrique permet de répondre à la question d'un envahissement tumoral métastatique, en temps réel. La prise en charge clinique adaptée peut ainsi être rapide. Cependant, l'apport de la CMF ne dispense en aucun cas de l'analyse cytologique. Le couple analytique MOp/CMF présente de nombreux avantages. Il possède de très fortes sensibilité et spécificité au moment du diagnostic initial mais également de rechute, avec un rattrapage des cas initialement négatifs lorsque la recherche était réalisée à l'aide uniquement de la cytologie. Ce couple permet ainsi de contribuer fortement au diagnostic d'exclusion devant des infiltrations atypiques. Avec sa sensibilité supérieure à l'œil humain, la perspective de ce protocole de CMF serait de pouvoir évaluer plus précisément la maladie résiduelle.

Cette étude nous a également permis de confirmer la pertinence de notre panel multiparamétrique dans la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux.

Cependant, la CMF présente encore quelques limites pré-analytiques et analytiques. Ces dernières sont des perspectives d'amélioration. Il s'agit ici de résultats préliminaires qu'il faudra étayer à l'aide d'inclusions supplémentaires dans le cadre d'une étude nationale multicentrique.

La mise au point de la CMF dans le cadre de la recherche des cellules de NB ouvre de multiples possibilités dans l'amélioration de la prise en charge thérapeutique.

L'autogreffe de cellules souches fait partie intégrante du traitement de cette pathologie, réalisée au moment de la rémission cytologique. Malheureusement les rechutes sont fréquentes, et on voit apparaître de nouvelles localisations métastatiques après les autogreffes, notamment pulmonaire. La question de la réinjection de métastases lors de l'autogreffe est légitime dans ce contexte. L'analyse du greffon à l'aide de notre protocole de CMF multiparamétrique pourrait permettre de répondre à cette question. L'élimination des cellules GD2+ du greffon, ainsi sélectionnées à l'aide d'un trieur, pourrait être rendue possible par une technique d'immuno-purification. Il serait donc intéressant de poursuivre ce travail en intégrant des échantillons de greffons de cellules souches hématopoïétiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):203–16.
2. Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O. Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2014 Nov 15;135(10):2249–61.
3. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007 Jun 23;369:2106–20.
4. Wright JH. Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. *J Exp Med*. 1910 Jul 23;12(4):556–61.
5. Maris JM. Recent Advances in Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;362(23):2202–11.
6. London WB. Evidence for an Age Cutoff Greater Than 365 Days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 22;23(27):6459–65.
7. Interiano RB, Davidoff AM. Current Management of Neonatal Neuroblastoma. *Curr Pediatr Rev*. 2015;11(3):179–87.
8. Esiashvili N, Goodman M, Ward K, Marcus RB, Johnstone PAS. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Jul;49(1):41–6.
9. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev*. 2010 May;19(3):173–81.
10. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med*. 2002 Apr 4;346(14):1047–53.
11. Yamamoto K, Ohta S, Ito E, Hayashi Y, Asami T, Mabuchi O, et al. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1209–14.

12. Woods WG, Gao R-N, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2002 Apr 4;346(14):1041–6.
13. Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Oct;4(10):795–805.
14. Heck JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2009 Mar;23(2):125–43.
15. Olshan AF, Smith JC, Bondy ML, Neglia JP, Pollock BH. Maternal vitamin use and reduced risk of neuroblastoma. *Epidemiology*. 2002 Sep;13(5):575–80.
16. Knudson AG, Strong LC. Mutation and cancer: Neuroblastoma and Pheochromocytoma. *Amer J Hum Genet*. 1972;24:514–32.
17. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):930–5.
18. Mosse YP. Anaplastic Lymphoma Kinase as a Cancer Target in Pediatric Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 26.
19. Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Oct 21;11(12):704–13.
20. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF. The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*. 1999 May 27;399(6734):366–70.
21. Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell*. 2002 Dec;2(6):447–50.
22. Daroff R, Fenichel G, Jankovic J, Mazziotta J. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012.
23. Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, Hou C, Monni S, Scott RH, et al. Chromosome 6p22 Locus Associated with Clinically Aggressive Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2585–93.
24. D'Angio GJ. Neuroblastoma Overview-1986. *Medical and Pediatric Oncology*. 1987;15:159–62.

25. Rothenberg AB, Berdon WE, D'Angio GJ, Yamashiro DJ, Cowles RA. Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison. *Pediatric Radiology*. 2009 Feb;39(2):155–60.
26. Conte M, Parodi S, De Bernardi B, Milanaccio C, Mazzocco K, Angelini P, et al. Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer*. 2006 Mar 15;106(6):1409–17.
27. Woods WG, Tuchman M, Robison LL, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson LC, et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet*. 1996 Dec 21;348(9043):1682–7.
28. Taggart D, Dubois S, Matthay KK. Radiolabeled metaiodobenzylguanidine for imaging and therapy of neuroblastoma. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Dec;52(4):403–18.
29. Temple W, Mendelsohn L, Kim GE, Nekritz E, Gustafson WC, Lin L, et al. Vesicular monoamine transporter protein expression correlates with clinical features, tumor biology, and MIBG avidity in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Mar;43(3):474–81.
30. Bleeker G, Tytgat GAM, Adam JA, Caron HN, Kremer LCM, Hooft L, et al. 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG-PET imaging for diagnosing neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;9:1–123
31. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Neuroblastoma Treatment (PDQ®): Patient Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cited 2016 Feb 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65838/>
32. Brodeur G, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224: 1121–24.
33. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313: 1111–16.
34. Morandi F, Corrias MV, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015 Jan; 1335(1):23–31.
35. Svensson K, Zeidman R, Troll r U, Schultz A, Larsson C. Protein kinase C beta1 is implicated in the regulation of neuroblastoma cell growth and proliferation. *Cell Growth Differ*. 2000 Dec;11(12):641–8.

36. Vita M, Henriksson M. The Myconcoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2006 Aug;16(4):318–30.
37. Cheung N-KV. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients With Neuroblastoma. *JAMA*. 2012 Mar 14;307(10):1062–71.
38. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*. 1999 Sep 2;18(35):4948–57.
39. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999; 340:1954–61.
40. Davidoff AM. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2012 Feb; 21(1):2–14.
41. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, et al. Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1; 27(7):1026–33.
42. Debette S. How to interpret a genome-wide association study (GWAS)? *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2012 May; (5):240–7.
43. Bosse KR, Diskin SJ, Cole KA, Wood AC, Schnepf RW, Norris G, et al. Common Variation at BARD1 Results in the Expression of an Oncogenic Isoform That Influences Neuroblastoma Susceptibility and Oncogenicity. *Cancer Research*. 2012 Apr 15;72(8):2068–78.
44. Nguyễn LB, Diskin SJ, Capasso M, Wang K, Diamond MA, Glessner J, et al. Phenotype Restricted Genome-Wide Association Study Using a Gene-Centric Approach Identifies Three Low-Risk Neuroblastoma Susceptibility Loci. Schork NJ, editor. *PLoS Genetics*. 2011 Mar 17;7(3):e1002026.
45. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993 Aug;11(8):1466–77.
46. Taggart DR, London WB, Schmidt ML, DuBois SG, Monclair TF, Nakagawara A, et al. Prognostic Value of the Stage 4S Metastatic Pattern and Tumor Biology in Patients With Metastatic Neuroblastoma Diagnosed Between Birth and 18 Months of Age. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4358–64.
47. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):298–303.

48. Shimada H, Chatten J, Newton WJ, Sachs N, Hamoudi A, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Aug; 73(2):405–16.
49. Peuchmaur M, d'Amore ESG, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: Confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003 Nov 15; 98(10):2274–81.
50. Shimada H, Ambros I, Dehner L, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer*. 1999 Jul 15; 86(2):364–72.
51. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenbom SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20; 33(27):3008–17.
52. Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr*. 2005 Feb; 17(1):7–13.
53. Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group “Survey” 1982-1992. *Eur J Cancer*. 2000 May; 36(7):901–8.
54. Strother DR, London WB, Schmidt ML, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P, et al. Outcome After Surgery Alone or With Restricted Use of Chemotherapy for Patients With Low-Risk Neuroblastoma: Results of Children’s Oncology Group Study P9641. *J Clin Oncol*. 2012 May 20; 30(15):1842–8.
55. Morgenstern DA, London WB, Stephens D, Volchenbom SL, Hero B, Di Cataldo A, et al. Metastatic Neuroblastoma Confined to Distant Lymph Nodes (stage 4N) Predicts Outcome in Patients With Stage 4 Disease: A Study From the International Neuroblastoma Risk Group Database. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 20; 32(12):1228–35.
56. Ducassou A, Gambart M, Munzer C, Padovani L, Carrie C, Haas-Kogan D, et al. Long-term side effects of radiotherapy for pediatric localized neuroblastoma: Results from clinical trials NB90 and NB94. *Strahlentherapie und Onkologie*. 2015 Jul; 191(7):604–12.
57. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Sep 30; 363(14):1324–34.

58. Stevens A, Lowe JS, Young B. Anatomie pathologique: atlas de Wheater. Bruxelles: De Boeck; 2004.
59. Komada Y, Azuma E, Kamiya H, Sakurai M. Phenotypic profile of human neuroblastoma cell lines: association with morphological characteristics. *Br J Cancer*. 1986 Oct;54(4):711-5.
60. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, and Ganglioneuroma: Radiologic-Pathologic Correlation. *Radio Graphics*. 2002 Jul; 22(4):911-34.
61. Parsons LN, Gheorghe G, Yan K, Simpson P, Jarzembowski JA. Improving Detection of Metastatic Neuroblastoma in Bone Marrow Core Biopsies: A Proposed Immunohistochemical Approach. *Pediatr Dev Pathol*. 2015 Oct 22
62. Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer*. 1995 Aug; 72(2):268-76.
63. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011 Apr;508(1):1-12.
64. Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR, Riley R, Imeson J, Pearson AD, et al. Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15; 19(6):1795-801.
65. Shapiro HM. Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry*. 1983 Jan;3(4):227-43.
66. Ronot X. La cytométrie en flux. Paris: Éditions Tec & doc Lavoisier; 2006.
67. Ferreira-Facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. Aziz SA, editor. *PLoS ONE*. 2013 Mar 5; 8(3):e55534.
68. Cheung NK, Von Hoff DD, Strandjord SE, Coccia PF. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies. *J Clin Oncol*. 1986 Mar; 4(3):363-9.
69. Cheung NK, Saarinen UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1985 Jun; 45(6):2642-9.

70. Mechttersheimer G, Barth T, Ludwig R, Staudter M, Möller P. Differential expression of leukocyte differentiation antigens in small round blue cell sarcomas. *Cancer*. 1993 Jan 1; 71(1):237–48.
71. Walker SR, Redlinger RE, Barksdale EM. Neuroblastoma-induced inhibition of dendritic cell IL-12 production via abrogation of CD40 expression. *Journal of Pediatric Surgery*. 2005 Jan;40(1):244–50.
72. Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, Haddad E, Annabi B, Duval M, et al. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway: CD133 in neuroblastoma. *Histopathology*. 2012 Jun;60(7):1144–55.
73. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer*. 1998 Feb 1;82(3):591–9.
74. Nagai J, Ishida Y, Koga N, Tanaka Y, Ohnuma K, Toyoda Y, et al. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma cells in peripheral blood using flow cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Feb;22(1):20–6.
75. Warzynski MJ, Graham DM, Axtell RA, Higgins JV, Hammers YA. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Cytometry*. 2002 Dec 15;50(6):298–304.
76. Swerts K, De Moerloose B, Dhooze C, Brichard B, Benoit Y, Laureys G, et al. Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: Comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry*. 2004 Sep; 61B:9–19.
77. Svennerholm L. The gangliosides. *J Lipid Res*. 1964 Apr; 5:145–55.
78. Wu ZL, Schwartz E, Seeger R, Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1986 Jan;46(1):440–3.
79. Cheresch DA, Rosenberg J, Mujoo K, Hirschowitz L, Reisfeld RA. Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res*. 1986 Oct; 46(10):5112–8.
80. Mujoo K, Cheresch DA, Yang HM, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res*. 1987 Feb 15; 47(4):1098–104.

81. Yoon S-O, Zhang X, Lee IY, Spencer N, Vo P, Choi YS. CD9 is a novel marker for plasma cell precursors in human germinal centers. *BiochemBiophys Res Commun*. 2013 Feb; 431(1):41-6.
82. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*. 1990 Aug; 10(8):4007-15.
83. Bryson GJ, Lear D, Williamson R, Wong R. Detection of the CD56+/CD45-immunophenotype by flow cytometry in neuroendocrine malignancies. *J Clin Pathol*. 2002 Jul; 55(7):535-7.
84. Mechtersheimer G, Staudter M, Möller P. Expression of the natural killer cell-associated antigens CD56 and CD57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors. *Cancer Res*. 1991 Feb 15; 51(4):1300-7.
85. Kemshead JT, Ritter MA, Cotmore SF, Greaves MF. Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res*. 1982 Mar 25;236(2):451-61.
86. COFRAC. SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (Portée A) / validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale. - Rév.
87. Corrias MV, Parodi S, Haupt R, Lacitignola L, Negri F, Sementa AR, et al. Detection of GD2-positive cells in bone marrow samples and survival of patients with localized neuroblastoma. *British Journal of Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):263-9.
88. Schumacher-Kuckelkorn R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Lacking immunocytological GD2 expression in neuroblastoma: report of 3 cases. *Pediatr Blood Cancer*. 2005 Aug;45(2):195-201.

ANNEXES

Annexe 1: Tableaux des résultats en nombre d'événements et comparaison avec les résultats en microscopie et de la BOM

Patient	Date	Indication	Nombre total d'événements	CD45-	GD2+ Fort	CD9+	CD56+	CD81+	CD90+	Microscopie optique	BOM
A	02/05/2014	Diagnostic	103658	10669	1	0	0	1	1	Négatif	Négatif
B	05/09/2014	Suivi	115890	19954	6	5	6	6	6	Négatif	Négatif
C	12/12/2013	Suivi	250000	18960	2	2	2	2	0	Négatif	Positif
	12/09/2014	Suivi	127512	23134	0	0	1	2	0	Positif	Positif
D	16/08/2014	Diagnostic	104108	7345	0	0	0	0	0	Négatif	Négatif
E	17/12/2014	Diagnostic	10000	5983	2395	1665	2392	2127	17	Positif	Positif
	28/01/2015	Suivi	1010000	19169	6	1	5	5	0	Positif	Non réalisée
	16/03/2015	Suivi	651222	10620	5	4	3	3	3	Positif	Positif
	22/05/2015	Suivi	1055512	153055	3	1	1	1	1	Positif	Positif
	09/07/2015	Suivi	1074077	245483	13	6	12	11	11	Négatif	Positif
	09/07/2015	Suivi	1068613	244406	10	4	9	9	9	Négatif	Négatif
	09/10/2015	Suivi	1115012	174480	4	3	3	2	4	Positif	Négatif
	25/11/2015	Suivi	965929	125634	4	2	4	4	3	Négatif	Positif
	25/11/2015	Suivi	677970	100517	3	1	3	3	3	Négatif	Positif
	11/01/2016	Suivi	1081563	184024	2	1	2	2	1	Négatif	Non réalisée
F	14/11/2013	Diagnostic	105664	13791	779	730	750	670	610	Positif	Négatif (sous réserve)
	27/12/2013	Suivi	109111	5185	2	2	0	2	2	Négatif	Non réalisée
	18/02/2014	Suivi	105249	16513	0	0	0	0	0	Positif	Négatif (sous réserve)
	14/08/2014	Suivi	124675	42134	0	0	0	0	0	Négatif	Positif

	07/11/2014	Suivi	236409	40096	0	0	0	0	0	Négatif	Négatif
	09/01/2015	Suivi	10000	1368	0	0	0	0	0	Négatif	Positif
	27/04/2015	Suivi	1203282	185226	0	0	0	0	0	Négatif	Négatif
	17/07/2015	Suivi	1116063	259825	2	1	2	1	2	Négatif	Négatif
	02/09/2015	Suivi	866778	114031	3	2	3	3	3	Négatif	Négatif
	10/11/2015	Suivi	147405	56325	42326	41669	41161	41904	41916	Positif	Non réalisée
G	31/07/2015	Diagnostic	1108657	104927	72	40	70	72	72	Négatif	Non contributive
H	13/03/2015	Diagnostic de rechute	964788	82453	1132	1043	1106	1115	1113	Positif	Positif
	04/05/2015	Suivi	1032207	96126	531	480	524	509	515	Positif	Positif
I	11/06/2015	Diagnostic	1091001	144156	1	0	1	1	1	Négatif	Négatif
J	03/12/2014	Suivi	1106251	161448	76	65	74	76	76	Négatif	Non réalisée
K	16/09/2014	Diagnostic	133877	23707	1052	935	1042	1019	1023	Positif	Non réalisée
	12/12/2014	Suivi	40260	7304	4	4	3	4	3	Négatif	Non réalisée
	01/04/2015	Suivi	1338767	183648	2	0	2	1	2	Négatif	Non réalisée
	23/04/2015	Suivi	1065592	112429	1	0	0	1	1	Négatif	Non réalisée
	23/04/2015	Suivi	1000000	79688	0	0	0	0	0	Négatif	Non réalisée
	09/11/2015	Suivi	1285444	45856	0	0	0	0	0	Négatif	Non réalisée
L	31/07/2014	Diagnostic de rechute	135432	19036	9416	9165	8842	9312	9128	Positif	Positif
M	13/01/2016	Diagnostic	1139602	123262	1	0	0	1	0	Négatif	Non réalisée

GD2+ Fort > 10³

Patient	Date	Indication	Nombre total d'événements	CD45-	GD2+ Faible	CD9+	CD56+	CD81+	CD90+
A	02/05/2014	Diagnostic	103658	10669	10	0	5	10	9
B	05/09/2014	Suivi	115890	19954	23	13	21	23	23
C	12/12/2013	Suivi	250000	18960	12	5	5	7	3
	12/09/2014	Suivi	127512	23134	0	0	0	0	0
D	16/08/2014	Diagnostic	104108	7345	0	0	0	0	0
E	17/12/2014	Diagnostic	10000	5983	3384	1546	3264	3336	3
	28/01/2015	Suivi	1010000	19169	100	0	93	66	1
	16/03/2015	Suivi	651222	10620	70	34	48	53	45
	22/05/2015	Suivi	1055512	153055	29	12	18	22	21
	09/07/2015	Suivi	1074077	245483	144	60	112	138	132
	09/07/2015	Suivi	1068613	244406	228	100	153	203	187
	09/10/2015	Suivi	1115012	174480	50	28	38	43	41
	25/11/2015	Suivi	965929	125634	80	22	71	77	73
	25/11/2015	Suivi	677970	100517	84	35	72	84	80
	11/01/2016	Suivi	1081563	184024					
F	14/11/2013	Diagnostic	105664	13791	773	92	134	118	95
	27/12/2013	Suivi	109111	5185	2	2	0	2	2
	18/02/2014	Suivi	105249	16513	44	5	3	5	10
	14/08/2014	Suivi	124675	42134	6	4	1	3	6
	07/11/2014	Suivi	236409	40096	16	3	2	2	2
	09/01/2015	Suivi	10000	1368	0	0	0	0	0
	27/04/2015	Suivi	1203282	185226	27	9	12	16	15
	17/07/2015	Suivi	1116063	259825	17	1	0	7	5
	02/09/2015	Suivi	866778	114031	20	4	8	13	13

	10/11/2015	Suivi	147405	56325	6911	3818	850	4547	5482
G	31/07/2015	Diagnostic	1108657	104927	290	114	202	263	262
H	13/03/2015	Suivi	964788	82453	777	448	303	597	462
	04/05/2015	Suivi	1032207	96126	494	254	227	314	258
I	11/06/2015	Diagnostic	1091001	144156	75	24	55	71	45
J	03/12/2014	Suivi	1106251	161448	452	349	382	430	397
K	16/09/2014	Diagnostic	133877	23707	747	187	156	387	640
	12/12/2014	Suivi	40260	7304	50	28	40	49	48
	01/04/2015	Suivi	1338767	183648	144	66	97	137	133
	23/04/2015	Suivi	1065592	112429	134	84	105	130	125
	23/04/2015	Suivi	1000000	79688	27	11	17	26	24
	09/11/2015	Suivi	1285444	45856	15	10	8	12	12
L	31/07/2014	Suivi	135432	19036	669	197	104	453	344

GD2+ Faible < 10³

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 16 juin 2016

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : MANENQ Christine

Sujet : Evaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique.

Jury :

Président : Mme. Béatrice FAIVRE, PU
Directeurs : Mme. Véronique LATGER-CANNARD, PH
M. Julien BROSEUS, AHU
Juges : M. Pascal CHASTAGNER, PU-PH
M. Jean-Louis MERLIN, PU-PH

Vu,

Nancy, le 03 mai 2016.

Le Président du Jury : Mme Béatrice FAIVRE

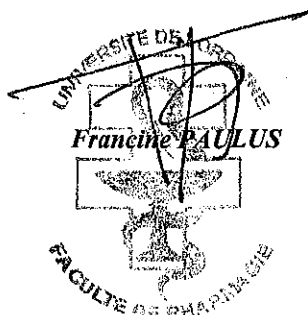
Directeurs de Thèse : Mme Véronique LATGER-CANNARD et
M. Julien BROSEUS

C.H.U. NANCY
Service d'Hématologie Biologique
Secteur de Cytologie
Dr V. LATGER-CANNARD
54511 Vandœuvre les Nancy CEDEX
Tél. 03 83 15 37 64

Julien BROSEUS
Service d'Hématologie Biologique
Secteur de Cytologie
54511 Vandœuvre les Nancy CEDEX

Vu et approuvé,

Nancy, le 18.05.2016

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 30 MAI 2016

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 9118.

N° d'identification :

TITRE

Évaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique

**Thèse soutenue le 16.06.2016
Par Christine MANENQ**

RESUME :

Objectif : Bien que l'incidence des neuroblastomes soit rare, la recherche d'un envahissement métastatique médullaire pose régulièrement problème au diagnostic et lors des bilans de suivi. L'identification morphologique en microscopie optique est parfois difficile, en particulier lorsque les cellules sont isolées, et lorsque l'infiltration est faible. Notre objectif a été d'évaluer les performances de la cytométrie en flux multiparamétrique pour la détection des cellules métastatiques du neuroblastome. **Matériels et Méthodes :** Nous avons étudié un panel multiparamétrique permettant l'analyse de la co-expression de marqueurs de surface : GD2 (disialoganglioside 2), CD9, CD56, CD81, CD90 sur la population CD45 négative. **Résultats :** L'analyse cytométrique de 36 pools de moelle osseuse de 13 enfants a permis d'identifier une infiltration tumorale pour 10 échantillons. Les cellules GD2+ co-expriment dans tous les cas les marqueurs étudiés. **Discussion-Conclusion :** Ces résultats préliminaires illustrent les performances de l'analyse cytométrique pour détecter l'infiltration métastatique du neuroblastome. Elle permet de répondre à la question d'un envahissement métastatique, en temps réel, permettant une prise en charge clinique adaptée et rapide, en complément de l'analyse par microscopie optique. L'analyse de prélèvements supplémentaires dans le cadre de l'étude nationale multicentrique permettra d'étayer ces résultats.

MOTS CLES : CMF, GD2, NEUROBLASTOME

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Véronique Latger-Cannard et Julien Broséus	Service d'hématologie biologique – CHRU de Nancy	Expérimentale	X
		Bibliographique	<input type="checkbox"/>
		Thème	5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

2 – Hygiène/Environnement

3 – Médicament

4 – Alimentation – Nutrition

5 - Biologie

6 – Pratique professionnelle