

COLORATION DES MÉGACARYOCYTES (CODE 20804)

Avis d'évaluation

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1 Demandeur : Hôpital Notre-Dame du CHUM.

1.2 Date de demande d'examen : 17 août 2012.

1.3 Date de transmission de l'avis au ministre : 12 avril 2013.

Mise en garde :

Le présent avis est fondé sur les informations scientifiques et commerciales [déposées par le(s) demandeur(s) ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire] selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE(S)

2.1 Nom de la technologie

Coloration de mégacaryocytes par immunocytochimie¹ sur lame de culture de mégacaryocytes (MK) (test quantitatif pour nombre de colonies mégacaryocytaires). La culture de progéniteurs mégacaryocytes est enregistrée dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* sous le code 20632.

2.2 Description brève de la technologie

La technologie proposée par le demandeur (MegaCult™-C collagène avec cytokines) a été mise au point par la compagnie StemCell Technologies (numéros de catalogue 04901 et 04951). La trousse est destinée à optimiser la quantification de progéniteurs de mégacaryocytes CFU-MK (*Colony Forming Unit Mégakaryocyte*) obtenus par culture à partir d'échantillons de moelle osseuse, de sang périphérique ou de sang du cordon. Parmi ses différentes composantes mentionnons les suivantes :

¹ L'immunocytochimie consiste à détecter la présence de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps sur des cellules vivantes (ou sur des tissus – on parle alors d'immunohistochimie). Si la protéine est à l'intérieur de la cellule (et non à la surface), il faudra fixer et perméabiliser les cellules avant l'immuno-détection.

- un milieu de culture qui est un substitut de sérum afin de minimiser les effets inhibiteurs de facteurs tels que le TGFβ² se trouvant dans les sérums utilisés pour d'autres lignées hématopoïétiques;
- une solution de collagène pour une croissance optimale des progéniteurs de MK, contenant une combinaison des cytokines qui stimulent la formation de colonies de MK : TPO, IL-3, IL-6, IL-11 et *stem cell factor* (SCF).

La trousse utilise des chambres de culture sur lame qui permettent l'incubation, la fixation et le marquage des cellules de toute la culture sur la même lame. Le marquage des CFU-MK s'effectue avec un anticorps primaire anti-GPIIb/IIIa (CD41), un anticorps secondaire biotinylé et un système de détection phosphatase alcaline conjuguée à l'avidine afin d'amplifier le signal primaire.

Les colonies colorées sont examinées au microscope et classées en trois catégories : colonies de mégacaryocytes (CFU-MK), colonies MK mixtes (contenant d'autres lignées) ou colonies sans MK. Les MK et plaquettes, qui expriment GPIIb/IIIa (CD41), montrent un marquage membranaire rose et des noyaux bleu pâle en raison de la contre-coloration au bleu Evans. Les colonies peuvent alors être classées selon leur taille : petites (de 3 à 20 cellules par colonie) découlant de progéniteurs plus matures; moyennes (de 21 à 40 cellules par colonie) ou larges (≥ 50 cellules par colonie) découlant de progéniteurs plus primitifs (selon le manuel technique du fabricant).

2.3 Société ou développeur

StemCell Technologies Inc. Plusieurs trousse MegaCult-C Medium de cette même compagnie sont disponibles : avec cytokines, sans cytokines et avec lipides.

2.4 Licence(s) : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (*Santé Canada, FDA*)

Les trousse MegaCult ne sont pas homologuées par Santé Canada. Le manuel technique indique qu'elles sont réservées à la recherche. Des validations internes sont nécessaires.

La FDA a refusé l'importation des différents produits de StemCell Technologies le 3 octobre 2002 en raison d'un problème de contamination (*Operational and Administrative System for Import Support* ou OASIS³). Il n'y a aucun autre détail disponible sur ce refus ni de mises à jour de ces informations.

2.7 Valeur pondérée : 284,83 (valeur pondérée dans le Répertoire 2012-2013 : 187,0).

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Les patients qui présentent une thrombocytose ou une thrombocytopénie inexpiquée avec suspicion de thrombocythémie essentielle (TE).

² TGFβ : *transforming growth factor beta*.

³ U.S. Food and Drug Administration. Refusal Details as Recorded in OASIS by FDA for Refusal 112-1075661-6/4/1 [site Web]. Disponible à : http://www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=112-1075661-6&DocId=4&LineId=1&SfxId=.

3.2 Description de la ou des maladies visée(s)

L'analyse vise le diagnostic de thrombocythémie essentielle (TE), maladie du groupe des syndromes myéloprolifératifs⁴. La TE est caractérisée par la prolifération de la lignée mégacaryocytaire au niveau de la moelle osseuse en raison d'une atteinte clonale de la cellule souche multipotente. Par conséquent, on observe à l'hémogramme une augmentation du taux de plaquettes sanguines ($> 450 \times 10^9/\text{litre}$) d'une durée de plus de six mois, selon les critères de diagnostic de la TE révisés par l'OMS en 2008 [Harrison *et al.*, 2010] (voir l'ensemble des critères en annexe).

La TE est un diagnostic d'exclusion puisqu'il n'y a pas d'examen spécifique à cette maladie. Le défi est de distinguer la TE de l'hyperplaquettose secondaire (HPS) ou réactionnelle à une maladie sous-jacente (p. ex, maladie inflammatoire et carence en fer) et des autres syndromes myéloprolifératifs (leucémie myéloïde chronique, polycythémia vera et splénomégalie myéloïde). Sur le plan clinique, la TE est asymptomatique dans 40 % des cas ou présente des manifestations hémorragiques dans 22 % des cas et thrombotiques dans 33 % des cas [Andrieu *et al.*, 1997]. Les patients atteints d'une forme asymptomatique de TE peuvent avoir une espérance de vie similaire à celles de sujets non atteints. Le pronostic vital de la TE est mis en jeu par le risque de survenue des manifestations thrombo-hémorragiques, de transformation leucémique ou d'évolution vers la myélofibrose [Serraj *et al.*, 2012].

3.3 Nombre de patients visés

Le volume prévu est de 3 patients aux 3 mois (environ 15 patients par année) pour les 3 prochaines années. L'incidence de la TE au Québec est de 1 à 2,5 cas pour 100 000 habitants (information fournie par le demandeur).

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant)

Hématologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Cette analyse nécessite un prélèvement de moelle osseuse pratiqué par un hématologue. Elle est réalisée exclusivement par le CHUM, qui ne l'offre pas à d'autres établissements⁵.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique : unique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Selon les critères de l'OMS révisés en 2008, la biopsie de moelle osseuse avec étalement coloré au Wright-Giemsa ou similaire est l'examen diagnostique de confirmation d'une néoplasie myéloproliférative, dont la TE (elle confirme la présence d'une hyperplasie médullaire de la lignée mégacaryocytaire et la présence de dystrophie cytologique⁶) [Vardiman *et al.*, 2009]. Elle permet

⁴ Groupe de quatre maladies caractérisées par une surproduction d'un ou de plusieurs types de cellules du sang pouvant s'accompagner ou non de fibrose au sein de la moelle osseuse.

⁵ Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Laboratoires - Culture des mégacaryocytes [site Web]. Disponible à : http://chumontreal.com/laboratoires/index.php?option=com_content&view=article&id=1994%3A5-hiaa-acide-5-hydroxyindol-acetique&catid=34%3AAanalysesbio&Itemid=58.

⁶ La présence de mégacaryocytes de grande taille, à noyau d'aspect polylobé, le plus souvent regroupés en amas (trois cellules ou plus).

de distinguer la TE des hyperplaquetoses secondaires et d'éliminer les autres syndromes myéloprolifératifs.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les fondements de cette technique ne sont pas récents. Celle-ci repose sur la détection de la lignée de progéniteurs de mégacaryocytes grâce à l'expression membranaire de la GPIIb/IIIa (CD41) [Hogge *et al.*, 1997]. Le marqueur est spécifique de la lignée mégacaryocytaire [Jean-Pierre, 2005]. L'avantage de la trousse est l'utilisation du collagène comme agent gélifiant qui ne nécessite pas de matériel de laboratoire spécialisé et qui permet également d'éviter l'exposition des cellules à des températures élevées [StemCell Technologies, 2010]. La solution de collagène et les autres composantes de la trousse permettent une croissance optimale des progéniteurs de mégacaryocytes.

De plus, l'utilisation de milieux de culture commercialisés favorise la standardisation de la méthode et améliore la reproductibilité inter et intra laboratoires [Mondet, 2011].

4.4 Le coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : aucun.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Trois études ont utilisé des trousses MegaCult™ (StemCell Technologies) pour le diagnostic de TE [Escoffre-Barbe *et al.*, 2006; Dobo *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2001]. Ces études ont abordé la valeur diagnostique de la culture endogène (sans cytokines) de colonies de mégacaryocytes détectées par coloration immunocytochimique avec l'anticorps monoclonal anti-CD41 (anti-GPIIb/IIIa) [Escoffre-Barbe *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2001] ou par May-Grünwald-Giemsa [Dobo *et al.*, 2004]. Leur analyse est fondée sur une approche comparative des résultats de la croissance mégacaryocytaire avec ou sans cytokines et n'aborde pas les avantages d'une coloration par immunocytochimie.

Dans l'étude multicentrique de Dobo et ses collaborateurs [2004], la culture sur milieu semi-solide à base de collagène a été réalisée à partir d'échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique (n=121). Les échantillons ont été placés dans trois milieux de culture : 1) MegaCult avec lipides et collagène humain, sans sérum ni cytokines; 2) milieu de culture témoin, avec ajout de différentes cytokines (interleukines IL-3, IL-6, *Stem cell factor*, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *Granulocyte Colony-Stimulating factor* (G-CSF) et érythropoïétine pour la croissance des progéniteurs érythrocytaires (*Burst Forming Unit Erythroid* ou BFU-E); et 3) milieu de culture témoin, avec cytokines (interleukines IL-6, IL-3 et thrombopoïétine) pour la croissance des progéniteurs mégacaryocytaires (CFU-MK). La coloration des mégacaryocytes a été faite avec la méthode classique de May-Grünwald-Giemsa. Selon les auteurs, l'identification des CFU-MK colorées (> 4 mégacaryocytes) est aussi précise que le marquage immunocytochimique avec anti-CD41/61.

La culture de progéniteurs (milieu avec collagène, sans sérum et sans cytokines) prélevés de la moelle osseuse confirme que la formation des colonies de progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires endogènes est spécifique à la TE (retrouvés dans 77,8 % et 33,3 % des cas, respectivement). Aucune colonie endogène n'a été observée chez les patients atteints de HPS. Dans le sang périphérique, la présence de colonies mégacaryocytaires endogènes est observée dans les

cas de TE et d'HPS (87,8 % et 53,1 %, respectivement) alors que les colonies érythrocytaires sont observées dans les TE (25,7 %) mais pas dans les HPS (0 %). Ces résultats confirment que cette méthode permet un diagnostic différentiel entre la TE et l'HPS. Dans les groupes témoin (avec cytokines), aucune différence n'a été observée chez les patients atteints de TE et d'HPS, autant à partir de la culture de cellules de moelle osseuse que de sang périphérique. Ces résultats montrent donc une très bonne spécificité (100 %) et sensibilité (80,2 %) de la culture spontanée (sans cytokines) avec coloration au May Grünwald-Giemsa pour le diagnostic de TE sur des progéniteurs mégacaryocytaires endogènes isolés à partir de moelle osseuse.

Mi et ses collaborateurs [2001] ont utilisé un milieu de culture semi-solide à base de collagène sans sérum ni cytokines et ensuite en présence de diverses concentrations de thrombopoïétine (TPO), pour le diagnostic de TE, à partir d'échantillons de moelle osseuse (29 patients et 7 témoins sains). La coloration a été faite en immunocytochimie en utilisant l'anticorps monoclonal anti-CD41 (Immunotech). Les résultats montrent une culture positive chez 100 % des 11 patients atteints de TE et chez aucun des 6 patients atteints de HPS ($p=0,002$) confirmés par le groupe de volontaires sains ($p=0,0007$). La culture était positive chez 33 % (4/12) des patients atteints de PV. L'ajout de TPO à concentration croissante (0,5 ng/ml, 5ng/ml, 50 ng/ml) ne permet pas de discriminer parmi les diagnostics. Les auteurs concluent que la méthode incluant un milieu à base de collagène et sans sérum ni cytokines permet le diagnostic différentiel entre la TE et la HPS.

La troisième étude a analysé la capacité de la culture endogène mégacaryocytaire à distinguer la TE de la polycythémia vera (PV) à partir d'une biopsie de moelle osseuse. La croissance des CFU-MK en absence et en présence de cytokines (TPO, IL-3, IL-6) a été analysée sur un milieu à base de collagène (MegaCult). Après 14 jours, les colonies formées (3 cellules ou plus) ont été visualisées par immunocoloration (anticorps monoclonal anti-CD41 et phosphatase alcaline). La croissance spontanée de CFU-MK est similaire entre les deux diagnostics et observée chez 95,2 % (40/42) des cas de TE par rapport à 94,0 % (47/50) des cas de PV. Les auteurs concluent que la méthode est utile pour détecter la TE et la PV, mais non pour discriminer entre les deux [Escoffre-Barbe *et al.*, 2006].

En résumé, les études ne font pas la distinction entre les résultats associés à la méthode de culture et ceux associés à la méthode de coloration des mégacaryocytes. Aucune comparaison directe entre la méthode classique de May Grünwald-Giemsa et l'immunocytochimie n'a été repérée.

5.1.3 Valeur thérapeutique : aucune information spécifique.

5.2 Validité clinique

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	x		
Spécificité	x		
Valeur prédictive positive (VPP)		x	
Valeur prédictive négative (VPN)		x	
Rapport de vraisemblance (LR)		x	
Courbe ROC		x	
Exactitude		x	

Méthode de culture à partir d'une biopsie médullaire de colonies endogènes mégacaryocytaire/érythrocytaire; coloration par méthode classique de May-Grünwald-Giemsa [Dobo *et al.*, 2004] :

- sensibilité : 80,2 % pour le diagnostic de TE;
- spécificité : 100 % pour le diagnostic de TE.

Méthode de culture à base de collagène, sans sérum ni cytokines à partir d'une biopsie de moelle osseuse; immunocoloration, en utilisant l'anticorps monoclonal anti-CD41 (Immunotech) [Mi *et al.*, 2001] :

- sensibilité : 100 % pour le diagnostic de TE;
- sensibilité : 33 % pour le diagnostic de PV;
- discrimination parfaite avec le HPS et les témoins sains.

Méthode de culture spontanée de colonies mégacaryocytaires à partir d'une biopsie médullaire; immunocoloration (anticorps monoclonal anti-CD41 et phosphatase alcaline) [Escoffre-Barbe *et al.*, 2006] :

- sensibilité de 95 % pour le diagnostic de TE;
- sensibilité de 94 % pour le diagnostic de PV;
- aucune capacité de discrimination entre les deux diagnostics.

5.3 Validité analytique (ou technique)

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		x	
Reproductibilité		x	
Sensibilité analytique		x	
Spécificité analytique		x	
Effet de matrice		x	
Concordance		x	
Corrélation		x	

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

Le guide de pratique du Royaume-Uni sur la thrombocythémie essentielle [Harrison *et al.*, 2010] n'aborde pas l'utilité diagnostique d'une coloration par immunocytochimie sur culture de mégacaryocytes et ne fait aucune recommandation sur le sujet.

6 RÉPERCUSSIONS À ANTICIPER DE L'INTRODUCTION ÉVENTUELLE DE L'ANALYSE

- 6.1 Impact sur les ressources matérielles et humaines :** n'a pas été analysé.
- 6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois :** n'ont pas été analysées.
- 6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique) :** n'ont pas été analysés.

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Coloration des mégacaryocytes (code 20804)

Le statut de la technologie diagnostique :

- ☒ Établie
- ☐ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS :

- ☒ Avis de recommandation de maintien
- ☐ Avis de refus de maintien
- ☐ Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle :

- ☐ Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- ☐ Décision de production d'un guide d'usage optimal
- ☐ Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance

ANNEXE A

Tableau A1 Critères diagnostiques de l'Organisation mondiale de la santé (2008) (adapté de Tefferi *et al.*, 2009)

	PV	TE	MFP
Critères majeurs	1. Un des critères suivants de polyglobulie : a) Hgb > 18,5 g/dL (hommes) ou > 16,5 g/dL (femmes); b) Hgb > 17 g/dL (hommes) ou > 15 g/dL (femmes); si associés avec une augmentation de ≥ 2 g/dL par rapport à la valeur basale et qu'on ne peut attribuer cette augmentation à la correction d'une carence en fer; c) Hb/Ht supérieurs au 99e percentile de référence pour l'âge, le sexe, et l'altitude de résidence; d) masse érythrocytaire > 25 % au-dessus de la valeur moyenne normale prédite. 2. Présence de la mutation V617F de JAK2 ou d'une autre mutation aux conséquences similaires.	1. Compte plaquettaire $\geq 450 \times 10^9/L$. 2. Prolifération mégacaryocytaire avec MK matures de grande taille. Pas ou peu de prolifération érythrocytaire ou granulocytaire. 3. Pas de critère OMS pour LMC, PV, MFP, SMD ou autre néoplasie myéloïde. 4. Présence de la mutation JAK2V617F OU d'un autre marqueur clonal OU absence d'argument pour une thrombocytose réactionnelle.	1. Prolifération et atypies mégacaryocytaires (MK de taille variable, avec un rapport nucléo-cytoplasmique aberrant, un noyau hyperchromatique irrégulier. Ces atypies sont accompagnées soit : a) d'une fibrose reticulinique et/ou collagène; b) d'une hypercellularité avec prolifération granulocytaire et souvent diminution érythrocytaire. 2. Pas de critère OMS pour LMC, PV, SMD ou autre néoplasie myéloïde. 3. Un des éléments suivants : a) présence de la mutation JAK2V617F; b) mise en évidence d'un autre marqueur clonal; c) pas d'argument pour une fibrose d'étiologie réactionnelle.
Critères mineurs	1. Prolifération des trois lignées myéloïdes. 2. Érythropoïétine sérique inférieure à la normale. 3. Croissance de colonies érythroïdes endogènes.		1. Leucoérythroblastose. 2. Augmentation de LDH sérique. 3. Anémie. 4. Splénomégalie palpable.
Diagnostic	Les 2 critères majeurs et 1 critère mineur OU le premier critère majeur et 2 critères mineurs	Les 4 critères majeurs	Les 3 critères majeurs et 2 critères mineurs.

Abréviations : Hgb : hémoglobine; LDH : lactate déshydrogénase; LMC : leucémie myéloïde chronique; MFP : myélofibrose primaire; OMS : Organisation mondiale de la santé; PV : polycythémia vera; SMD : syndrome myélodysplasique; TE : thrombocythémie essentielle.

RÉFÉRENCES

- Andrieu J-M, Colonna P, Lévy R. Cancers : guide pratique d'évaluation, de traitement et de surveillance. Paris, France : ESTEM; 1997.
- Dobo I, Boiret N, Lippert E, Girodon F, Mossuz P, Donnard M, et al. A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004;89(10):1207-12.
- Escoffre-Barbe M, Amiot L, Beaucournu P, Jegou P, Grulois I, Grosbois B, et al. Spontaneous megakaryocytic colony formation does not discriminate between essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2006;81(7):554-6.
- Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *Br J Haematol* 2010;149(3):352-75.
- Hogge D, Fanning S, Bockhold K, Petzer A, Lambie K, Lansdorp P, et al. Quantitation and characterization of human megakaryocyte colony-forming cells using a standardized serum-free agarose assay. *Br J Haematol* 1997;96(4):790-800.
- Jeanpierre S. Rôle des molécules de la famille du TGF- β dans la mégacaryopoïèse. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de l'École pratique des hautes études. Lyon, France : École pratique des hautes études (EPHE). Disponible à : http://www.ephe.sorbonne.fr/images/stories/scd_ephe/monographies_svt/biol_cell_mol/ephe_dip_jeanpierre_rdv05.pdf.
- Mondet J. Caractérisation clinique et biologique d'une population de l'arc alpin présumée atteinte d'un néoplasme myéloprolifératif Philadelphie négatif : apport respectif des différents marqueurs biologiques. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme d'État de docteur en pharmacie. Grenoble, France : Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble; 2011. Disponible à : http://dumas.ccsd.cnrs.fr/docs/00/64/10/42/PDF/2011GRE17046_mondet_julie_1_D_.pdf.
- Mi JQ, Blanc-Jouvan F, Wang J, Sotto MF, Cousin F, Castinel A, et al. Endogenous megakaryocytic colony formation and thrombopoietin sensitivity of megakaryocytic progenitor cells are useful to distinguish between essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10(3): 405-9.
- Serraj K, Mecili M, Azzouzi H, Ghiura CF, Andres E. Les thrombocytoses : physiopathologie, diagnostic et traitement. *Médecine Thérapeutique* 2012;18(1):11-20.
- StemCell Technologies. MegaCult® -C: Assays for quantitation of human and mouse megakaryocytic progenitors. Version 3.3.0. Vancouver, BC : StemCell Technologies Inc.; 2010. Disponible à : http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/1/28413MAN_3_3_0.pdf.
- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: Order out of chaos. *Cancer* 2009;115(17):3842-7.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.