

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté de médecine de Sétif
Département de Médecine



THESE

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR
EN SCIENCES MEDICALES**

Présentée à la faculté de médecine de Sétif

Par

Docteur Hamouda Hakim

Maître Assistant en Hématologie

**IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES
PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

Jury de thèse

Président : Professeur GRIFI Fatiha (Université Badji Mokhtar d'Annaba)

**Directeur de thèse : Professeur HAMDI-LEZZAR- Selma
(Université Ferhat Abbas Sétif 1)**

Assesseurs :

Professeur MESLI Naima (Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen)

Professeur DJABI Farida (Université Ferhat Abbas 1 de Sétif)

Soutenue le 17 Mars 2019

Remerciements

A la mémoire de mon père Aissa, ma mère Benseghir Torkia, ma belle mère Boumazbar Djamila et mon maitre le professeur Benlatrache Khoudir

A ma femme Samia et à mes enfants (Takieddine et Seradjeddine), qu'ils trouvent dans ce travail le faible témoignage de mon affection

A mon beau père

A mes frères, mes sœurs et leurs enfants

A mes beaux frères, belles sœurs et leurs enfants

A toute ma famille

A Monsieur le Professeur Brahim Mohamed, qui était mon formateur sur les principes de la cytométrie. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A toute l'équipe médicale et para médicale du service d'hématologie

A tous les patients d'hématologie avec lesquels je partage leurs moments de douleurs et de lutte pour un espoir de guérison

A tous mes amis

Remerciements

A Madame le Professeur HAMDI- LEZZAR Selma

De la faculté de médecine de Sétif et chef de service d'hématologie.

A qui j'exprime ma profonde gratitude et reconnaissance pour son encadrement, ses encouragements et sa rigueur tout au long de ce travail. Sans vous, cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Trouvez, ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Professeur GRIFI Fatiha

De la faculté de médecine d'Annaba et chef de service d'hématologie. Je vous remercie d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance. Ça me fait un immense honneur. Soyez assurée de mes vifs remerciements.

A Madame le Professeur MESLI Naima

De la faculté de médecine de Tlemcen et chef de service d'hématologie, Merci, pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de notre jury. Merci de vos remarques et vos orientations. Soyez assurée de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur DJABI Farida

De la faculté de médecine de Sétif et chef de service du laboratoire central du CHU de Sétif. Merci, pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de notre jury et d'avoir examiné ce travail. Soyez assurée de mon respect et mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
---------------------	---

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1. PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

1. 1 GENERALITES	3
1. 2 HISTOIRE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)	3
1. 3 COMPARTIMENT FLUIDIQUE	4
1. 4 EXCITATION LUMINEUSE	6
1. 5 COMPARTIMENT OPTIQUE	7
1. 6 COMPARTIMENT ELECTRONIQUE	8
1. 6 .1 Le détecteur	9
1. 6. 2 Le traitement de l'impulsion	9
1. 6. 3 La digitalisation du signal	10
1. 7 FLUOROCHROMES	11
1.7.1 Principe de la fluorescence	11
1.7.2Caractéristiques spectrales des fluorochromes	11
1.7.2.1 Rendement quantique	11
1.7.2.2 Spécificité	11
1.7.2.3 Accessibilité	12
1.7.2.4 Toxicité	12
1.7.2.5 Photo- destruction	12
1.7.2.6 Transfert d'énergie	12
1. 8 REGLAGES DE L'APPAREIL	13
1. 8.1 Réglages des PMT et du seuil	13
1. 8.2 Réglages des compensations	15
1. 9 INTERPRETATION DES RESULTATS	17
1.10 SECURITE DANS UN LABORATOIRE DE CMF	18

CHAPITRE 2. TECHNIQUE ET ANALYSE

2.1 PRELEVEMENTS	20
2.1. 1 Sang périphérique	20
2.1. 2 Moelle Osseuse	20
2.1. 3 Liquides biologiques	20
2.2 MOYENS MATERIELS	21
2. 2.1 Réactifs	21
2. 2.2 Séparation des cellules	22
2. 2.2.1 Séparation des cellules du sang périphérique	23
2. 2.2.2 Séparation des cellules de la moelle osseuse	23
2.3 MARQUAGE CELLULAIRE	23
2. 3.1 Marquage de surface	23
2. 3.1.1 Marquage cellulaire en immunofluorescence indirecte	24
2. 3.1.2 Marquage cellulaire en immunofluorescence directe	24
2. 3.1.3 Détection des immunoglobulines de surface	25
2. 3.2 Marquage des antigènes intra cytoplasmique	25

2.4 FIXATION	27
2. 4.1 Fixation de cellules par le formol	27
2. 4.2 Fixation de cellules par le para formaldéhyde	27
2.5 ANALYSE DE L'ECHANTILLON EN CMF	28
2. 5.1 Evaluation de la fréquence d'une population cible	29
2. 5.2 Numération en valeur absolue	29
2. 5.3 Expression d'un antigène par une sous population	29
2. 5.4 Intérêt du CD45 dans la discrimination des populations	30

CHAPITRE 3. LEUCEMIES AIGUES ET APPLICATION DE LA CMF

3.1 DEFINITION	32
3.2 CLASSIFICATIONS DES LEUCEMIES AIGUES (LA)	32
3. 2.1 CLASSIFICATION FAB	32
3. 2. 1.1 Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	32
3. 2. 1.2 Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)	38
3. 2.2 CLASSIFICATION OMS	39
3. 2. 2.1 Leucémies aiguës myéloïdes	39
3. 2. 2.2 Leucémies aiguës lymphoblastiques	41
3.3 IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES	41
3.3.1 Profil des cellules leucémiques	42
3.3.2 Panels de classification des leucémies aiguës (LA)	42
3.3.2.1 Panel obligatoire de dépistage	42
3.3.2.2 Panel complémentaire	43
3.3.3 Phénotype des LAM	43
3.3.3.1 Leucémie aiguë myéloïde peu différenciée (LAM0)	43
3.3.3.2 Leucémie aiguë myéloïde peu mature (LAM1) et avec maturation (LAM2)	43
3.3.3.3 Leucémie aigue promyélocytaire (LAM 3)	44
3.3.3.4 Leucémie aigue myélo-monocytaire(LAM4) et monoblastique (LAM 5)	44
3.3.3.5 Erythro-leucémie ou leucémie aigue érythroïde (LAM 6)	44
3.3.3.6 Leucémie aigue mégacaryoblastique (LAM 7)	45
3.3.3.7 Leucémie aigue à basophiles	45
3.3.4 Phénotype des LAL	46
3.3.4.1 Leucémie aigue lymphoïde de phénotype B (LAL B)	47
3.3.4.2 Leucémie aigue lymphoïde de phénotype T (LAL)	47
3.3.5 Phénotype des leucémies aiguës biphénotypiques	48
3.3.6 Leucémies aiguës à cellules dendritiques plasmocytoïdes	50
3.4 EVALUATION DE LA MALADIE RESIDUELLE (MRD)	50

PARTIE PRATIQUE

1. MATERIELS ET METHODES	52
1.1 Patients	52
1.1.1 Critères d'inclusion	52
1.1.2 Critères de non inclusion	52
1.1.3 Fiche de renseignement du patient	52

1.2 Echantillons	52
1.3 Moyens techniques	53
1.3.1 Réactifs, Solutions et consommables	53
1.3.1.1 Anticorps monoclonaux (AcM) de souris	53
1.3.1.2 Solutions	54
1.3.1.2.1 Solution de lyse des globules rouges (GR)	54
1.3.1.2.2 Solution tampon PBS(Phosphate Buffer salin)	54
1.3.1.2.3 Solution de perméabilisation	54
1.3.1.2.4 Solutions spécifiques au cytomètre	54
1.3.1.3 Consommables	55
1.3.2 Equipements	55
1.4 Méthodes	55
1.4.1 Marquage cellulaire	55
1.4.1.1 Marquage sur sang total	55
1.4.1.2 Marquage sur moelle osseuse	57
1.4.2 Acquisition des données	57
1.4.3 Analyse et interprétation des résultats à distance de l'acquisition	58
1.4.4 Saisie et analyse des données	60
2. RESULTATS	61
2.1 Données épidémiologiques	61
2.2 Caractéristiques cliniques et biologiques	63
2.3 Classification selon le groupe FAB	67
2.4 Caractéristiques de l'immunophénotypage par CMF des leucémies aiguës	71
2.4.1 Immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	71
2.4.1.1 Immunofluorescence (MIF) des marqueurs myéloïdes	84
2.4.1.2 Degré de positivité des marqueurs myéloïdes	84
2.4.1.3 Classification des LAM selon l'EGIL	85
2.4.1.4 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et des sous types de LAM	86
2.4.1.5 Apport du CD45 dans les LAM	87
2.4.1.6 Concordance entre classification FAB et CMF	89
2.4.1.7 Marqueurs aberrants dans les LAM	89
2.4.2 Immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques	90
2.4.2.1 Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques	113
2.4.2.2 Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes B, marqueurs aberrants et classification des LAL B	113
2.4.2.3 Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes T, marqueurs aberrants et classification des LALT	115
2.4.2.4 Corrélation entre les données morphologiques et Immunophénotypiques des LAL	116
2.4.2.5 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et les LALB	117

2.4.2.6	Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et les LALT	117
2.4.3	Leucémies aiguës biphénotypiques (LAB)	119
3.	DISCUSSION	120
3.1	Caractéristiques épidémiologiques	120
3.2	Caractéristiques cliniques et biologiques	120
3.3	Caractéristiques morphologiques selon FAB	121
3.3.1	Leucémies aiguës myéloïdes	121
3.3.2	Leucémies aiguës lymphoïdes	121
3.3.3	Formes indifférenciées	122
3.4	Caractéristiques de l'immunophénotypage des leucémies aiguës par CMF	122
3.4.1	Immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	122
3.4.1.1	Profil phénotypique de la LAM peu différenciée (LAM0)	122
3.4.1.2	Profil phénotypique des LAM1 sans maturation et LAM2 avec maturation	123
3.4.1.3	Profil phénotypique des leucémies aiguës promyélocyaires LAM3	124
3.4.1.4	Profil immunophénotypique des LAM4 et LAM5	125
3.4.1.5	Profil immunophénotypique des LAM6 et LAM7	126
3.4.1.6	Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et des sous types de LAM	126
3.4.1.7	Apport du CD45 dans l'analyse des leucémies aiguës myéloïdes	127
3.4.1.8	Analyse des concordances des classifications FAB/CMF	128
3.4.1.9	Marqueurs aberrants dans les LAM	128
3.4.2	Immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques	130
3.4.2.1	Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques	130
3.4.2.2	Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes B, marqueurs aberrants et classifications	131
3.4.2.3	Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes T, marqueurs aberrants et classifications	133
3.4.2.4	Corrélations	135
3.4.3	Leucémies aiguës Biphénotypiques (LAB)	135
4.	Perspectives de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës	136
	CONCLUSION	137
	RESUME	140
	BIBLIOGRAPHIE	143
	ANNEXES	
	FICHE TECHNIQUE D'ETUDE DES LEUCEMIES AIGUES	

FICHE DU CONSENTEMENT ECLAIRE
LISTE DES CLUSTERS DE DIFFERENCIATION(CD)
LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES FIGURES
ABREVIATIONS

INTRODUCTION

Les leucémies aigües sont des proliférations monoclonales de cellules hématopoïétiques jeunes, plus au moins bloquées à un stade de différenciation, d'étiologie encore inconnue. Elles surviennent à tout âge, cependant la forme lymphoïde prédomine chez l'enfant et la forme myéloïde chez l'adulte.

L'incidence des LAM au monde est variable, elle est de 4.1/100000 habitants/an aux USA(2017), de 4 en Angleterre (2016), 3,47 au Canada(2018), 3,4 en Australie(2013), 1,1 en Brésil(2015) et 1,35 (2010) en Chine.

Dans les pays arabes selon l'OMS 2004, l'incidence des leucémies aigües est élevée, en Iraq elle est de 12,6/100 000 hab/an, de 8,4 en Jordanie, de 6,4 en Arabie saoudite et elle est de 5,1 en Egypte.

L'incidence des LAL est moins marquée, elle est de 1,7 aux USA (2017), dans les autres pays aussi bien l'Asie que l'Amérique latine cette incidence elle se situe entre 0,37 et 2/100 000 habitants/an (2017)

En Algérie, les études multicentriques retrouvent un taux d'incidence des LA de 1,38/100000hab/an. Cette incidence est de 0,47/100 000 habitants pour les leucémies aigües lymphoblastiques(2013) et 1,12/100 000habitants pour les leucémies aigües myéloïdes (2018).

Le diagnostic des leucémies aigües est basé sur les études morphologiques, cytochimiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires à l'origine de la classification de l'OMS (organisation mondiale de la santé) en 2008 et révisée en 2016.

L'étude immunophénotypique par cytométrie en flux (CMF), grâce aux anticorps monoclonaux (AcM) couplés aux fluorochromes, identifie les antigènes membranaires et intracytoplasmiques, permettant de différencier la population normale de celle dont dérive la prolifération clonale maligne d'une part et caractériser le stade de différenciation au sein d'une lignée qu'elle soit myéloïde ou lymphoïde d'autre part. Les critères de malignité d'une population cellulaire reposent sur l'absence de marqueurs normalement présents à un stade de maturation, sur l'intensité d'expression anormale qui peut être faible ou forte d'un ou de plusieurs marqueurs et parfois sur l'expression d'un ou de plusieurs marqueurs dits aberrants. Cette technique, par sa rapidité, permet l'analyse de 10000 à 100000 cellules par seconde.

Grâce à un panel d'anticorps monoclonaux et un système de score établi par le groupe EGIL (European group for immunological characterization of leukemia), une classification des leucémies aigües est établie. Cette classification a un intérêt diagnostique, pronostique et thérapeutique. En raison de son intérêt clinique et les informations qu'elle apporte, la

cytométrie (CMF) ne cesse de se développer et de s'imposer comme moyen diagnostique de routine incontournable des leucémies aigües. La standardisation des procédures techniques, la nature des clones d'anticorps et leur couplage pourront aider dans l'obtention d'un résultat immunophénotypique identique dans les différents centres de cytométrie. Aussi, elle occupe une place importante dans l'évaluation de la réponse thérapeutique par la détermination de la maladie résiduelle (MRD).

Les objectifs de ce travail

L'introduction de l'immunophénotypage des leucémies aiguës par cytométrie dans nos moyens diagnostics et son utilisation en pratique de routine, représente l'essentiel de notre travail avec pour objectifs :

1/ Mettre en place un plateau technique de cytométrie en flux.

2/ Déterminer l'apport de la CMF comme moyen diagnostic.

3/ Etablir la répartition immunophénotypique des leucémies aiguës selon l'EGIL.

4/ Comparer les résultats de cette étude aux données nationales et internationales.

5/ Proposer des perspectives.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1

PRINCIPE DE LA

CYTOMETRIE EN FLUX

1. 1 GENERALITES

La cytométrie en flux (CMF) est une des nouvelles biotechnologies qui a bénéficiée d'importants progrès dans divers domaines.

De nombreux chercheurs (physiciens, biophysiciens, biologistes et informaticiens) apportent d'année en année de nouveaux concepts et de nouvelles techniques permettant une analyse précise des populations cellulaires et de leurs sous types. Par ailleurs son avantage est la vitesse d'acquisition et la potentialité d'une analyse sur des dizaines voir des centaines de milliers de cellules.

Cet examen s'est développé progressivement et s'est imposé dans la pratique de nombreux laboratoires de biologie clinique et/ou de recherche par la diversité des applications qui en sont faites. Ces progrès résultent d'une grande technicité et de l'automatisation des appareils disponibles d'une part et du développement de nouveaux anticorps monoclonaux (AcM) pour réaliser des marquages multiples tels que les fluorochromes en tandem et les microbilles ou les nanocristaux d'autre part. Actuellement, les applications de la CMF couvrent des disciplines diverses telles que l'hématologie, l'immunologie, la microbiologie, la pharmacologie, l'allergologie etc..... Les champs d'application ne cessent de s'élargir avec le développement de nouveaux réactifs et de nouvelles techniques.

1. 2 HISTOIRE DE LA CMF

Le principe de la cytométrie en flux réside principalement dans l'observation de cellules circulant dans un flux liquide qui permet de les aligner l'une derrière l'autre en facilitant ainsi la distinction de chacune par rapport aux autres. Ce mode de séparation individuelle a été décrit pour la première fois par Andrew Moldavan en 1934 [1] pour dénombrer les cellules d'une population en utilisant un fin tube capillaire, allongé à la flamme et placé sous l'objectif d'un microscope. Les cellules en suspension dans l'eau (Globules rouges ou levures) circulent sous pression dans le capillaire. Un micro capteur photoélectrique est ajusté sur l'oculaire et connecté avec un appareil de mesure. Le but de l'expérience est d'obtenir que chaque cellule passant dans le tube soit prise en compte par le détecteur et crée ainsi un micro courant. En 1934, cette découverte a permis la naissance de la cytométrie en flux et le travail publié dans le journal <<Science>>.

En 1941, Coons, Creech et Jones, chercheurs en bactériologie utilisèrent des anticorps couplés à une molécule fluorescente (fluorochrome), l'anthracène, pour la détection de pneumocoques isolés ou présents dans des tissus grâce à une source d'excitation Ultra violets(UV).

En 1953 Crossland- Taylor en se basant sur la propriété que possèdent deux flux laminaires coaxiaux afin d'établir un système dans lequel la gaine interne contient des cellules. Les différences de pressions imposées aux deux courants concentriques permettent de varier la proportion entre les volumes des deux veines et en conséquence le débit cellulaire et la vitesse d'analyse. Si ces flux sont constitués de liquides ionisés, la présence d'une cellule dans le milieu fait varier l'impédance proportionnellement au volume cellulaire.

Cette propriété permettait dès 1949 à Wallace Coulter de mesurer précisément le volume de chaque cellule. Le compteur de la cellule devient un analyseur.

Parallèlement, la quantification de signaux optiques progresse dans sa précision grâce à l'apparition de PMT(Photomultiplicateur).

En1950, Coons et Kaplan décrivent le premier couplage d'anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

En 1965, la description du rapid cell spectrophotometer de Kamentsky, un cytomètre à flux est construit sur la base d'un microscope à transmission couplé à une lampe à arc et permettant des mesures d'absorption [2,3].

Dans les années 70, Kamentsky fonde en 1970 la société bio/Physics Systems et commence à produire les appareils Cytograph et Cytofluorograph. A l'initiative de Van Dilla(1969), ces appareils sont les premiers à être équipés d'une source laser. En 1972 Herzenberg et ses collaborateurs développent un nouvel appareil, appelé FACS(fluorescence activated cell sorter) équipé d'un laser Argon. Et en 1974, la société BD(Becton-Deckinson Biosciences, commercialise le FACS II. En 1976 Shapiro et al conçoit une série de cytomètre de plusieurs lasers afin de faire l'analyse de multiples fluorescences et en 1978 Schlossman commence à produire des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de cellules lymphoïdes du sang [4].

En 1981, apparait, des cytomètres avec un banc optique fixe et adapté à un ordinateur pour le traitement de données.

En 2001, la firme BD sciences a mis sur le marché un analyseur de cellules permettant la mesure de quatorze couleurs LSR II.

En 2002, Cylab de partec (laboratoire de CMF), monte le premier cytomètre mobile dans un véhicule de marque Renault Kangoo.

En 2004, le Cyflow de Partec est envoyé dans la station spatiale internationale (Cytomètre spatial)

En 2006, l'industrialisation dans le domaine de cytométrie a enregistré plus d'une vingtaine de compagnies fabriquant des appareils de CMF, cependant les leaders dans ce domaine restent les deux firmes américaines BD (Becton-Deckinson) et Beckman coulter. Certains appareils ont une capacité d'analyser les cellules à la vitesse de 100 000 événements par seconde [5].

1. 3 COMPARTIMENT FLUIDIQUE : la focalisation hydrodynamique

Le principe général de la CMF (figure 1) est d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules que renferme un échantillon qui peut être du sang, de la moelle osseuse ou autre liquide. Les cellules en suspension préalablement marquées avec des anticorps monoclonaux (AcM) vont défiler les unes derrière les autres avec une vitesse rapide pour être analysées individuellement. Cela grâce à un principe de mécanique des fluides appelé hydro focalisation (figure 1) (Kachel et al, 1990) [6].

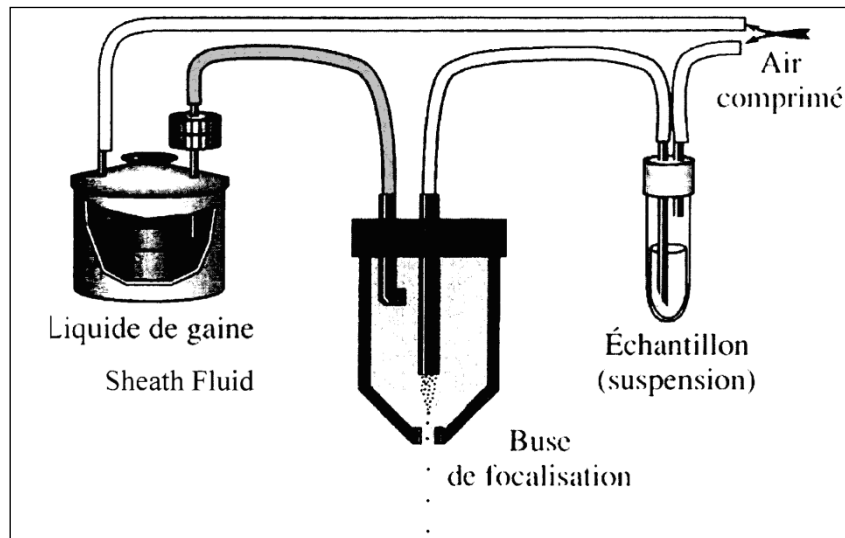


Figure 1: Principe d'hydro focalisation et mouvements de particules dans la veine liquide
(X. Ronot 2006)[8]

Pour réaliser le flux, une pression est appliquée sur le liquide de gaine et sur l'échantillon, avec un différentiel de pression positif mais réduit sur l'échantillon. Cependant un différentiel de pression négatif provoquerait un retour du liquide de gaine vers l'injecteur, et par là vers l'échantillon (ce phénomène est habituellement constaté sur tous les automates en absence de tube et permet le rinçage de la tubulure entre chaque échantillon).

La solution contenant l'échantillon de cellules est aspirée par le biais d'un injecteur (air comprimé) qui va amener les cellules au centre d'une buse dans laquelle un liquide de gaine (sheath Fluid) va les pousser avec une pression plus ou moins élevée (en fonction de la vitesse de défilement des cellules). En effet, la sortie de la buse est un orifice réduit et parfaitement calibré généralement d'un diamètre de 50 à 300 μ m.

La pression différentielle exercée sur l'échantillon est ajustable par l'utilisateur (débit faible, moyen ou fort). Si elle est augmentée, le diamètre de la veine échantillon est augmenté. Cela a pour effet certes d'accélérer le débit de cellules mais aussi de diminuer la précision du centrage des cellules dans le jet, ce qui se répercute sur la qualité de l'analyse (augmentation des coefficients de variation : CV). C'est pourquoi il est conseillé d'appliquer une pression sur l'échantillon qui permet de conserver cette précision.

En conséquence, pour conserver une vitesse d'analyse optimale, il convient d'ajuster au mieux la concentration de l'échantillon à la vitesse d'analyse offerte par la gaine porteuse, qui varie en fonction des appareils. Une concentration de 10⁶ cellules /ml est parfaitement adaptée pour une vitesse d'analyse de 1000 à 2000 cellules/secondes.

Par ailleurs, il est important que la densité du liquide de gaine soit inférieure ou égale à celle du liquide de l'échantillon (Figure 2).

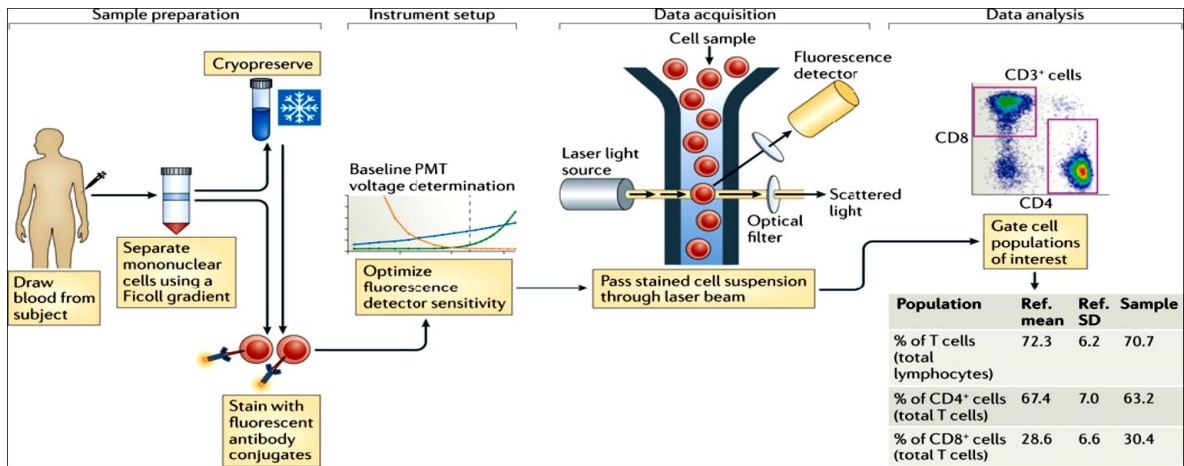


Figure 2 : Schéma général du principe d'analyse par cytométrie en flux

1. 4 EXCITATION LUMINEUSE

Après le phénomène de focalisation de la suspension cellulaire, l'analyse des cellules s'effectue par le biais d'une source d'excitation lumineuse qui frappe les cellules et induisant l'émission de la fluorescence des fluorochromes combinées aux anticorps (Figure 3). Le faisceau laser a l'avantage de dispenser une lumière monochromatique qui est plus facile à diriger et à focaliser. Il existe plusieurs types de laser qui sont utilisés comme source d'excitation lumineuse. En CMF les plus utilisés sont des lasers Argon qui fournissent plusieurs raies d'excitation, la plus utilisée est d'une puissance de 488nm.

L'intensité lumineuse fournie par le laser est variable selon les appareils et peut être comprise entre 15 et 200 mW. La quantité de fluorescence émise par les fluorochromes est proportionnelle à l'intensité de l'excitation.

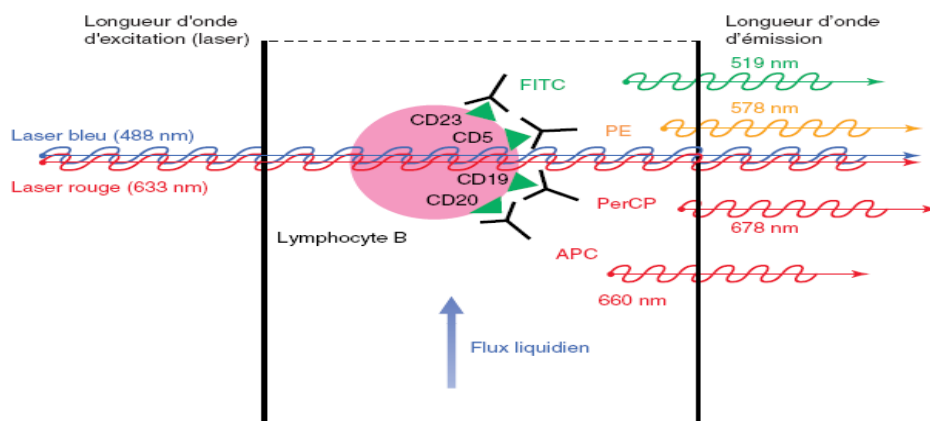


Figure 3: Schéma du principe d'excitation et d'émission de la fluorescence multiparamétrique

Les fluorochromes fixés sur les AcM, sont capables d'absorber l'énergie du laser puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure (fluorescence), ce qui permet de quantifier les antigènes à la surface ou dans le cytoplasme d'une cellule. FITC: isothiocyanate de fluorescéine; PE: Phycoérythrine; APC: Allophycocyanine; PerCP: Peridinine chlorophylle-protéine

Actuellement avec la diversité des cytomètres, la plus part des appareils sont équipés de plusieurs lasers (2 à 4 sources) pour élargir le panel de fluorochromes détectables et donc augmenter le nombre de paramètres analysables (Crissman, 1982).

1. 5 COMPARTIMENT OPTIQUE

Les cellules frappées par le faisceau laser, émettent des signaux lumineux qui sont collectées par un système optique pour être amenés jusqu'aux photo-détecteurs (PD). Dans certains appareils de CMF, l'intersection entre la source lumineuse et les cellules se fait dans une chambre d'analyse en quartz. Pour d'autres, l'intersection laser/flux se fait dans l'air, à la sortie d'une buse. En raison de différences d'indices de réfraction importantes entre l'air et le liquide de gaine, des phénomènes de réflexion induisent une perte de lumière au niveau des points d'excitation et de collection. Par contre la quantité de lumière récoltée avec des cellules d'analyse en quartz est plus importante. Les cytomètres équipés par les chambres d'analyse en quartz ne nécessitent pas d'optimisation car l'alignement entre le laser et le banc optique est fixe par contre l'intersection laser/ flux qui se fait dans l'air, l'alignement entre le laser et le banc optique est moins stable et demande des réglages quotidiens (Waston, 1999)[7].

L'interaction entre le faisceau et les particules ou cellules, résultent des signaux lumineux de plusieurs natures :

- La diffusion aux petits angles (*Forward scatter, FSC*), collectée dans l'axe du faisceau laser et correspondant à la diffraction, elle renseigne sur la taille des particules analysées(Salzman, 1979).
- La diffusion aux grands angles (*Side scatter, SSC*), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction. Elle renseigne sur la structure interne des cellules (granularité, rapport nucléo-cytoplasmique), ce paramètre est utilisé pour discriminer les sous populations cellulaires du sang. Ce signal est faible pour les lymphocytes, légèrement plus fort pour les monocytes et très élevé pour les granulocytes. (Figure 4).

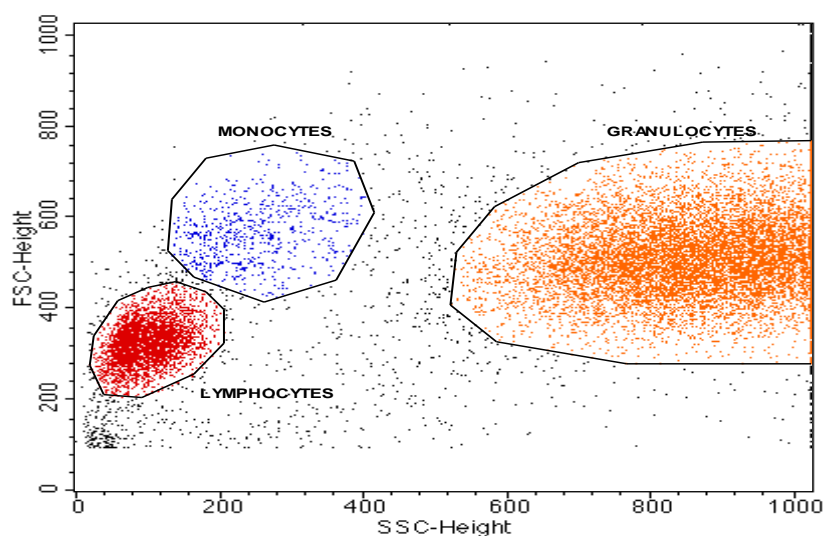


Figure 4 : Cytogramme biparamétrique des cellules du sang normal en taille (FSC) et Structure (SSC)

Le rôle d'un filtre ou d'un miroir est fondamental, car il permet de sélectionner la frange du signal lumineux à transmettre, soit réfléchir, stopper ou atténuer afin que chaque détecteur capte uniquement les longueurs d'ondes qui lui sont destinées.

Les premiers objets rencontrés par la lumière sont les miroirs dichroïques appelés les diviseurs optiques ou de faisceau (beam splitter). Ils séparent la lumière composée de différentes longueurs d'ondes en l'a dirigeant vers les différents photomultiplicateurs (PMT).

Un miroir dichroïque passe-bas de 560 nm transmet les longueurs d'ondes inférieures à 560 nm et réfléchit les longueurs d'ondes supérieures à 560nm.

Un miroir dichroïque passe-haut agira dans le sens inverse.

La collection de la fluorescence se fait ensuite à travers des filtres qui sont disposés devant les photorécepteurs.

De manière schématique, on peut définir trois types de filtres :

- Les filtres passe-haut (high-pass filter), laissent passer la lumière au dessus d'une certaine longueur d'onde exemple un filtre 510 passe –haut arrête les longueurs d'ondes de moins de 510
- Les filtres passe-bas (Short-pass filter) sont le contraire des filtres passe-haut
- Le filtre passe- bande (band-pass filter), ce type de filtre est le plus fréquemment utilisé en CMF, laisse passer la lumière comprise entre deux longueurs d'ondes (Figure 5).

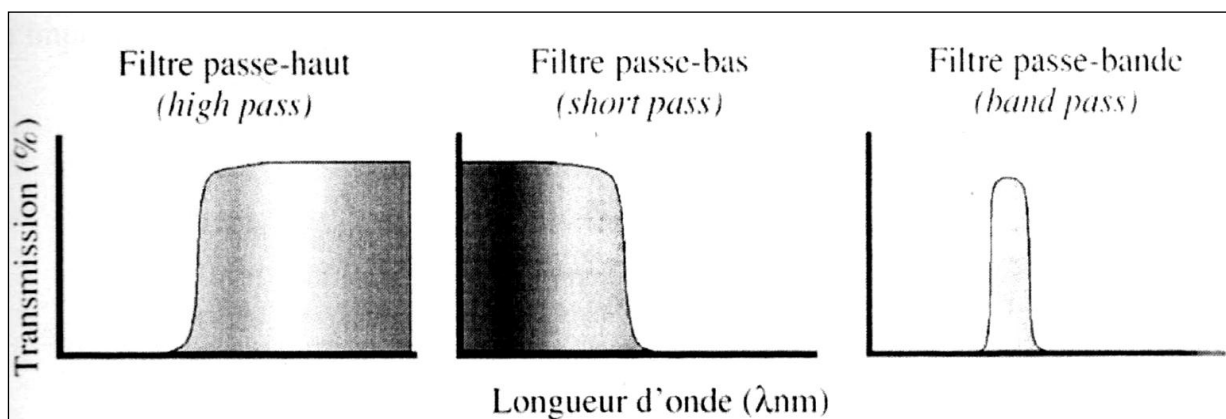


Figure 5 : Différents types de filtres utilisés en CMF

Ainsi, devant un détecteur destiné à collecter la fluorescence de la FITC, on placera par exemple un filtre 530/30 ou 530 +/- 15, ce type de filtre permet une meilleure collection de possible des diverses fluorescences dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 515 nm et 545 nm[5].

1. 6 COMPARTIMENT ELECTRONIQUE

Dans cette partie, lors du passage des cellules devant le laser, le signal lumineux se transforme par la suite en un signal électrique qui pourra être digitalisé puis enregistré et traité par un ordinateur. Ce qui fait appel à différents circuits électroniques.

1. 6. 1 Le détecteur

C'est un composant qui a la charge de transformer un photon en un courant électrique dit photons électrons. On trouve deux types de détecteurs dans un cytomètre: des photodiodes (PDi) et des PMT. Les PD sont actuellement plus efficaces dans la transformation de lumières en photons électrons que les PMT. Néanmoins, les PMT ont une plus grande sensibilité et un pouvoir d'amplification du signal électrique grâce aux électrodes qu'ils disposent.

Donc c'est une pratique commune que d'utiliser des PD comme détecteurs des signaux de forte intensité (absorption, extinction ou diffusion de la lumière aux petits angles (forward scatter : FS) et des PMT pour les signaux de moindre intensité (diffusion de la lumière aux grands angles (side scatter : SS) et signaux de la fluorescence.

L'ensemble du signal électrique issu de l'émission de fluorescence d'une cellule lors de son passage devant un laser est appelé impulsion (pulse).

1. 6. 2 Le traitement de l'impulsion

Une impulsion se caractérise d'une part par sa hauteur (pulse height ou peak value) et d'autre part par son aire (pulse area ou intégral value). La caractérisation de l'impulsion est réalisée par un échantillonneur de valeur crête (peak sample) qui mesure la hauteur de l'impulsion ou par un intégrateur (integrator) qui mesure l'aire de l'impulsion (Figure 6).

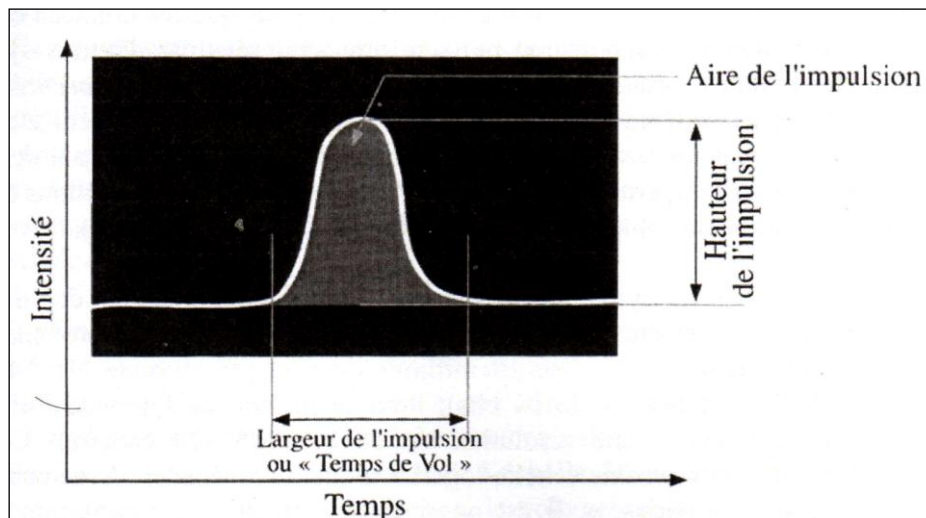


Figure 6 : Paramètres mesurables de l'impulsion

Le signal provenant de chaque détecteur est traité par un circuit de compensation. Il existe deux composants fondamentaux : le déclencheur (trigger) et le seuil (threshold) ou discriminateur. Le premier correspond au paramètre choisi par l'utilisateur pour que l'appareil effectue une mesure sur lequel l'utilisateur définit un seuil de déclenchement. Une particule est prise en compte par l'appareil et mesurée dans l'ensemble des paramètres étudiés, uniquement si elle est capable de produire un signal supérieur au seuil dans le paramètre de déclenchement. Le réglage du seuil est donc très important : si ce seuil est trop élevé, les cellules les plus petites comme les lymphocytes ne seront pas comptées ni analysées et le résultat sera biaisé; à l'inverse si le seuil est trop bas, un grand nombre de débris est analysé et

risque de nuire à la qualité des résultats en particulier si le but de cette étude porte sur les lymphocytes.

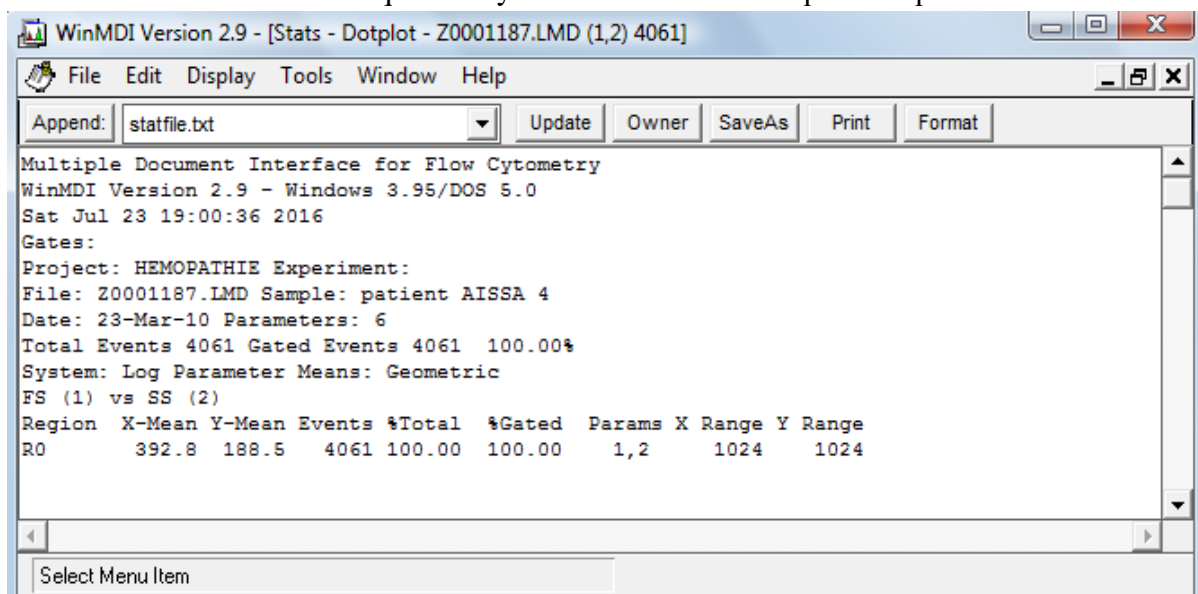
L'amplificateur de gain est un circuit électronique supplémentaire pour le traitement de l'impulsion. Ce composant permet d'amplifier des signaux linéaires de faible intensité. En général, plusieurs échelles de gain existent sur les appareils (gain de 1, 2, 4, 8 et 12). Lorsque l'utilisateur augmente l'amplification du gain, il concentre la résolution d'analyse du PMT sur les signaux les plus faibles sans influence ni modification de la sensibilité de détection de ce PMT [5]. Pour cette raison, il est recommandé de commencer par augmenter le voltage du PMT avant d'augmenter le gain qui amplifie les signaux de faible intensité.

1. 6. 3 La digitalisation de l'impulsion

C'est la dernière étape du traitement électronique du signal, elle est réalisée par un convertisseur analogique numérique (ADC: analogic to digital converter) qui va transformer la valeur d'un voltage en valeur numérique.

Un ADC de 8 bits peut échantillonner un signal sur 256 canaux ($2^8=256$), un ADC de 10 bits échantillera un signal sur 1024 canaux ($2^{10}= 1024$). Pour une échelle logarithmique, l'axe est divisé en 1024 canaux répartis sur quatre décades. La première décade (1- 10) concerne les canaux de 0 à 255, la deuxième décade (10- 100) les canaux de 256 à 511, la troisième (100- 1000) les canaux de 512 à 767 et la quatrième décade (1000- 10000) les canaux de 768 à 1023. L'organisation et le format des fichiers de données sont standardisés par la norme FCS 3.0 (définie par ISAC : international society of analytical cytology en 1996). Cette standardisation du format des fichiers créés par le cytométriste son logiciel d'acquisition peut être analysée par d'autres outils informatisés. Le format de fichier permet d'enregistrer l'ensemble des conditions d'acquisition et autres informations (Nombre d'événements, le nom de l'utilisateur, la date de l'examen, le type de protocole). C'est ainsi que les informations sont transmises à un logiciel d'analyse type Win MDI 2.9 (Tab I).

Tab I : Données statistiques analysées à distance de l'acquisition par Win MDI 2.9



1.7 FLUOROCHROMES

1. 7.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence se définit comme la luminescence émise par certaines molécules (fluorochromes ou fluorophores) résultant de l'absorption de lumière à une certaine longueur d'onde et ré-émission presque instantanée de lumière à une longueur d'onde plus grande.

Le principe est comme suit: lorsqu'on irradie une substance qui absorbe plus qu'elle ne transmet, les photons impliqués provoquent le déplacement de certains électrons de la molécule vers un niveau d'énergie supérieur, puis les électrons reviennent plus ou moins rapidement à leur niveau d'énergie initial. Cela induit une diminution de l'énergie lumineuse émise par rapport à l'énergie absorbée. Il en résulte par conséquent un décalage entre les spectres d'absorption et d'émission qui caractérisent les fluorochromes.

1. 7.2Caractéristiques spectrales des fluorochromes

L'intensité de la fluorescence est directement liée à l'intensité de l'excitation mais également aux capacités d'absorption du fluorochrome à la longueur d'onde choisie.

Chaque fluorochrome est caractérisé par un spectre d'absorption (ou d'excitation) et un spectre d'émission de fluorescence. C'est en se référant à ces spectres que l'utilisateur va pouvoir choisir d'une part la raie du laser la plus efficace pour l'excitation et d'autre part le filtre le mieux adapté pour une collection spécifique de la fluorescence. Cependant ces combinaisons sont du domaine de recherche. Les industriels qui préparent les réactifs et les fluorochromes développent ces derniers, proportionnellement avec les générations de cytomètres.

1.7. 2. 1 Le rendement quantique

Le rendement quantique (F) d'un fluorochrome correspond au rapport entre la quantité de photons absorbés et la quantité de photons émis.

Le rendement quantique dépend de nombreux paramètres tels que la concentration du fluorochrome, le PH, la concentration ionique et la longueur d'onde d'excitation.

1.7. 2. 2 La spécificité

La spécificité est la caractérisation principale des fluorochromes qui permet la détection d'un constituant cellulaire particulier. On cite quelques exemples de fluorochromes :

- FITC, Texas Red, la PE (Phycoérythrine), cyanine3, cyanine5 sont des fluorochromes qui se fixent avec les anticorps pour déterminer les antigènes de surface et intracellulaire.
- Le bromure d'éthidium, iodure de propidium, acridine orange, Mitramicine et autres sont des fluorochromes spécifiques de l'ADN.

1.7. 2. 3 L'accessibilité

A l'exception des fluorochromes dits «Vitaux », la plupart d'entre eux sont incapables de pénétrer dans les cellules vivantes. C'est pourquoi une étape de fixation est souvent requise préalablement au marquage de cibles intracellulaires. Suivant le type de fixateur utilisé, une étape de perméabilisation est nécessaire pour obtenir une stoechiométrie de marquage.

1.7. 2. 4 La toxicité

L'analyse sur des cellules vivantes, impose de prendre en compte les effets toxiques des fluorochromes utilisés car il y a un risque de perturbations de leurs fonctions immédiates. Les effets sur la viabilité et le cycle cellulaire sont parmi les plus couramment décrits et sont généralement liés à la concentration extracellulaire et intracellulaire du fluorochrome, au temps de marquage et à la durée de rétention dans la cellule.

1.7. 2. 5 La photo-destruction

L'excitation d'un fluorochrome n'est pas sans conséquence sur les cellules. Le phénomène d'excitation/émission induit par le rayonnement provoque une usure des cellules qui progressivement et en fonction de la quantité d'énergie absorbée, ne seront plus capables d'émettre une fluorescence. Ce phénomène connu sous le nom de photoblanchiment (photobleaching) est fréquemment soulevé lorsque l'étude de la fluorescence est faite en microscopie de fluorescence; cependant il n'a pas de conséquence en CMF car le temps d'exposition est très court (quelques microsecondes).

1.7. 2. 6 Le transfert d'énergie (tandems de fluorochromes)

Dans le cas d'une analyse multiparamétrique, on recherche à mesurer simultanément plusieurs protéines ou compartiments subcellulaires. Pour cela, il est nécessaire que ces différents éléments se distinguent par des émissions de fluorescence différentes. Les associations ou couplages de deux fluorochromes permettent d'exciter à partir d'une émission laser, indirectement un fluorochrome. Le premier est excité par la source lumineuse et émet une fluorescence à une longueur d'onde. Cette longueur d'onde se trouvant dans le spectre d'absorption du second qui est capable d'émettre sa fluorescence comme s'il avait été excité par la raie laser de la source lumineuse [9](Tableau II) et (figure 7).

Tableau II : Degré d'excitation et d'émission des tandems

Fluorochromes associés	Excitation (nm)	Emission (nm)
Fluorescéineisothiocyanate (FITC)	488	518
Phycoérythrine (PE)	488	578
Texas red (ECD)	590	615
Phycoérythrine/ Texas red (PE/ TR)	546	618
Phycoérythrine / Cyanine 5(PE/ Cy-5)	488	660 – 670
Phycoérythrine / Cyanine 7 (PE/ Cy- 7)	488	> 750
Allophycocyanine (APC)	650	660
Allophycocyanine / Cyanine 7(APC/ Cy7)	633	> 750

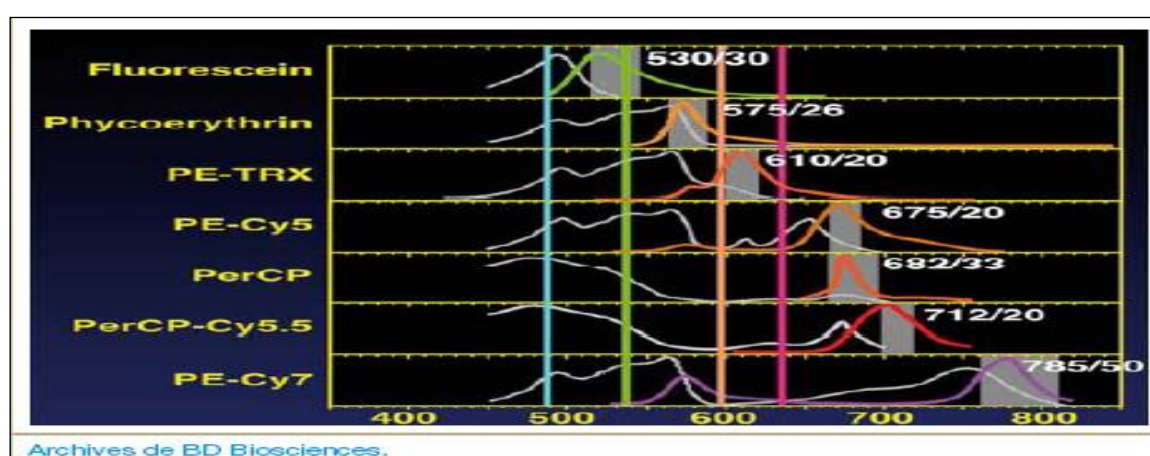


Figure 7 : Fluorochromes en CMF : leurs spectres d'excitation et leurs spectres d'émissions

1. 8 REGLAGES DU CYTOMETRE

La fiabilité des résultats dépendra de la qualité des réactifs, la bonne préparation de l'échantillon à analyser et surtout le bon réglage de l'appareil.

Le réglage du cytomètre varie en fonction du type de marquage et le type de cellules qui seront utilisés. Il concerne les PMT, le seuil et les compensations.

1. 8. 1 Les réglages des PMT et du seuil

Ces réglages sont effectués grâce à des cellules sanguines non marquées (aussi appelées cellules blanches). Le voltage et le gain des détecteurs des paramètres de taille sont ajustés afin de visualiser sur l'histogramme bi paramétrique taille(FS) et structure(SS) l'ensemble des sous populations cellulaires. Il est alors possible de tracer une région autour des cellules d'intérêt (figure 8). Ainsi, les débris ne viendront pas perturber le réglage des voltages des PMT asservis à la détection de fluorescence.

Les débris pourront aussi être éliminés grâce au réglage du seuil (Threshold). Dans ce cas, le réglage du seuil définit le niveau minimum de diffusion aux petits angles d'une particule pour

qu'elle soit considérée comme un événement. Le niveau du seuil doit être ajusté pour éliminer les débris et le bruit électronique, tout en évitant d'éliminer les petites cellules comme les lymphocytes. Afin d'optimiser le réglage des PMT restants, l'utilisateur doit déterminer le protocole sur une échelle linéaire ou logarithmique. Les valeurs doivent être ajustées de façon à ce que les cellules non marquées apparaissent dans la première décade de l'échelle (Figure 9). Si le niveau d'expression d'antigènes est faible, le voltage appliqué au PMT peut être augmenté pour améliorer la sensibilité de détection.

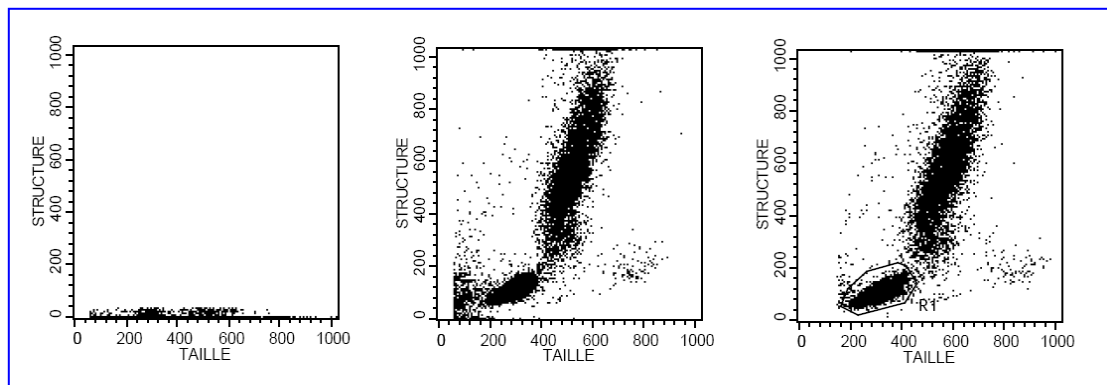


Figure 8 : Réglage des PMT et seuil sur cellules sanguines normales non marquées

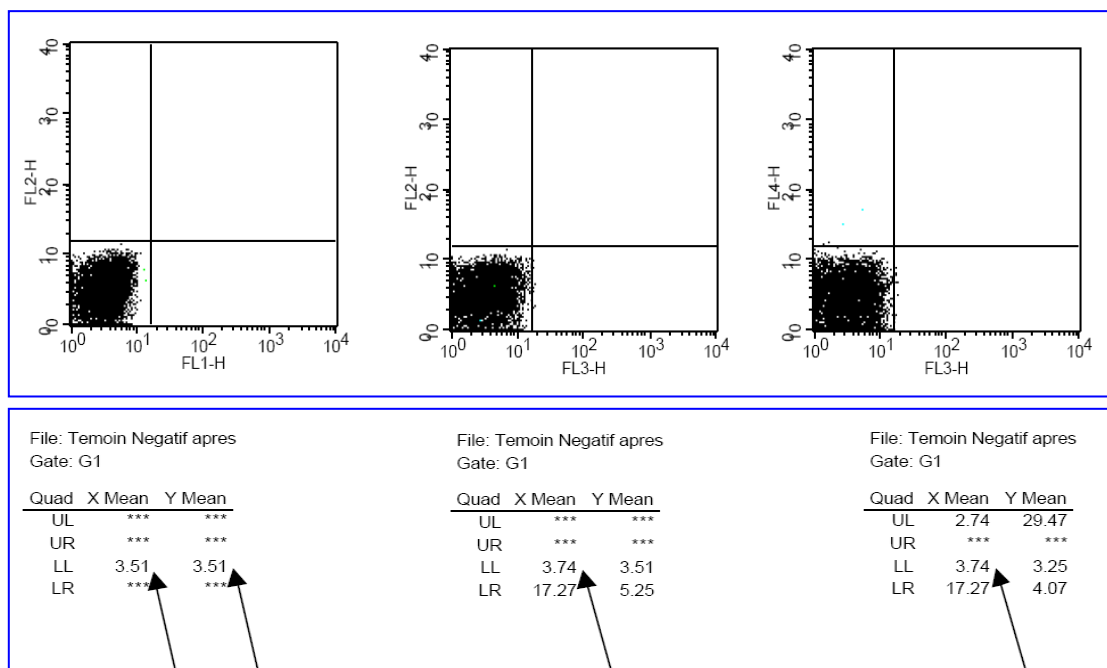


Figure 9 : Ajustement de l'autofluorescence sur cytomètre 4 couleurs

1. 8. 2 Les réglages des compensations

Les chevauchements des spectres de fluorescence des différents fluorochromes simultanément utilisés dans des protocoles multi couleurs créent des interférences. Par exemple, le FITC et la PE (Phycoérythrine), qui sont excités à 488 nm, ont un maximum d'émission de fluorescence à 520 et 578 nm respectivement. Les filtres qui équipent habituellement les appareils de CMF sont optimisés pour que la collection de fluorescence de ces deux fluorochromes se fasse au plus près de ce maximum d'émission. En raison de la largeur des spectres d'émission de fluorescence, une partie de la fluorescence émise par le FITC sera captée par le PMT dédié à la collection de la fluorescence de la PE et vice versa. S'il n'y avait pas de chevauchements de spectres, une population cellulaire uniquement marquée avec du FITC aurait un signal en PE identique à celui de cellules non marquées. Toutefois, sans que les réglages des compensations soient optimisés, une population cellulaire marquée par le FITC et non marquée par la PE apparaît comme ayant un marquage par cette dernière en raison de la contamination du canal de la PE par la fluorescence du FITC (Figure 10).

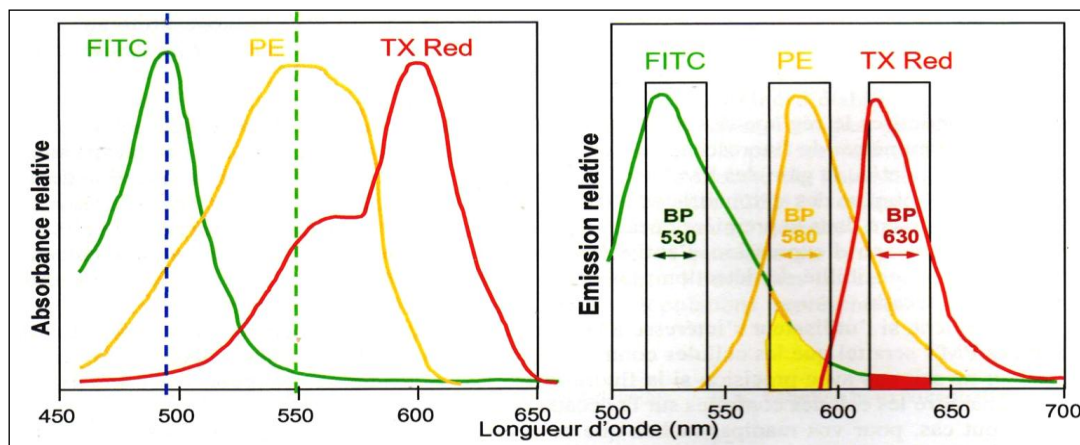


Figure 10 : Chevauchement des spectres d'émissions des FITC, PE et RD(red texas)

Les appareils de CMF disposent tous des algorithmes qui permettent de corriger ce phénomène, c'est le réglage des compensations de fluorescence. Cette partie est la plus importante dans le réglage en général dont dépend la qualité des résultats.

Ces réglages sont réalisés grâce à des mono-marquages ciblant la population lymphocytaire. Il consiste à prendre deux tubes, l'un qui renferme des cellules uniquement marquées par le FITC et un autre tube qui renferme des cellules uniquement marquées par la PE. Lors du passage des cellules mono-marquées FITC, la compensation de fluorescence FITC/PE est ajustée de façon à ce que les valeurs des médianes de fluorescence relatives à la PE pour les populations FITC- et FITC+ soient identiques. En d'autres termes pratiques la manœuvre consiste à ajuster la compensation de FL2 - %FL1 jusqu'à l'obtention d'une médiane (Mean) de la population FITC qui doit être \leq à celle de la population négative sur l'axe de FL2: $Y_{\text{mean LR}} \leq Y_{\text{mean LL}}$ (Figure 11).

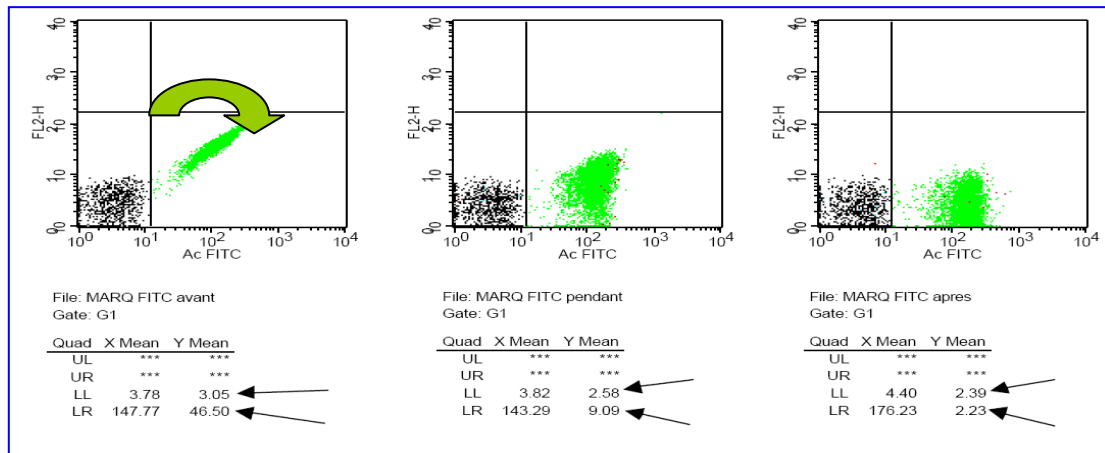


Figure 11 : Compensation de la fluorescence FITC/ PE

Puis la même démarche est réalisée avec les cellules uniquement marquées par la PE. L'ajustement de la compensation de FL1 - % FL2 jusqu'à avoir une médiane (Mean) de la population PE qui doit être \leq a celle de la population négative sur l'axe de FL1: X mean UL \leq X mean LL (Figure 12).

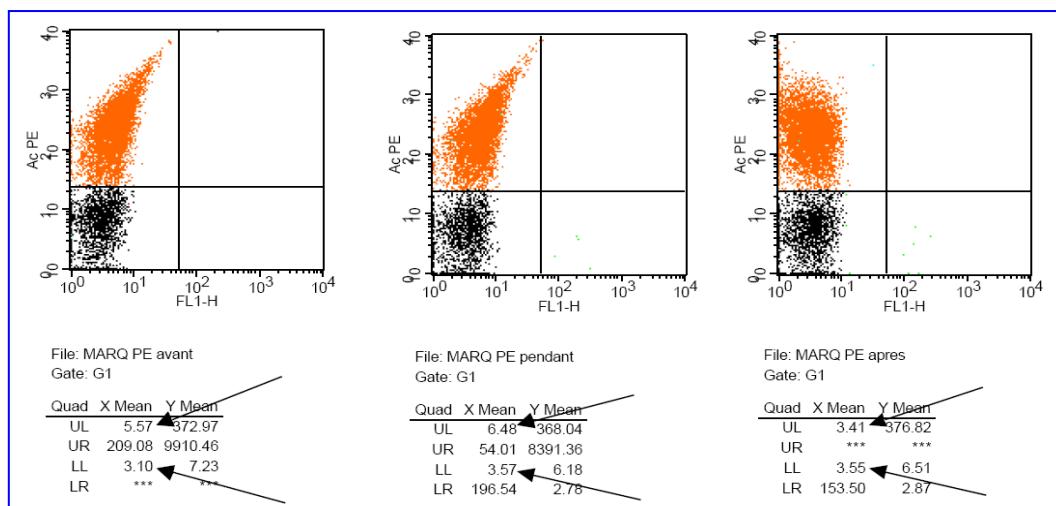


Figure 12 : Compensation de la fluorescence PE/ FITC

Afin que ces réglages soient parfaitement réalisés, il faut tenir compte de certains points :

- Ne jamais compenser « à l'œil » car c'est le meilleur moyen de surcompenser les valeurs enregistrées.
- Utiliser les médianes de fluorescence plutôt que les moyennes car elles sont plus représentatives de la fluorescence globale des cellules analysées.
- Ne jamais retoucher les voltages après avoir réglé les compensations car celles-ci sont dépendantes des intensités de fluorescence analysées.
- Les compensations dépendent directement des fluorochromes.
- Il est souvent conseillé d'utiliser des applications logicielles spécifiques pour le réglage des compensations que de les faire manuellement. Ce qui fait gagner beaucoup de temps et limitera les erreurs de réglage. Actuellement les dernières générations de cytomètres dédiées à

la recherche disposent de logiciels intégrés qui ajustent et adaptent automatiquement les compensations [10,11]. Une fois ces réglages effectués, l'appareil est prêt à être utilisé, mais dans le principe de chaque application ou protocole les tubes témoins dits isotypes ne doivent pas être négligés.

1. 9 INTERPRETATION DES RESULTATS

La cytométrie est un outil qui permet d'étudier une population ou l'ensemble des populations cellulaires en déterminant leurs caractéristiques, identifiant les sous populations au sein même d'une population complexe et hétérogène et ce grâce à la capacité des logiciels d'analyse intégrés.

L'analyse se fait grâce à un protocole avec des applications statistiques afin d'apprécier le pourcentage d'une sous population, l'intensité de fluorescence moyenne(IFM) pour un paramètre donné et calculs des moyennes, médianes et le coefficient de variation (CV).

Les résultats de l'analyse peuvent se présenter sous forme :

- d'histogramme monoparamétré (qui est configuré par un paramètre en abscisse, et l'ordonnée correspond au nombre d'événements par canal) (Figure13).
- d'histogramme biparamétré où il y a un paramètre en abscisse et un paramètre en ordonnée qui est souvent en mode linéaire pour l'étude de la taille et structure des globules blancs seulement et obligatoirement en mode logarithmique pour les globules rouges, les plaquettes et l'autofluorescence (FL1,FL2,FL3,FL4 etc...). Le nombre d'événements pouvant être représenté par la densité de nuage de points (Dot plot) ou par des courbes de niveau (contour plot ou densité plot) (Figure14).

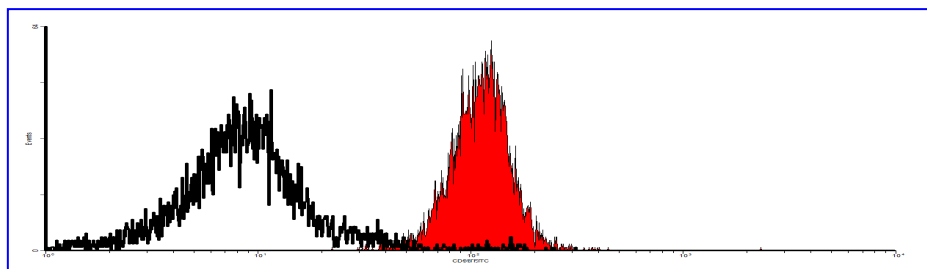


Figure 13 : Histogramme monoparamétré

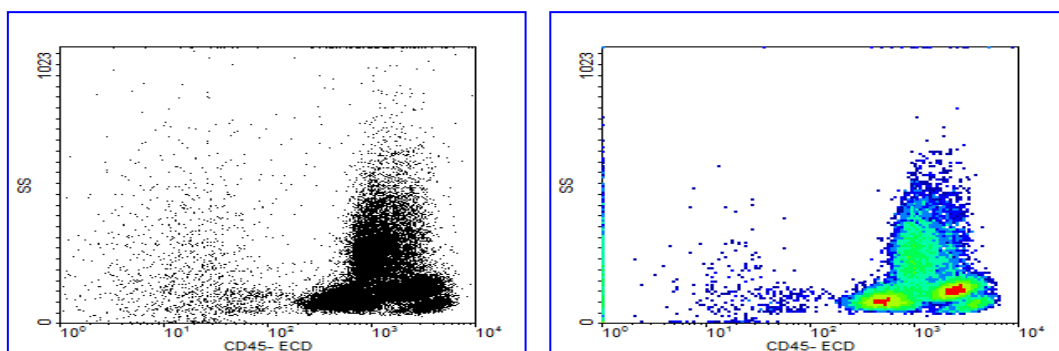


Figure 14 : Histogrammes biparamétré (Dot Plot, Densité Plot)

Lorsque l'analyse révèle plusieurs sous populations, on passe au fenêtrage (Gating) de la population ciblée en traçant une région autour d'elle et de limiter la suite de l'analyse à cette population sélectionnée. Cela s'appelle l'analyse conditionnée (Figure15).

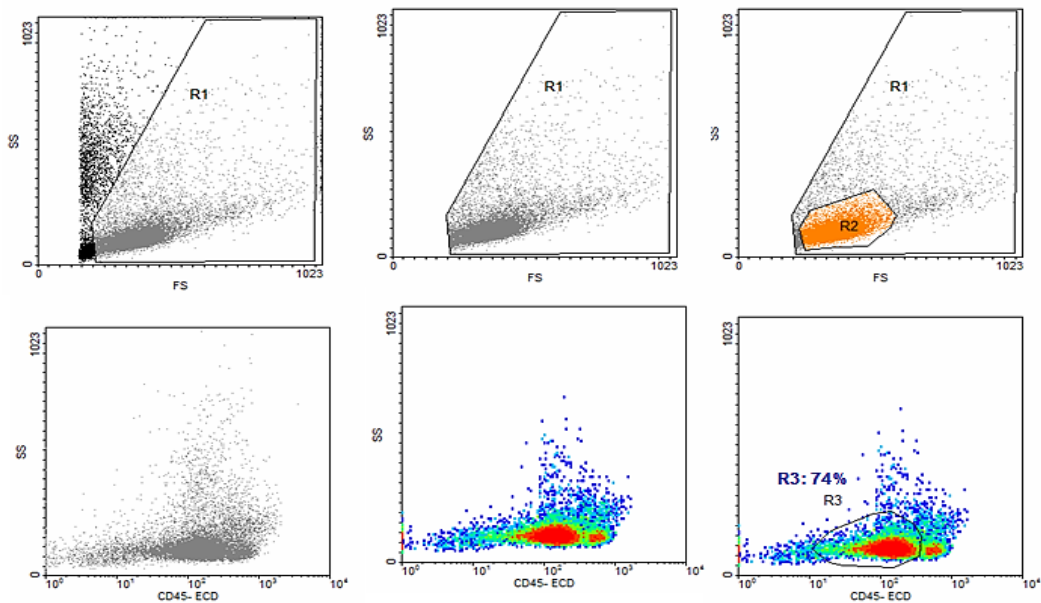


Figure 15 : Gating d'une population (R2) puis d'une sous population blastique(R3)

1. 10 SECURITE DANS LE LABORATOIRE DE CMF

Par la diversité des technologies mises en œuvre, par son utilisation dans l'analyse de matériel pathogène, son implantation à côté des autres appareils (laboratoire de biologie commune), et du fait de son utilisation parfois routinière, la cytométrie en flux (CMF) peut comporter certains risques.

Les risques biologiques et chimiques sont les premiers à prendre en compte.

Les risques biologiques tiennent à la nature des échantillons analysés et à leurs potentialités pathogènes, d'autant plus qu'ils sont d'origine humaine. Une précaution avec mesure de sécurité rigoureuse permet souvent de minimiser ou mieux d'éliminer ce risque.

Le risque chimique trouve essentiellement son origine dans les réactifs propre à l'appareil de CMF et surtout les marqueurs fluorescents.

Qu'ils soient biologiques ou chimiques, ces risques sont potentialisés par la formation d'aérosols à la préparation de l'échantillon à la paillasse ou de l'appareil à l'occasion d'un bouchage partiel de la buse. En conséquence, il est très recommandé que la manipulation soit dans une hôte à flux laminaire, afin d'éviter toute dispersion d'aérosols.

Au-delà des manipulations proprement dites, on évitera de se débarrasser des effluents ou des restes d'échantillons, sans les avoir au préalable soumis à une décontamination ou les placer dans des citernes ou bidons de déchets spécifiques aux produits pathogènes, biologiques et chimiques de laboratoire médical.

Le risque laser est essentiellement oculaire. En principe, un affichage extérieur doit signaler la présence d'un laser sous tension. En fonctionnement normal, le faisceau doit être gainé de la

sortie du tube laser proprement dit à la chambre de mesure. Le risque devient plus réel lors d'un réalignement de faisceau, ou d'une manière générale, lorsque pour des raisons de maintenance, le faisceau se trouve dénudé. Dans ces cas, il devient strictement interdit l'accès à la pièce du cytomètre pendant la durée des opérations, la puissance lumineuse sera réduite à son minimum, la limitation du nombre de personnes présentes dans le rayon du cytomètre avec le port obligatoire de lunettes de protection.

Le risque électrique se situe à deux niveaux. A un niveau général, par l'association d'une composante électrique mettant en jeu des tensions élevées (alimentations laser en particulier) et d'une composante hydraulique constituée par la partie fluide de l'appareil et par le système de refroidissement des lasers (internes et externes par un environnement climatisé à température adaptée qui va avec notre climat qui est subsaharien). Dans tous les cas, un système de sécurité d'arrêt d'urgence est vivement recommandé.

Par ailleurs deux événements n'ont plus de risques, mais méritent d'être signalés :

- La fatigue visuelle quand l'acquisition et le nombre d'échantillon à analyser sont importants, mais elle peut être réduite par l'utilisation des écrans de visualisation.
- La nuisance auditive provenant des niveaux sonores généralement élevés dus à l'ensemble de l'appareil. Le niveau sonore maximal produit par un cytomètre est de 70 dB, ne fait pas courir de risque (niveau de danger et risque de surdité : 90 dB) mais plutôt de fatigue et diminution de la concentration et vigilance.

CHAPITRE 2
TECHNIQUE ET ANALYSE

Pour une analyse multiparamétrique de cellules, ces dernières doivent être dissociées les unes des autres, mises en suspension et fixées avec les anticorps monoclonaux. Les procédures de la préparation de l'échantillon sont de plus en plus spécifiques allant des modalités de prélèvement, de préparation et conservation des échantillons à l'analyse au cytomètre. Toutes ces étapes pré analytiques sont soumises à la réglementation du guide de bonne exécution des analyses médicales (GBEA) en général et la cytométrie en particulier.

2.1 : PRELEVEMENTS

C'est une étape importante, les conditions de prélèvements et les modalités de conservation sont d'une importance non négligeable et le non-respect de cette étape fait perdre la qualité des résultats.

2. 1.1 : Sang périphérique

Le prélèvement est obligatoirement effectué sur anticoagulant par ponction veineuse. Trois anticoagulants peuvent être utilisés: L'EDTA, l'héparine et l'Acide Citrate Dextrose (ACD). L'EDTA (Éthylène Diamine Tetra acetic Acid) est recommandé pour l'immunophénotypage sur sang frais, analysé le jour même. Cependant si l'analyse ne peut se réaliser qu'après 24 heures, les prélèvements doivent se faire dans des tubes renfermant le citrate ou l'héparine de lithium, car les résultats sont meilleurs que ceux obtenus avec le sang conservé en EDTA [13]. Donc il est important de vérifier la qualité du prélèvement avant toute analyse.

2. 1. 2 Moelle osseuse(MO)

La moelle est très riche en cellules, mais lors de la ponction par aspiration celle-ci peut être très facilement diluée par du sang, le résultat est alors difficilement interprétable.

Le prélèvement est effectué par un trocart Mallarmé, la première goutte aspirée est étalée sur deux lames afin d'effectuer des examens cytologiques et cytochimiques, la seconde aspiration de 1 à 1,5 ml servira pour l'immunophénotypage. Le prélèvement est immédiatement transféré dans un flacon contenant un anticoagulant pour éviter la formation de caillots. Les grains ou grumeaux qu'on y trouve habituellement doivent être dissociés, soit doucement avec une pipette afin de récupérer les cellules hématopoïétiques soit par le recours à des filtres d'un calibre allant de 50 – 200 μ et adapter aux tubes EDTA. Dans le cas de conservation pour une lecture tardive au delà de 24 heures, le recueil de la moelle se fera dans un flacon contenant 20 ml de solution de Hanks ou de milieu RPMI mélangés avec 10 gouttes de calciparine [13].

2.1. 3 Liquides biologiques

Les cellules contenues dans les liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien (LCR), le liquide pleural et le liquide d'ascite sont prélevés dans un tube sec. En revanche, les cellules prélevées lors de ponction de ganglion doivent être transportées dans un

milieu liquide tels l'HBSS (Hank's balanced salt solution) ou le RPMI à défaut dans du PBS. Dans l'attente du marquage, le prélèvement est conservé à 4°C sur une durée qui ne doit pas excéder les 24 heures [14].

2. 2 MOYENS MATERIELS

2.2. 1 Réactifs

- **Les anticorps monoclonaux (AcM) et le volume à distribuer:** Jusqu'à présent plus de 365 anticorps sont connus et commercialisés souvent en combinaison avec les fluorochromes soit en monomarquage ou en marquage multiples. Ces anticorps par effet de fluorescence vont déterminer les marqueurs antigéniques de surface ou intra cytoplasmique dits CD (clusters de différenciation) permettant l'identification de la nature de la cellule et aidant par conséquent au diagnostic phénotypique d'une maladie (Voir dans les annexes: les tableaux récapitulatifs des différents CD et leur intérêts au diagnostic).

La plupart des anticorps utilisés sont monoclonaux, ils sont obtenus chez la souris, exceptionnellement chez le rat, Ils sont d'isotypes G1 le plus souvent, parfois G2a ou G2b, rarement M. Ce sont des anticorps entiers avec une partie Fab'2 qui reconnaît l'antigène et une partie Fc capable de se fixer sur des récepteurs membranaires. Cette fixation est à l'origine de fixation non spécifique de l'antigène (Ag), responsable d'un bruit de fond qui est surtout observé avec les isotypes IgG2a. On parvient à le neutraliser plus ou moins efficacement en saturant les récepteurs, avant le marquage par des immunoglobulines polymérisées (incubation 30 minutes à température ambiante avec du sérum humain chauffé 30 min à 56°C). Par ailleurs, l'intensité de la fluorescence dépend du nombre de molécules de fluorochrome fixées sur chaque anticorps : Rapport Fluorochrome (F)/ Protéine (P). Malgré que les anticorps commercialisés sont préalablement combinés aux fluorochromes et testés par les fabricants, il est nécessaire de valider leur sensibilité sur les cellules spécifiques. Le volume de l'anticorps à ajouter à la suspension varie d'un fabricant à l'autre.

- Pour les anticorps FITC, PE, PerCP et PerCP Cy5.5 (BD Pharmingen) : 20 µl par test. Cette modalité est identique pour les réactifs de Beckmann Coulter.

- Pour les anticorps APC (BD), 5 µl par test.

- Pour les kits 2, 3 ou 4 couleurs BD, 20 µl par test.

- **Le Ficoll Métrizoate Ficoll Hypaque** ou encore des solutions toutes préparées appelées Lympho-prep (Nyegaard), MSL(Eurobio), d'une densité de 1,077 sont composées de 5,6%(poids/volume) de Ficoll et de 9,6%(poids/volume) de Métrizoate de Na⁺. Ces solutions sont stériles et doivent être conservées au réfrigérateur à + 4°C. Certaines préparations (J. Prep, J. BIO) sont stockées à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- **La solution Hanks filtrée** disponible en flacon dans le commerce ou en poudre pour effectuer 5 litres avec de l'eau bi distillée. Le PH doit être compris entre 7,2 et 7,6. On peut l'ajuster avec du bicarbonate de sodium.

- **Le Phosphate buffered salin (PBS)**: soit qu'il est commercialisé en poudre et à mélanger avec l'eau bidistillée (dilution au 1/10^{ème}) soit il est préparé de la façon suivante :

- NaCl : 80 grammes/ litre

- Na₂HPO₄ 2H₂O : 27g/ litre

- NaH₂PO₄ 2H₂O : 4g/ litre

La dilution est faite dans un litre d'eau bi distillée et constitue une solution à diluer au 1/10^{ème} (10 X) pour l'emploi.

- **Le Sérum de Veau fœtal (SVF)** : Il doit être préalablement décomplémenté 45 min maximum (sinon il y a un risque d'élimination de protéines normales) à 56° C au bain marie et aliquoté stérilement en tube de 5 ml et conservé à - 20°C. Il faut éviter les congélations décongélations qui entraînent des pertes de facteurs de croissance pour les cellules en culture [15].

-Produits de lyse des GR :

- Le Facs lyse Becton Dickinson (BD)

Cette solution est commercialisée sous forme de flacon de 100 ml, elle est utilisée après le marquage de la suspension cellulaire par les anticorps monoclonaux. Elle doit être diluée au 1/10^{ème}. C'est une solution qui se conserve un mois à température ambiante.

- La lyse avec le produit Eurobio :

Elle est commercialisée sous formes de flacons de 1000 ml, utilisée sous la forme pure.

- La versalyse: c'est une solution commercialisée par la firme Beckman Coulter, en flacon de 100 ml, elle est aussi utilisée sans être diluée selon les mêmes protocoles que la lyse Eurobio.

- La solution de lyse des globules rouges préparation maison:La formule de la préparation est la suivante :

- NH₄ CL 8,26 grammes/L

- Bicarbonate de K 1gramme/L.

- EDTA Tetra Na 0,037 gramme/L.

- QSP 1 litre d'eau distillée.

Cette solution se conserve à + 4° et elle reste stable pendant 15 jours maximum.

2. 2. 2 Séparation des cellules

Pour une analyse des cellules mononuclées dans le cadre d'un immunophénotypage sur sang ou moelle osseuse, les marquages peuvent être réalisés après leur isolement sur un milieu de séparation de densité 1,077(milieu de séparation des lymphocytes, MSL® ou ficoll®). Aujourd'hui, on préfère travailler directement sur moelle osseuse totale ou sur sang total. Cette approche est plus rapide, évite des manipulations et la perte possible de sous

populations. Mais à titre de rappel nous rapportons la méthodologie de séparation des cellules sur gradient.

2.2. 2. 1 Séparation des cellules du sang périphérique isolées sur gradient

C'est à partir des méthodes de séparation cellulaire par gradient de densité par le Ficoll ($d = 1,077$) présentées dans l'article de BOYUM[16], que l'on a pu obtenir une suspension vivante et stérile de lymphocytes à partir du sang, de la moelle, des organes lymphoïdes, chez l'homme et chez l'animal.

Le sang prélevé sur EDTA ou ACD est mélangé volume pour volume avec une solution saline tamponnée (tampon Tris isotonique) ou une solution de phosphate buffered saline (PBS) ou une solution de Hank's (Hank's balanced salt solution).

Il existe deux méthodes:

- La première : Au fond d'un tube plastique de 10 ml, introduire 2 ml de solution Ficoll et avec une seringue ou une pipette, poser à la surface le sang dilué au $\frac{1}{2}$ (50%) dans du Hanks.
- La deuxième consiste à mettre les 5 ml de sang dans le tube, puis à injecter dans un deuxième temps avec une seringue et une aiguille (type aiguille à ponction lombaire) le Ficoll en dessous du sang dilué.

Le tube est centrifugé 30 minutes à 400 g et à la température ambiante.

Après la centrifugation, recueillir à la surface du Ficoll un anneau contenant les lymphocytes en majorité (90 à 95 %) et des monocytes. Les cellules sont alors lavées deux fois dans la solution de Hanks additionnée de 5 % de sérum de veau fœtal (SVF).

2. 2. 2. 2 Séparation des cellules de la moelle osseuse sur gradient de ficoll

C'est la méthode la plus classique pour étudier les différentes cellules souches des différentes lignées par un marquage en immunofluorescence directe ou indirecte.

La moelle diluée provenant du flacon contenant la calciparine est directement posée à la surface d'un gradient de Ficoll.

Une moelle prélevée dans le flacon hépariné est préalablement diluée avec 5 à 10 ml de Hanks ou RPMI stérile avant d'être posée à la surface du Ficoll.

La procédure est ensuite semblable à celle retenue pour les cellules sanguines.

2. 3 MARQUAGE CELLULAIRE

La suspension cellulaire obtenue par prélèvement direct ou récupérée à partir du Ficoll puis lavée et ajustée à une concentration de 10 millions de cellules par ml. Le marquage permet d'analyser les antigènes de la surface cellulaire et intracellulaire.

2. 3. 1 Marquage de surface des globules blancs

Dans la plupart des méthodes décrites, il suffira de prendre 100 μ l de cette suspension, soit 1 million de cellules, pour effectuer les marquages dans chaque tube. Cependant il faut savoir que 100 μ l provenant d'un individu normal ne sont pas comparables à 100 μ l de sang total en

cas de leucémie aigüe ou syndrome lymphoprolifératif hyperleucocytaire et pour que les anticorps soient utilisés en conditions saturantes, la quantification des cellules sanguines doit être préalablement définie et si elle est élevée, elle doit être diluée afin d'avoir une proportionnalité entre le nombre de cellules à marquer et la quantité d'anticorps à mettre. Par ailleurs, les cellules de la moelle osseuse comportent chez l'homme un nombre important de cellules jeunes et de progéniteurs des différentes lignées.

C'est au niveau de la moelle osseuse que l'on retrouve le plus fort pourcentage de cellules CD34+, correspondant aux progéniteurs médullaires (Bender et col, 1991). Les cellules pourront être identifiées par la détection d'antigènes de surface ou cytoplasmique correspondant aux différentes lignées (Uckun, 1990; Terstappen et col, 1992).

Le phénotypage des leucémies (Bené MC et col, 1999) [17] est souvent effectué dans un prélèvement de moelle osseuse et implique des précautions particulières.

2. 3. 1. 1 Marquage cellulaire en immunofluorescence indirecte

- L'anticorps monoclonal non conjugué conservé à -20°C et aliquoté pré dilué si nécessaire est ajouté aux 100 μl de la suspension cellulaire (le volume d'Ac est défini par le fournisseur)
- Laisser incubé 30 min à $+4^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité.
- Effectuer 2 lavages dans 5 ml de PBS
- Préparer une dilution d'un anticorps anti-Ig de souris FITC dans du PBS
- Après deux lavages, ajouter la solution d'anticorps anti-souris fluorescent (le volume est défini par le fournisseur)
- Laisser incubé 30 min à l'obscurité à 4°C
- Effectuer 2 lavages dans 5 ml de PBS.
- La suspension cellulaire est alors prête pour une lecture au cytomètre.

2. 3. 1. 2 Marquage cellulaire en immunofluorescence directe

L'anticorps monoclonal (AcM) conjugué à un fluorochrome (FITC, PE ou autre) va permettre d'effectuer des lectures en double, quadruple voir plus de marquage aidant à l'identification des sous populations plus rapidement. En effet ces fluorochromes peuvent être excités par un seul laser argon par la raie à 488nm, et produire un signal de fluorescence qui sera sélectionné avec un jeu de filtres et des miroirs appropriés : 510- 530 nm pour la fluorescence verte du FITC et 570- 580nm pour la fluorescence orange. La méthode consiste à :

- Mettre dans chaque tube 100 μl de sang total auquel on ajoute un volume d'AcM défini par le fournisseur (10 à 20 μl).
- Laisser la suspension incubé 30 min à la température ambiante et à l'obscurité.
- Ajouter 1 à 2 ml de la solution de lyse des GR et re-incuber les tubes pendant 20- 30 min à l'obscurité. Après une aspiration du surnageant.
- Effectuer un double lavage par 3ml de PBS. Avant de suspendre le culot dans un tube avec 250- 500 μl de PBS pour lecture au cytomètre.

2. 3. 1. 3 Détection des immunoglobulines de surface (Igs)

La présence d'immunoglobulines sériques dont les isotypes sont identiques aux immunoglobulines de surface des lymphocytes B, rend ces dernières difficiles à les détecter au niveau du sang total [18]. Leur recherche incite le recours à la procédure suivante:

- Distribuer 1ml de prélèvement dans un tube conique de 15 ml
- Ajouter 14 ml de CellWash ou PBS (1^{ère} fois)
- Agiter par retournement ou avec une pipette
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min
- Eliminer le surnageant par aspiration (le culot est instable)
- Ajouter 14 ml de PBS (CellWash ou PBS) (2^{ème} fois)
- Agiter par retournement ou avec une pipette
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min
- Eliminer le surnageant par aspiration (le culot est instable)
- Reprendre le culot dans 1 ml ou plus en fonction de la numération des GB et de la dilution à effectuer.
- Distribuer 100µl de cette suspension dans les tubes avec les anticorps.

2. 3. 2 Marquage des antigènes intra cytoplasmiques

Une meilleure définition structurale et fonctionnelle de la cellule fait appel à la révélation d'antigènes intra cytoplasmiques. Celle-ci nécessite une perméabilisation préalable des cellules afin d'assurer l'entrée des réactifs impliqués dans la réaction d'immunofluorescence. En effet, l'utilisation de détergents pour une perméabilisation membranaire doit éviter toute destruction ou agrégation cellulaire, dénaturation antigénique ou apparition de fluorescence non spécifique.

Un détergent, tel la saponine qui perméabilise les membranes cellulaires sans les détruire, peut ainsi être utilisé pour la détection des antigènes intracellulaires sur les cellules entières en CMF (Jacob et col, 1991). La saponine agit principalement en solubilisant les stérols et laisse la membrane intacte. C'est une méthode rapide et sensible [19].

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que certains antigènes peuvent être détectés au stade intra cytoplasmique le plus précoce de la différenciation, tel que le CD3 dans les LAL de type T (Campana et col, 1987) et le CD22 dans les LAL de type pré-B (Janossy et col, 1989) [20].

Cette technique a montré une grande utilité dans le phénotypage des LAL de type indifférencié et la myéloperoxydase (MPO) qui a une spécificité dans la forme myéloïde.

Pour un double marquage comprenant l'étude d'un antigène de surface et d'un antigène intra cytoplasmique, il est préférable de suivre la chronologie suivante:

- Marquage membranaire traditionnel pour l'antigène de surface.
- Permeabilisation avec la saponine, incubation avec l'anticorps recherchant l'antigène intra cytoplasmique.
- Maintenir la saponine dans les milieux de lavage ultérieurs.

En pratique courante, deux types de marquage sont utilisés:

- Marquage de surface selon Becton Dickinson (BD)

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des prélèvements sur tube vacutainer EDTA de moins de 6 heures gardés à température ambiante.

- Déposer dans des tubes de 5 ml, la quantité de réactif recommandé par le fabricant.
- Ajouter dans chaque tube 100 µl de sang total puis agiter au vortex pendant quelques secondes.
- Incuber l'échantillon à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15-20 min.
- Ajouter 2 ml de FACS lyse diluée au 1/10^{ème} avec de l'eau distillée puis agiter au vortex lentement et incuber 10 minutes comme précédemment.
- Centrifuger les tubes à 300g pendant 5 min sans refroidir.
- Eliminer le surnageant par aspiration en laissant 50 µl de liquide dans les tubes pour éviter de troubler le culot.
- Ajouter 3 ml de PBS dans chaque tube puis agiter au vortex lentement et centrifuger les tubes à 300g pendant 5 min.
- Retirer le surnageant par aspiration et laisser au fond du tube 50 µl de liquide.
- Ajouter 500 µl de PBS au culot puis agiter au vortex pendant quelques secondes avant la lecture au cytomètre.

Dans certaines situations, Les échantillons peuvent être conservés 24 heures entre 2 et 8°C à l'obscurité après adjonction de fixateur type para formaldéhyde à 1%.

- Marquage intracytoplasmique selon Beckmann Coulter

A titre d'exemple, on décrit une combinaison de 4 anticorps appliqués sur un cytomètre de 4 couleurs. Elle comporte les CD3c-FITC/ MPO- PE/ CD45- ECD/ CD79ac- PC5.

Le marquage consiste à :

- Déposer 100µl de Sang total dans le tube.
- Ajouter 10µl de CD45 ECD et Vortexer immédiatement et à faible vitesse.
- Incuber le tube pendant 20 min à l'obscurité
- Ajouter 100µl d'un fixateur (formaldéhyde ou le **Réactif 1**) puis un vortex immédiat.
- Incuber l'échantillon 15 min à l'obscurité puis ajouté 3ml de PBS
- Centrifuger le tube à 400g pendant 5 min puis éliminé le surnageant par retournement
- Ajouter 100µl de l'intraprep (**Réactif 2**) puis Incuber le tube pendant 10 min à l'obscurité, une fois le temps écoulé, l'agiter doucement pendant 2 – 3 minutes
- Ajouter 10 µl des Ac (MPO, CD3c, CD79a), vortexer puis incubation à l'obscurité pendant 15 min
- Laver l'échantillon par adjonction de 2 ml de PBS
- Centrifuger pendant 5 min puis éliminé le surnageant par retournement rapide
- Resuspendre le culot dans 0,5 à 1 ml de PBS. Puis lecture au cytomètre.

2. 4 FIXATION

Après le marquage cellulaire, l'analyse peut se faire soit immédiatement, soit après 24 heures de conservation entre 2–8°C à condition que l'échantillon ait été fixé par le para formaldéhyde à 1%.

2. 4. 1 Fixation de cellules par le formol

La méthode de fixation par le formol officinal est la plus simple, puisque cette solution liquide est parfaitement stable.

Il suffit de préparer une solution d'un litre de PBS en ajoutant 10 ml de formol officinal (concentration de formol à 1%). Cette solution est utilisée pour remettre en suspension les cellules une fois le marquage effectué. Les cellules sont lues au cytomètre dans cette suspension de formol à 1%.

Bien que cette méthode permette de conserver les cellules pendant plusieurs jours, elle entraîne quelques inconvénients:

- Une diminution de la taille des cellules
- Une autofluorescence au niveau des cellules négatives. Il y aura donc lieu de placer le curseur de lecture de la fluorescence spécifique un peu plus loin que sur des cellules vivantes.
- Selon les fluorochromes utilisés on peut noter une baisse de rendement quantique à pH acide.

2. 4. 2 Fixation de cellules par le para formaldéhyde

C'est la méthode la plus classique, elle consiste à effectuer une fixation par le para formaldéhyde.

- Préparation du fixateur : Elle consiste à :

- Dissoudre 1g de para formaldéhyde dans 100 ml de PBS en chauffant à 60°C jusqu'à dissolution complète du soluté.
- Laisser refroidir à température ambiante, puis ajuster le pH à 7,4 avec du NaOH ou du HCL.
- Filtrer sur millipore 0,25 µm, car il reste parfois des cristaux insolubles.

La solution se conserve 15 jours à + 4 °C

- Méthode de fixation des cellules consiste à :

- Incuber 100 µl de suspension cellulaire avec les anticorps.
- Laver les cellules en PBS.
- Centrifuger puis re-suspendre le culot contenant les cellules dans 1 ml de tampon de para formaldéhyde.
- Conserver les cellules au moins 24 heures à + 4 °C dans le tampon de fixation.

- Résultats de la fixation des cellules

Les cellules fixées au para formaldéhyde peuvent être conservées en suspension de PBS à + 4°C, au minimum 1 semaine avec la stabilité du marquage.

Comme avec le formol, on observe une diminution modérée de la taille et de l'apparition d'une auto fluorescence qui demande des ajustements du curseur de positivité.

Si on compare les deux méthodes de fixation, il est démontré que la première méthode au formol, plus simple à mettre en œuvre et à préparer donne des résultats similaires à long terme voir supérieurs à celle au para formaldéhyde. La plupart des marqueurs des classes de différenciation présentent une grande stabilité dans le temps après fixation. Cependant certains marqueurs comme le CD16, HLA-DR classe II, le CD18, le CD11b, le CD45 et le CD42b peuvent présenter une diminution par effet de fixation.

Donc une fixation de longue durée (1-2 semaines) peut produire des résultats aléatoires avec certains CD (CD2, CD3, CD4, CD7, CD19, CD21, CD29, TCR)[21, 22,23].

2. 5 ANALYSE DE L'ECHANTILLON EN CMF

L'étude d'un marquage en cytométrie en flux (CMF) s'effectue en deux étapes : acquisition puis analyse des données.

A l'issue du dernier lavage après marquage, tous les prélèvements sont repris dans du PBS avant leur passage au cytomètre. L'acquisition est effectuée après avoir vérifié tous les contrôles de l'appareil et les réglages des différents marquages.

D'une manière générale, dans la leucémie aigüe la stratégie de l'analyse se passe de préférence avec deux panels, le premier aide dans l'orientation pour déterminer le type de la lignée et le suivant qui englobe le maximum d'anticorps visant à déterminer le sous type, le stade différenciation et les particularités (sur ou sous expression et les marqueurs aberrants).

Les cellules sont généralement analysées avec un seuil en FSC (taille) et SSC (Structure), la présentation des nuages qui correspond aux sous populations leucocytaires permet d'éliminer les cellules mortes et les plaquettes. Une seconde analyse sur un histogramme avec l'anticorps panleucocytaire (ALC : CD45) permet de discriminer les populations cellulaires et aide au fenêtrage de la population ciblée afin de déterminer son pourcentage et ses caractéristiques immunophénotypiques.

Le nombre de cellule à acquérir dépend de la fréquence attendue des populations à analyser. La précision du résultat est en effet liée au nombre d'événements comptés par le cytomètre. Pour un coefficient de variation (CV) de 10% par exemple, il faut au moins 10 cellules formant un nuage de points homogène. Le nombre d'événements à acquérir sera donc d'autant plus grand que la population évaluée est faiblement représentée.

Pour une analyse des sous populations lymphocytaire, il est classique de sélectionner environ 3000-5000 événements dans la fenêtre des lymphocytes. Ce qui donne une précision suffisante pour des populations représentant plus de 1% de lymphocyte.

Pour dénombrer des événements rares comme les CD34 en deçà de 0,1%, il faut en compter au moins 50000 événements. Ces chiffres sont atteints en quelques secondes lorsque le prélèvement n'est pas cytopénique et il est appliqué dans la détermination de la maladie résiduelle avec la recherche d'une sensibilité encore plus faible entre 4 – 5 logs.

2.5. 1 Evaluation de la fréquence d'une population cible

L'analyse commence par une étape essentielle qui est la définition de la fenêtre de sélection dite «Gating» afin de cibler une population de référence. Le gating d'une population anormale supposée blastique est difficile sur un histogramme de taille(FSC)/structure(SSC) surtout lorsque l'invasion sanguine ou médullaire est partielle d'une part et les populations se chevauchent d'autre part.

2.5. 2 Numération en valeur absolue

Dans la technique simple de la plateforme, l'évaluation en pourcentage et en valeur absolue a eu lieu par CMF grâce à des billes de calibration. Pour les appareils qui prélèvent un volume fixe et précis, ces billes peuvent être passées séparément (étalon externe) de l'échantillon ou être mises dans l'échantillon (étalon interne).

Deux méthodes sont disponibles (Bene MC et al, 1998) [24]:

- Soit on ajoute à l'échantillon de sang un même volume de billes prélevées dans un flacon (Technique **flow count de Beckman Coulter**).
- Soit on utilise des tubes d'analyse contenant déjà une quantité fixe de billes lyophilisées, dans lesquels on ajoute un volume défini de prélèvement (Technique **true Count de BD biosciences**).

Le nombre d'événements acquis par CMF est proportionnel aux concentrations de billes et de cellules. Connaissant le nombre ou la concentration de billes dans le tube d'analyse, on calcule la concentration cellulaire. Le calcul peut se faire grâce aux logiciels adaptés ou effectué manuellement selon les formules suivantes :

- ◆ *Technique flow count : [cellules] = (nb événements billes / nb événements cellules) x (Billes).*
- ◆ *Technique TrueCount : [cellules] = (nb événements billes / nb événements cellules) x (nb billes par tube / volume de sang).*

2.5. 3 Expression d'un antigène par une sous population

La présence d'un antigène sur une sous population peut s'exprimer soit en pourcentage de cellules positives pour ce marqueur, soit en niveau moyen d'expression. La population d'intérêt doit être parfaitement caractérisée et ciblée (par exemple: sélection des cellules blastiques sur le critère de la faible intensité du clone sur l'histogramme CD45/SSC).

Les résultats exprimés en pourcentage de cellules positives sont faciles à établir lorsque le marquage est intense et bimodal. Dans ce cas, il existe une bonne discrimination «vallée » entre le témoin iso typique ou la population négative pour le marqueur et la population positive qui sert de seuil de positivité.

Chaque laboratoire détermine le seuil de positivité d'une population cellulaire vis à vis d'un marqueur qui varie entre le marquage intra cellulaire et le marquage de surface. Souvent le seuil de positivité peut se situer à > 10% pour le marquage intracellulaire et souvent à 20% rarement plus pour le marquage de surface.

2. 5. 4 Intérêt du CD45 dans la discrimination des populations

Toutes les cellules hématopoïétiques expriment le CD45 au cours de leur développement. L'expression du CD45 va persister sur les leucocytes tout au long de leur vie à l'exception des plasmocytes, tandis que les érythrocytes et les plaquettes perdent l'expression de ce marqueur au cours de leur différenciation.

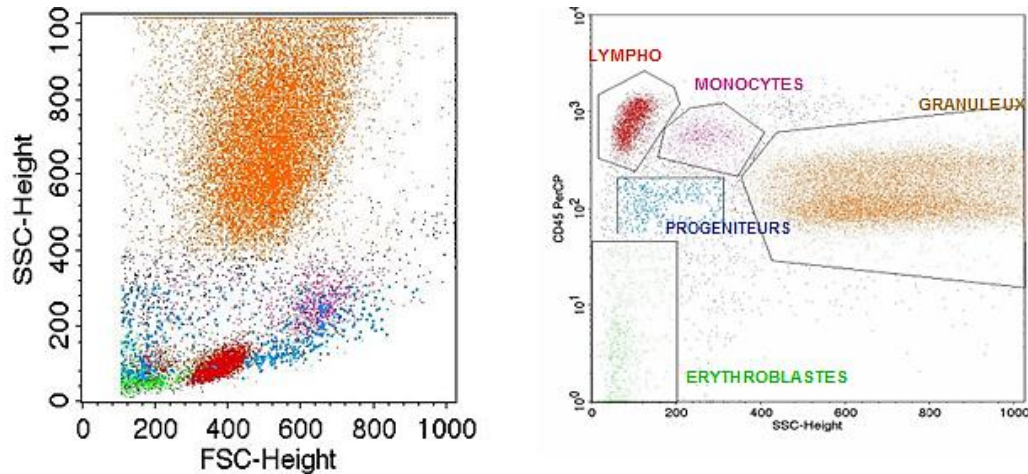


Figure 16 : Répartition des cellules de la moelle normale en FSC/SSC et 45/SSC

La figure 16, illustre l'avantage de l'utilisation du CD45 en association avec le SSC pour identifier les différents groupes de cellules au sein d'une suspension de cellules médullaires, obtenues après lyse des globules rouges. Cette approche permet de mettre en évidence cinq groupes principaux de cellules. Les lymphocytes, colorés en rouge, sont caractérisés par l'intensité la plus forte du CD45 et le signal le plus faible en SSC. Les cellules vertes englobent les cellules de la lignée érythroïde caractérisée par la négativité pour le CD45 et un faible signal en SSC. Les cellules violettes correspondent aux monocytes qui montrent une expression du CD45 un peu plus faible que celle des lymphocytes et des caractéristiques intermédiaires en SSC entre les lymphocytes et les cellules myéloïdes.

Les cellules colorées en bleu correspondent aux progéniteurs montrant l'expression la plus faible du CD45 avec des caractéristiques de SSC variables, proche de celles des lymphocytes ou des monocytes. Enfin, les cellules orange englobent les cellules myéloïdes caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45. Le second dot-plot permet d'observer les caractéristiques de FSC-SSC (taille-granularité) de chacun des groupes de cellules identifiées sur le dot-plot SSC-CD45. De plus, à partir de cette approche, il est possible d'avoir une idée de la maturation des cellules pour chacun des groupes de cellules identifiées du fait de l'augmentation ou de la diminution de l'expression du CD45 avec la maturation. Ainsi, les progéniteurs peuvent être identifiés non seulement par leur expression du CD34 mais aussi par l'expression faible du CD45. Les progéniteurs de la lignée myéloïde montrent un signal plus intense en SSC que les progéniteurs de la lignée lymphoïde pour un niveau identique d'expression du CD45. Les cellules de la lignée érythroïde montrent une diminution de l'expression du CD45 depuis le stade d'érythroblaste jusqu'au stade d'érythrocyte mature, les cellules les plus matures étant négatives pour le CD45.

Par contraste, les progéniteurs de la lignée lymphoïde B vont montrer une augmentation progressive de l'expression du CD45 avec leur maturation pour atteindre une expression maximale au stade de lymphocyte mature. Au niveau des cellules de la lignée myéloïde, les modifications de l'expression du CD45 avec la maturation sont moins marquées. L'expression du CD45 reste faible pendant la majorité du processus de maturation pour ne montrer qu'une faible augmentation d'expression lors du passage du métamyélocyte vers le neutrophile segmenté.

Au niveau des monocytes, on observe une augmentation marquée de l'expression du CD45 du monoblaste jusqu'au monocyte avec peu de modifications des caractéristiques de SSC.

Comme nous venons de le voir, l'analyse du niveau d'expression du CD45 en association avec le SSC offre un outil intéressant pour l'étude des cellules médullaires avec beaucoup plus de clarté et une nette discrimination entre les différentes populations.

Dans la pathologie, en particulier les leucémies aiguës (Figure 17), la discrimination des cellules blastiques par rapport aux cellules matures résiduelles est réalisée habituellement à l'aide de l'histogramme bi-paramétrique de taille (FSC) et de la granularité (SSC). Les blastes forment une population homogène se différenciant généralement bien des lymphocytes et des débris (plaquettaires, et résidus membranaires des globules rouges). Cette méthodologie facilement applicable lorsque la moelle est massivement envahie est plus difficile lorsque les blastes sont en faible nombre ou lorsqu'ils forment une population hétérogène. Dans cette situation il existe un risque de contamination de la fenêtre des blastes par des éléments matures, aboutissant éventuellement à la détection de marqueurs des deux lignées (myéloïde et lymphoïde) et au diagnostic erroné de leucémie biphenotypique [25,26, 27]. Les limites de cette méthode nous ont conduits à appliquer la procédure d'utilisation du CD45 en triple fluorescence comme recommandation universelle.

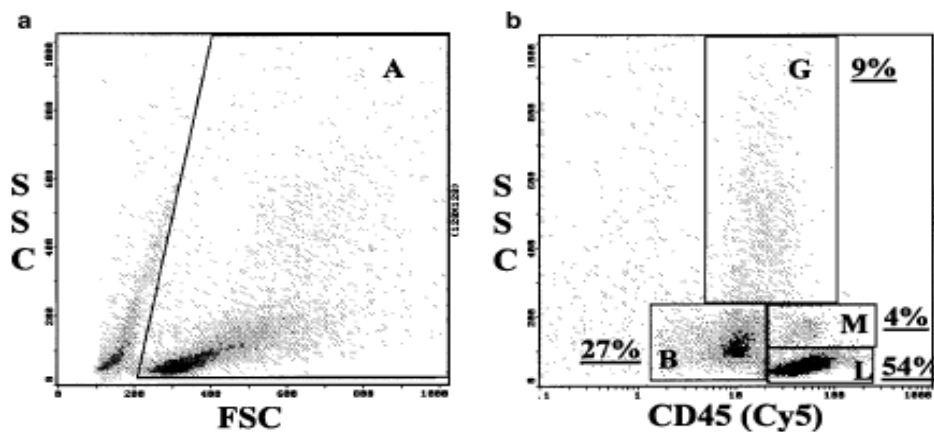


Figure 17 : Intérêt de discrimination du CD45/SSC vs FSC/SSC

A : Cellules viables, G : Granuleux, M : monocytes, L : Lymphocytes, B : Blastes

CHAPITRE 3

**LEUCEMIES AIGUES ET
APPLICATION DE LA CMF**

3. 1 DEFINITION

Les leucémies aiguës sont des hémopathies malignes définies initialement par le groupe FAB (franco-Américano- Britannique) par la présence de plus de 30% de blastes dans la moelle osseuse, puis ce seuil est passé à 20% dans la classification de l’OMS (organisation mondiale de la santé). On distingue deux formes :

- Les leucémies aiguës myéloïdes
- Les leucémies aiguës lymphoïdes

3.2 CLASSIFICATIONS DES LEUCEMIES AIGUES

3. 2. 1 Classification FAB

3. 2. 1. 1 Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les leucémies aiguës myéloïdes sont caractérisées par une expansion clonale de blastes myéloïdes, elles surviennent à tout âge mais sont plus fréquentes chez l’adulte.

La première classification a été proposée en 1976 par le groupe FAB [28], elle est fondée sur l’aspect morphologique des blastes sur les frottis médullaires colorés au May Grunwald Giemsa (MGG) et sur les colorations cytochimiques au noir soudan, myéloperoxydase, PAS (acide périodique Schiff) et estérases. Ces réactions sont pour but de préciser la lignée d’appartenance des blastes par la présence ou l’absence d’activité d’enzymes.

- **La myéloperoxydase (MPO):** La cytochimie de la myéloperoxydase caractérise les cellules myéloïdes granuleuses et à un degré moindre les cellules monocytaires. La présence d’une activité myéloperoxydasique dans les blastes est attestée par la dégradation de la benzidine donnant une couleur marron vert en présence de peroxyde d’hydrogène dans les cellules. Les lignées neutrophile et éosinophile montrent une positivité intense et focalisée, alors que les cellules de la lignée monocyttaire expriment la myéloperoxydase sous forme de granulations cytoplasmiques fines et dispersées.

- **Les estérases:** Il existe deux types d’estérases. Les estérases non spécifiques NASDA, capables d’hydrolyser le naphthol-ASD-acétate (NASDA), sont présentes dans les lignées granulocytaire et monocyttaire, l’activité enzymatique est révélée sous la forme de grains bleus. L’activité estérase de la lignée monocyttaire est inhibée par le fluorure de sodium, ce qui la différencie de celle de la lignée granuleuse, pour laquelle il n’y a pas d’inhibition. Les estérases spécifiques, appelées butyrate-estérases caractérisent les cellules monocytaires différenciées.

Les réactions des estérases sont utilisées pour individualiser les cellules granuleuses et monocytaires au sein d’une population blastique.

Selon la classification FAB, on distingue 8 catégories de LAM, définies en fonction de la différenciation cellulaire de la moelle osseuse vers une ou plusieurs lignées et du degré de maturation des cellules (Tableau III).

Tableau III : Classification FAB: Aspects morphologiques des 8 variétés de LAM

Type FAB	Stade de maturation	Définition
LAM 0	Indifférenciée	Inclassable par cytologie et cytochimie (MPO et/ou Noir soudan négatives)
LAM 1	Sans maturation	90% de blastes sans maturation granuleuse, Corps d'Auer(CA) +/-
LAM 2	Avec maturation	30-90% de blastes avec maturation granuleuse > à 10%, CA fréquents
LAM 3	Promyélocytaire	Majorité de promyélocytes anormaux avec CA fréquents et parfois en fagots
LAM 4	Myélo-monocytaire	Myéloblastes > 30%, le reste une composante monocytaire LAM4 Eo: granulations Eosino ++ pathologiques (3-30%)
LAM 5	Monoblastique	LAM5a: Peu différenciée: Monoblastes > 80%. LAM5b: différenciée: Monoblastes < 80%, le reste une composante monocytaire
LAM 6	Erythro- leucémie	Myéloblastes > 30%, Erythroblastes > 50% avec dysérythropoïèse.
LAM 7	Mégacaryoblastique	Morphologie difficile à reconnaître, parfois Blastes avec des pseudopodes cytoplasmiques.

- La LAM 0 ou LA myéloblastique indifférenciée

Les blastes médullaires représentent plus de 90% de cellules nucléés. Il s'agit de myéloblastes agranulaires, sans corps d'Auer et absence de positivité pour la peroxydase. Le taux de blastes positif pour la myéloperoxydase (MPO) ou le noir soudan ne dépasse pas 3% (Figure 18). L'immunophénotypage des cellules blastiques est nécessaire, il montre une expression d'au moins deux antigènes myéloïdes avec absence de marqueurs lymphoïdes (voir partie immunophénotypage des LAM).

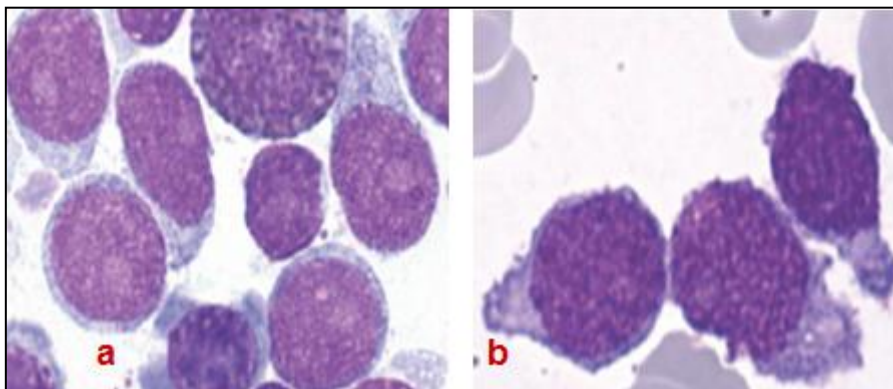


Figure 18 : Aspects a et b d'une LAM 0 au MGG

- La LAM1 ou LA myéloblastique sans maturation granuleuse

Plus de 90% de cellules de la moelle sont des blastes. La maturation granuleuse (à partir du promyélocytes et au-delà) représente moins de 10%. Le taux de blastes positifs pour le Noir soudan (NS) ou peroxydase est supérieur ou égal à 3%. Les myéloblastes peuvent contenir quelques granulations et/ou un corps d'Auer (CA) (Figure 19). Un corps d'Auer est formé par la coalescence ou l'agencement de lysosomes réalisant un fin bâtonnet de 2 à 3 μm azurophile.

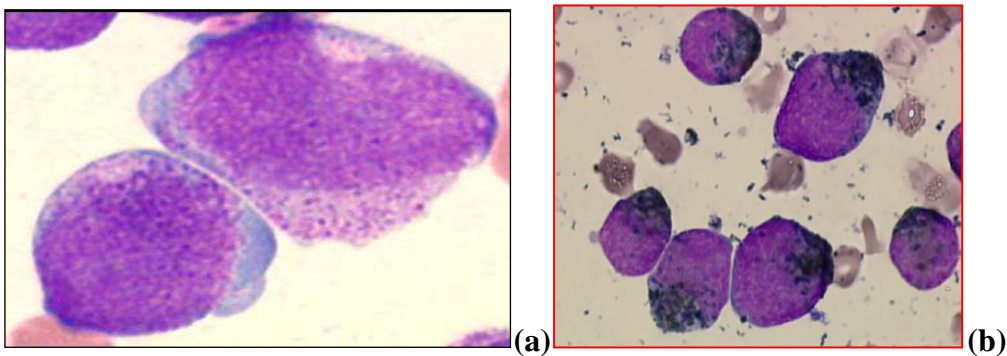


Figure 19 : Aspect morphologique et cytochimique d'une LAM1.

(a) Blastes granulaires, (b) Noir soudan positif

- La LAM2 ou LA myéloblastique avec maturation granuleuse

Elle est caractérisée par une blastose médullaire comprise entre 20 et 90% des éléments nucléés, associée à une maturation granuleuse supérieure à 10% montrant à des degrés divers des signes de dysgranulopoïèse. Le taux de blastes positifs pour la MPO est supérieur ou égal à 3%. Les blastes peuvent contenir un corps d'Auer volumineux (Figure 20), une monocytose peut être présente mais elle est modérée (inférieur à 20%).

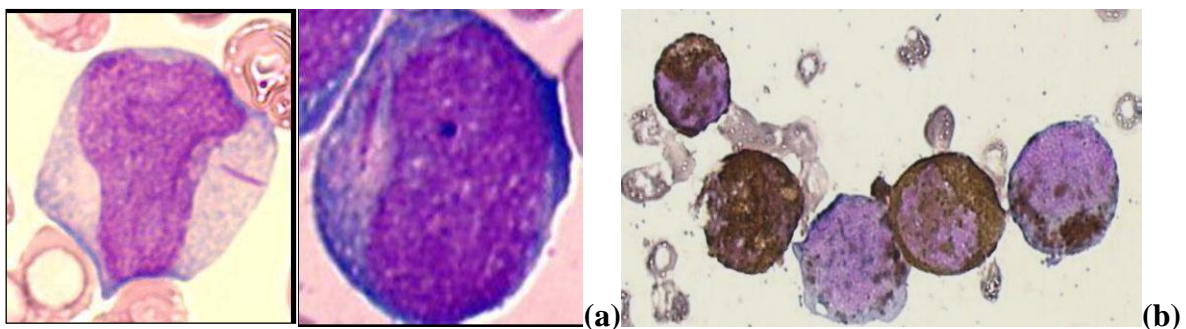


Figure 20: Myéloblastes différenciés dans la LAM2

(a) MGG : blastes bien différenciés avec bâtonnets d'Auer.(b)- Noir soudan :positif

- La LAM3 ou LA promyélocytaire

Elle est caractérisée par la présence au niveau de la moelle osseuse de plus de 20 % de promyélocytes anormaux, ces cellules qui présentent de nombreuses granulations volumineuses et atypiques, de teinte variant du rouge clair au rouge pourpre dont certaines peuvent contenir plusieurs bâtonnets d'Auer groupés en Fagots (Figure 21.a). Les peroxydases sont intensément positives.

A la présentation clinique, une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) est souvent associée, ce qui en fait la gravité et la nécessité d'un traitement spécifique en urgence.

A côté de la forme classique il existe une forme dite "variante" ou LAM3v, dont les blastes sont soit dépourvus de granulation, soit présentant quelques fins grains azurophiles. Les blastes peuvent prendre des aspects monocytoïdes voire bilobés ou réniformes. Cette forme microgranulaire contient de très rares cellules avec fagots de corps d'Auer (Figure 21.b). Cette forme variante est souvent hyperleucocytaire et de pronostic moins bon que la forme classique.

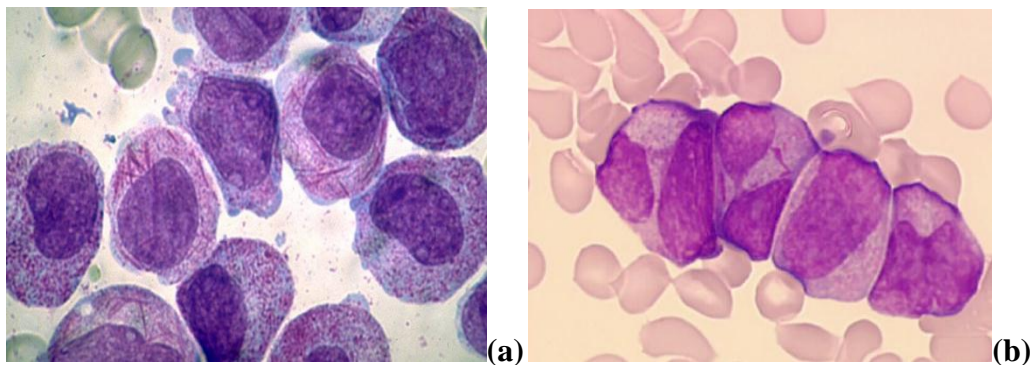


Figure 21 : LAM3 au MGG (a) la forme classique avec fagots, (b) la variante (M3v)

- La LAM4 ou LA myélo-monocytaire

Cette entité ressemble à la LAM2 avec un contingent monocytaire sanguin supérieur à 5000 éléments/mm³ ou une composante monocytaire (monocytes et précurseurs monocytaires) médullaire supérieur à 20 % à côté de myéloblastes différenciés et majoritaire (Figure 2.5.a). La cytochimie révèle une forte activité estérasique.

La variante LAM4 à éosinophiles (LAM4eo) est objectivée dans la moelle osseuse seulement, les éosinophiles anormaux (pourcentage varie de 3- 30%), sont reconnues par la présence de grosses granulations violettes atypiques dispersées dites basophiles dans le cytoplasme (Figure 22).

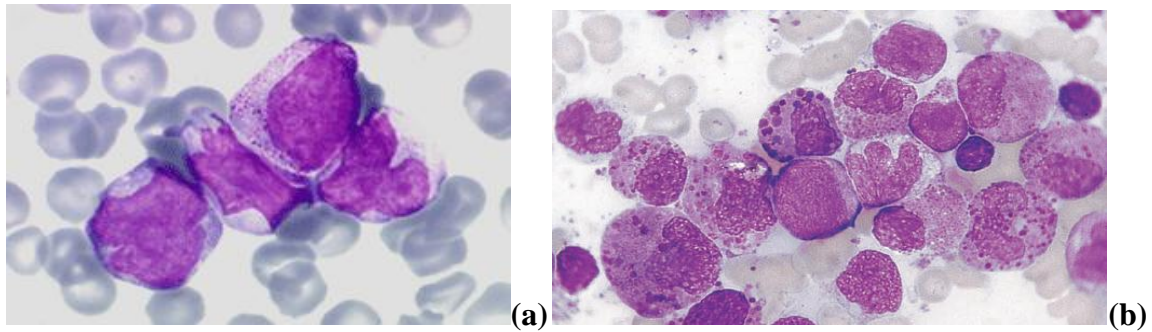


Figure 22 : Aspects morphologiques des LAM4
 (a) myéloblastes, monoblastes et monocytes.
 (b) LAM 4 à Eosinophiles (Eosinophiles anormaux)

- La LAM5 ou LA Monoblastique

Plus de 80 % des cellules de la moelle sont des cellules monocytaires (monoblastes, promonocytes ou monocytes). Selon le taux de la composante monocyttaire (monocytes et promonocytes) associée aux monoblastes, on peut distinguer les LAM5a (aspect monomorphe de monoblastes de 80%) (Figure 23a) des LAM5b (monoblastes < 80% avec la composante monocyttaire) (Figure 23b). La distinction de ces deux formes a peu d'intérêt pour le clinicien car le pronostic est identique. Les cellules sont négatives vis-à-vis de la peroxydase ou faiblement positive par la présence de grains fins dispersés et les NASDA estérases sont positives et inhibées par le fluorure de sodium (NaF) (Figure 24).

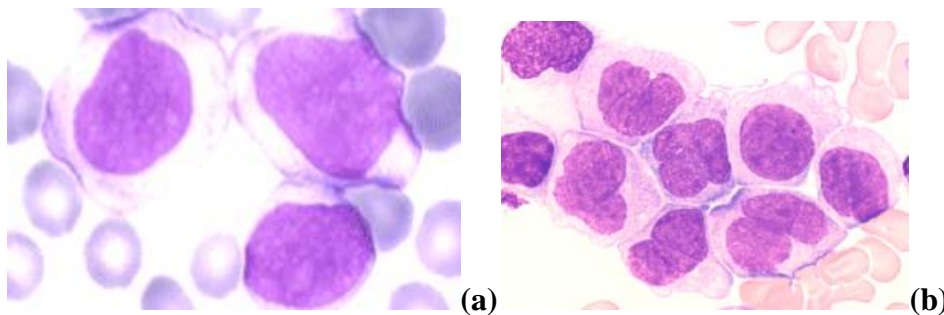


Figure 23 : Aspects morphologique d'une LAM5 (a) la forme monoblastique pure et (b) présence d'un contingent de promonocytes et monocytes.

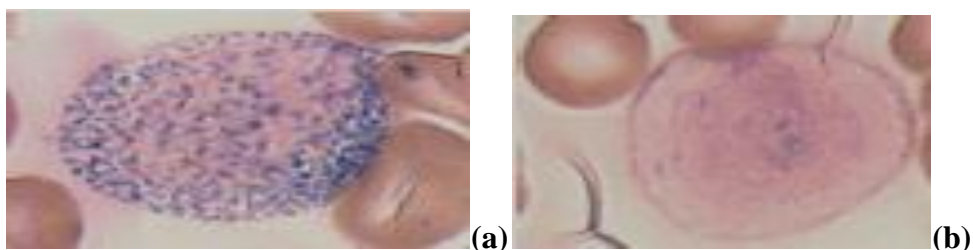


Figure 24 : Aspect cytochimique d'une LAM5
 (a) réaction NASDA positive, (b) réaction négative par le NaF
 (Flandrin George. Atlas Genet Cytogenet. Oncol Haematol. May 2002).

- La LAM6 ou Erythro-leucémie (LA avec composante érythroblastique)

C'est une prolifération associant une population érythroblastique majoritaire supérieure ou égale à 50 % et une composante granuleuse comportant une blastose supérieure ou égale à 20 %. Une proportion de 30 % d'érythroblastes suffit si les anomalies morphologiques à type de dystrophie sont très marquées (Figure 25). Par ailleurs dans des situations rares, il existe une variante de LAM6 dite : erythro-leucémie pure où on note l'absence de myéloblastes. Cette variété constitue un diagnostic différentiel avec les anémies mégalo-blastiques.

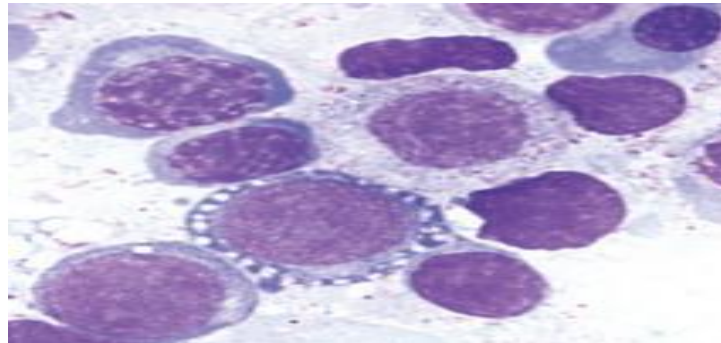


Figure 25 : Aspect d'une LAM6 : forme de M6 avec Erythroblastes vacuolés[39]

- La LAM7 ou LAMégacaryoblastique

Plus de 20 % des cellules de la moelle sont des blastes à différenciation mégacaryocytaire. Les mégacaryoblastes présentent un noyau ovale, nucléolé, à cytoplasme basophile avec souvent des expansions cytoplasmiques très évocatrices de la lignée (Figure 26). Cette entité est souvent associée à une myélofibrose, ce qui rend utile la biopsie ostéo- médullaire (BOM) pour étude histologique / histochimique ou mieux le recours à l'immunophénotypage pour établir le diagnostic.

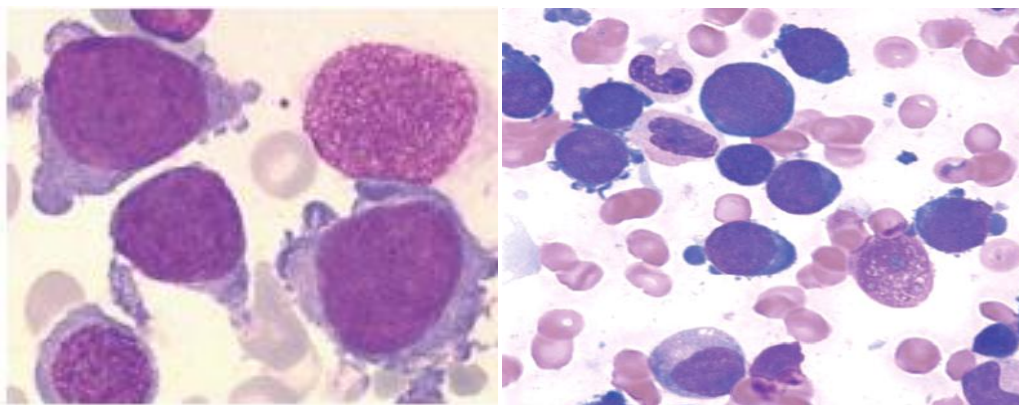


Figure 26 : Aspect d'une LA mégacaryocytaire LAM7 : avec des pseudo-podes cytoplasmiques[39]

3. 2. 1. 2 Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

Les LAL sont des proliférations malignes clonales aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de cellules immatures de la lignée lymphoïde, bloquées au stade lymphoblastique. Elles affectent en majorité des cas les enfants. Le diagnostic de LAL a été longtemps fondé sur la simple morphologie des blastes et la négativité de la cytochimie de la myéloperoxydase et/ où le noir soudan. La classification FAB distingue 3 groupes : LAL1, LAL2 et LAL3. La LAL3 étant la LAL dont l'aspect des cellules est similaire à celui du lymphome de Burkitt et fait qualifier cette variété de leucémie de type Burkitt. La détermination du type morphologique dépend de la taille des cellules, des nucléoles, de la basophilie du cytoplasme et de la présence de vacuoles (Tableau IV, figure 27)[32].

Tableau IV : Classification FAB (French- American- British) des leucémies aiguës lymphoblastiques[32]

TYPE FAB	CARACTERISTIQUES
LAL 1 (30%)	Prolifération cellulaire homogène Blastes de 15 à 25µm de diamètre Rapport nucléo-cytoplasmique augmenté (>80%) Noyau arrondi avec 1 à 2 petites encoches Chromatine fine, petit nucléole Cytoplasme basophile réduit à une fine couronne perinucléaire
LAL 2 (60%)	Prolifération cellulaire hétérogène Blastes de 20 à 30µm de diamètre Rapport nucléo-cytoplasmique variable (<80%) Noyau à contour régulier Chromatine fine parfois réticulée, avec 1- 2 nucléoles bien visibles Cytoplasme basophile plus abondant
LAL 3 (10%)	Prolifération cellulaire hétérogène Blastes de 20 à 30µm de diamètre Noyau arrondi avec 1 à 2 petits visibles Chromatine fine parfois perlée Cytoplasme abondant très basophile souvent criblé de vacuoles

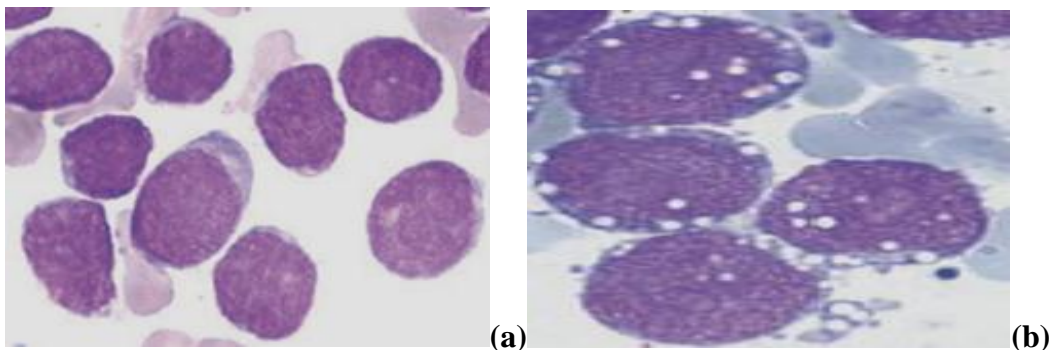


Figure 27 : Aspects morphologiques des LAL : (a) LAL 2, (b) LAL 3[39]

3. 2. 2 Classification OMS

3 - 2 – 2 -1 Les leucémies aiguës myéloïdes

Actuellement avec les progrès de la cytogénétique dans les hémopathies malignes, La mise en évidence d'anomalies génétiques spécifiques de certains types de leucémies a abouti aux nouvelles propositions de l'OMS (Tableau IV) qui sont fondées sur :

- L'intégration des anomalies génétiques récurrentes
- La prise en considération de la dysmyélopoïèse ou des antécédents de syndrome myélodysplasique.
- La prise en considération des antécédents thérapeutiques (chimiothérapie ou radiothérapie). Cette notion de caractère secondaire d'une leucémie aiguë est totalement nouvelle. Ceci permet d'insister sur le caractère pronostique défavorable des LAM secondaires par rapport aux LAM *de novo*. Par ailleurs et dans le même sens une corrélation entre la morphologie de la classification FAB, les anomalies cytogénétiques récurrentes et la biologie moléculaire a été validé par l'OMS en 2008 et révisée en 2016. (Tableaux V, VI) [29, 30,31]

Quatre groupes principaux sont ainsi reconnus.

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes :

- LAM avec t (8;21)(q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1. Cette entité est apparentée sur le plan morphologique à la LAM2. La présence de blaste avec un corps d'Auer piqué dans la dépression du noyau est évocatrice de cette translocation.
- LAM avec t (15;17)(q22;q12) ; PML-RAR α . Cette translocation est caractéristique de la leucémie aiguë à promyélocytes (LAM3).
- LAM avec éosinophiles médullaires anormaux et anomalies sur le chromosome 16 : inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22) ; CBF β -MYH11.
- L'inversion du 16 est ainsi une anomalie caractéristique de la LAM4 à éosinophiles.
- LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL
- LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214
- LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVII
- LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1
- Entités provisoires :
- LAM avec mutation NPM1
- LAM avec mutation CEBPA

- LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies

- Faisant suite à un SMD (syndrome myélodysplasique) ou SMD/SMP
- Ou présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des SMD
- Ou présentant une dysplasie sur > 50 % des cellules d'au moins 2 lignées.

- LAM post-chimiothérapie quel que soit le traitement

- LAM sans spécificité particulière : LAM de la classification FAB

Tableau V : Classification OMS des LAM 2008 révisée en 2016

<p>1^{er} groupe : LAM avec translocations chromosomiques récurrentes LAM avec t(8 ;21)(q22;q22) AML1 (CBFα)/ ETO et AML2 :RUNX1-RUNX1T1 LAM avec t(15 ;17)(q22;q11-12) et variants PML/ RARα LAM avec inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q11)CBFβ/ MYH 11X LAM avec anomalies 11q23(MLL)</p>
<p>2^{ème} groupe : LAM avec dysplasie multi lignée Avec SMD majeur Sans SMD majeur</p>
<p>3^{ème} groupe : LAM et SMD induits par Agents alkylants Epipodophyllotoxine Autres</p>
<p>4^{ème} groupe : LAM non différenciées Définition du FAB sus citée : LAM0 à LAM7 Leucémie aigue basophile LA panmyéloïde avec myélofibrose LA biphénotypiques ou mixtes</p>

Tableau VI: Correspondance OMS 2008 et FAB[30]

OMS 2008	FAB
Groupes avec anomalies cytogénétiques récurrentes	
LAM avec t (8; 21)(q22 ;q22) ; RUNX1 – RUNX1T1	LAM avec maturation (LAM2- FAB)
LAM avec t (15; 17) (q22 ; q12) ; PML - RAR α	LA à Promyélocytes (LAM3 - FAB)
LAM avec inv(16)(p13.1q22)ou t(16 ;16)(p13.1q22) ; CBF β - MYH11	LA Myélomonocytaire aigue avec éosinophiles anormaux (LAM4 Eosi- FAB)
LAM avec t(9 ; 11) (p22 ; q23) ; MLLT3- MLL	LA Monoblastique (LAM5 – FAB)
LAM avec t (6 ; 9) (p23 ; q34) ; DEK- NUP214	LAM avec maturation et excès de basophiles (LAM2- FAB)
LAM avec inv (3) (q21 ; q26.2)ou t(3 ;3) (q21 ;q26.2) ; RPN1- EVI1	LAM avec mégacaryocytes anormaux (LA à mégacaryocytes)
LAM avec t (1 ; 22) (p13 ; q13) ; RBM15- MKL1	LA Mégacaryoblastique (LAM7- FAB)
Entités provisoires : LAM avec mutation NPM1	Divers types de LAM(souvent LA sans maturation, LA myélomonocytaires ou monoblastiques
LAM avec mutation CEBPA	

Au moment du diagnostic d'une leucémie aiguë myéloïde, le délai et le coût de l'analyse cytogénétique rendent difficile l'application de cette classification OMS. La classification morphologique FAB et le recours à l'immunophénotypage par la CMF sont très utilisés aujourd'hui.

3. 2. 2 Les leucémies aiguës lymphoblastiques

La classification OMS, actualise la classification FAB en tenant compte des éléments de la morphologie, de l'immunophénotypage, des caractères cytogénétiques et aussi du tableau clinique [32]. La distinction LAL1/LAL2 de la classification FAB n'ayant pas de pertinence pronostique contrairement à la classification immunophénotypique qui définit les LAL-B et LAL-T [33], la classification FAB n'est presque plus utilisée aujourd'hui [34]. Il ne restait plus qu'une entité LAL3 qui est désormais appelée lymphome de Burkitt et reclassée parmi les tumeurs à cellules B matures. La notion d'infiltration primaire d'un site ganglionnaire ou extra-nodulaire est ajoutée par l'OMS en introduisant le terme de lymphome/leucémiolymphoblastique. Lorsqu'un patient présente une masse nodulaire et des lymphoblastes dans la moelle osseuse, la distinction entre une leucémie et un lymphome est arbitraire. Contrairement aux LAM, il n'y a pas de consensus sur un pourcentage limite de blastes requis pour établir un diagnostic de leucémie lymphoblastique. Néanmoins, dans la plupart des démarches diagnostiques et protocoles thérapeutiques, un seuil de 25 % de blastes médullaires est utilisé pour définir une leucémie lymphoblastique.

L'étude cytogénétique étant désormais indispensable au pronostic et décisionnelle pour la nature du traitement, l'OMS prend en compte les anomalies spécifiques de certaines entités.

- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B sans autre spécification

- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec anomalies cytogénétiques récurrentes:

- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t (9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t (v;11q23); MLL réarrangé
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t (12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hyper diploïdie
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hypo diploïdie
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t (5;14) (q31;q32); IL3-IGH
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t (1;19) (q23;p13.3).

3.3 IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES

La cytométrie en flux grâce aux connaissances profondes du profil phénotypique des cellules hématopoïétiques contribue au diagnostic des leucémies aiguës peu différenciées, permet de déterminer la lignée (B ou T) dont sont issues les cellules leucémiques lymphoblastiques ou encore spécifier des entités plus rares comme une participation de cellules érythroïdes dans une LAM6 très immature ou plaquettaire dans une LAM7 ainsi qu'une mise en évidence de leucémies biphénotypiques.

3.3.1 Profil des cellules leucémiques

Les données de la cytométrie en flux a permis de montrer que les cellules leucémiques expriment un profil phénotypique différent de la cellule normale même si elle mime un stade de différenciation ou de maturation de l'hématopoïèse. On distingue trois types d'anomalies :

- Absence d'expression de marqueurs présents normalement à un stade de maturation donné pour la lignée dont est issue la cellule leucémique.
- Niveau d'expression anormal (sur ou sous expression) d'un marqueur présent pour un stade de maturation donné.
- Expression de marqueurs d'autres lignées dits aberrants non exprimés normalement par les cellules de la lignée dont sont issues les cellules leucémiques.

Elle permet aussi de réaliser la distinction entre un excès de cellules blastiques normales dans le cadre d'un processus de régénération et un excès de cellules blastiques anormales dans le cadre des états pré-leucémique (myélodysplasie).

3.3.2 Panels de classification des leucémies aiguës

3.3.2.1 Panel obligatoire de dépistage

Pour remplir les objectifs de classification des leucémies aiguës, il faut rechercher l'expression ou l'absence d'un certain nombre de molécules qui permettent de définir les différents types et sous types de leucémies aiguës.

Les propositions de panels d'anticorps à étudier ont été nombreuses, ont évolué au cours du temps et en fonction de la puissance du cytomètre, du nombre de couleurs et des objectifs de l'analyse. Les dernières propositions ont été élaborées par un groupe d'experts européens dans le cadre de l'European Leukemia Net (Groupe EGIL: *Group for the immunological Characterisation of leukemias en 1995*)[36] qui propose le panel suivant :

- Marqueurs sans assignement de lignée : CD45, HLA Dr, CD34
- Marqueurs myéloïdes: MPO (Myéloperoxydase), CD13, CD33, CD117, CD14, CD64, CD41 ou CD61, CD235a (GPA : Glycophorine A).
- Marqueurs lymphoïdes B : CD19, CD79a, CD10, CD22, sIg, TDT (terminal deoxynucleotidyl transférase), cIgM.
- Marqueurs lymphoïdes T : CD3, CD2, CD7, CD1a, CD4, CD5 et CD8
- Marqueurs NK : CD56.

En cas de prélèvement pauvre en cellules ou pour obtenir une orientation rapide, on peut se limiter aux marqueurs suivants :

- Marqueurs sans assignement de lignée : CD45, CD34, TDT (lymphoïde).
- Marqueurs myéloïdes : MPOc, CD13, CD33, CD117.
- Marqueurs lymphoïdes B : CD19, CD79ac, CD10, (s ou c) CD22, sIg.
- Marqueurs lymphoïdes T : cCD3, CD2, CD7.

Certains antigènes sont à rechercher spécifiquement en intra cytoplasmique comme la myéloperoxydase (MPO), CD79a, CD3 et la TDT), d'autres seulement en cas de négativité de leur expression en surface, ce qui traduit un stade plus indifférencié (CD22, CD13, IgM)[35].

3. 3. 2. 2 Panel complémentaire

Un panel complémentaire permet d'affiner la classification selon les recommandations présentées dans le tableau VII, en fonction de l'orientation diagnostique fournie par le panel obligatoire; ainsi la recherche de la clonalité par la restriction isotypique des chaînes légères des immunoglobines est inutile en cas de prolifération myéloïde et inversement, la recherche de CD35 et de CD36 est inutile en cas de prolifération lymphoïde [37].

Tableau VII : Marqueurs complémentaires de l'analyse des LA

Orientation	Antigènes à rechercher
Myéloïde	cLactoferrine, cLysozyme CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD35, CD36, CD71, CD64
Lymphoïde B	Kappa/ Lambda en surface, CD20, CD52
Lymphoïde T	TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$
Prolifération CD4+ CD56+	CD123

3. 3. 3 Phénotype des LAM

La définition immunophénotypique des sous types de LAM est moins bien admise que celle des LAL, mais certaines orientations se dessinent dans certaines formes de LAM.

3. 3. 3. 1 Leucémie aiguë myéloïde peu différenciée (LAM 0)

Ce type représente 3-5% des LAM, il est fréquent chez l'adulte. Dans cette forme le caractère indifférencié des blastes morphologiquement d'une part et la négativité de la myéloperoxydase (MPO ou Noir soudan B) d'autre part, donnent à l'immunophénotypage une place majeure et décisive dans le diagnostic.

L'expression des marqueurs myéloïdes (CD33, CD13, CD117) à la surface des cellules blastiques à un score supérieur à 2 selon la classification EGIL à côté de l'expression des marqueurs d'immaturité (CD34) et la négativité des marqueurs lymphoïdes, érythrocytaires (CD235a), plaquettaires (CD41, CD42, CD61) et monocytaires (CD64, CD14) aboutissent au diagnostic de cette forme.

3. 3. 3. 2 Leucémie aiguë myéloïde peu mature (LAM1) et avec maturation (LAM2)

Les LAM1 et LAM2 représentent respectivement 10% et 30% des cas de LAM, leurs profils phénotypiques sont presque semblables à la LAM0, seulement la myéloperoxydase est d'une positivité supérieure à 3% pour la LAM1 et fortement positif pour la LAM2. Par ailleurs, il n'existe pas de marqueur spécifique pour la LAM1 par rapport à la LAM 2, en dehors d'un constat qui a été soulevé par certains auteurs que le CD15 est plus exprimé dans les LAM2

d'une part et l'intensité d'expression du CD34 est plus forte dans la LAM1 par rapport à la LAM2 d'autre part [38].

3. 3. 3. 3 Leucémie aiguë promyélocytaire (LAM 3)

Cette forme représente 5- 8% des LAM. L'immunophénotypage dans les formes classiques des LAM3 est souvent inutile du fait de la clarté de l'aspect morphologique. Cependant dans la forme dite «variante», la cytologie est parfois très difficile. La CMF montre dans les formes typiques la positivité des marqueurs myéloïdes déjà cités comme dans les formes précédentes d'une part et la forte expression de la MPO intracytoplasmique d'autre part.

La particularité qui est constamment retrouvée dans les formes classiques typiques est la perte d'expression des marqueurs d'immaturité (CD34 et HLA-DR), cependant dans la forme dite «variante»(LAM 3v), leur expression est variable(figure28)[39].

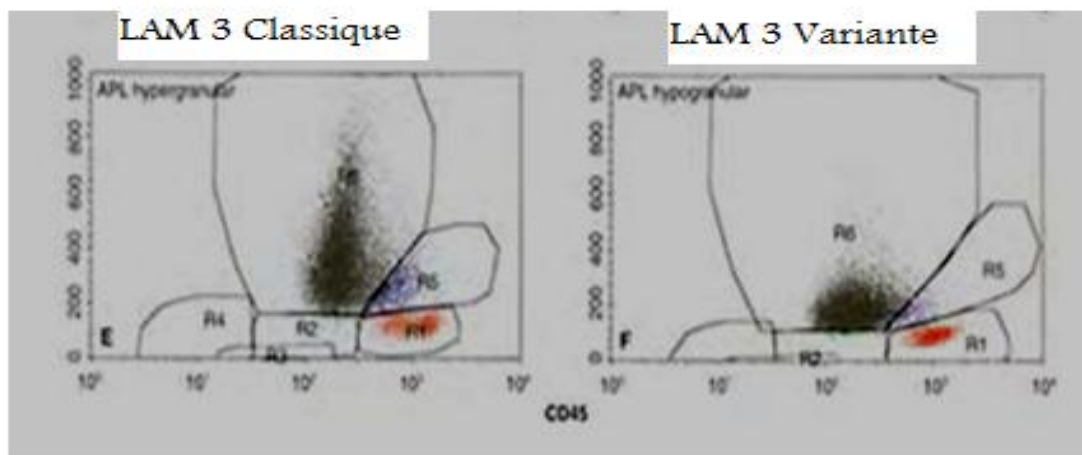


Figure 28 : Expression du clone de promyélocytes LAM3 et LAM 3v en CD45/ SS

3. 3. 3. 4 Leucémie aiguë Myélo-monocytaire (LAM4) et Monoblastique (LAM5)

Ces formes représentent respectivement 20 et 12% des cas de LAM. A côté de l'aspect morphologique qui est souvent objective, le diagnostic phénotypique est porté sur la présence de marqueurs monocytaires (CD64, CD14, CD11b, CD11c et CD4) associé aux marqueurs myéloïdes (CD33, CD13). D'une manière générale, le profil des deux formes est semblable en dehors de certaines particularités. Dans la LAM5 surtout le sous type LAM5a, on observe dans plus de 50% des cas, une négativité de la MPO, CD117 et CD34 d'une part [39,40] et d'autre part, la possibilité d'expression de marqueurs plaquettaires (par adhésion de plaquettes) à la surface des blastes, qui fait la confusion avec la LAM7.

3. 3. 3. 5 Erythro- leucémie ou leucémie aiguë érythroïde (LAM 6)

Cette forme représente moins de 3 % des LAM, elle existe sous deux formes. La forme habituelle faite d'une composante de myéloblastes à plus de 20% et une érythroblastose à plus de 50% avec signes de dysérythropoïèse. L'autre forme dite leucémie érythroïde pure, elle est exceptionnelle et de diagnostic difficile.

Le profil phénotypique dans la forme habituelle comporte la co-expression des marqueurs myéloïdes avec une intensité faible et des marqueurs érythroïdes comme les CD235a (Glycophorine A ou GPA), CD36 et parfois le CD71.

Dans la forme LA érythroïde pure dite variante, le diagnostic phénotypique est difficile[41] car toutes les cellules sont au stade de basophilie et peuvent ne pas exprimer les marqueurs myéloïdes voir même la négativité de la GPA. Parfois il y a le recours aux cultures in vitro, à la cytogénétique et/ ou la biologie moléculaire pour établir le diagnostic[42].

3. 3. 3. 6 Leucémie aiguë mégacaryoblastique (LAM 7)

Cette forme représente 3 à 5% des cas de LAM, de diagnostic souvent tardif du fait de la moelle pauvre par effet de la fibrose et l'aspect atypique des blastes. Dans cette forme le recours à l'immunophénotypage par cytométrie en flux est indispensable pour le diagnostic. Le profil phénotypique est basé sur l'expression d'au moins deux marqueurs de la lignée plaquettaire (CD41, CD42b, CD61). Par ailleurs les marqueurs CD34, CD64, CD117 et CD13 sont d'une expression variable allant d'une intensité modérée à faible, les autres marqueurs la MPO et HLA DR sont très souvent négatifs. (Tableau VIII) (Figure 29).

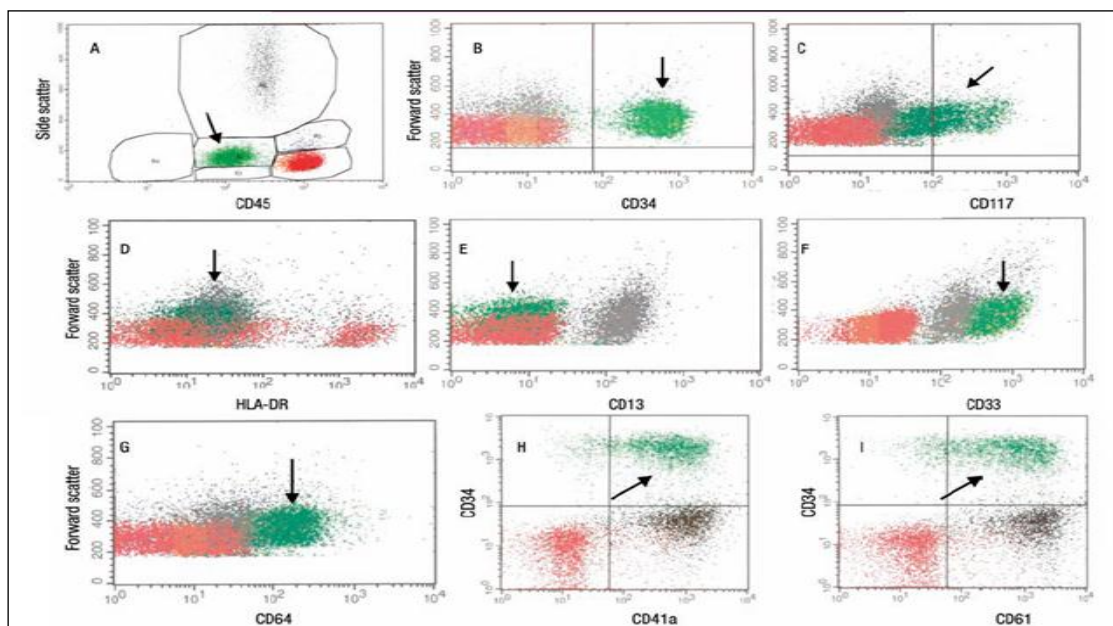


Figure 29 : Profil phénotypique par CMF d'une LAM7[39]

3. 3. 3. 7 : Leucémie aiguë à basophiles

C'est une variété très rare, cette prolifération est composée de blastes indifférenciées et de précurseurs basophiles contenant des grains anormaux révélés par la réaction colorée au bleu de toluidine. Le profil immunophénotypique le plus retrouvé est l'expression du CD34+, HLADR+, CD9+, CD123+, CD25+, CD19+ ou CD22+, CD33+ et CD13+ ; mais les autres marqueurs sont négatifs.

En résumé et en référence à certains travaux en CMF, dans les LAM, les marqueurs les plus souvent exprimés sont CD13, CD33, CD117, HLA-DR, CD15 (Casasnovas et al. 1998, Legrand et al. 2000). Lorsque il y a une participation monocyttaire, les CD14, CD36 ou CD64 sont alors plus fréquemment exprimés (Norgaard et al. 2001). Dans les LAM6 dite Erythro-leucémie, c'est l'expression de CD36 et de CD235a (Glycophorine A) qui est retrouvée sur des blastes qui n'expriment pas le CD45 (Domingo-Claros et al. 2002, Garand et al. 1995)[43]et l'expression de CD41, CD42 et de CD61 doit faire évoquer une LAM7 de la lignée mégacaryocytaire (Pagano et al. 2002).

Le profil immunophénotypique des LAM proposé par EGIL est représenté dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Profil immunophénotypique des LAM selon EGIL

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
MPO	-	+	+	+	+	-/+	+	-
CD13	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
CD33	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD117	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-
CD34	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
HLA-Dr	++	+	+	-	+/-	+	+/-	-/+
CD41/42	-	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	-	+/-	+	+	-	-
CD14	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD19	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
CD2	+/-	+	+	+	+	-/+	+	-
GlycoA	-	-	-	-	-	-	+	-

Par ailleurs, d'autres travaux menés par plusieurs groupes ont permis de décrire des caractéristiques de certaines entités avec des combinaisons telles que l'expression des CD33+/HLADr- dans les LAM avec t(15 ;17) (Paietta et al., 2004), l'expression du CD2 dans les LAM myélo-monocytaires avec éosinophilie et inv(16) (Adeansen et al., 1993), l'expression du CD34, CD19 et du CD56 dans les LAM avec t(8 ;21) (Hurwitz et al., 1992), et la coexpression de HLA-DR, CD7, CD13, CD15, CD33 et CD34 dans les LAM avec des mutations de CEBPA (Lin et al., 2005).

3. 3.4 Le phénotype des LAL

La mise en évidence par cytométrie en flux de marqueurs cellulaires membranaires et intracytoplasmiques a permis d'affirmer la nature lymphoïde des blastes, de distinguer les LAL à précurseurs B (LAL-B) et les LAL à précurseurs T (LAL-T) puis d'individualiser les

différents sous-groupes. Les phénotypes immunologiques des LAL sont définis à partir des stades physiologiques de la maturation des cellules lymphoïdes dans la moelle osseuse et le thymus (classification EGIL)[34,36].

Chacune des formes de LALB ou T comprenant un large spectre immunophénotypique permettant de définir les sous types.

3. 3.4. 1 Leucémie aiguë lymphoïde de phénotype B (LAL B)

Pour cette lignée, à coté des marqueurs dits d'immaturité comme la molécule HLA-DR et l'Ag TdT (deoxynucleotidyl transférase terminale) qui sont présents dans presque tous les cas de LALB [44], certains marqueurs (CD19, CD22c, CD79c) sont pan B, d'expression pour la majorité en intra cytoplasmique et présents depuis le premier stade des blastes B et jusqu'au blastes mature. Cependant d'autres interviennent dans la détermination des sous types de la lignée B (CD10, chaîne μ d'immunoglobine cytoplasmique « μ », IgMs de surface et le CD20)(tableau IX). Dans le type I les lymphoblastes dit pro-B sont caractérisés par l'absence d'Ig que ce soit de surface (Igs) ou en intra cytoplasmique (μ c) de même l'absence d'expression du CD10. Cependant dans le type II des lymphoblastes dit pré-pré B, outre la négativité des Ig de surface et intracytoplasmique, le CD10 est nettement exprimé. Dans le type III ou pré-B, les lymphoblastes acquièrent en plus du CD10, une expression de la chaîne lourde μ mise en évidence en intra –cytoplasmique. En fin le type IV des blastes B matures où l'Ig de surface est exprimée. Le groupe EGIL et ELN ont établi un récapitulatif des différents types de LAL B (Tableau IX)[34].

Tableau IX: Classification immunophénotypique des LAL B selon EGIL

EGIL	Autres classifications	Marqueurs communs	Autres marqueurs
B – I	Pro B	CD19+ / CD79acy +/ CD22 (s ou cy) + Présence au moins 2 des 3 marqueurs. HLA Dr +	TdT+/ CD10- / cIgM- / sIg –(κ ou λ)
B – II	Commune		TdT+/ CD10+ / cIgM-/ sIg –(κ ou λ)
B – III	Pré B		TdT+/ CD10+/ cIgM+ / sIg –(κ ou λ)
B - IV	B mature		TdT+/ CD10+/ cIgM + / sIg +(κ ou λ)

TdT : terminal desoxyribonucleotidyl transferase; c : intracytoplasmique; s : surface

3. 3.4. 2 Leucémie aiguë lymphoïde de phénotype T (LAL T)

Le groupe européen d'immunologie et de classification des leucémies a établi au même titre que les LALB, une classification des LAL T en quatre sous types.

Les marqueurs communs sont représentés par le CD3c et CD7 (Pan-T) et d'autres d'immaturité non spécifiques comme le TdT et le HLA-DR.

La LAL de type I dite Pro-T est composée d'une population très immature, exprimant le CD34 et les pan-T, alors que tous les autres marqueurs sont négatifs (CD2, CD5, CD4, CD8, CD1a, CD3s (Surface) et le récepteur TCR. L'expression de ces deux derniers traduit le type Type IV mature, le type III dit LAL T thymique exprime L'Ag cortical thymique CD1a sur une population CD3s négatif, CD4+ et CD8+. Dans le type II (LAL Pré-T), la population blastique est encore immature, elle n'exprime pas le CD34 mais exprime souvent le CD2 et le CD5. (Tableau X)[34] (Tableau XI) [36].

Tableau X: Classification immunophénotypique des LAL T selon EGIL

EGIL	Equivalent «physiologique»	Marqueurs communs	Autres marqueurs
T – I	Pro T	CD3 cy + / CD7 + / TdT + / HLA Dr +	Aucun
T – II	Pré T		CD2+ / CD5+ / sCD3- / CD1a-
T – III	Cortical		CD2+ / CD5+ / sCD3- / CD1a+ / CD4+ / CD8+
T - IV	T mature		T- IVa: CD2+ / CD5+ / sCD3+ / CD4+ ou CD8+ / TCRα /β+ T- IVb : CD2- / CD5+ / sCD3+ / CD4- / CD8- / TCRγ/δ +

Tableau XI : Classification EGIL des LAL T

EGIL	CD 3 Cyto	CD 7	CD2/ CD5/ CD8	CD 1a	CD 3 Surf
T I - Pro – T	+	+	-	-	-
T II - Pré – T	+	+	+	-	-
T III – Corticale	+	+	+	+	-
T IV Mature	+	+	+	-	+

Cyto : Intra- cytoplasmique, Surf : Surface

3. 3. 5 Phénotype des leucémies aiguës de lignée ambiguë

Dans environ 4 % des cas de leucémie aiguë (LA), le phénotype des blastes ne permet pas de distinguer l'origine myéloïde ou lymphoïde des précurseurs. Ces LA sont classées en LA de lignée ambiguë. L'OMS distingue les LA indifférenciées des LA biphénotypiques.

► Les LA indifférenciées

La morphologie et les marqueurs phénotypiques ne permettent pas l'assignement à la lignée lymphoïde ou myéloïde. Les cellules blastiques sont généralement HLADR+, CD34+, CD38+ et parfois TdT+ et CD7+.

► Les LA biphénotypiques

La cytométrie de flux est la seule susceptible d'identifier la leucémie aiguë biphénotypique (LA Biph). Les blastes co-expriment des marqueurs myéloïdes et lymphoïdes B et/ou T. Le système de score de l'EGIL est fondé sur la présence d'un certain nombre d'antigènes ayant différents niveaux de pondération (tableau XII)[36].

L'assignation à une lignée nécessite un score strictement supérieur à 2 pour chaque lignée.

Tableau XII: Système du score de l'EGIL pour les LA biphénotypiques (LAB)

Points	Lymphoïde B	Lymphoïde T	Myéloïde
2	CD79a, CD22c, Chaîne μ c	CD3c ou mb, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$	MPO, Anti- lysozyme
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CD65, CD117
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64

c : Intracytoplasmique ; mb : membranaire

Contrairement à l'EGIL, l'OMS 2008 ne distingue pas les LA biphénotypiques des LA biclonales. La leucémie aiguë biclonale est définie par la coexistence de deux populations exprimant chacune les marqueurs d'une lignée [45].

En 2008, l'OMS propose de nouveaux critères dans la classification des LA de lignée ambiguë, plus particulièrement dans le groupe des leucémies aiguës de phénotype mixte (MPAL) [46](tableau XIII). De plus, elle exclut les MPAL, les LA avec anomalies cytogénétiques récurrentes: les LA avec t(8;21),t(15;17) ou inv(16) sont classées dans les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes malgré l'expression de marqueurs de lignées non myéloïdes[47, 48].

La classification OMS a créé des catégories distinctes pour deux anomalies cytogénétiques, les plus communes décrites dans les MPAL, la t (9;22) et la translocation remaniée 11q23 :

- LA de phénotype mixte avec t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL
- LA de phénotype mixte avec t(v;11q23) ; MLL réarrangé

Ces entités sont corrélées à un mauvais pronostic. L'OMS classe les MPAL sans anomalie cytogénétique spécifique en :

- LA de phénotype mixte B et myéloïde, sans autre spécification
- LA de phénotype mixte T et myéloïde, sans autre spécification

Tableau XIII : Classification OMS 2008 : leucémies aiguës de lignée ambiguë

Lignées	Marqueurs
Myéloïde	MPO ou différenciation monocyttaire (au moins 2 des suivants : NSE, CD11c, CD14, CD64, Lysozyme)
Lignées T	c CD3 ou sCD3
Lignées B	<ul style="list-style-type: none">• CD19 forte et au moins 1 des CD suivants : Expression forte du CD79a, cCD22 ou CD10Ou• CD19 faible et au moins 2 des CD suivants: Expression forte du CD79a, cCD22 ou CD10

3. 3.6 Leucémies aiguës à cellules dendritiques plasmocytoïdes

Elles sont définies par leur immunophénotype, qui associé à la coexpression par les blastes de CD4, CD56, CD123 et CD43, la négativité des marqueurs T (CD3, CD5), des marqueurs B (CD19 et CD20) et des marqueurs myéloïdes (CD13 et MPOc). Les anomalies chromosomiques sont complexes, avec des remaniements impliquant fréquemment les chromosomes 5 et 9.

3. 4 EVALUATION DE LA MALADIE RESIDUELLE (MRD)

L'immunophénotypage ne se limite pas seulement au diagnostic mais également utilisé dans le suivi des LA. L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) par cytométrie de flux (CMF) est devenue une étape importante dans le suivi des LA. Cette technique permet de repérer la population pathologique présente en très faible quantité avec une sensibilité de 0,01% (détection d'1 cellule anormale sur 10 000 cellules normales) [49, 50]. Le principe fondamental sur lequel repose cette détection est la recherche de phénotypes aberrants associés aux cellules leucémiques. Cette détection connaît parfois des limites liées à la possibilité de modification du phénotype des blastes au moment de la rechute ou à l'absence, dans certaines LA, de combinaison antigénique spécifique permettant de les différencier d'une sous-population cellulaire normale. L'apport de l'évaluation de la MRD est particulièrement important pour les LAL où de nombreuses études rapportent que la positivité de la MRD est un facteur prédictif d'un plus haut risque de rechute, indépendamment des autres facteurs de risque et que ce risque est proportionnel au pourcentage de cellules leucémiques détectées.

Aujourd'hui, l'étude de la MRD a un rôle primordial sur la prise en charge d'une leucémie aiguë. Les résultats de l'évaluation de la MRD peuvent permettre d'adapter l'intensité et la durée du traitement et d'estimer le délai optimum pour une greffe de cellules souches[51].

En Algérie, l'évaluation de la MRD par CMF dans les LA n'est pas encore effectuée en pratique courante, par insuffisance de moyens matériels (cytomètre assez puissant et une variété d'anticorps monoclonaux compatibles).

La biologie moléculaire, utilisant la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel est également une méthode très sensible pour évaluer la maladie résiduelle. En effet, elle garantit une sensibilité de 10^{-4} à 10^{-6} . Toutefois, le suivi moléculaire nécessite la présence d'un transcrit chimérique analysable, qui n'est retrouvé que chez 60 % des patients [52].

PARTIE PRATIQUE

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Patients

C'est une étude prospective, concernant 176 échantillons de patients atteints de leucémies aiguës, diagnostiqués au laboratoire du service d'hématologie du CHU de Sétif.

La période d'étude a débuté en Mars 2013 et arrêté en Mars 2016

Le diagnostic est retenu sur une blastose sanguine et/ou médullaire supérieure à 20% conformément aux recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS).

1.1.1 Critères d'inclusion

- Patients âgés de plus de 15 ans.
- Patients présentant une leucémie aiguë de Novo.
- Patients ayant signé le consentement éclairé.

1.1.2 Critères de non inclusion

- Enfants de moins de 15 ans
- LA secondaires (Syndromes myéloprolifératifs, myélodysplasiques et LA post chimiothérapie et/ou radiothérapie).

1.1.3 Fiche de renseignement du patient

- Données épidémiologiques: Age, sexe, adresse, situation familiale et profession
- Données cliniques: Signes d'insuffisance médullaire et tumoraux
- Données hématimétriques
- Données cytologiques du sang et moelle osseuse (Frottis colorés au MGG) et cytochimiques (au noir soudan B) de la moelle osseuse et rarement sur sang périphérique.

1.2 Echantillons

1.2.1 Prélèvement sanguin de 5 ml sur EDTA pour:

- Un hémogramme
- Un immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF), quand les blastes circulants sont supérieur à 5000 éléments/ mm³.
- Des frottis sanguins permettant:
 - Une étude morphologique des blastes et des cellules sanguines au microscope optique (MO) après une coloration au May Grunwald Giemsa (MGG)
 - Une étude cytochimique (Noir soudan).

1.2.2 Myélogramme: pour

- Une étude morphologique des frottis médullaires au MGG afin de déterminer l'aspect des blastes.
- Une étude cytochimique au Noir soudan
- Une analyse immunophénotypique à partir d'une quantité de 1,5- 2 ml de moelle, prélevée et mise rapidement dans un tube EDTA après l'avoir filtrée (Filtrefalcon BD ou Filtre Partec 50 µ de diamètre).

Le taux de cellules de la suspension doit être déterminé pour un éventuel ajustement entre 2 - 5G/L. Ce taux recommandé est proportionnel à la quantité d'anticorps à ajouter pour l'immunophénotypage.

Les prélèvements de sang périphérique et de la moelle osseuse avec toutes les procédures se passent au niveau du service d'hématologie et l'unité d'exploration.

1.3 Moyens techniques

Techniquement, la cytométrie en flux consiste à mettre la suspension cellulaire qu'elle soit sanguine ou médullaire en contact avec des anticorps déjà couplés à des fluorochromes, selon le principe de l'immunofluorescence directe.

Dans notre application l'appareil que nous disposons est de quatre couleurs. Les fluorochromes utilisés sont l'Isothiocyante de fluorescéine (FITC) qui émet une fluorescence verte, la Phycoérythrine (PE) qui émet une fluorescence rouge orangé, l'ECD (Phycoerythrin-Texas Red-x) et la PC5 (Phycoerythrin – cyanin 5).

Après différentes étapes de lyse et lavage au PBS, la suspension finale est analysée avec l'acquisition des cellules à une grande vitesse. Les résultats sont exprimés en cytogrammes.

1. 3.1 Réactifs, Solutions et consommables

1.3. 1. 1 Anticorps monoclonaux (AcM) de souris

Ils sont obligatoirement couplés aux fluorochromes soit FITC (couleur verte), soit PE (couleur Orange), soit en ECD (couleur rouge) soit PC5 (Couleur mauve).

Tous les anticorps utilisés dans cette étude sont commercialisés par la firme Beckmann Coulter. Ils sont représentés par :

CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD41, CD42, CD45, CD61, CD64, CD117, CD235a, HLA Dr, TCRαβ, la chaînes mu(μ) IgM, Les chaînes Ig Kappa(κ) et Lambda(λ). En plus des marqueurs isotopiques de type IgG négatifs de souris combinés avec les quatre fluorochromes.

Ces anticorps (AcM) se présentent dans la majorité des cas isolément, cependant le choix de combinaison avec les fluorochromes est fonction du proposé par la firme.

La majorité des AcM servent au diagnostic et à la classification des hémopathies malignes.

Le CD45 dit panleucocytaire est utilisé pour permettre une bonne discrimination des populations leucocytaires et un bon fenêtrage (gating) de la population ciblée qui est le clone blastique.

Par ailleurs certains AcM sont commercialisés en couples de spécificité opposée et de fluorescence différente afin d'avoir une expression sur les diagrammes biparamétriques, comme c'est le cas pour les chaînes κ - λ commercialisées par la firme beckmann en combinaison avec le CD19 (Kappa-FITC, Lambda-PE et CD19 en ECD).

1.3.1.2 Solutions

1.3.1.2.1 Solution de lyse des globules rouges (GR)

La Versalyse de Beckmann est utilisée sous forme pure, elle est conservée à la température ambiante et garde une stabilité de 15 jours maximum.

1.3.1.2.2 Solution tampon PBS(Phosphate Buffer salin)

Cette solution de préparation saline est composée de 0,01 M de phosphate sodique, 0,145 M de Chlorure de sodium et PH à 7,2. C'est une solution optimisée pour le lavage des cellules en suspension en préservant leur viabilité. Elle est commercialisée par Beckman sous forme de poudre (Sachet de 10grammes), à mélanger avec 500 ml d'eau distillée et à garder à la température ambiante du laboratoire.

1.3.1.2.3 Solution de perméabilisation(intrapep permeabilization reagent)

Cette solution est utilisée pour le marquage intracellulaire. C'est un réactif composé de deux flacons, chacun renfermant 5 ml de solution :

- Le réactif 1 : Contient laformaldéhyde qui est un fixateur à manipuler avec précaution en raison de son effet toxique, risque allergique élevé et même cancérigène, il sert à la fixation des anticorps monoclonaux sur les cellules.
- Le réactif 2: Contient du sodium nitrique (NaN_3), il assure la perméabilisation de la membrane permettant l'entrée facile des anticorps en intracellulaire.

1.3.1.2.4 Solutions spécifiques au cytométre

- Liquide de gaine Sheath, commercialisé sous le nom de Coulter Isoton II Diluent, Bidon de 20 litres. Cette solution, elle sert pour la dilution et le rinçage du système fluidique après chaque test.
- Coulter Clenz : Flacon de 1litre. Il s'agit d'une solution de nettoyage du cytométre Beckman.

1.3.1.3 Consommables

- Tubes Falcon de 5 ml de couleur bleu et parfois à paroi transparente, spécifique au cytométre Beckman
- Pipettes de 5 μl , 10 μl , 20 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl et 1000 μl .
- Embouts : deux modèles(la pointe jaune de 5-200 μl et la pointe bleue de 500- 1000 μl).

- Tubes de prélèvement : EDTA
- Filtres ou tubes filtre : Filtres Partec de 50- 100 μ de diamètre ou filtre adapté au tube falcon de marque Becton Dickinson(BD)
- Trocart Mallarmé pour ponction de moelle.
- Lames pour étalement de sang et de moelle osseuse, portoir de lame pour séchage et graveur diamant pour identification de la lame
- Autres accessoires : Portoir tubes falcons, minuteurs, tubes coniques de 50 ml pour la dilution de la lyse.

1.3.2 Equipement

- Automate de numération sanguine de 20 paramètres type Medonic
- Microscope optique pour analyse cytologique du sang et moelle colorée au MGG et Noir soudan
- Appareil de coloration de lame au MGG de marque Hematek
- Cytomètre en flux type EPICs XL, 4 couleurs de marque Beckman coulter équipé d'un laser de type Argon. Il est composé de 3 compartiments : Fluidique, optique et électronique. Le détail de ces compartiments et le mode de fonctionnement sont dans le chapitre (Cytométrie en flux).
- Centrifugeuse réfrigérée d'une capacité de 30 tubes de marque Eppendorf (5702 R) d'une vitesse réglable en g et enrpm.
- Vortex capacité un seul tube avec vitesse réglable.

1.4 Méthodes

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) s'effectue en deux temps :

Le premier c'est le prélèvement de l'échantillon qui peut être du sang total ou suc de moelle osseuse, puis le marquage des cellules en suspension par les anticorps dont la détermination du panel va avec l'objectif de l'analyse. Et en deuxième temps la lecture des cellules marquées en suspension par le cytomètre.

1.4.1 Marquage cellulaire

1.4.1.1 Marquage sur sang total

Le prélèvement s'effectue dans un tube renfermant un anticoagulant (EDTA). L'analyse doit être préalablement précédée d'un hémogramme pour déterminer le taux de globules blancs (GB) et le pourcentage de blastes circulants à partir du frottis de sang coloré au May Grunwald Giemsa (MGG). Il est recommandé d'avoir un seuil de blastes supérieur entre 5000 et 20 000 élt/mm³. Dans les formes hyperleucocytaires, on procédera à la dilution de l'échantillon pour rendre le taux à un seuil proportionnel avec la quantité de l'AcM à ajouter.

Le nombre de tube est proportionnel en fonction du panel et du nombre de couleur (Type de cytomètre). Dans notre laboratoire, le panel que nous avons établi, comporte dix (10) tubes, compatible avec le cytomètre de 4 couleurs que nous disposons. Chaque tube renferme 4

combinaisons d'anticorps préalablement liés à des fluorochromes (FITC, PE, ECD et PC5) (TabXIV).

Tab XIV: Panel d'anticorps monoclonaux 4 couleurs spécifique à la leucémie aiguë

	FITC	PE	ECD	PC5
Tube 1	Ctrl Neg	Ctrl Neg	CD45	-
Tube 2	CD19	CD10	CD45	CD34
Tube 3	CD33	CD13	CD45	CD5
Tube 4	CD3c	MPOc	CD45	CD79ac
Tube 5	IgMc	CD22 c	CD45	---
Tube 6	Kappa	Lambda	CD19	---
Tube 7	CD20	CD1a	CD45	TCR α/β
Tube 8	CD3	CD22	CD45	CD64
Tube 9	CD42	GlycoA	CD45	CD117
Tube 10	HLA-DR	CD14	CD45	CD2

Procédure de marquage de surface (membranaire): Elle concerne selon le panel sus cité, les tubes (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10). La technique consiste à :

- Mettre dans chaque tube sec Falcon, par ordre et selon le panel, 20 μ l de chaque anticorps déjà combiné avec le fluorochrome de spécificité connue, auquel on ajoute 100 μ l de sang total ou de moelle osseuse filtrée et diluée.
- Agiter par vortex puis incubation de tous les tubes à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant une durée minimale de 15 min et max de 20 min.
- Ajouter 1 ml ou 2 ml de Versalyse pure dans chaque tube avec agitation à une vitesse réduite puis incubation à l'obscurité pendant 10 – 15 minutes.
- Centrifuger les tubes à 1500 tours/ min ou à 300 g.
- Eliminer le surnageant par renversement du tube ou mieux par aspiration du surnageant à l'aide d'une micropipette.
- Laver par 2 ml de solution PBS, agiter par vortex puis centrifuger 5 minutes à 1500 T/min.
- Faire un second lavage.
- Eliminer le surnageant et ajouter 500 à 1000 μ l de PBS.
- Analyser la suspension au cytomètre.

Procédure du marquage intracellulaire des tubes (4,5) : La procédure consiste à :

- Mettre dans les tubes test 100 μ l de sang total auquel on ajoute 10- 20 μ l de l'anticorps monoclonal CD45 combiné au Fluorochrome ECD
- Agiter par vortex à faible vitesse de quelques secondes
- Incuber les tubes 20 min à l'obscurité.
- Ajouter 100 μ l du fixateur (Réactif 1) puis vortexer immédiatement
- Incuber les tubes une deuxième fois à 18- 25°C et à l'abri de la lumière pendant 15 minutes.
- Ajouter 3- 4 ml de la solution PBS.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 300g.

- Eliminer le surnageant par aspiration ou par retournement du tube en un seul geste
- Ajouter 100µl du réactif 2(Intraprep) et laisser diffuser dans la solution sans vortex.
- Incuber 5- 10 min à la température ambiante.
- Agiter doucement les tubes à la main pendant 2- 3 secondes.
- Ajouter 20 µl d'anticorps monoclonaux (AcM).
- Vortexer le tube à vitesse faible.
- Incuber pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité.
- Ajouter 3 - 4 ml de BPS.
- Centrifuger à 300 g les tubes pendant 5 min.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 500 – 1000µl de PBS.
- Analyser la suspension au cytomètre.

1.4.1.2 Marquage sur moelle osseuse

Le prélèvement de moelle doit être de 1-2,5 ml. Il servira à pratiquer des étalements sur lames pour étude morphologique et cytochimique. La seringue à adapter au trocart doit être préalablement rincée à l'héparine. Le prélèvement obtenu est mis immédiatement dans un tube EDTA.

En deuxième temps, on filtre le suc médullaire grâce aux filtres de 50-100 µ de diamètre (marque partec ou BD falcon) puis on effectue une numération des cellules sur cellule de Malassez pour but d'ajuster la suspension à 5- 10 x 10³ cellules/ mm³.

La procédure du marquage membranaire et intra-cytoplasmique est identique à celle du sang périphérique.

1.4.2 Acquisition des données

Le cytomètre doit être préalablement réglée :

- En voltages par l'utilisation de cellules sanguines non marquées permettant une bonne répartition des populations en taille(FSC) / Structure (SSC) et une détermination du seuil ou threshold pour éliminer les débris de GR, les cellules non viables et les plaquettes. Sur l'histogramme bi paramétrique, tous les événements doivent se situer dans le quadrant 3 ou la zone négative pour les FL1, FL2, FL3, FL4.
- En compensation par les mono-marquages sur les lymphocytes avec utilisation des AcM combinés (CD3- FITC, CD8-PE, CD45-ECD et CD4-PC5) comme recommandé dans la plupart des applications de réglage des compensations.
- Lors du Contrôle de l'alignement du laser à l'aide d'une suspension de billes (**flow check**)de concentration connue et stable commercialisée par Beckman. L'obtention d'un Pic étroit correspond à un coefficient de variation (CV) bon (Figure 30).

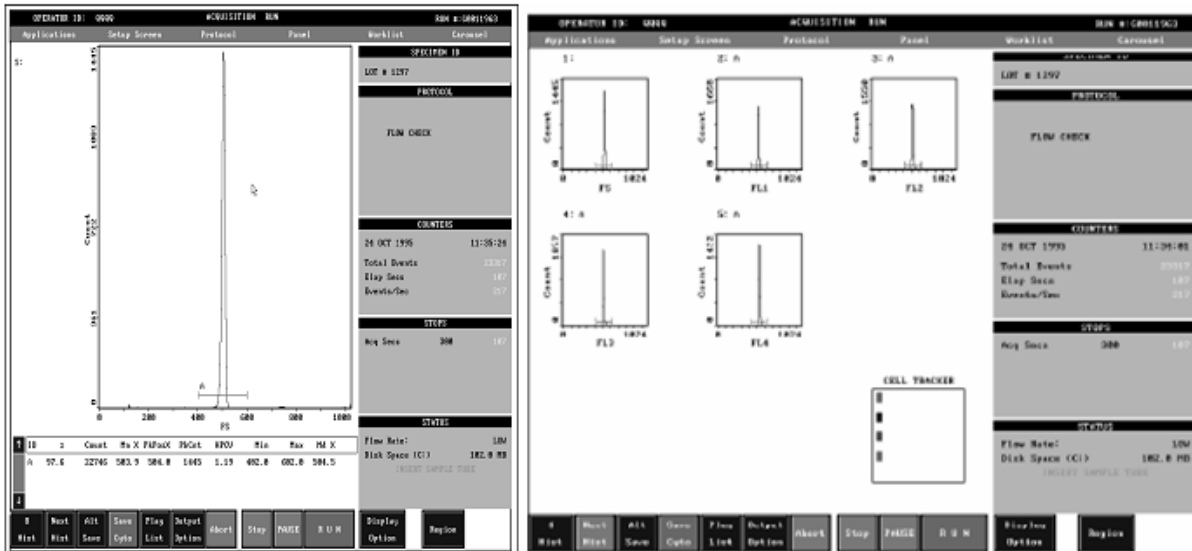


Figure30 : Contrôle de qualité du cytomètre EPICS XL par Flow check

On procède à l'acquisition avec une vitesse de passage des événements au mode faible vitesse (mode low). Une fois le contrôle de qualité terminé, les échantillons passent au cytomètre dans l'ordre en fonction du protocole et/ou du panel programmé. Le nombre d'événements d'intérêt (blastes sélectionnés ou fenêtrés sur l'histogramme en 45/ SSC) à atteindre dans les leucémies aiguës est d'un minimum de 5000 événements. Les fichiers de données (List mode data ou LMD) sont enregistrés dans un répertoire avec identification du patient, la date de l'acquisition et les données statistiques.

1.4. 3 Analyse et interprétation des résultats à distance de l'acquisition

En raison de la complexité du système d'analyse intégré au cytomètre EPICs XL de marque Beckmann (Système II MS. DOS), à la fin de l'acquisition, les données du patient sont exportées vers un répertoire de stockage et elles seront analysées à distance à l'aide d'un logiciel spécifique cytométrie de type WIN MDI 2.9 (Figures31, 32).



Figure 31: Image du logiciel WIN MDI 2.9

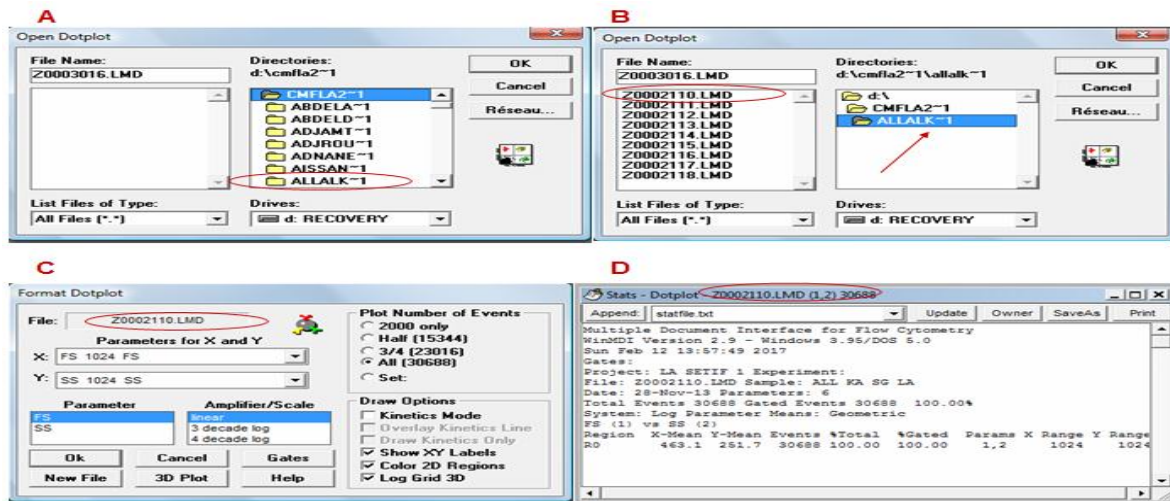


Figure 32 : Logiciel WIN MDI 2.9 avec LMD (données d'un patient)

A : Répertoire des patients analysés, B : Nombre de tubes ou tests pratiqués, C : Choix d'un dot plot du patient sélectionné, D : Données statistiques : identification du patient, date de l'analyse et le nombre d'événements analysés.

Tout analyse doit débuter par un histogramme bi paramétrique dit aussi <<Dot plot>> de la population globale en taille (FSC) et en structure (SSC) pour avoir une vue globale sur la répartition des différentes populations de sang ou de moelle osseuse. En raison de l'interférence et le chevauchement des populations entre elles du fait de leurs tailles et parfois de leurs structures proches, le recours à une analyse logarithmique est systématique, par utilisation d'un marqueur panleucocytaire dit ALC (antigène leucocytaire commun) ou CD45. Ce dernier s'exprime avec des intensités variables d'une population à l'autre permettant une bonne discrimination des cellules blastiques par rapport aux autres. Ce marqueur est obligatoire pour le bon fenêtrage (gating) des blastes qui seront analysés avec le panel d'anticorps choisi (Figure 33).

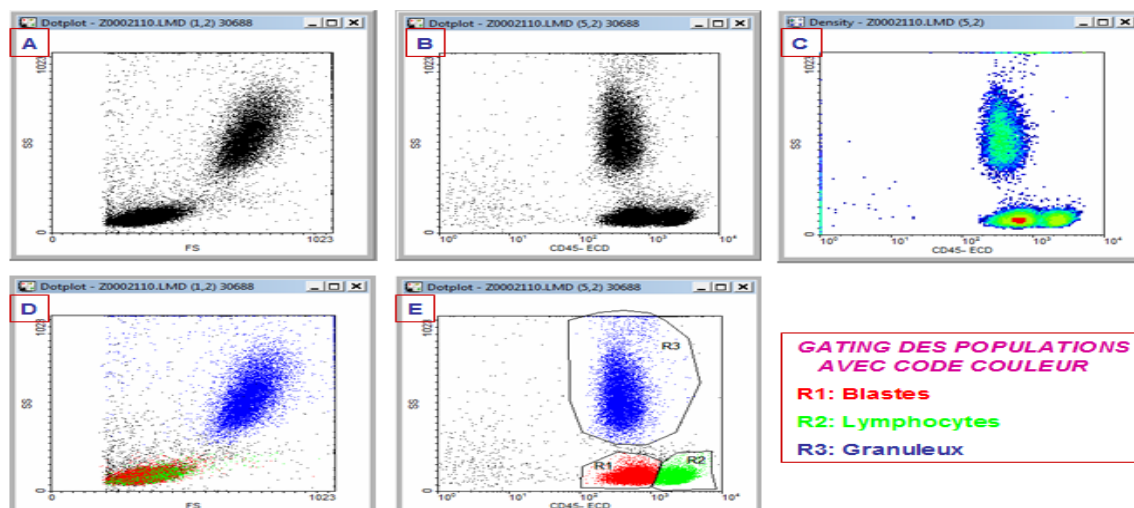


Figure 33: Analyse d'un dot plot par logiciel WIN MDI 2.9

A : en taille (FSC) et structure (SSC) en mode linéaire, B : Répartition des populations en mode log avec le CD45/ SSC, C : Histogramme en density plot qui montre qu'il y a 2 populations, DetE: L'intérêt du CD45 qui discrimine les populations par rapport au FS/SS permettant le bon fenêtrage de la population cible (Blastes: R1).

Ainsi, l'analyse des histogrammes en CD45/ SS, permet de connaître le degré de viabilité des cellules et le pourcentage de la population blastique par rapport à d'autres populations(Figure33 et Tab XV).

Tab XV : Données statistiques des populations fenêtrées en CD45/ SS

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated	Params	X Range	Y Range
R0	625.4	251.7	30688	100.00	100.00	5,2	10000	1024
R1	614.5	87.6	12907	42.06	42.06	5,2	10000	1024
R2	2282.7	88.4	7049	22.97	22.97	5,2	10000	1024
R3	404.6	586.5	9523	31.03	31.03	5,2	10000	1024

L'analyse du profil immunophénotypique de la population blastique avec les anticorps monoclonaux testés, permet de :

- Déterminer le type et sous type de leucémie aiguë myéloïde ou lymphoïde.
- Rechercher les marqueurs aberrants.
- S'assurer de l'absence ou la présence d'une Leucémie aiguëbiphénotypique.

Le seuil de positivité est de 20% pour le marquage membranaire et 10% pour le marquage intra cellulaire (CD3c, CD79ac et MPOc).

La leucémie est classée phénotypiquement selon les recommandations et les critères établis par l'EGIL.

1.4.4 Saisie et analyse des données

La saisie des données est réalisée sur un logiciel Excel 2003 puis une analyse par le logiciel SPSS version 20.

Nous avons étudiés les paramètres épidémiologiques et cliniques des patients, biologiques et immunophénotypiques de leurs échantillons de sang et de moelle osseuse. Des corrélations ont été recherchées entre le degré de positivité des anticorps et les sous types de LA ainsi que la relation entre la classification FAB et les données de la CMF. L'étude de la concordance entre la classification FAB et les données de la CMF ainsi que la relation entre le taux de blastes en microscopie optique et en CMF n'a été étudiée que dans les LAM.

RESULTATS

2. RESULTATS

2. 1. Données épidémiologiques

- Lieu de résidence

Notre étude a recensé 176 cas de leucémies aiguës de novo, diagnostiquées au laboratoire d'hématologie du CHU de Sétif sur une période de 3ans. 55% des patients résident dans la wilaya de Sétif, 21% de la wilaya de M'sila et 14% de BBA. Le taux des patients des wilayas limitrophes est plus faible. (Figure 34).

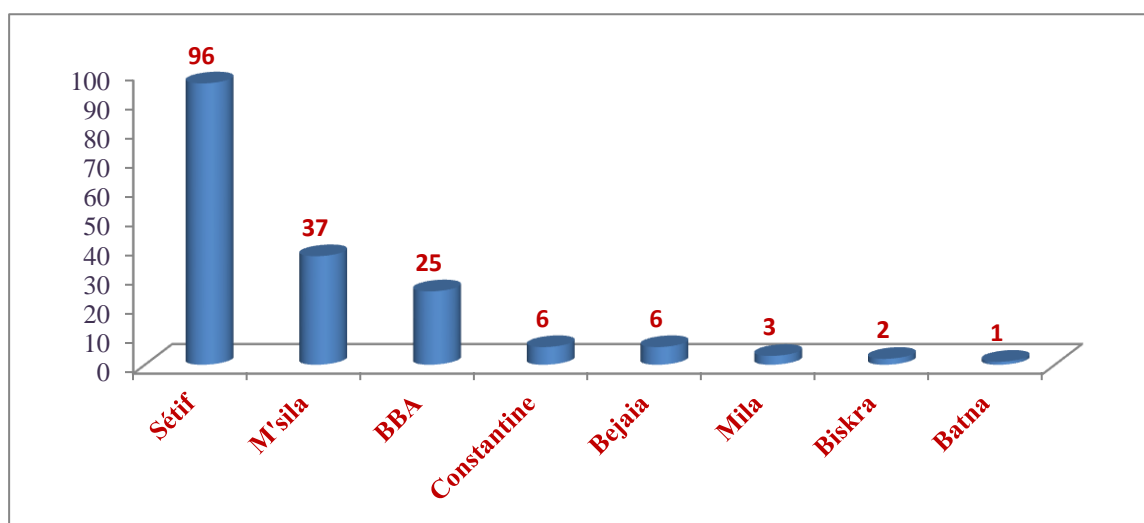


Figure 34 : Répartition des patients par wilaya de résidence

- Profession

L'activité professionnelle est renseignée pour 110 pts (63%). 7 pts (4%) sont exposés aux hydrocarbures et produits chimiques, 12 patients (7%) sont des agriculteurs, 14 pts (8%) sont des menuisiers et 8 pts (5%) sont employés dans une carrière, 15 pts(9%) exercent dans des administrations, 27 pts (15%) exercent des professions sans risque et étudiants 27 pts (15%).66 pts(37%) sont sans professions(Figure 35).

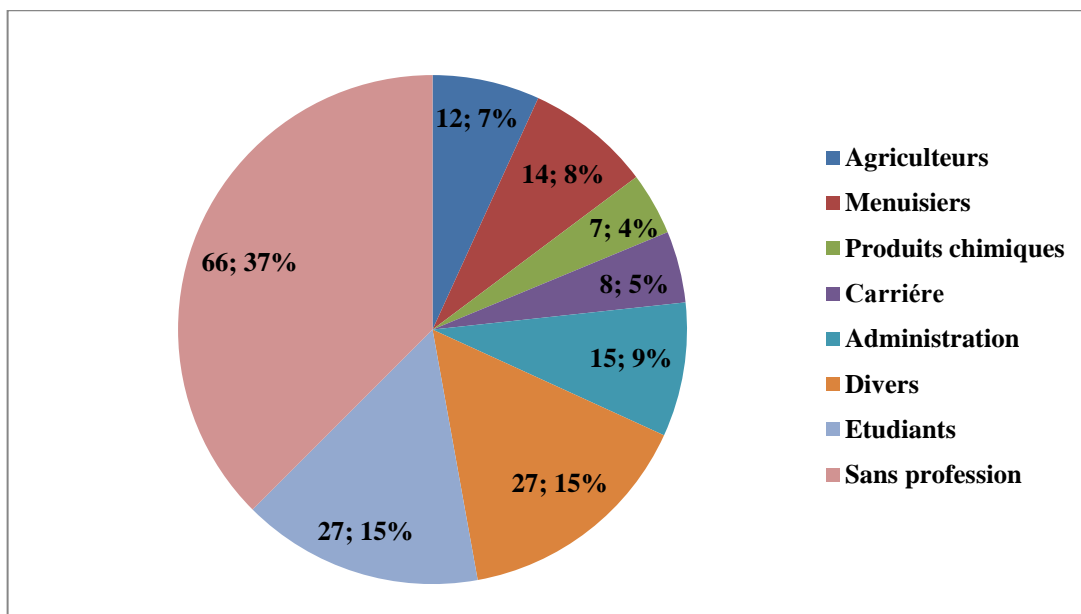


Figure 35: Répartition selon la profession

- Age et Sexe

L'âge médian est de 37 ans avec des extrêmes de 15 - 86 ans, répartis en 98 Hommes/78 Femmes avec un Sex ratio (H/F) de 1,25(Figure 36).

- Dans les LAM, l'âge médian est de 45 ans (15- 86) et le sex ratio est de 1,06.

- Dans les LAL, l'âge médian est de 23 ans (15- 80) et le sex ratio est de 1,77.

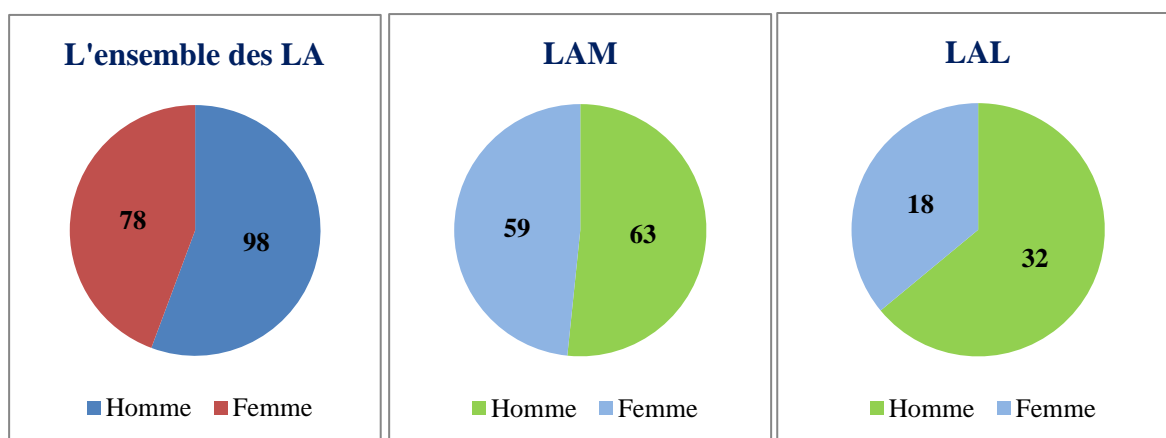


Figure 36: Répartition selon le sexe

La répartition par tranche d'âge retrouve 72% de jeunes adultes de moins de 30 ans dans la LAL et 60% de patients de plus de 40 ans dans la LAM (Figure 37).

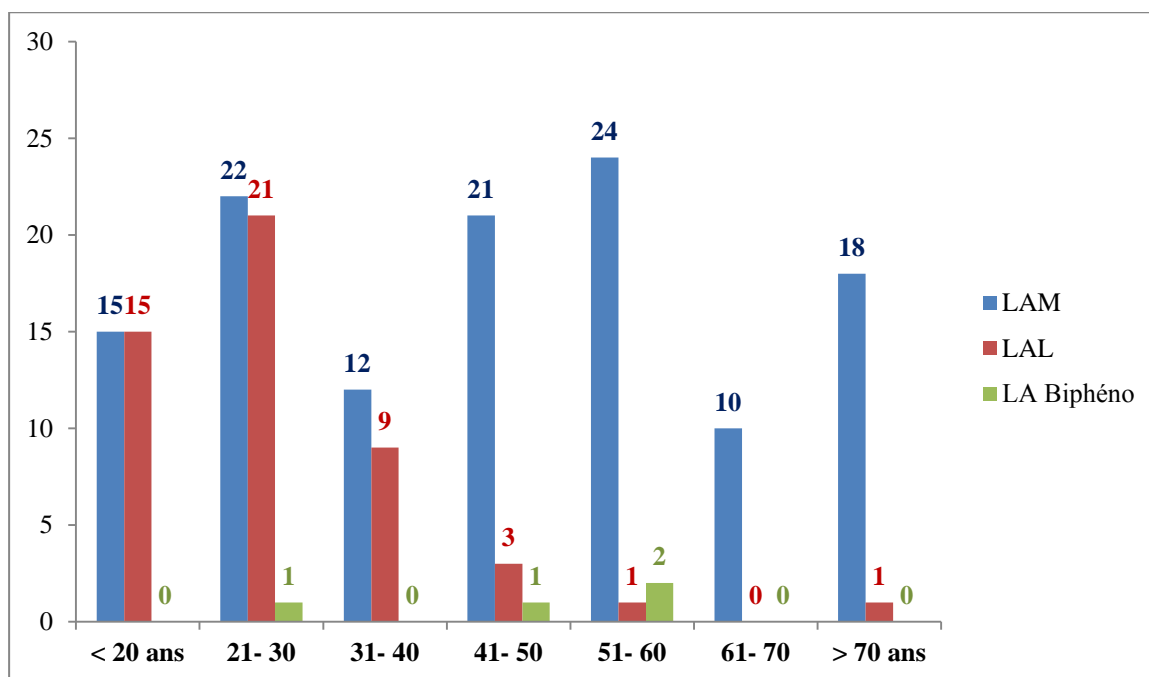


Figure 37 : Répartition des leucémies aiguës par tranche d'âge

2.2 Caractéristiques cliniques et biologiques

- Le Performans status (PS) est supérieur à 2 dans 89% des cas. Le syndrome anémique est retrouvé dans 91% des cas, l'anémie est sévère dans 50% des cas.
- Le syndrome hémorragique est retrouvé dans 59% des cas.
- Le syndrome infectieux est retrouvé dans 57% des cas, il est représenté par une angine dans 33 cas (6 cas sont ulcéro-nécrotique), l'atteinte bronchique est retrouvée dans 18 cas, l'atteinte urogénitale et digestive dans respectivement 9 et 4 cas.
- Le syndrome tumoral est retrouvé dans 47% des cas (Tab XVI).

Tab XVI : Caractéristiques cliniques des leucémies aiguës

Aspects Cliniques	LAM N : 122	LAL N:50	LA Total N : 176
Indice de Performance : PS 0 - 1 2 3 - 4	10(8%) 68(56%) 44(36%)	9 (18%) 29 (58%) 12 (24%)	19 (11 %) 103 (58 %) 54 (31 %)
Syndrome anémique : Pâleur Légère Modérée Franche	5(4%) 46(38%) 66(56%)	2 (4%) 19 (38%) 21 (42%)	08(4%) 65(37 %) 88(50 %)
Syndrome hémorragique : Présent Cutanée : Ecchymoses et/ ou Pétéchies <u>Cutaneo +Muqueuse</u> Gingivorragies Épistaxis Bulles endo-buccales Métrorragies Hgie rétinienne Hématurie Hématomes	74(61%) 34(28%) 40(33%) 15(38%) 10(25%) 10(25%) 7(18%) 7(18%) 5(12%) 7(18%)	29(58%) 15(24%) 12(24%) 7 (58%) 8 (67%) 3 (25%) 0 (0%) 4 (33%) 1 (8%) 0	104(59%) 49(28%) 52 (30%) 22/ 52 (42%) 18 (35 %) 13 (25 %) 07 (13 %) 11 (21%) 06 (11 %) 07 (13%)
Syndrome infectieux : Fièvre Angine (*) Bronchique Digestive (**) Uro-génital Abcès cutané Herpès labial Abcès dentaire	76(62%) 30(5*)(39%) 13(17%) 04(2**)(6%) 06(8%) 07(9%) 04(6%) 02(3%)	22(44%) 03(1*)(14%) 05(24%) 00 03(14%) 00 01(5%) 01(5%)	100(57%) 33(6 *) (35%) 18(19%) 04(2**) (4 %) 9(12 %) 07 (7 %) 05(6 %) 03(3%)
Syndrome tumoral : Présent Adénopathies périphériques localisées Cervicales Axillaires Inguinales Adénopathies Abdominales Adénopathies médiastinales Adénopathies généralisées SPM Stade I Stade II Stade III Stade IV Hépatomégalie (HPM) Hypertrophie gingivale Douleur osseuse	40(33%) 13(11%) 10(77%) 02(16%) 01(8%) 01(2%) 00 03(3%) 19(16%) 6(32%) 9(47%) 2(10%) 2(10%) 1(1%) 4(3%) 28(23%)	41(82%) 10(20%) 10(100%) 0 0 0 8(16%) 9(18%) 22(44%) 4(18%) 10(45%) 5(23%) 3(14%) 3(6%) 00 18(36%)	82(47%) 23(13%) 20/23(87 %) 02 (9%) 01 (4%) 01(1 %) 08(4,5%) 12(7%) 43(24%) 12/41(28%) 19 (44%) 07 (16 %) 05 (12 %) 04(3%) 04(3%) 46(26%)

* : ulcéro- nécrotique, ** Infection anale

- Le syndrome tumoral est présent dans 82% des cas de LAL et dans 33% des cas de LAM.
- La splénomégalie est retrouvée dans 44% des cas de LAL et dans 16% des cas de LAM.
- Les adénopathies généralisées sont palpables dans 18% des cas des LAL et dans 3% des cas des LAM.

- L'atteinte médiastinale objectivée à la radiologie standard ou au scanner dans 16% des cas de LAL, n'est pas retrouvée dans les LAM (Tab XVI). Cette atteinte est plus fréquente (37% des cas) dans les LAL de phénotype T (Tab XVII).
- Par ailleurs, la fréquence du syndrome d'insuffisance médullaire est similaire aussi bien dans les LAM que dans les LAL.

Tab XVII: Aspects cliniques des leucémies aigües lymphoblastiques B et T

<i>Aspects Cliniques</i>	<i>LAL B N : 30</i>	<i>LAL T N : 19</i>
Indice de Performance : PS		
0 - 1	2(7%)	7(37%)
2	22(73%)	7(37%)
3 - 4	6(20%)	5(26%)
Syndrome anémique : Pâleur		
Légère	0	2(10%)
Modérée	12(40%)	7(37%)
Franche	14(47%)	6(32%)
Syndrome hémorragique :		
Absent	14(47%)	7(37%)
Cutanée : Ecchymoses et/ ou Pétéchies	10(33%)	5(26%)
<u>Cutanéo +Muqueuse</u>	4(13%)	6(32%)
Syndrome infectieux :		
Fièvre	17(57%)	7(37%)
Angine	1(3%)	2(10%)
Bronchique	4(13%)	2(10%)
Uro-génital	4(13%)	0
Herpès labial	1(3%)	0
Abcès dentaire	1(3%)	0
Sans Foyer	6(20%)	3(16%)
Syndrome tumoral :		
Adénopathies localisées	4(13%)	7(37%)
Cervicales	3(10%)	6(32%)
Médiastinales	0	7(37%)
Adénopathies généralisées	3(10%)	5(26%)
SPM	14(47%)	7(37%)
Hépatomégalie (HPM)	3(10%)	0
Douleur osseuse	12(40%)	6(32%)

- Le taux moyen d'hémoglobine est de 7g/dl (il est de 7,2 g/dl dans les LAM et 7,8g/dl dans les LAL). Néanmoins un taux d'Hb <8 g /dl est retrouvé dans 71% des cas de LAM et 58% des cas de LAL(Figure38).
- Le taux moyen des plaquettes est de 40 Giga/ l, cette moyenne est presque identique pour les deux formes de LAM et de LAL (41,8 G / 38,5 G/L), de même que le taux de sévérité (Plaquettes < 30 G/L) qui est de 57% dans les LAM et 58% dans les LAL (Figure39).
- Le taux moyen des GB est de 64,3 G/L, Il est de 66,6 G/L dans les LAM et de 60,6G/L dans les LAL. Dans 47% des cas, l'hyperleucocytose est supérieure à 30 G/L. Par ailleurs le taux des formes hyper leucocytaires à Plus de 100 G/L est presque identique (19cas soit 16% des LAM et 7cas soit 14% des LAL(Figure40).

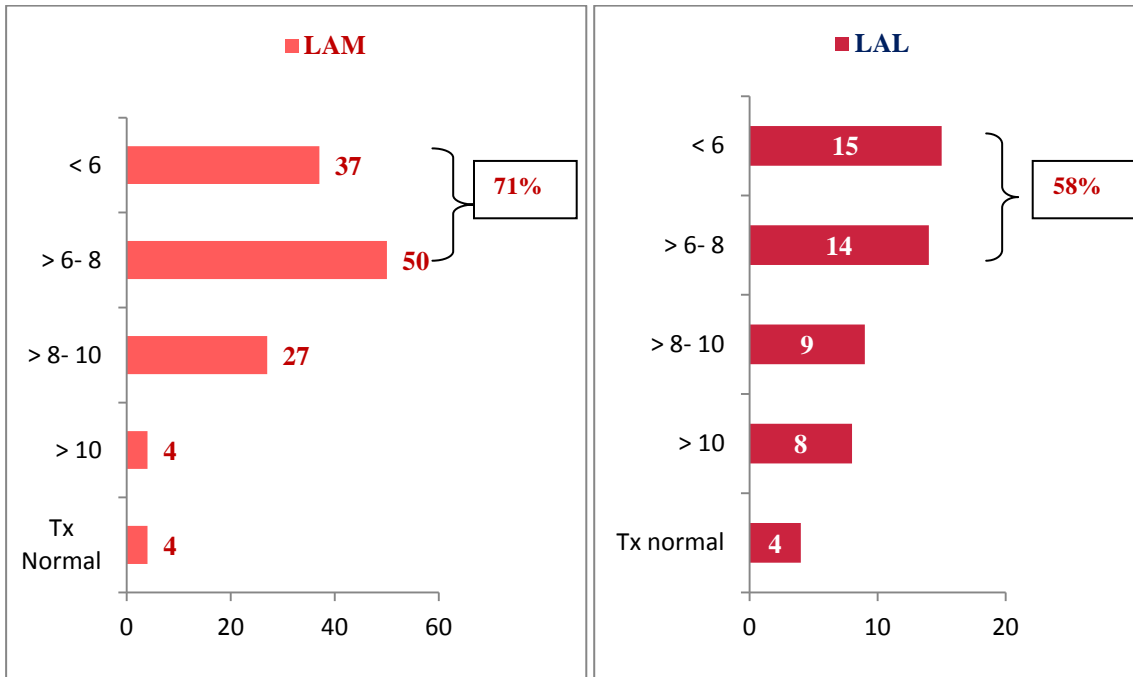


Figure 38: Répartition des taux d'hémoglobine dans les LAM et LAL

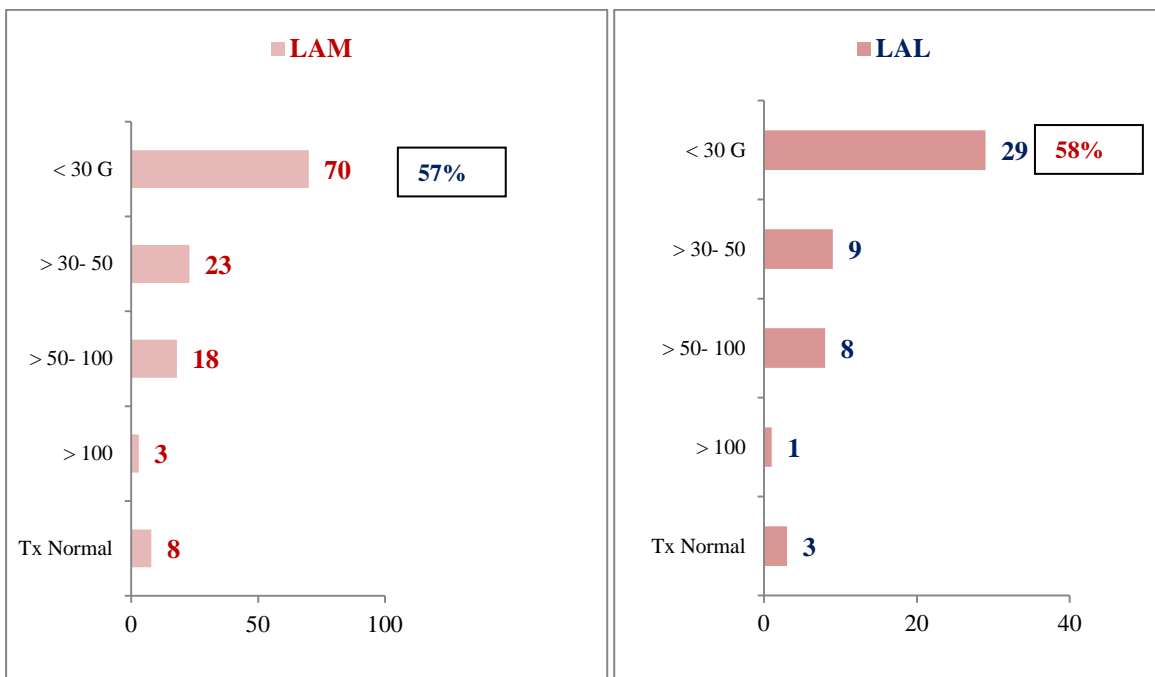


Figure 39 : Répartition des plaquettes dans les LAM et LAL

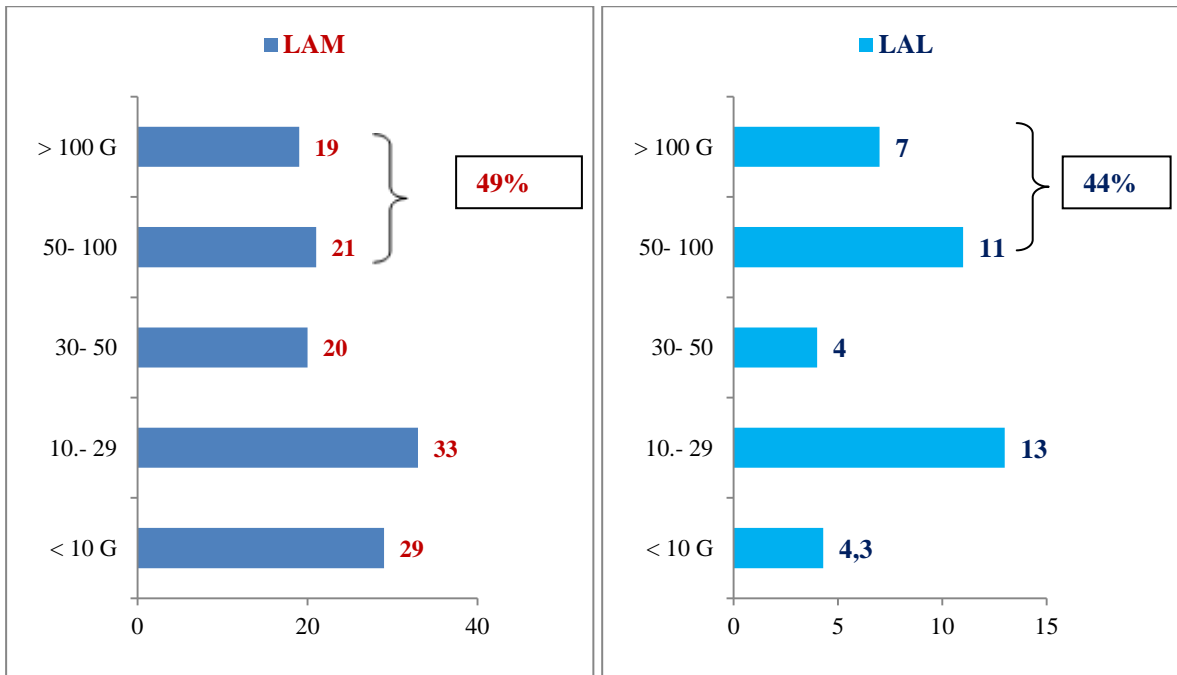


Figure 40 : Répartition des GB dans les LAM et LAL

2.3 Classification selon le groupe FAB

La classification FAB retrouve (Figure 41):

- 115 cas (65%) de LAM
- 49 cas (28%) de LAL
- 12 cas (7%) de LA Indifférenciées (LAI).

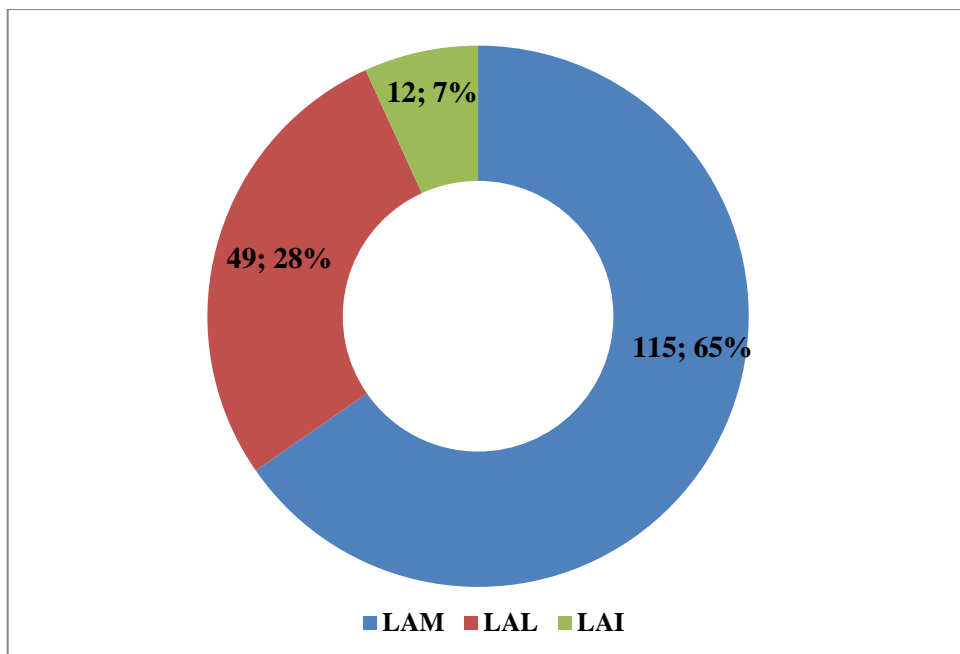


Figure 41: Répartition des leucémies aiguës selon FAB

- 164 /176 (93%)cas sont classés selon le groupe FAB.
- Les LAM2et LAM4 sont les plus fréquentes avec des taux respectivement de 26% et de 28%, alors que le taux le plus faible est retrouvé dans la LAM5 (9%).
- Par ailleurs, une difficulté de classification selon le groupe FAB s’est présentée pour un cas de LAM2 et un cas de LAM4.Dans cette classification aucun cas de LAM6 / LAM7 n’a été identifié (Figure 42).
- Dans les LAL, le type 2 est le plus retrouvé (86%), alors que le type 1 est de 12% et seulement 1cas (2%) est classé comme type 3.
- Outre la négativité dans tous les cas de LAL, le Noir soudan (NS) et aussi négatif dans 10 cas de LAM (Figure 43).

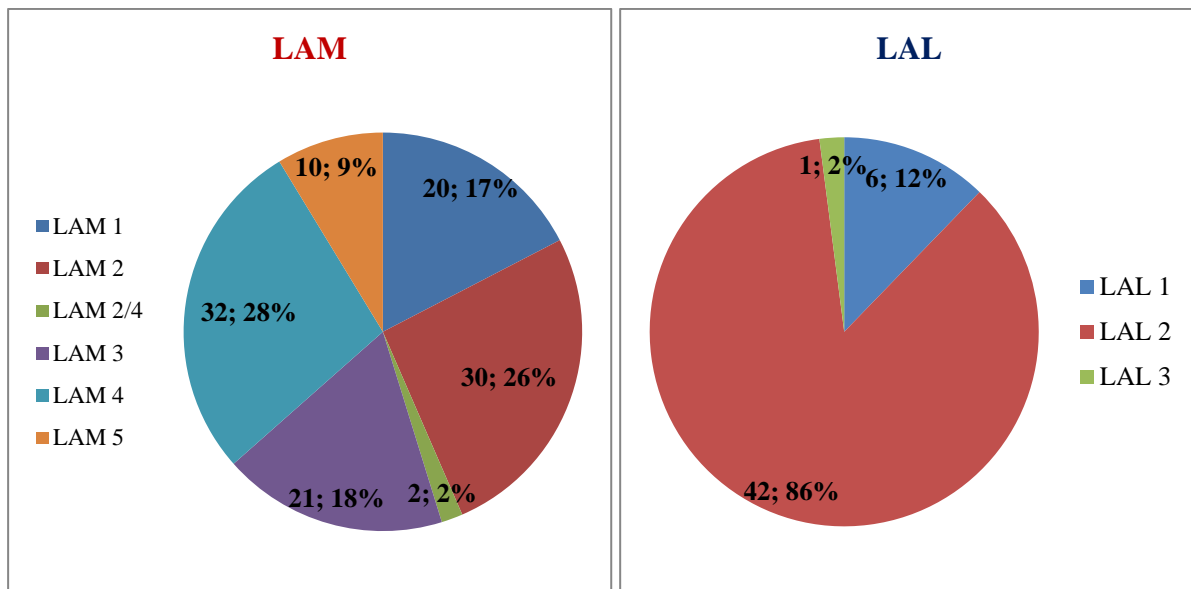


Figure 42 : Répartition des types de leucémies aiguës LAM et LAL selon FAB

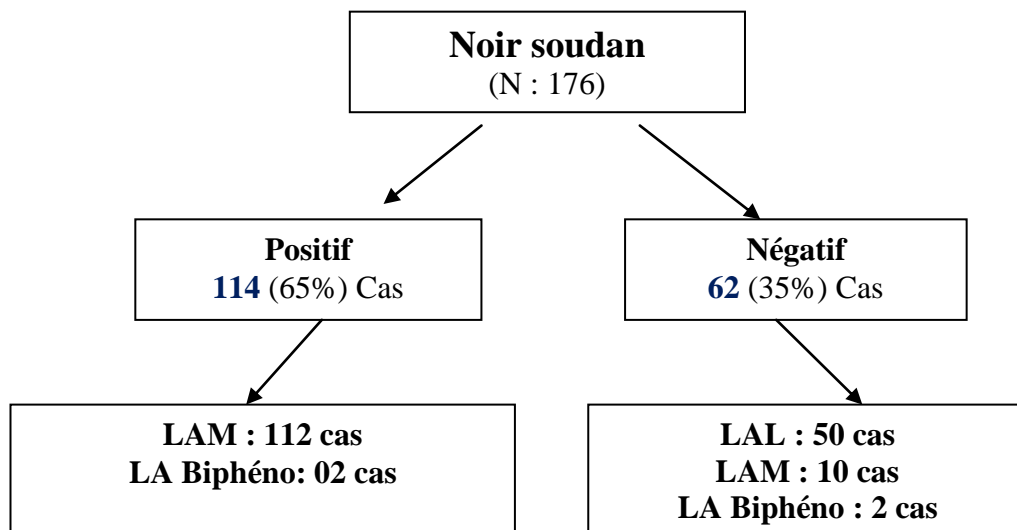


Figure 43 : Résultats de la coloration au Noir soudan

Les aspects morphologiques des cas de leucémies aiguës rencontrés dans notre étude sont représentés par les spécificités iconographiques (Figures 44 et 45).

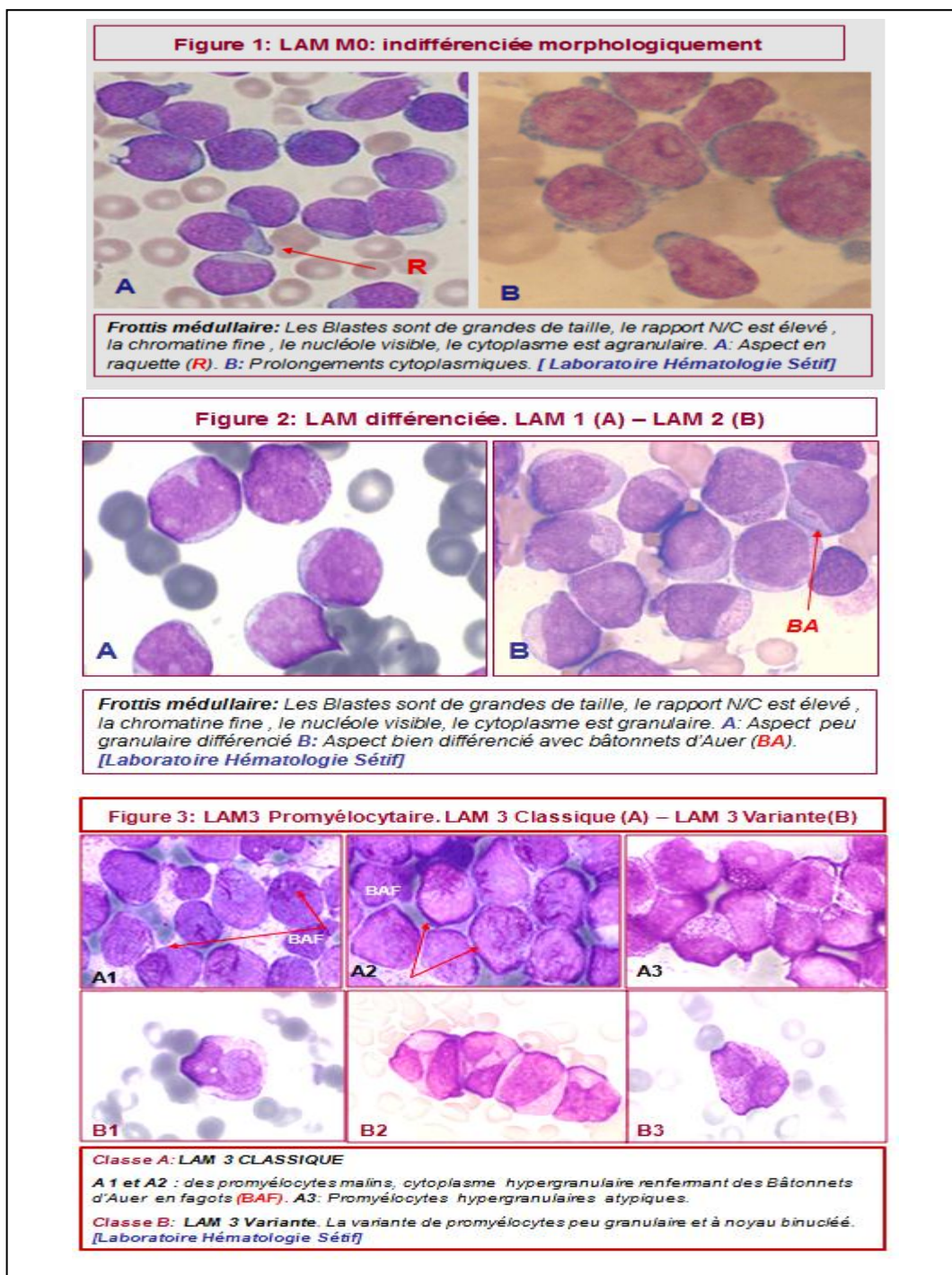
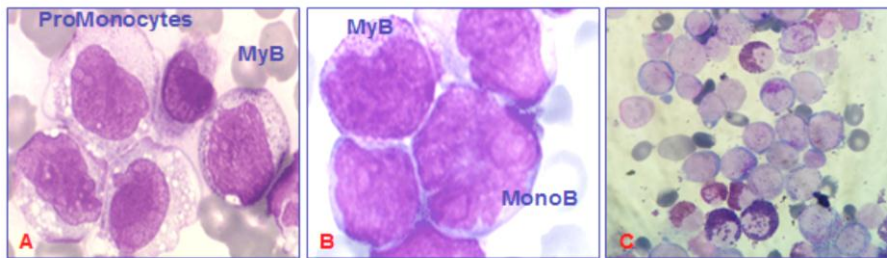


Figure 44: Aspects iconographiques des LA : M0, M1, M2 et LAM3 au MGG

Figure 4: LAM 4: Myélo-monocytaire et la variante à Eosinophile



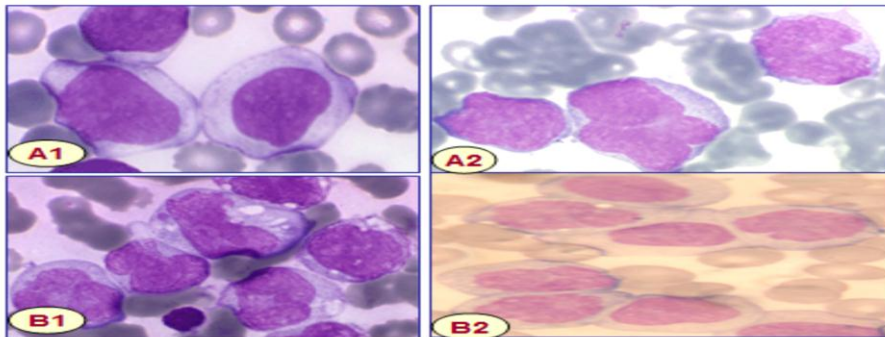
Frottis médullaire:

A: Les Promonocytes sont de grandes de taille, le rapport inférieur ou = 1 à côté d'un myéloblaste (MyB).

B: 3 cellules monoblastiques (MonoB) à chromatine nucléolée) à côté d'un myéloblaste.

C: Frottis renfermant une composante blastique à coté de granuleux Éosinophiles dont certains à granulations pathologiques basophiles [Laboratoire Hématologie Sétif]

Figure 5: LAM 5 Monoblastique: A: LAM 5a – B: LAM 5b

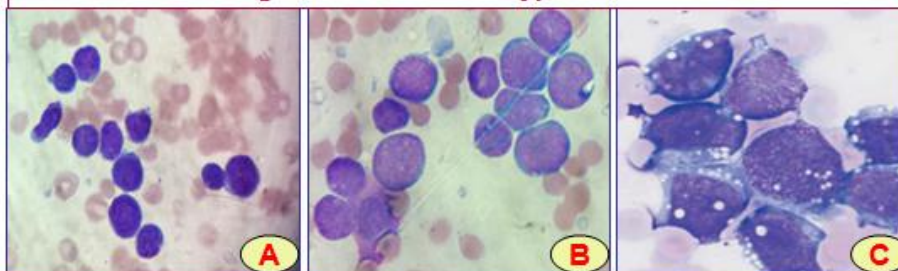


Frottis médullaire:

A: LAM 5 a: Nappe de cellules monoblastiques à cytoplasme étendu non granulaire et à chromatine fine

B: LAM 5b: Cellules monoblastiques avec la composante promonocytaire et monocyttaire [Laboratoire Hématologie Sétif]

Figure 6: Trois Sous types de LAL



Frottis médullaire: Aspects morphologique des trois sous types de lymphoblastes dans les LAL.

A: Nappes de petits lymphoblastes à chromatine peu fine , nucléolée: LAL 1

B: Population mixte de lymphoblastes petits et grands à chromatine plus fine et nucléolée le rapport N/C est élevé: LAL 2

C: Aspect de nappes de blastes de taille moyenne à grandes , a cytoplasme hyperbasophile et siège de vacuoles. LAL type 3 (Burkitt Like). [Laboratoire Hématologie Sétif]

Figure 45 : Aspects iconographiques des LA : M4 – M5 et LAL au MGG

2.4 Caractéristiques de l'immunophénotypage par CMF des leucémies aiguës

2.4.1 Immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les différents anticorps monoclonaux testés à 100% sont représentés par les marqueurs anti-MPOcy, CD13, CD33, CD117, CD34, HLA-DR, CD14 et CD64, à 99% pour le CD41, à 95% pour la GPA, à 65% pour le CD61, à 43% pour le CD11c et à 35% pour le CD15. Le CD16 n'a pas été testé (non disponible) (Figure46).

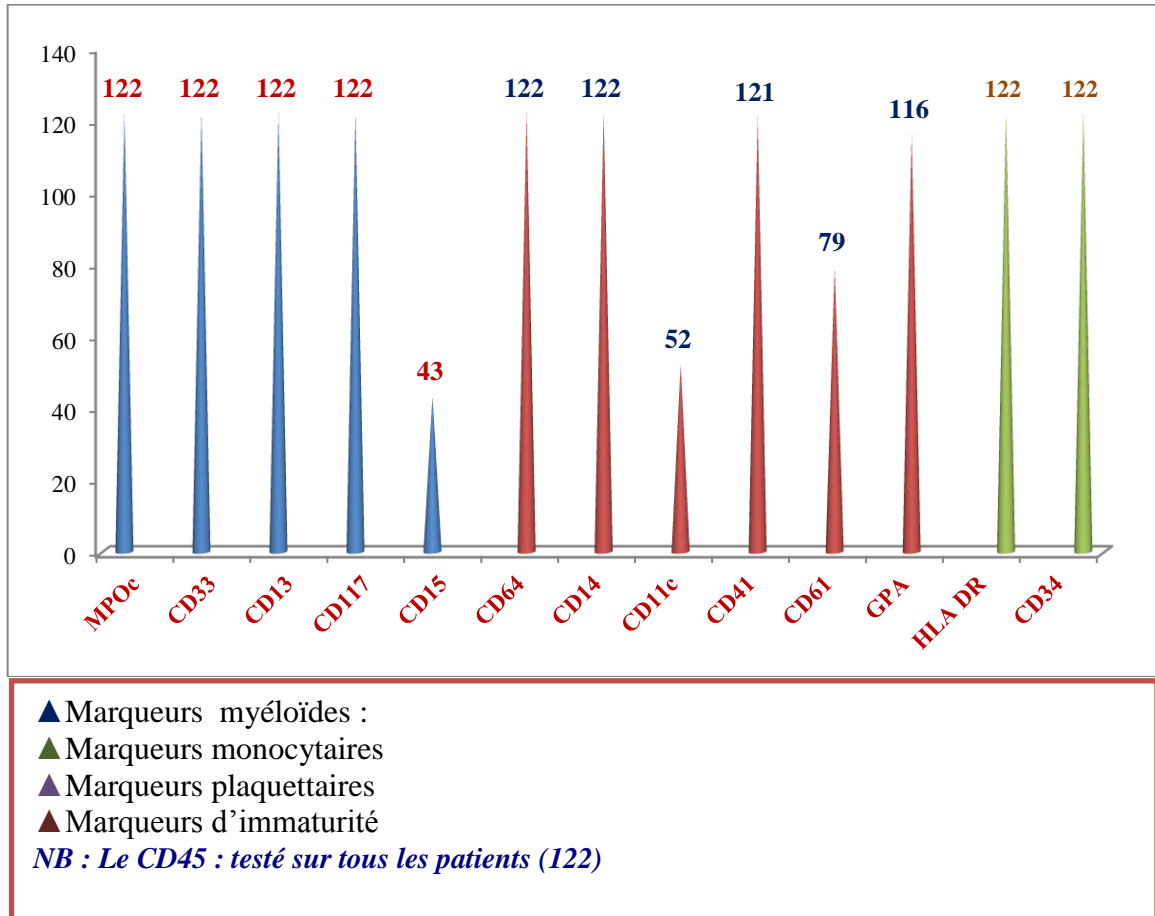
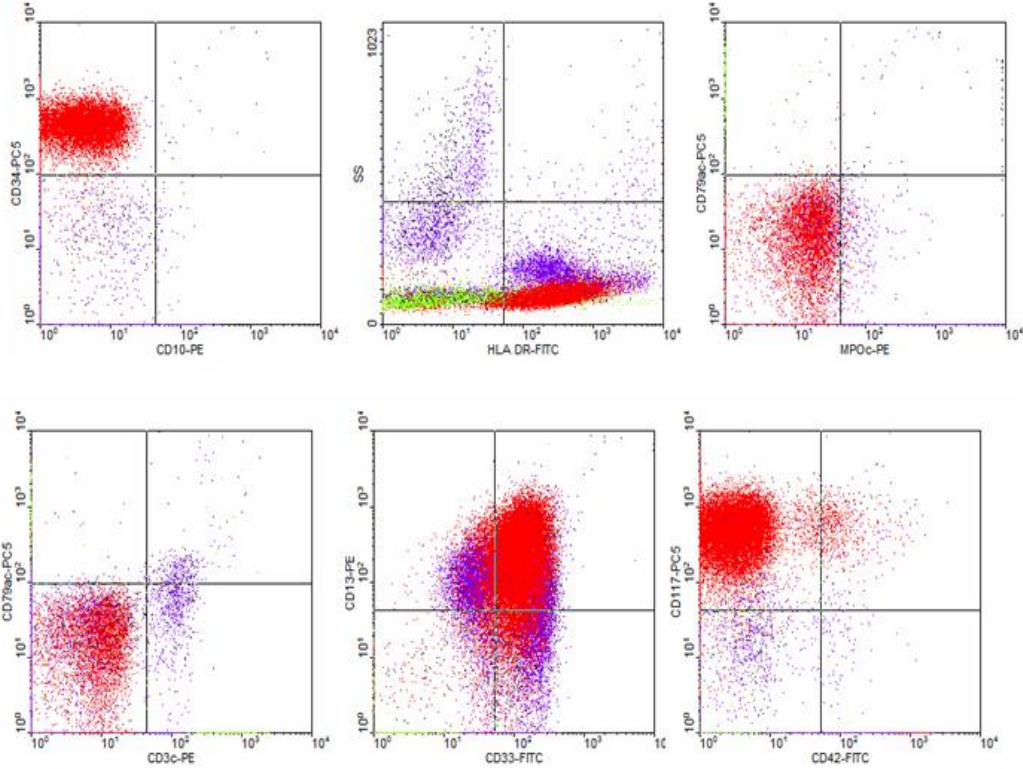
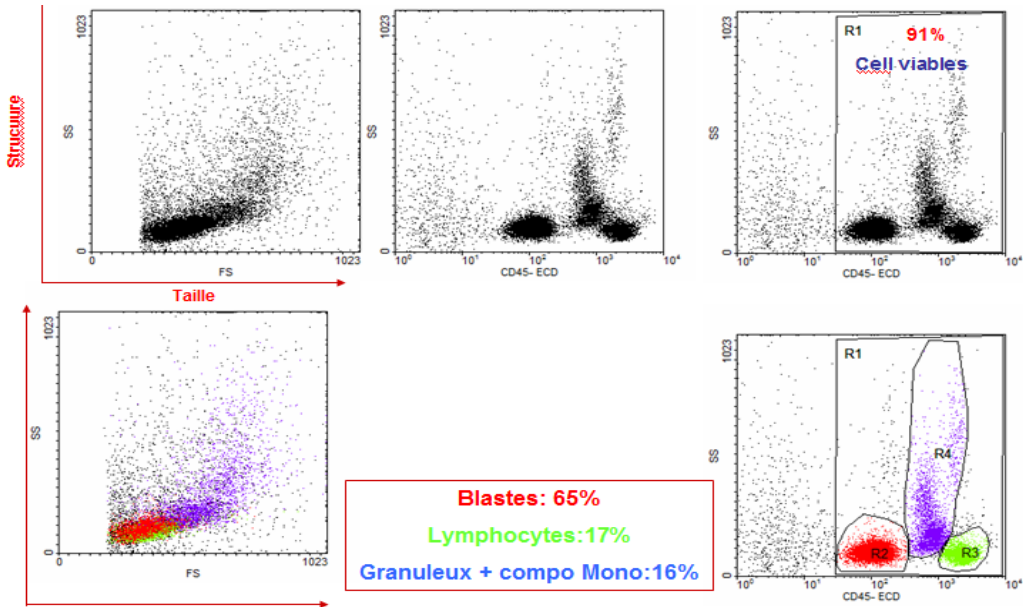


Figure 46 : Degré d'utilisation des marqueurs myéloïdes et d'immaturité dans les LAM

Ces anticorps ont permis d'identifier les différents types de LAM, que nous illustrons dans les différentes figures d'histogrammes.

- Profil phénotypique des sous types de LAM



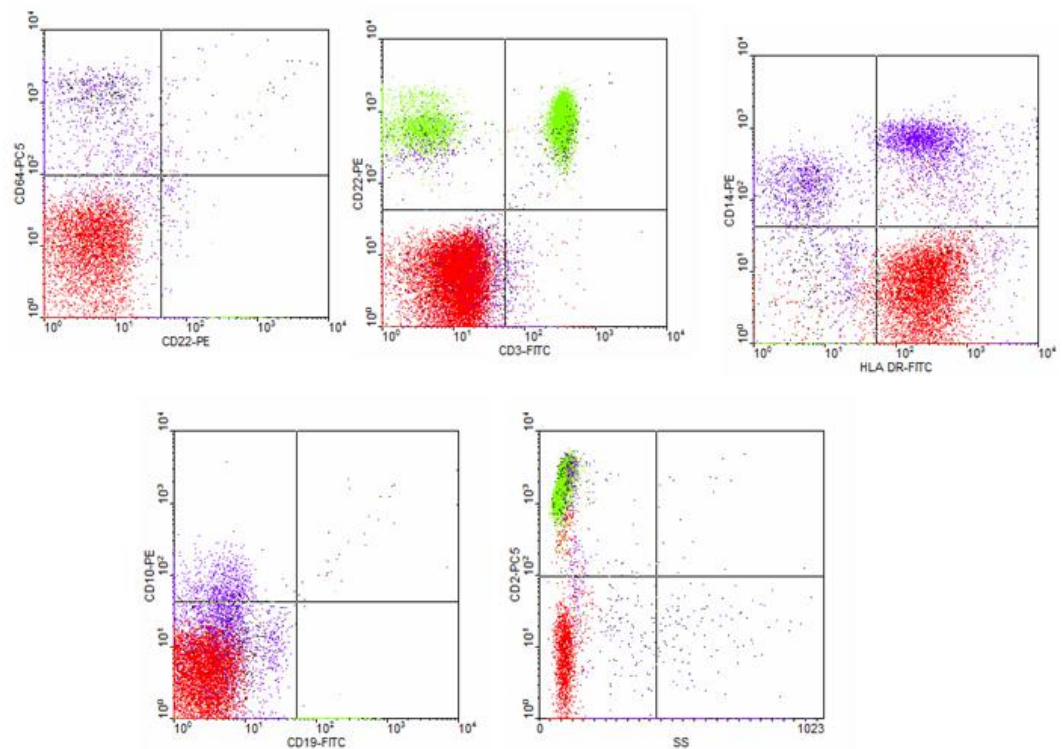
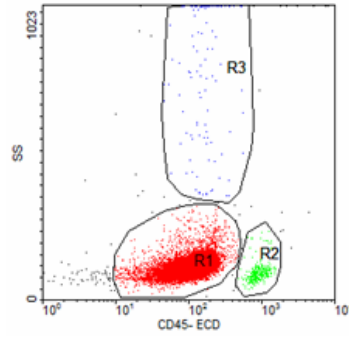
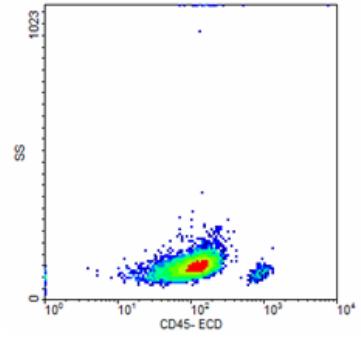
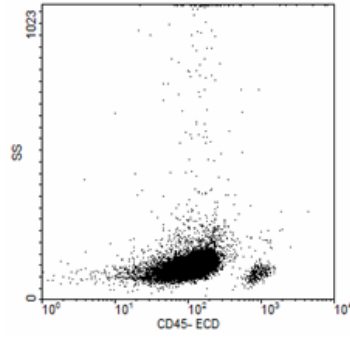
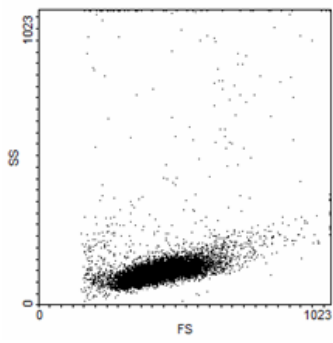
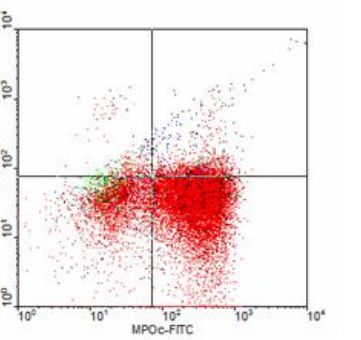
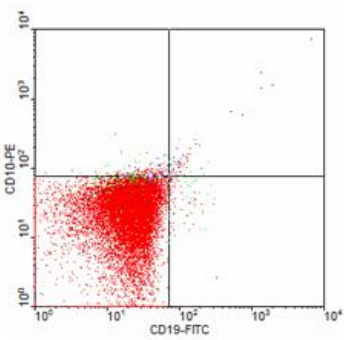
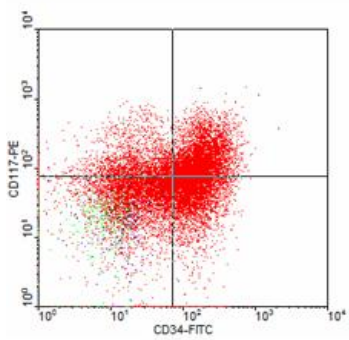
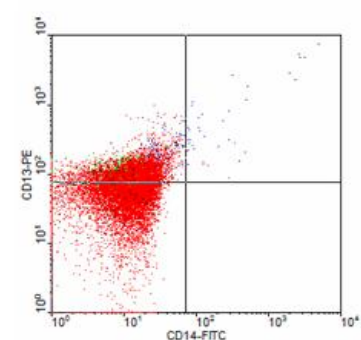
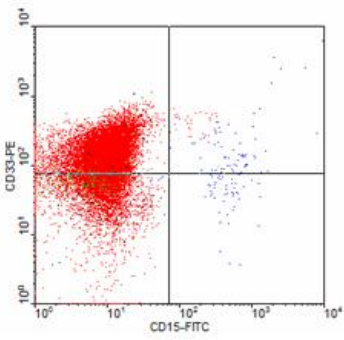
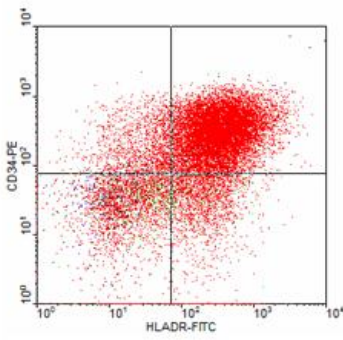


Figure 47 : Profil phénotypique de la LAM0

La population Blastique située dans la région R2 est de 65%, elle exprime les marqueurs d'immaturité (CD34 et HLADR) et les marqueurs myéloïdes CD13+, CD33+ et CD117+ sauf la MPOc). Les marqueurs monocytaires et plaquettaires (CD14, CD42) et lymphoïdes (CD79Ac, CD22, CD10, CD3s, CD3c et CD2) sont négatifs.



Blastes: 96%
Lymphocytes: 2%
Granuleux: 1%



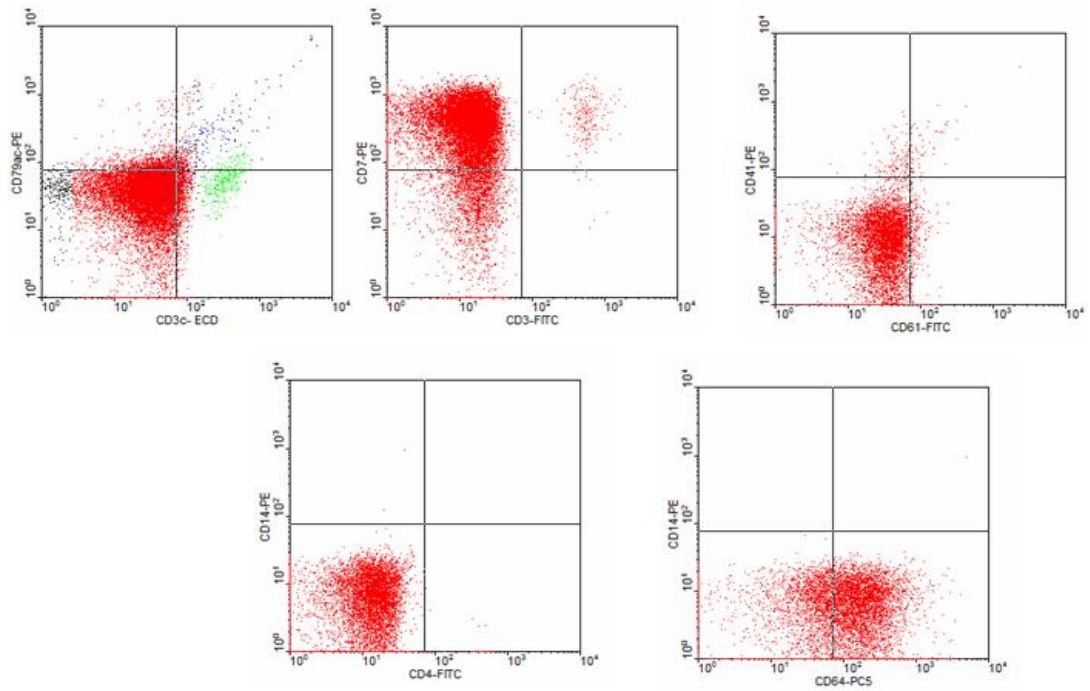
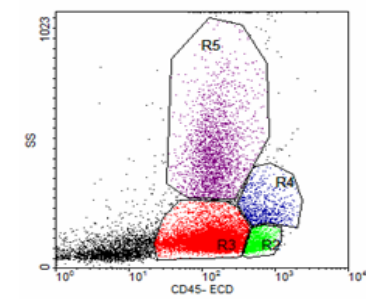
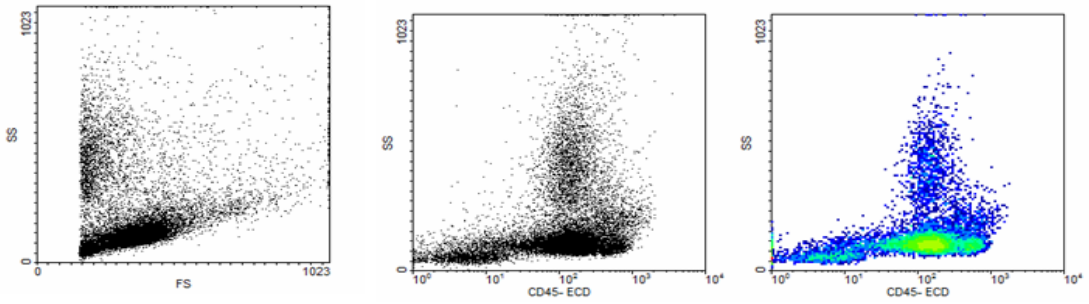


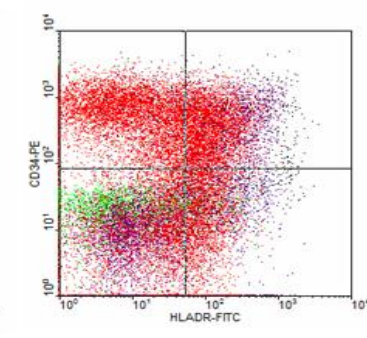
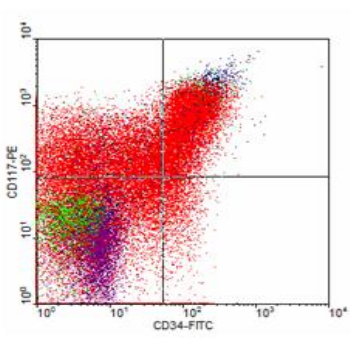
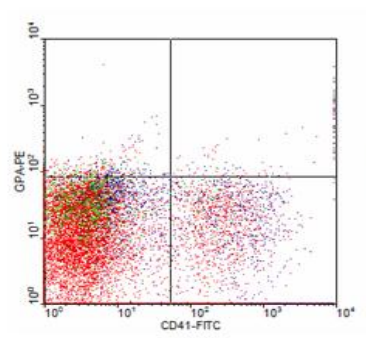
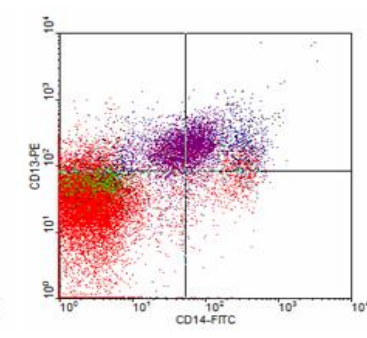
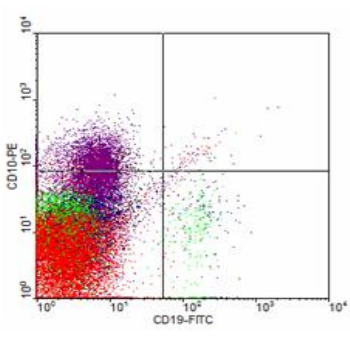
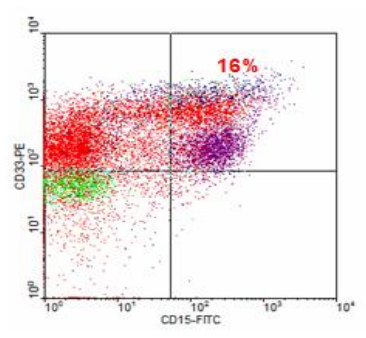
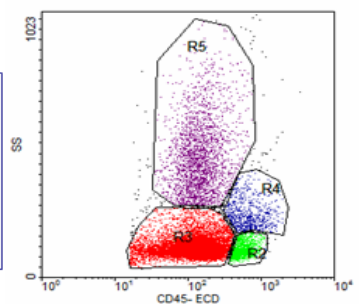
Figure 48: Profil phénotypique de la LAM1

La population blastique est de 96%, elle exprime le CD34, HLADR, CD33, CD13, CD117 et la MPOc. Les autres marqueurs (CD14, CD4, CD41, CD61, CD79ac, CD19, CD10, CD3c, CD3s) sont négatifs. Cette population co-exprime le marqueur aberrant CD7.



Moelle osseuse

R1: Population totale: 81%
R2: Lympho: 7 %
R3: Blastes: 73 %
R4: Mono: 3 %
R5: Granuleux: 17%



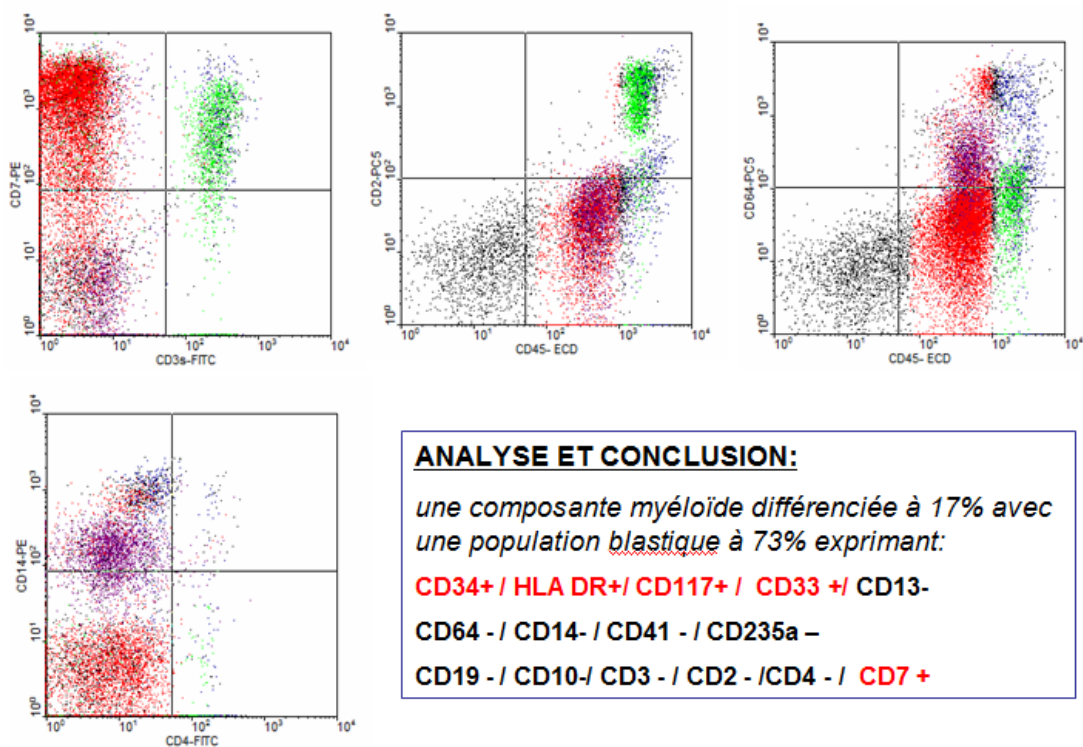
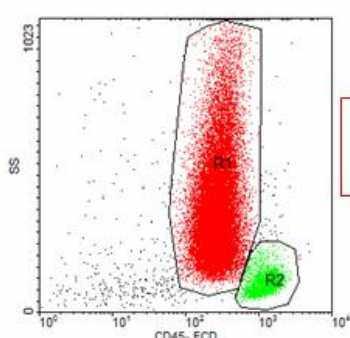
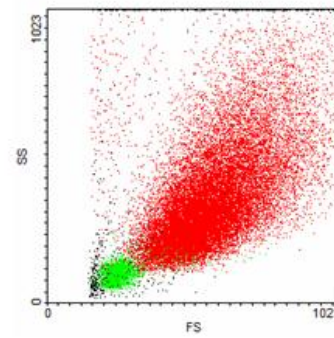
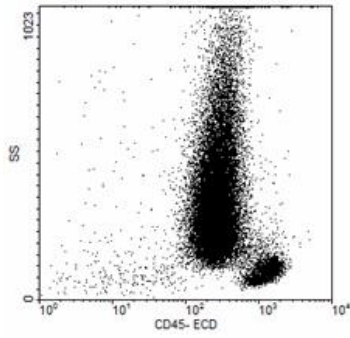
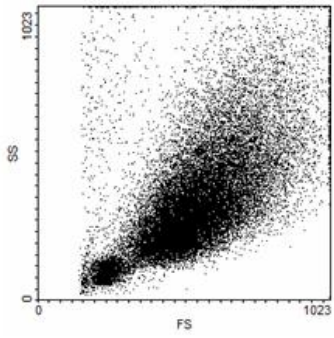
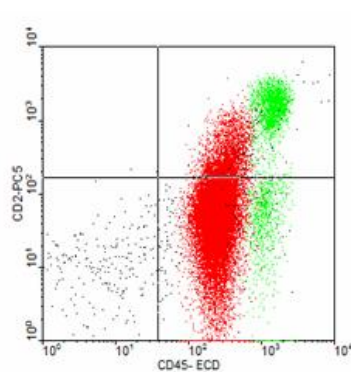
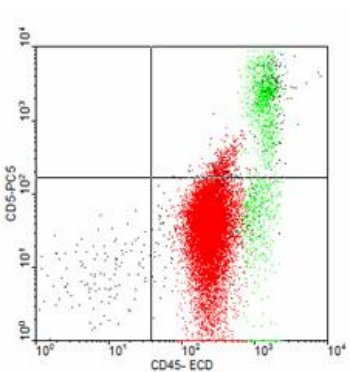
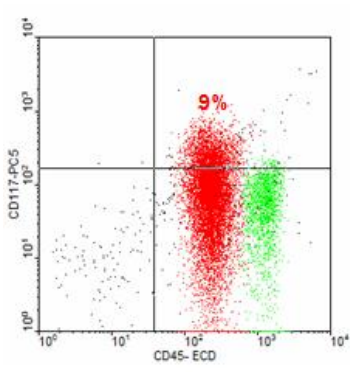
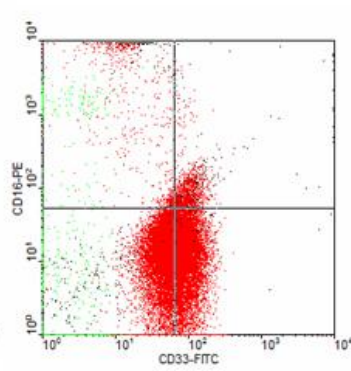
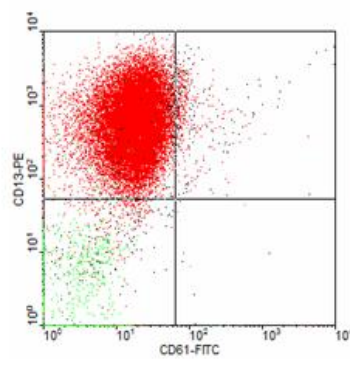
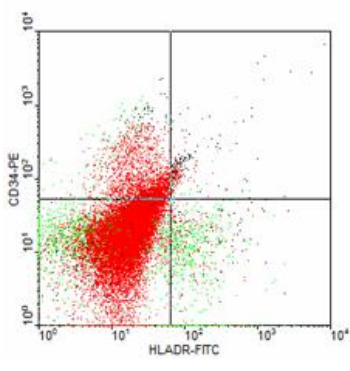


Figure 49 : Profil phénotypique de la LAM 2

La population blastique est de 73% avec une composante myéloïde différenciée de 17%, elle exprime les marqueurs d'immaturation, les marqueurs myéloïdes (CD 33 et CD117). Les autres marqueurs (CD13, CD64, CD14, CD41, CD235a, CD19, CD10, CD3 et CD4) sont négatifs. Dans ce type on note une co-expression du marqueur aberrant CD7.



Promyélo: 89%
Lympho: 9%



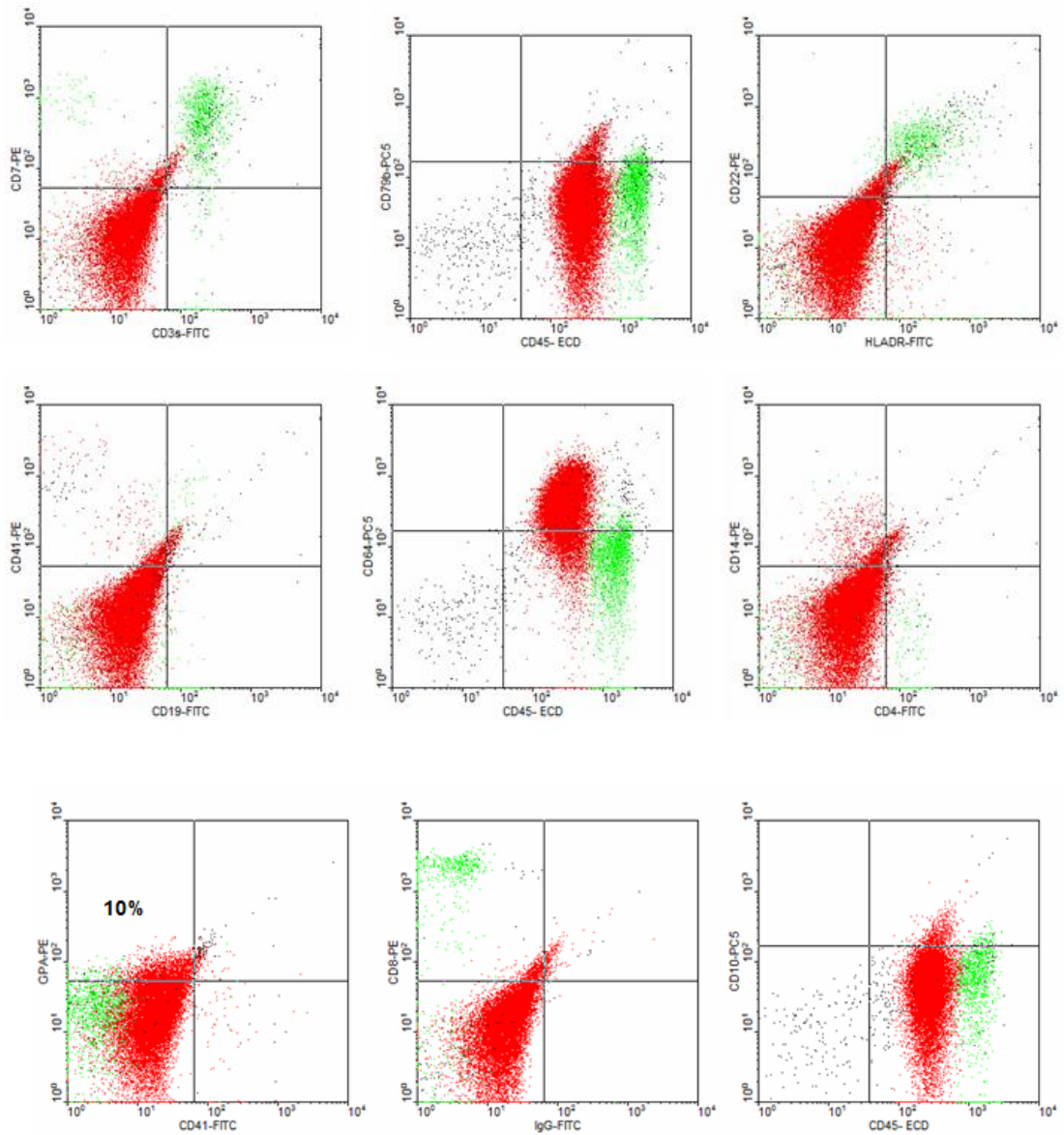
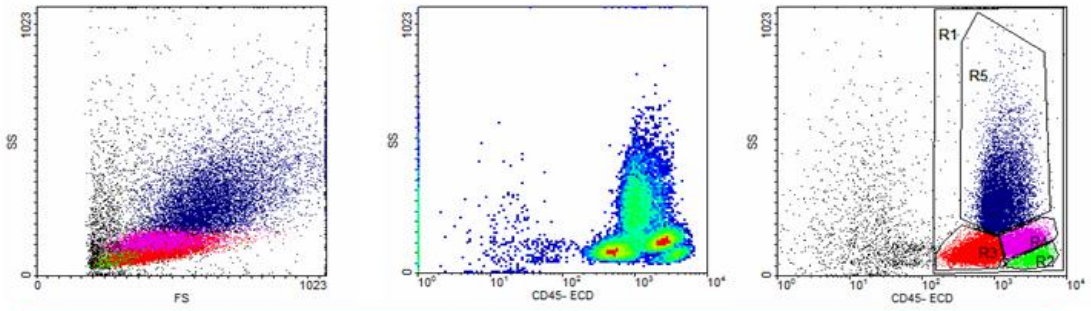
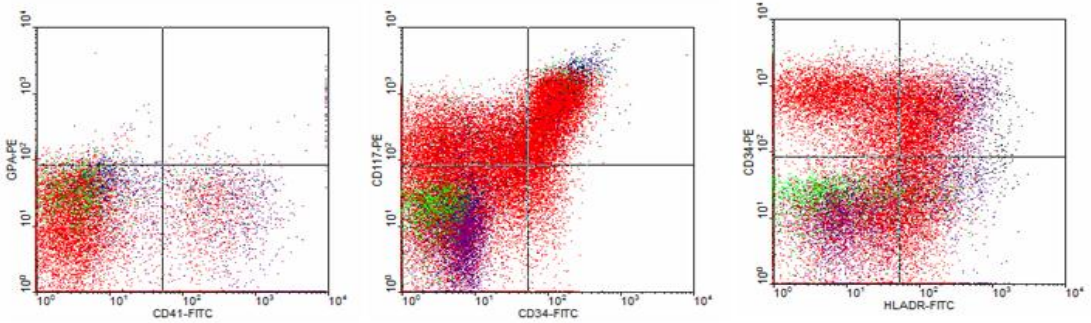
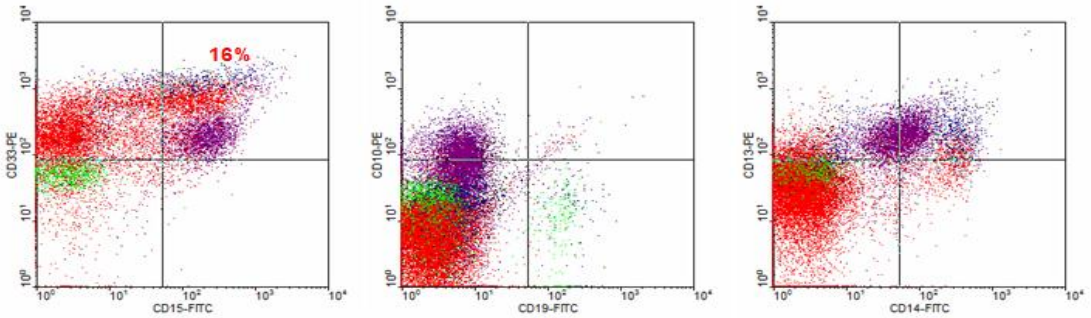
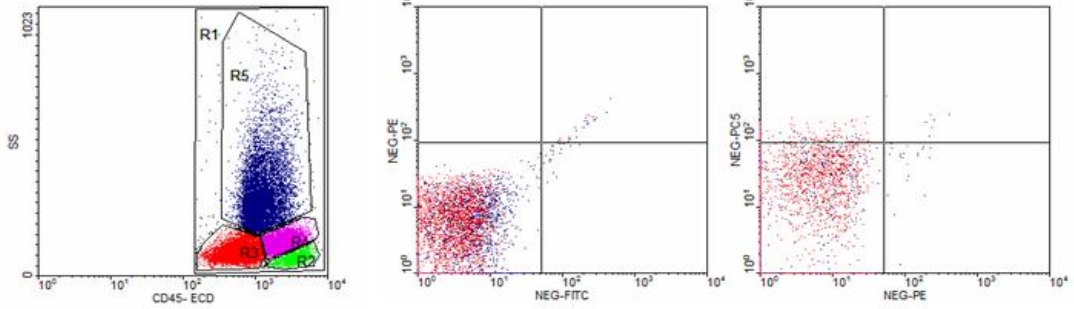


Figure 50 : Profil phénotypique d'une LAM 3

La population promyélocytaire n'exprime plus les marqueurs d'immatérité (CD34 et HLA DR) ni le CD117 et exprime les CD13, CD33 et CD64 ; Les autres marqueurs myéloïdes spécifiques (CD14, CD41, GPA) ainsi que les marqueurs lymphoïdes (CD79, CD19, CD10, CD22, CD3s, CD7, CD5, CD2 et CD8) sont négatifs.



**R1: Population: 93%, R2: Lymphocytes: 5%, R3: Myéloblastes: 31%,
R4: Monoblastes+ composante Mono: 29%, R5: Granuleux: 25%**



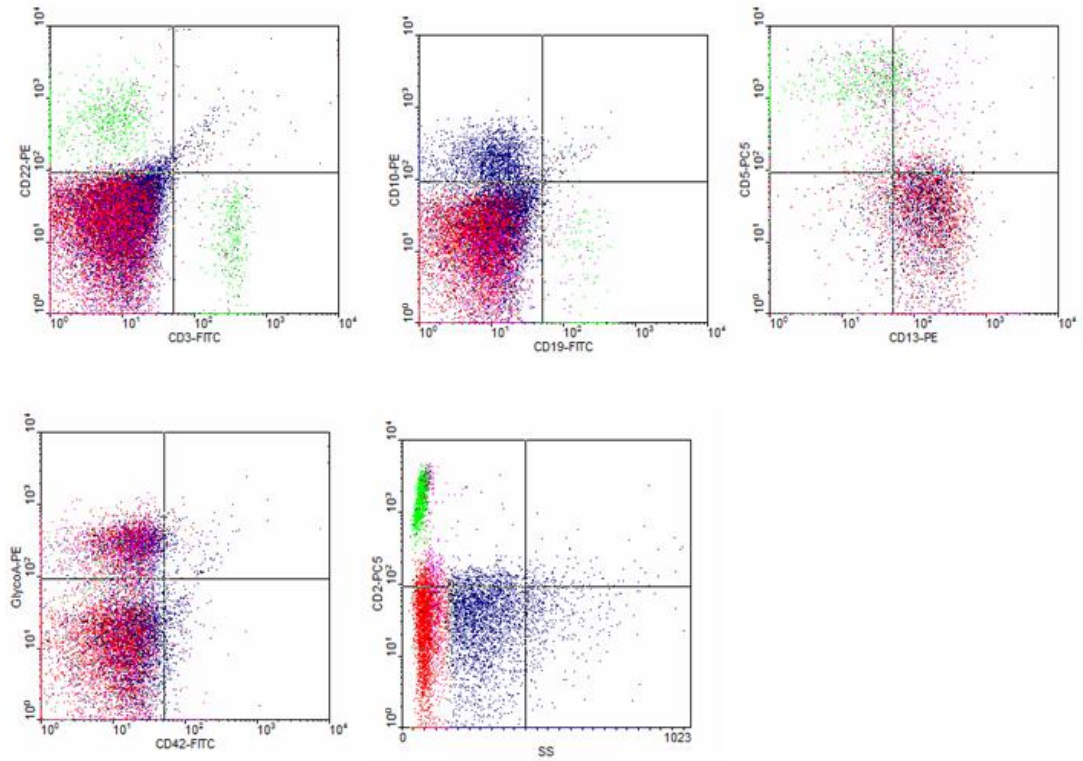
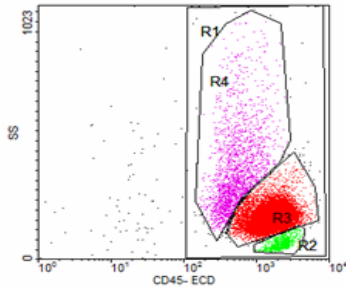
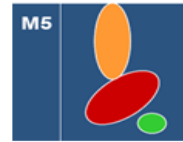
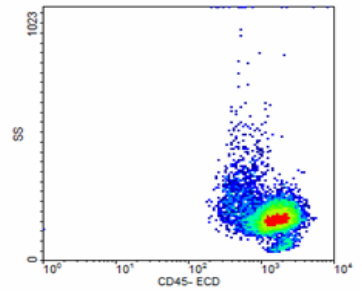
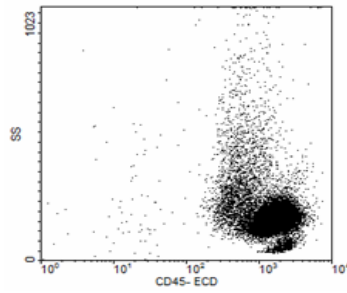
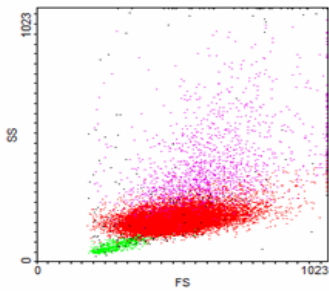
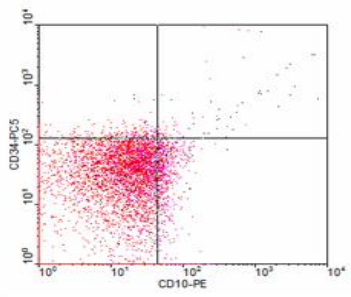
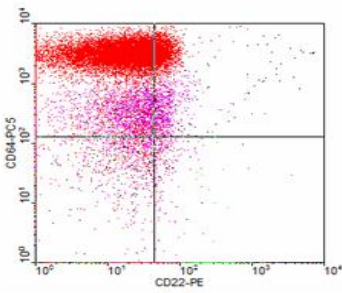
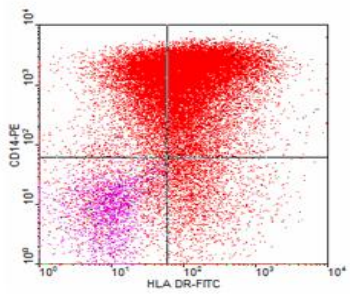
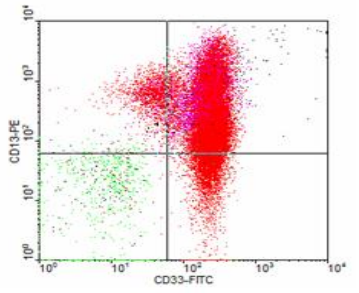
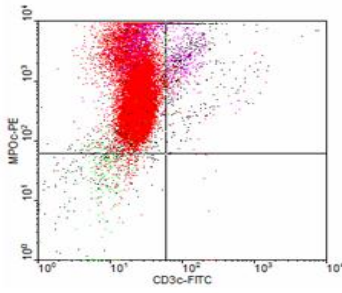
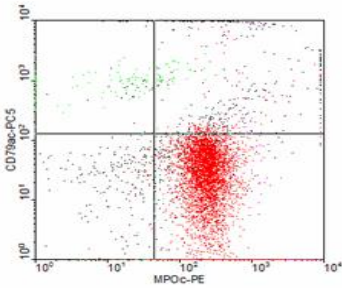


Figure 51 : Profil phénotypique de la LAM 4

Ces histogrammes objectivent, une population hétérogène, composée d'un clone blastique myéloïde de 31% et monocyttaire de 29% exprimant les CD34+, HLADR+, MPOc+, CD13+, CD33+,CD117+, CD14+ et CD64+, négatifs vis-à-vis des marqueurs : GPA-, CD22-, CD19-, CD10- , CD3c-, CD2- et CD5-.



R1: Population totale: 99,5% comporte:
R2: LYMPHOCYTES: 4%
R3: MONOBLASTES: 85%
R3: GRANULEUX: 11%



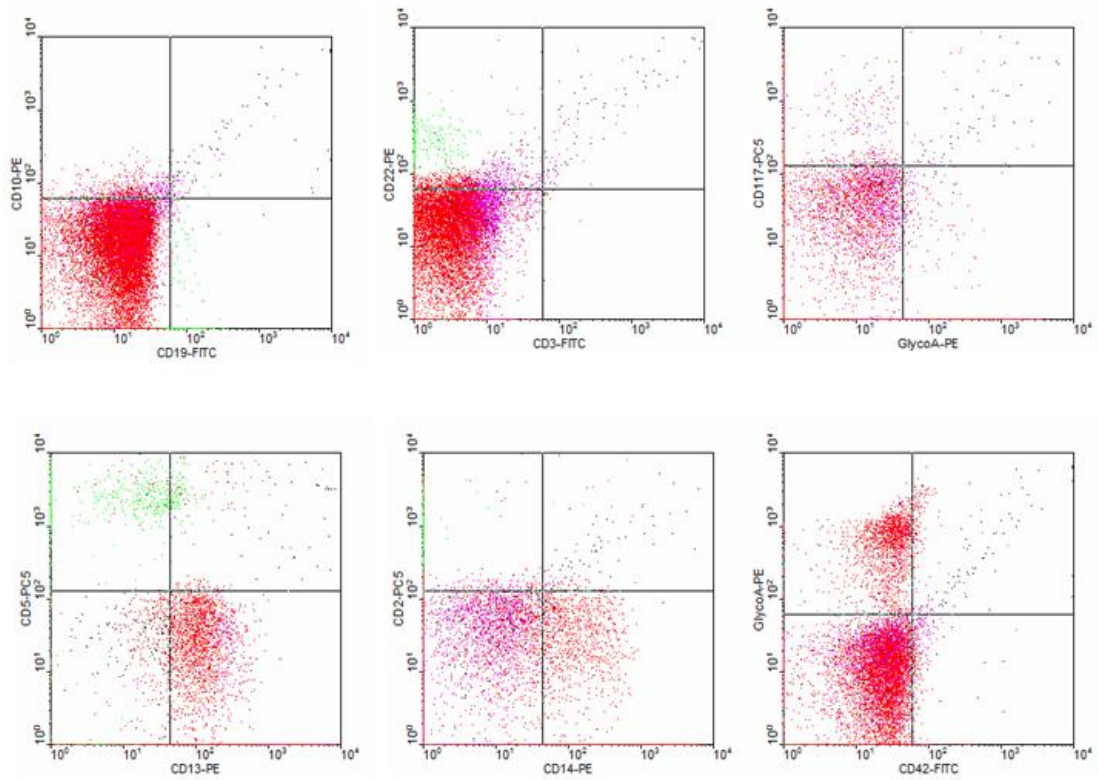


Figure 52 : Profil phénotypique de la LAM 5

La population blastique est retrouvée dans 85%, elle exprime le HLA DR mais non le CD34, les autres marqueurs myéloïdes et monocytaires sont positifs (MPOc +/ CD13+/ CD33+/ CD117+/ CD14+/ CD64+). La GPA, le CD42 et les marqueurs lymphoïdes sont négatifs.

2.4.1.1 Immunofluorescence (MIF) des marqueurs myéloïdes

Tab XVIII : Moyenne d'immunofluorescence (MIF) des marqueurs myéloïdes et d'immaturité

MIF (%)	LAM0 N : 7	LAM1 N : 21	LAM2 N : 32	LAM3 N : 21	LAM4 N : 32	LAM5 N : 9	TOTAL N : 122 (MIF %)
MPOc	3	54	85	82	79	20	68%
13	65	49	60	62	57	59	58%
33	70	57	72	63	60	67	60%
117	57	50	59	34	48	27	47%
15 (n : 43)	1	2	11	29	24	4	12%
16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
14	3	4	4	3	49	56	20%
64	4	11	13	46	61	68	34%
11c (n : 52)	2	6	4	9	55	56	22%
41 (n : 121)	2	2	1	2	4	8	3%
61(n : 79)	2	2	2	1	6	6	3%
GPA(n:116)	1	2	2	2	3	1	2%
34*	78	54	57	4	52	26	45%
HLA DR*	66	52	55	3	67	68	50%

MIF : moyenne de l'immunofluorescence

Ce tableau met en évidence la moyenne de l'immunofluorescence des marqueurs dans les sous types de LAM. Pour les marqueurs d'immaturité, la MIF est intense dans tous les sous types sauf pour la LAM5 où elle est faible et presque nulle dans la LAM3. Pour la MPOc, la MIF est faible dans la LAM5 et nulle dans la LAM0. Pour les marqueurs de la lignée myélo-monocytaire, la MIF est intense. Cette dernière est presque nulle avec les marqueurs des lignées plaquettaire et érythrocytaires.

2.4.1.2 Degré de positivité des marqueurs myéloïdes

L'expression des marqueurs myéloïdes est retrouvée dans 90% des cas pour la myéloperoxydase et le CD33, dans 87% des cas pour le CD13 et dans 72% des cas pour le CD117. Pour les marqueurs d'immaturité CD34 et HLA DR, leur positivité est respectivement de 57% et 72%. (Figure 53). Le taux des autres marqueurs est plus faible en rapport avec le type de LA.

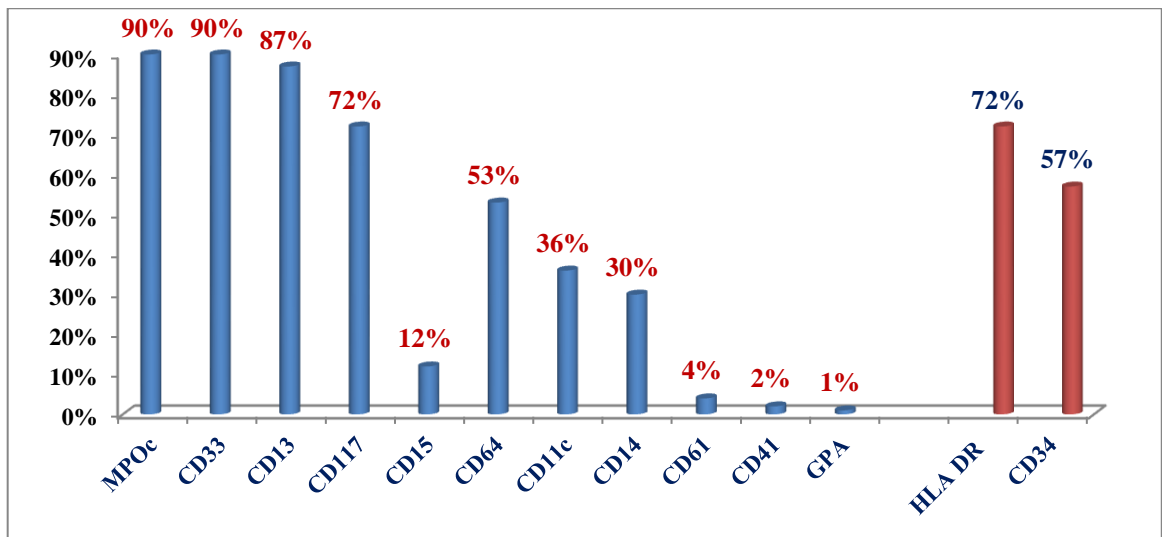


Figure 53 : Degré de positivité des marqueurs myéloïdes et d’immaturité dans les LAM

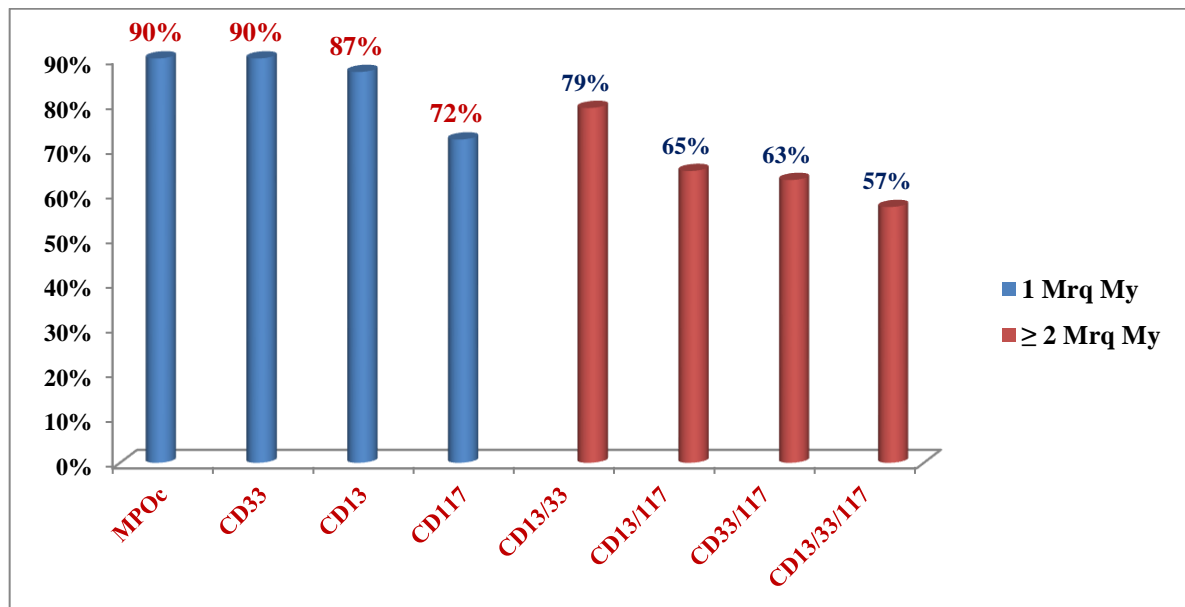


Figure 54: Degré de positivité des marqueurs myéloïdes en mono marquage et marquage combiné dans les LAM

Le degré de positivité des anticorps myéloïdes en monomarquage est plus fort qu’en marquage combiné (90% versus 79% versus 57%). (Figure 54).

2.4.1.3 Classification des LAM selon l’EGIL

L’exploitation des marqueurs et leur degré de positivité ont permis de classer les LAM selon les critères établis par le groupe EGIL. Les formes les plus fréquentes sont représentées par les LAM2 à 26% et LAM4 à 26% (dont 4 formes à eosinophile), suivie des LAM1 (17%) et la LAM3 (17% dont 3 formes variante), la LAM5 (8% dont 5 formes 5a et 4 formes 5b). Néanmoins, la CMF nous

a permis d'identifier la LAM0 mais les formes erythro-myéloïde et mégacaryoblastique (LAM6 et LAM7) n'ont pas été mise en évidence dans ce travail. (Figure 55).

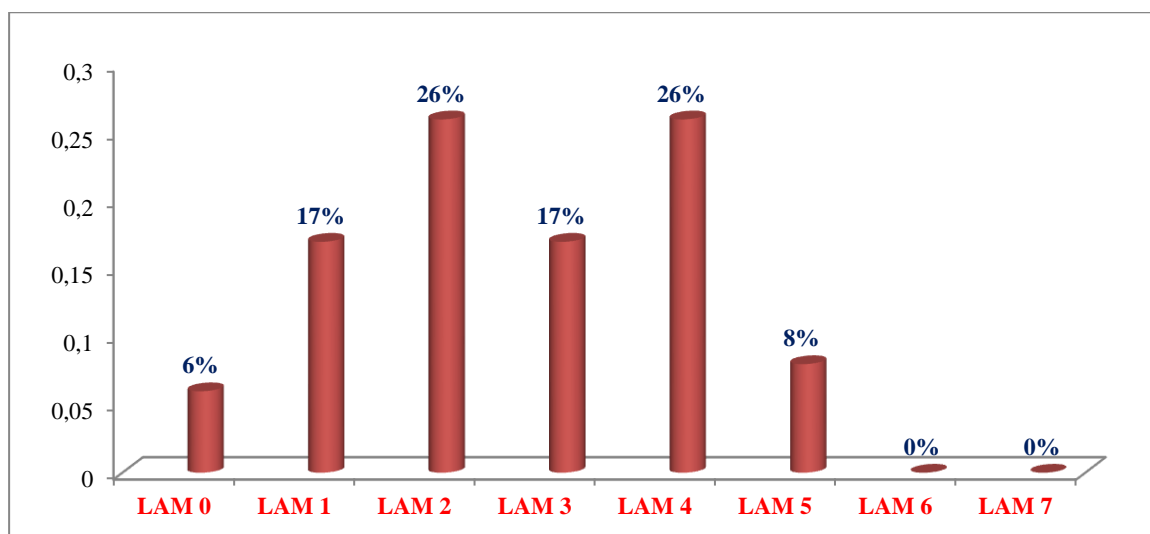


Figure 55 : Répartition des leucémies aiguës myéloïdes par CMF

2.4.1.4 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et des sous types de LAM

Tab XIX : Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et sous types de LAM

CD + (%)	LAM 0 N : 7	LAM1 N : 21	LAM 2 N : 32	LAM 3 N : 21	LAM 4 N : 32	LAM 5 N : 9	TOTAL N : 122 (%)	P
MPOcy	0	21	32	21	32	3	90	0,000
CD13	7	15	25	20	30	9	87	0,04
CD33	5	17	29	21	29	9	90	NS
CD117	6	15	28	11	25	3	72	0,007
CD15 (n : 43)	0/4	0/9	1/9	1/6	2/13	1/2	12	NS
CD16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	---
CD14	0	0	1	0	29	7	30	0,000
CD64	0	3	4	18	31	9	53	0,000
CD11c (n : 52)	0/2	0/9	0/10	1/12	14/15	4/4	36	0,000
CD41 (n : 121)	0/7	0/21	0/31	0/21	2/32	1/9	2	NS
CD61 (n : 79)	0/6	0/13	0/23	0/7	2/24	1/6	4	NS
GPA (n:116)	0/7	0/19	0/32	0/19	1/30	0/9	< 1	NS
CD34	7	14	24	0	22	2	57	0,000
HLA DR	6	15	26	0	32	9	72	0,000

NT : Marqueur non testé

Le degré des marqueurs en fonction des sous types de LAM objective une positivité de la MPOc à 100% sauf pour la LAM5 (33%) et elle est nulle dans la LAM0.

De même que pour les marqueurs CD34 et HLA DR, où la positivité est forte dans tous les types de LAM sauf la LAM3 où on note une perte de leur expression et dans la LAM5 où le CD34 est faiblement exprimé (29%).

Le degré de positivité des autres marqueurs (CD13, CD33) est élevé et similaire dans tous les types de LAM, pour le CD117 sa positivité n'est similaire aux précédents que dans la LAM4, cette positivité est modérée dans les LAM3 et LAM5.

Le CD15 n'est testé que pour un échantillon restreint, Il marquerait beaucoup plus la population myélo-monocytaire différenciée.

Les marqueurs CD14, CD64, CD11c ont une forte positivité spécifique pour la lignée monocytaire. L'expression des marqueurs myéloïdes et d'immaturité (CD34, HLADR, MPOc, CD117) est corrélée avec la classification FAB mais ne l'est pas avec les CD33et CD15.

L'expression des marqueurs myélo-monocytaires (CD14, CD64, CD11c) est aussi par leur spécificité corrélée avec les sous types LAM4 et LAM5.

Quant aux marqueurs spécifiques (CD41, CD61 et GPA), la corrélation est non significative vue l'absence de sous types LAM6 et LAM7.

2.4.1.5 Apport du CD45 dans les LAM

- Le CD45 permet de discriminer d'une part les blastes des lymphocytes et des monocytes par la différence de l'intensité de ce marqueur et d'autre part, les blastes des cellules granuleuses par la différence de granularité. Le CD45 permet de déterminer la taille du clone blastique, en comparant la taille du clone de blastes en 45/ SS par rapport à la taille mesurée sur un histogramme taille(FSC) / Structure(SSC)(Figure56).

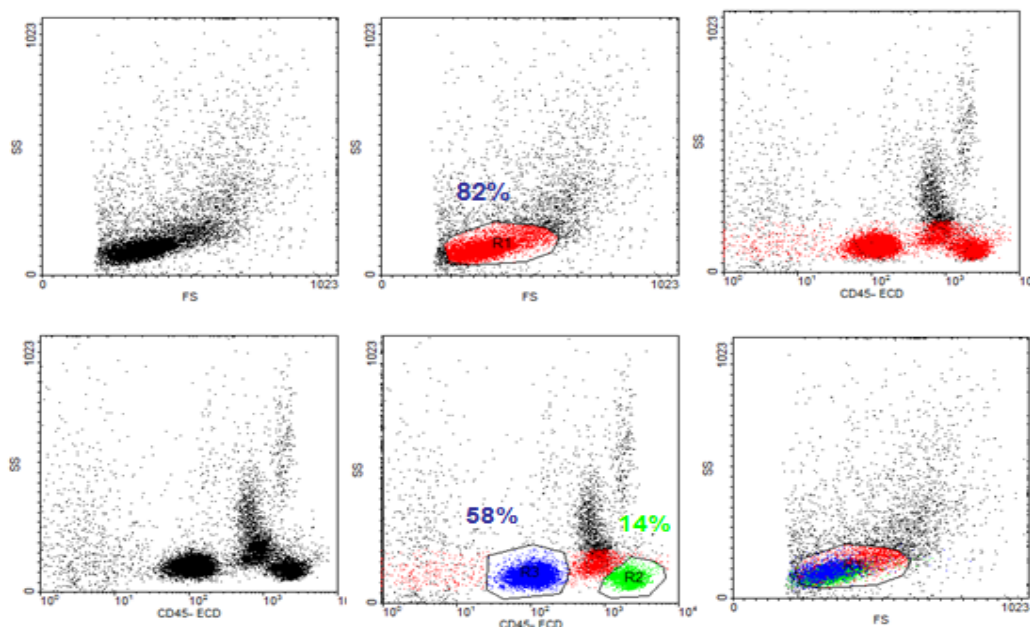


Figure 56 : Apport du CD45 dans la selection de la population blastique

Le gating de la population blastique en taille- structure (FSC/ SSC) retrouve un clone blastique en moyenne de 63%. Ce dernier est de 73% après fenêtrage du clone en utilisant le CD45. Cette différence est notée dans presque tous les sous types de LAM à l'exception de la LAM1 (Fig 57).

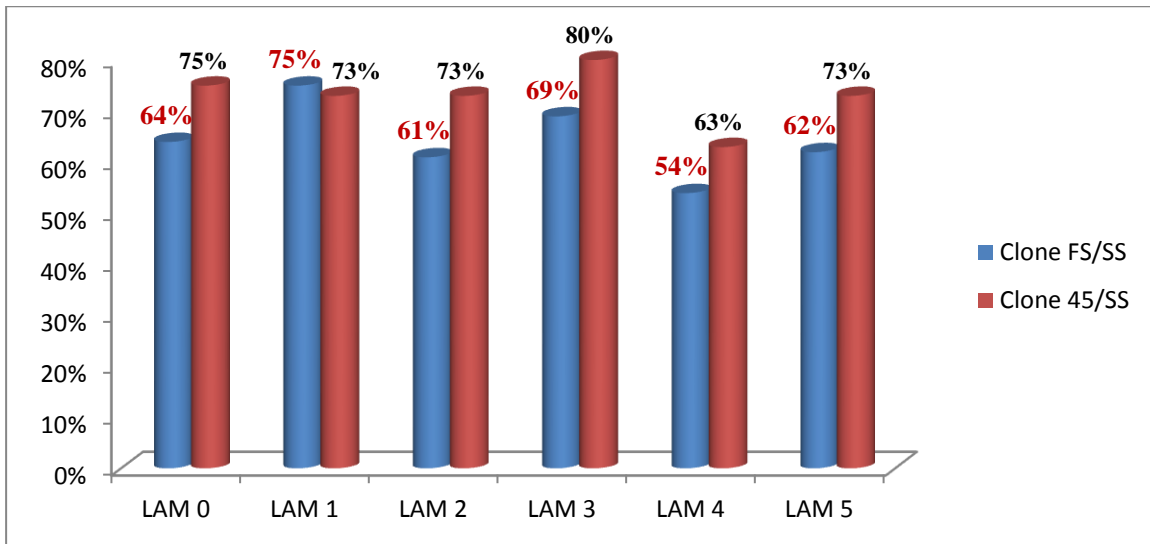


Figure 57 : Clone de blaste en taille /structure versus SS/45

- Corrélation entre taux de blastes en microscopie et en CMF (45/SS)

L'analyse morphologique du taux de blastes au niveau du sang ou de la moelle osseuse est corrélée au résultat par CMF du clone blastique fenêtré par l'utilisation du marqueur CD45, reconnu comme marqueur de gating des blastes (r de spearman : 0,798, n : 122, p : 0,0001) (Figure 58).

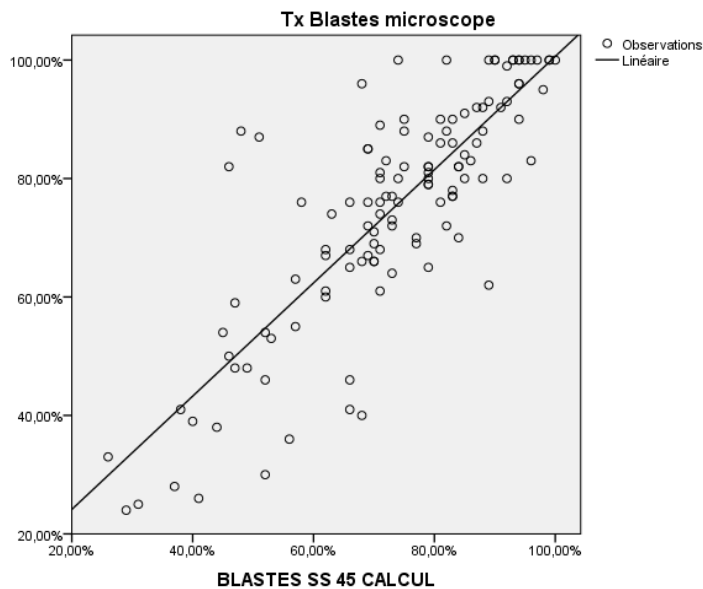


Figure 58 : Corrélation entre taux de blastes en microscopie et en CMF (45/SS)

2.4.1.6 Concordance entre classification FAB et CMF

Tab XX : Concordance entre classification FAB et CMF

MORPHOLOGIE												
		LAM0	LAM1	LAM2	LAM3	LAM4	LAM5	LAM6	LAM7	M2/4	LAInd	Total
CMF	M0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	7
	M1	0	19	0	0	0	0	0	0	0	2	21
	M2	0	0	30	0	0	0	0	0	2	0	32
	M3	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	21
	M4	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	32
	M5	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9
	M6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	19	30	21	32	10	0	0	2	08	122	
r de spearman : 0,552 n : 122 p : 0,001												

La concordance est parfaite dans 111 cas/ 122(91%)

La concordance partielle dans 8 cas (7 %)

La discordance est retrouvée dans 3 cas (2%)

Dans 9% des cas, la CMF a clarifié le sous type de LAM.

2.4.1.7 Marqueurs aberrants dans les LAM

Un des facteurs déterminants de la malignité des leucémies aiguës sur le plan phénotypique est l'expression de marqueurs aberrants. Certains de ces marqueurs sont corrélés avec les anomalies morphologiques et cytogénétiques et permettent l'évaluation de la maladie résiduelle.

Grâce à l'utilisation d'un panel étendu qui vise à la fois les trois lignées, nous avons identifié sur la série des 122 échantillons de patients LAM, les marqueurs aberrants. L'expression de ces marqueurs était de 31%, les plus exprimés sont les CD7, CD2 et CD56 retrouvés respectivement dans 15,6%,13% et 12,5% alors que les autres marqueurs, leur expression est plus faible (1,19-2,5%) (Tableau XXI).

Tab XXI: Répartition des antigènes aberrants et leur fréquence dans les LAM

CD + (%) / LAM	LAM 0	LAM 1	LAM 2	LAM 3	LAM 4	LAM 5	TOTAL
	N : 7	N : 21	N : 32	N : 21	N : 32	N : 9	N : 122(%)
CD7 (n : 83)	0/3	7/17	1/20	0/17	5/20	0/6	13(15,6)
CD2 (n: 90)	0/5	0/15	2/28	3/15	4/19	3/8	12(13)
CD5 (n: 113)	0/6	0/19	0/28	0/21	1/31	1/8	2(1,8)
CD56 (n: 32)	0/2	1/7	2/5	0/6	0/11	1/1	4(12,5)
CD19 (n:122)	0	0	2	0	1	0	3(2,5)
CD22 (n:84)	0/4	0/15	0/26	1/14	0/17	0/8	1(1,19)
CD10 (n:122)	0	1	0	0	0	2	3(2,5)
Total	0	9	7	4	11	7	38(31,1)

2.4.2 Immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques

Le panel d'anticorps monoclonaux utilisé a permis de différencier une LAL de phénotype B d'une LAL de phénotype T.

Les marqueurs d'immatunité CD34, HLA DR et le CD117 ont été testés sur tous les échantillons de patients.

Les marqueurs Lymphoïdes B: CD19, CD79acy, CD10 sont appliqués sur l'ensemble des LAL, cependant le CD22, IgM(μ) et Ig surface ont été testés sur 44 patients (88%).

Les marqueurs lymphoïdes T: CD3cy et de surface, CD5, CD4, CD8 et CD10 sont appliqués dans tous les cas. Les autres marqueurs CD2, CD7 et CD1a sont utilisés à des degrés variables dans respectivement 44cas (80%) ,30cas (60%) et 22 cas (44%) (Figure 59).

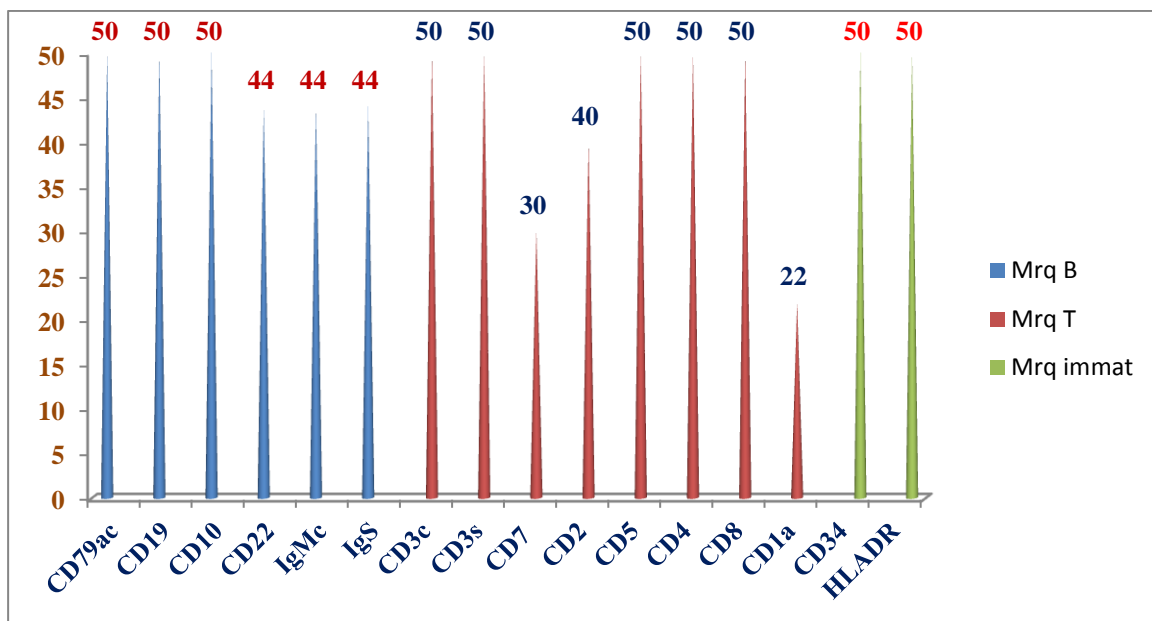
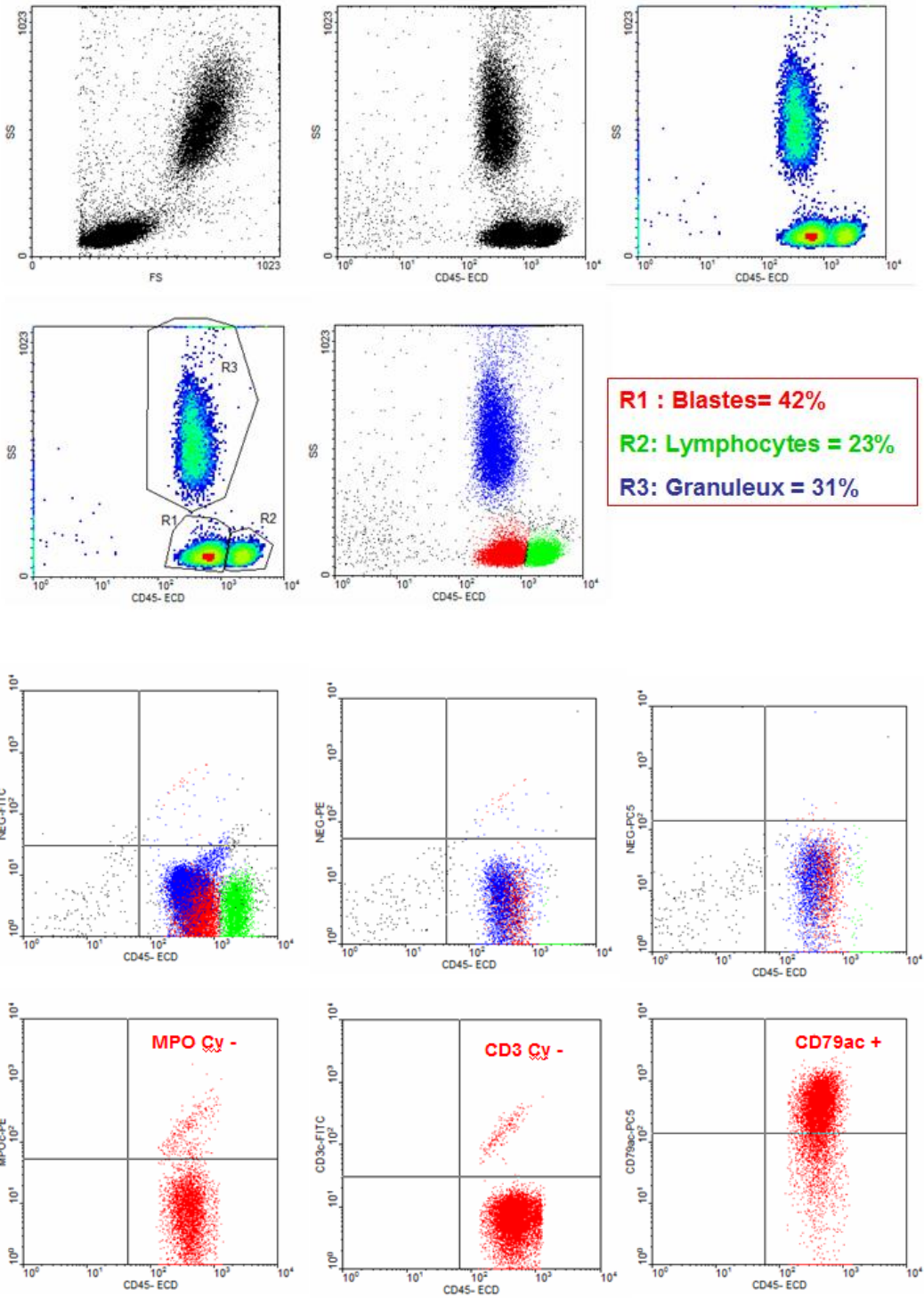
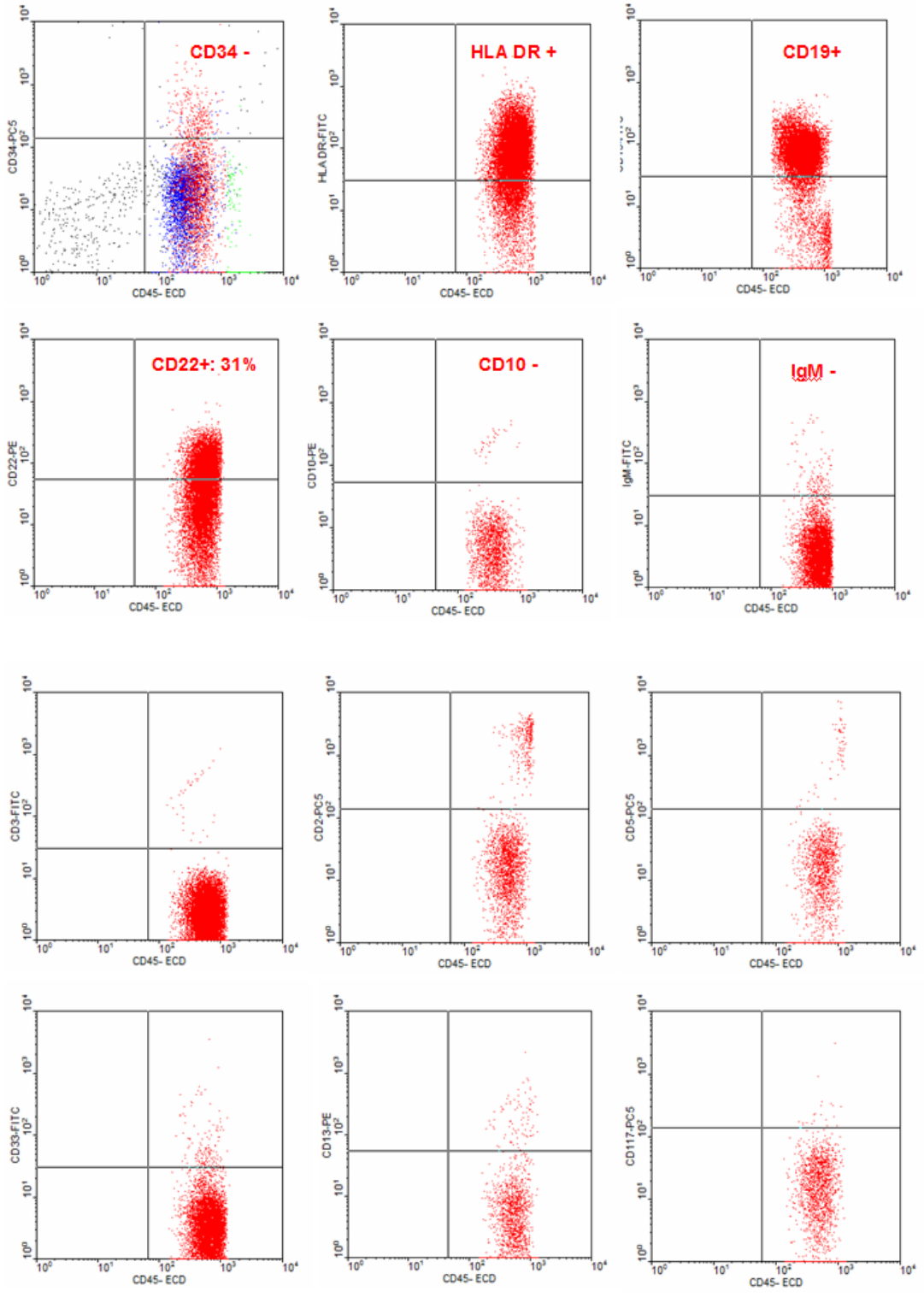


Figure 59: Marqueurs lymphoïdes et d'immatunité testés dans les LAL

Ces anticorps ont permis de mettre en évidence le diagnostic des LAL, déterminer leurs phénotypes B et T et les différents sous types que nous illustrons par les différents histogrammes.

- Profil phénotypique des sous types de LAL B





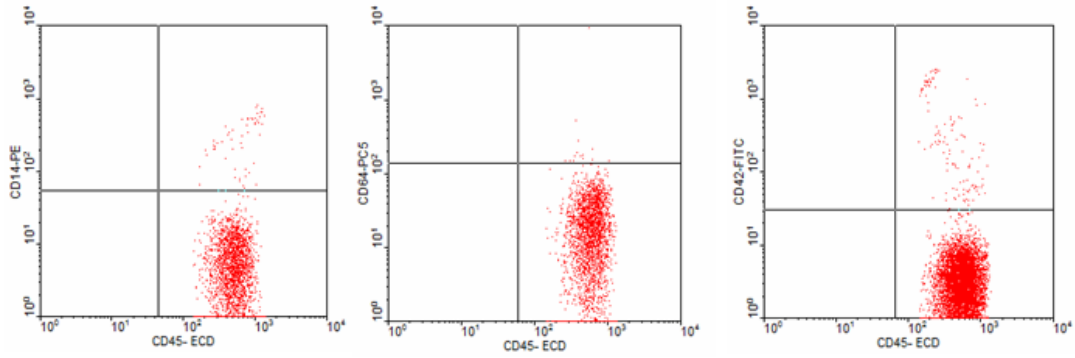
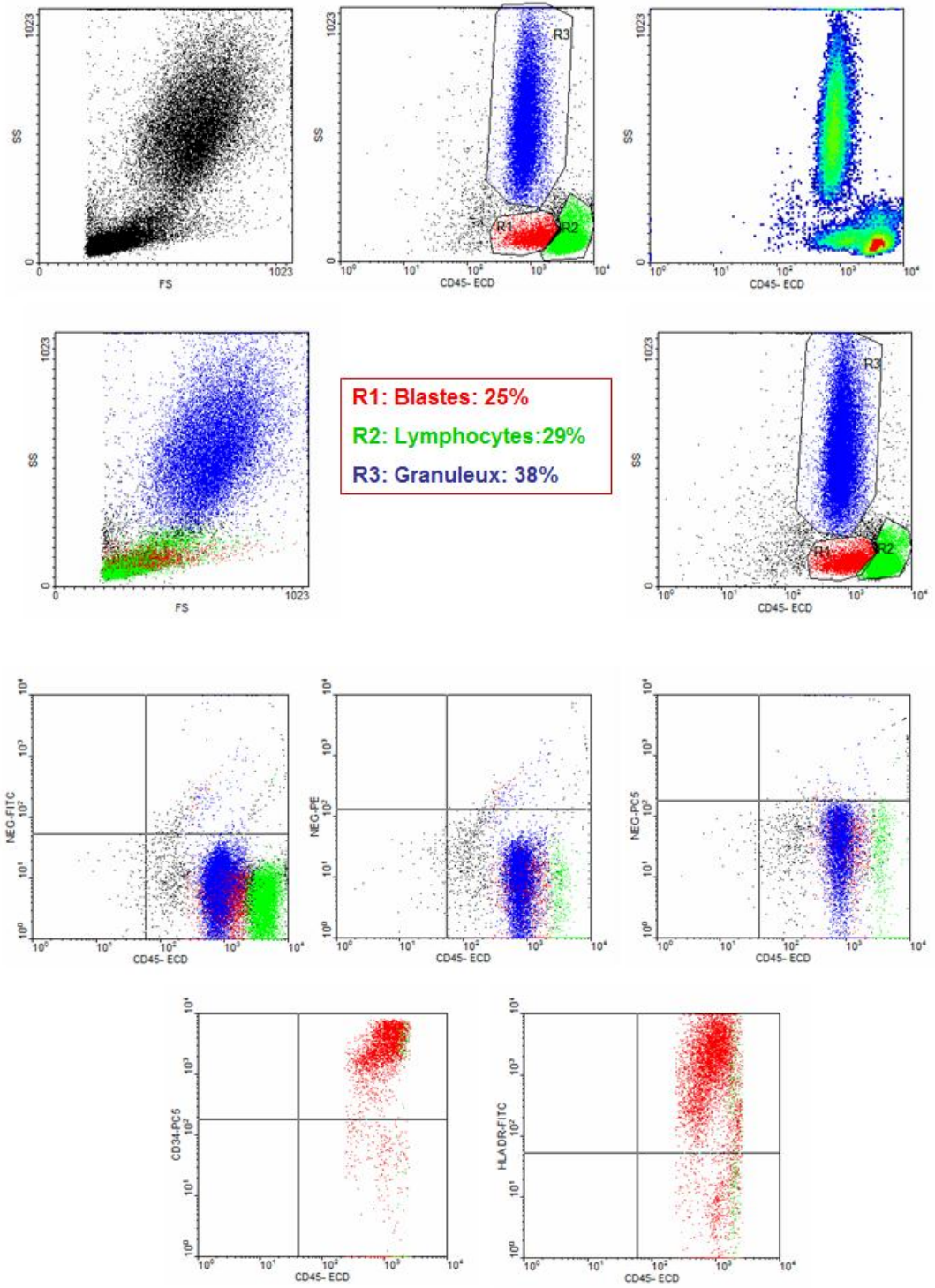
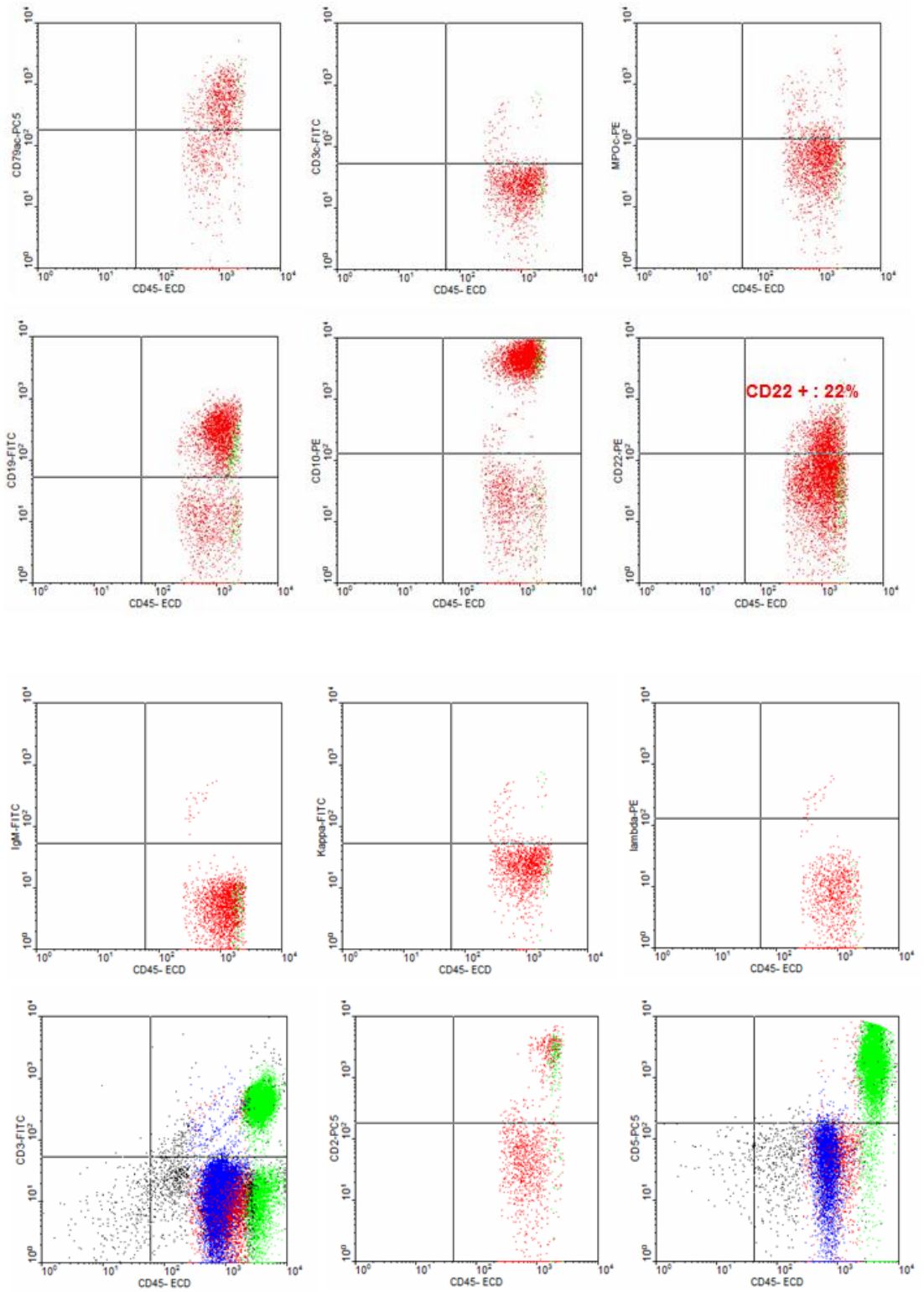


Figure 60: Profil phénotypique de la LAL B de type I (Pro-B)

La population blastique située dans la région R1 est de 42%, elle exprime le marqueur d'immatunité HLADR mais non le CD34, une positivité des marqueurs lymphoïdes B (CD79a Cy+/ CD19 +/- CD22+) mais une négativité vis à vis des CD10 et IgM. Les autres marqueurs lymphoïdesT (CD3c, CD3s, CD5, CD2) et myéloïdes (MPOc, CD13, CD33, CD11, CD14, CD64 et CD42) sont négatifs.





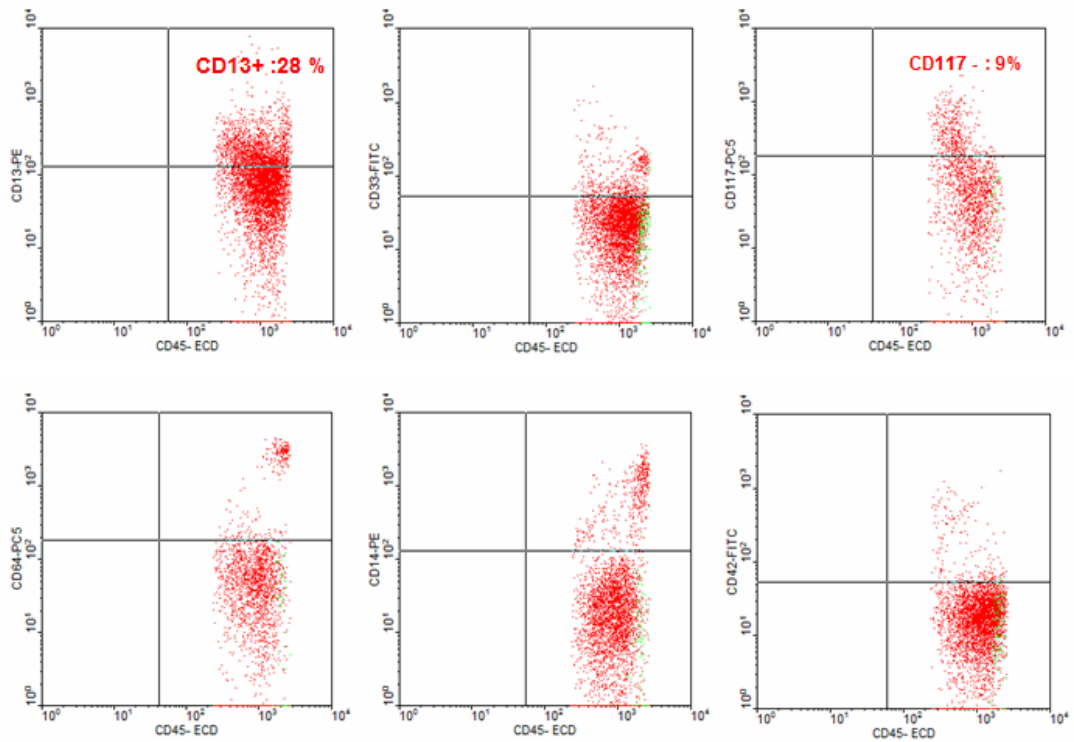
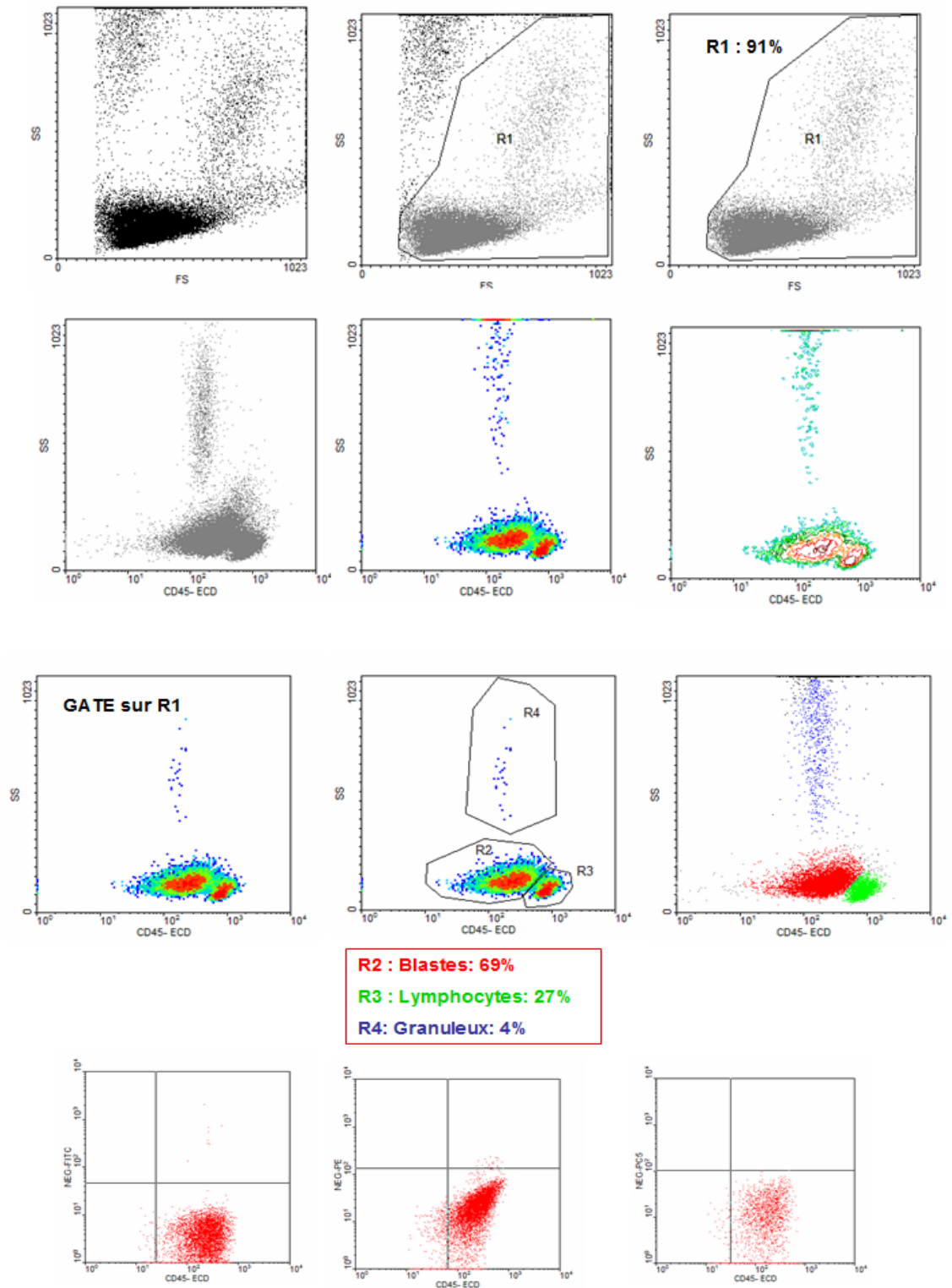
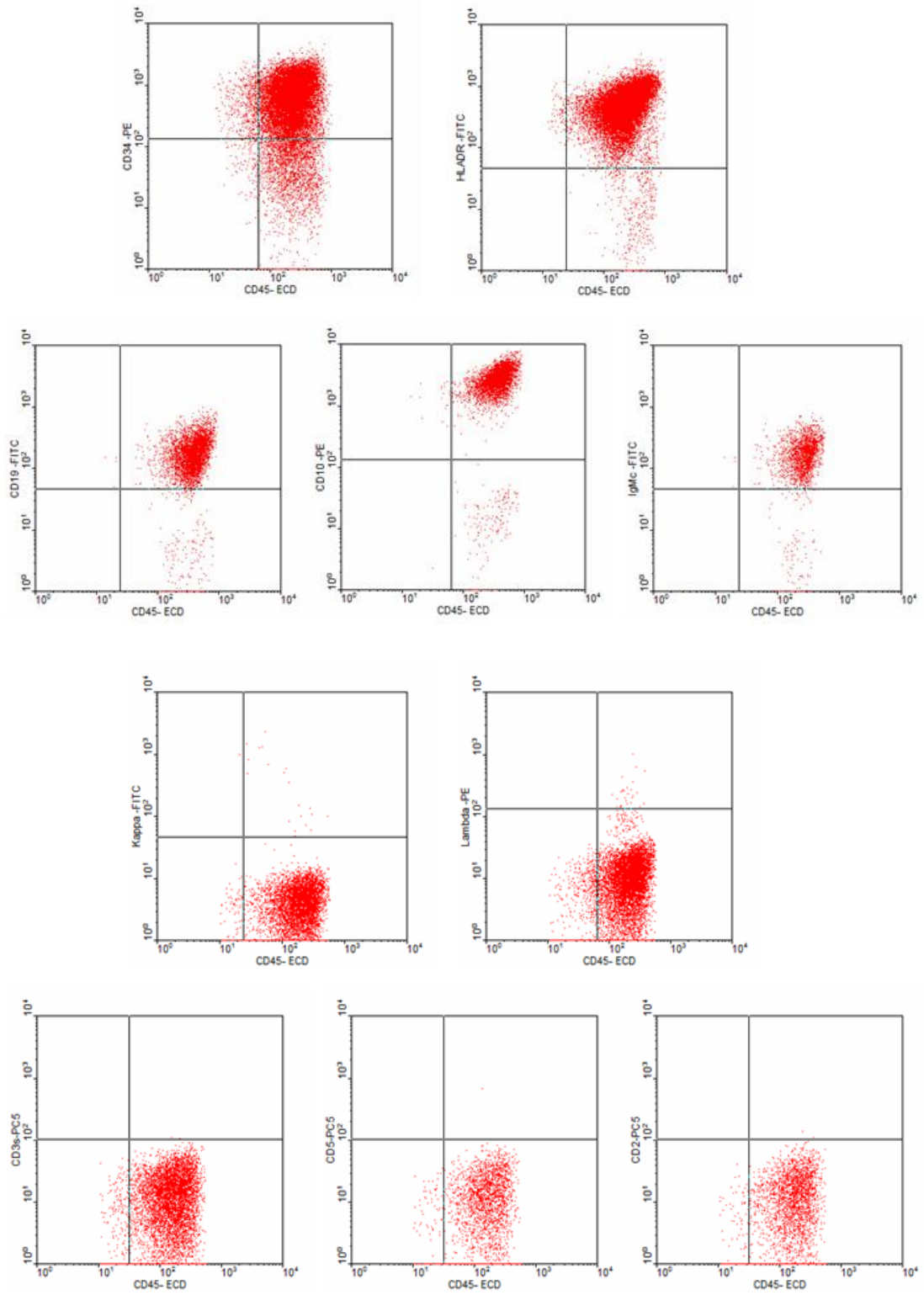


Figure 61: Profil phénotypique de LAL B de type II (Pré-Pré B)

La population blastique est de 25%, elle co- exprime les marqueurs d’immaturité CD34 et HLADR, une positivité des marqueurs lymphoïdes B (CD79a cy/ CD19/ CD22) et l’antigène commun CD10. Les autres marqueurs lymphoïdes B (IgM et IgS), lymphoïdes T(CD3cy et de surface, CD2 et CD5) et myéloïdes (MPOc, CD33, CD117, CD64, CD14, CD42) sont négatifs. Dans ce cas on note une expression du marqueur aberrant CD13.





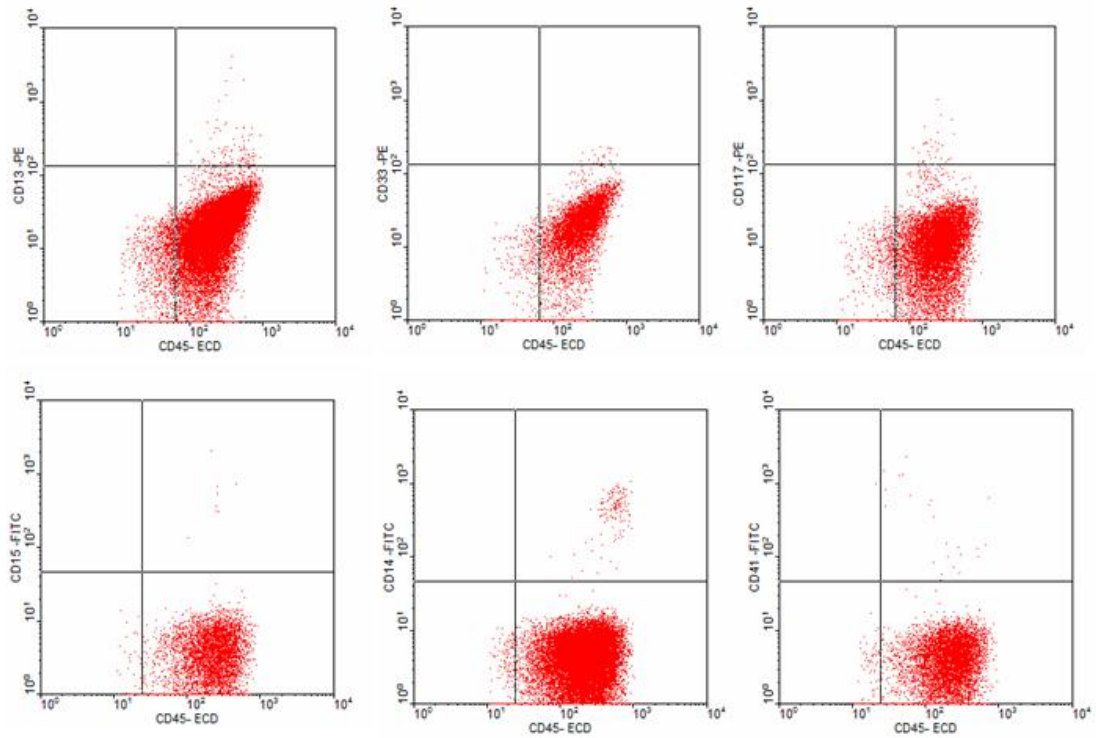
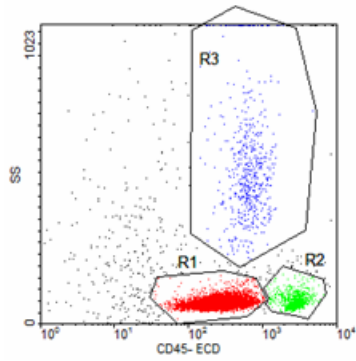
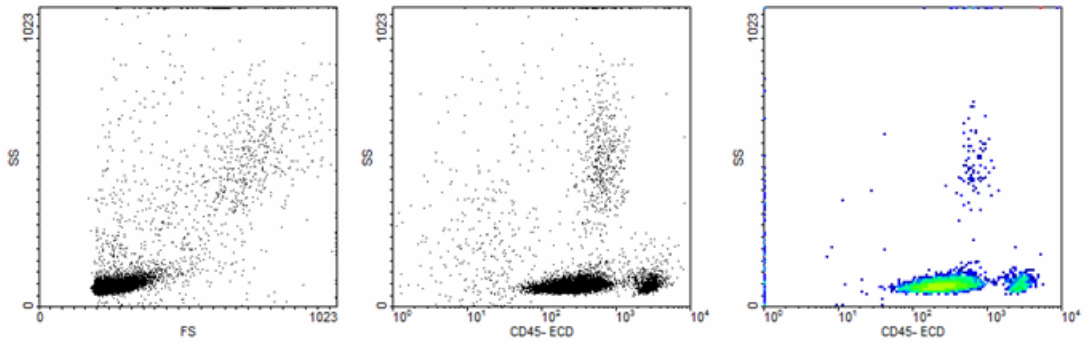


Figure 62: Profil phénotypique de LAL B de type III(Pré- B)

La population blastique est de 69%, elle exprime les marqueurs CD34 et HLADR. Les marqueurs lymphoïdes exprimés sont le CD19, CD10 et la chaîne μ (IgM en intracytoplasmique). L'immunoglobuline de surface, les marqueurs lymphoïdes T(CD3s, CD5, CD2) et myéloïdes (CD13, CD33, CD117, CD14, CD41 et GPA) sont négatifs. Cet aspect phénotypique est compatible avec le sous type III de la LALB.

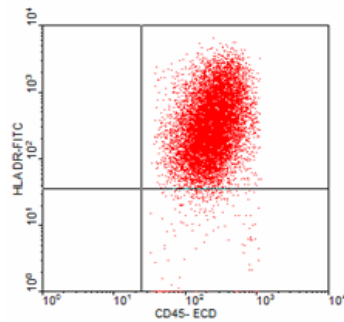
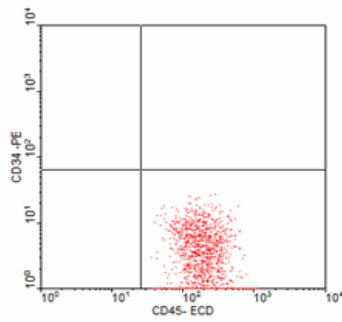
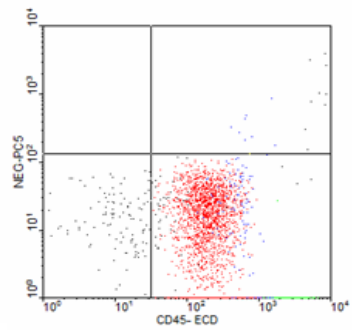
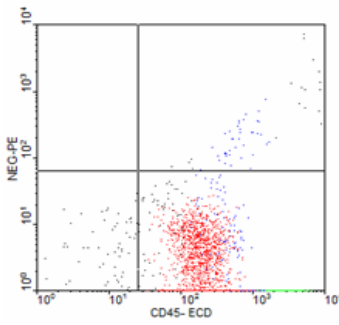
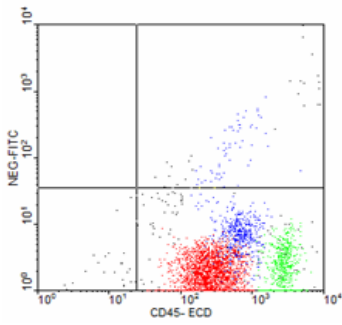


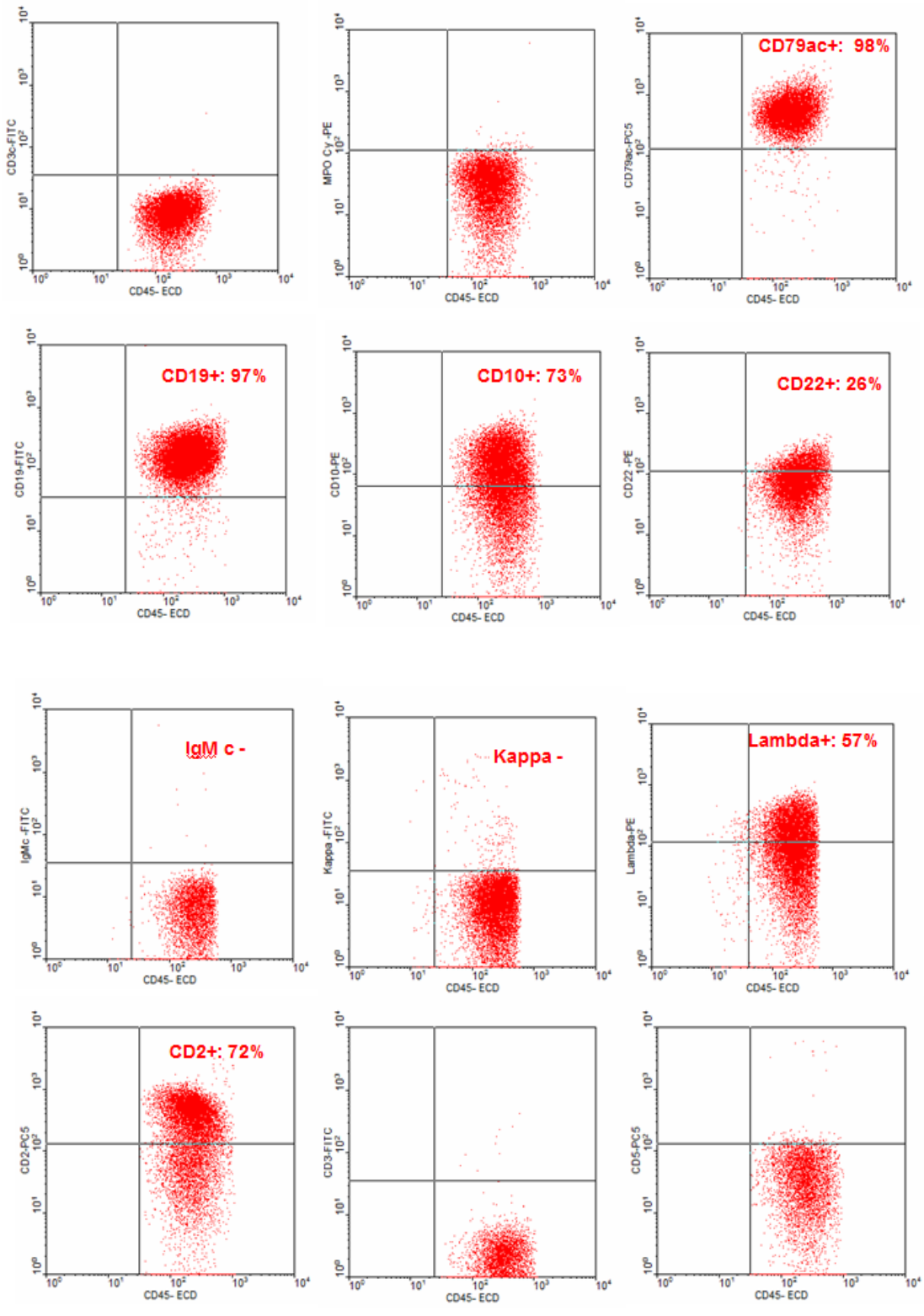
Cellules viables : 94%

R1: Blastés: 78%

R2: Lymphocytes: 10%

R3 : Granuleux: 6%





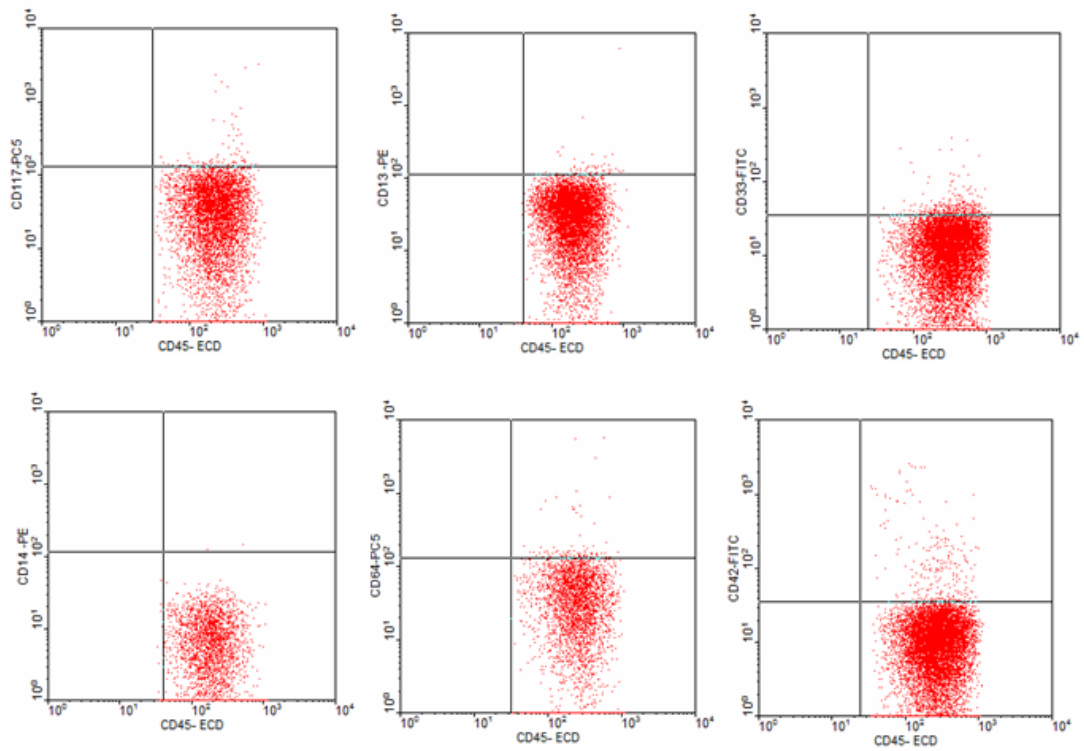
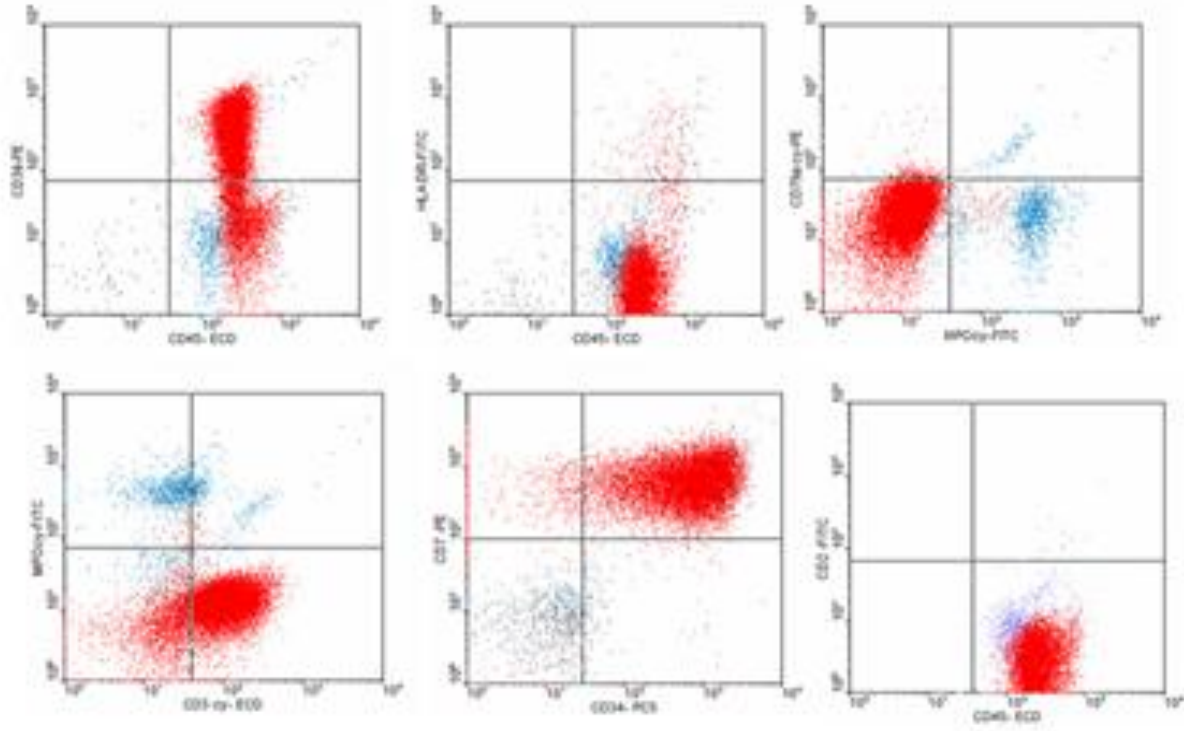
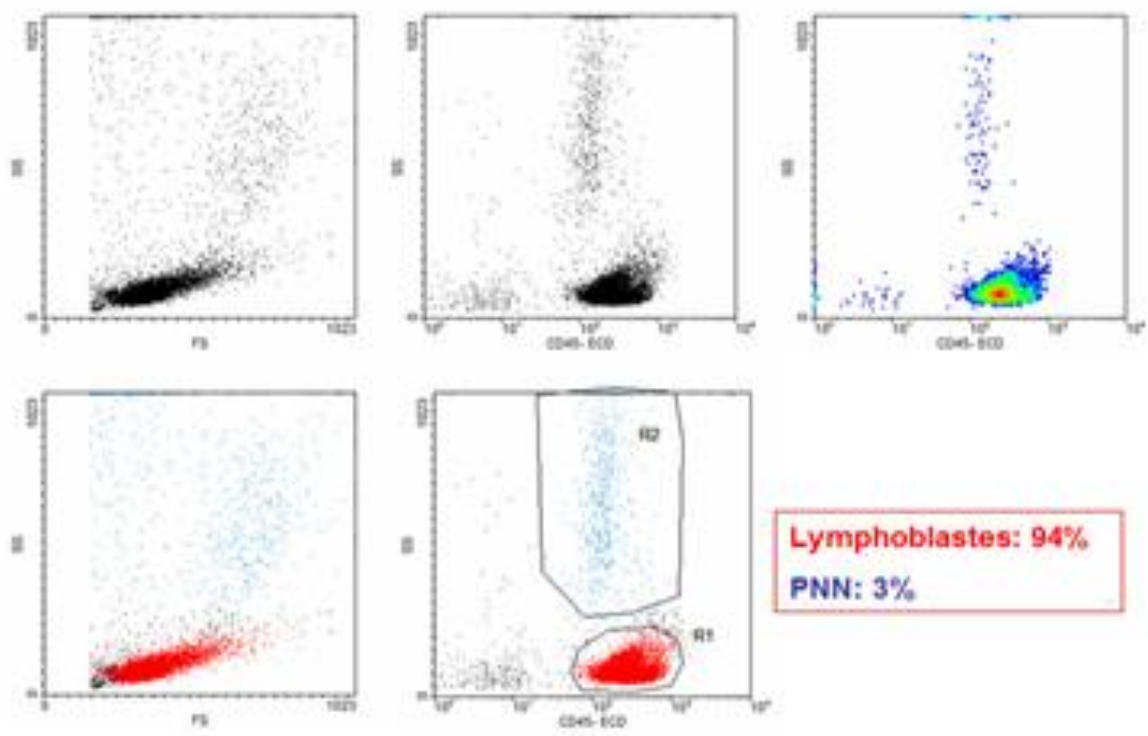


Figure 63: Profil phénotypique de LAL B type IV (mature)

La population blastique est de 78%, le marqueur d'immaturité CD34 n'est pas exprimé, les marqueurs lymphoïdes B (CD79ac, CD19, CD10, CD22 et l'immunoglobuline de surface de type Lambda) sont positifs, les marqueurs myéloïdes et lymphoïdes T sont négatifs à l'exception du marqueur aberrant CD2 retrouvé positif.

- Profil phénotypique des sous types de LALT



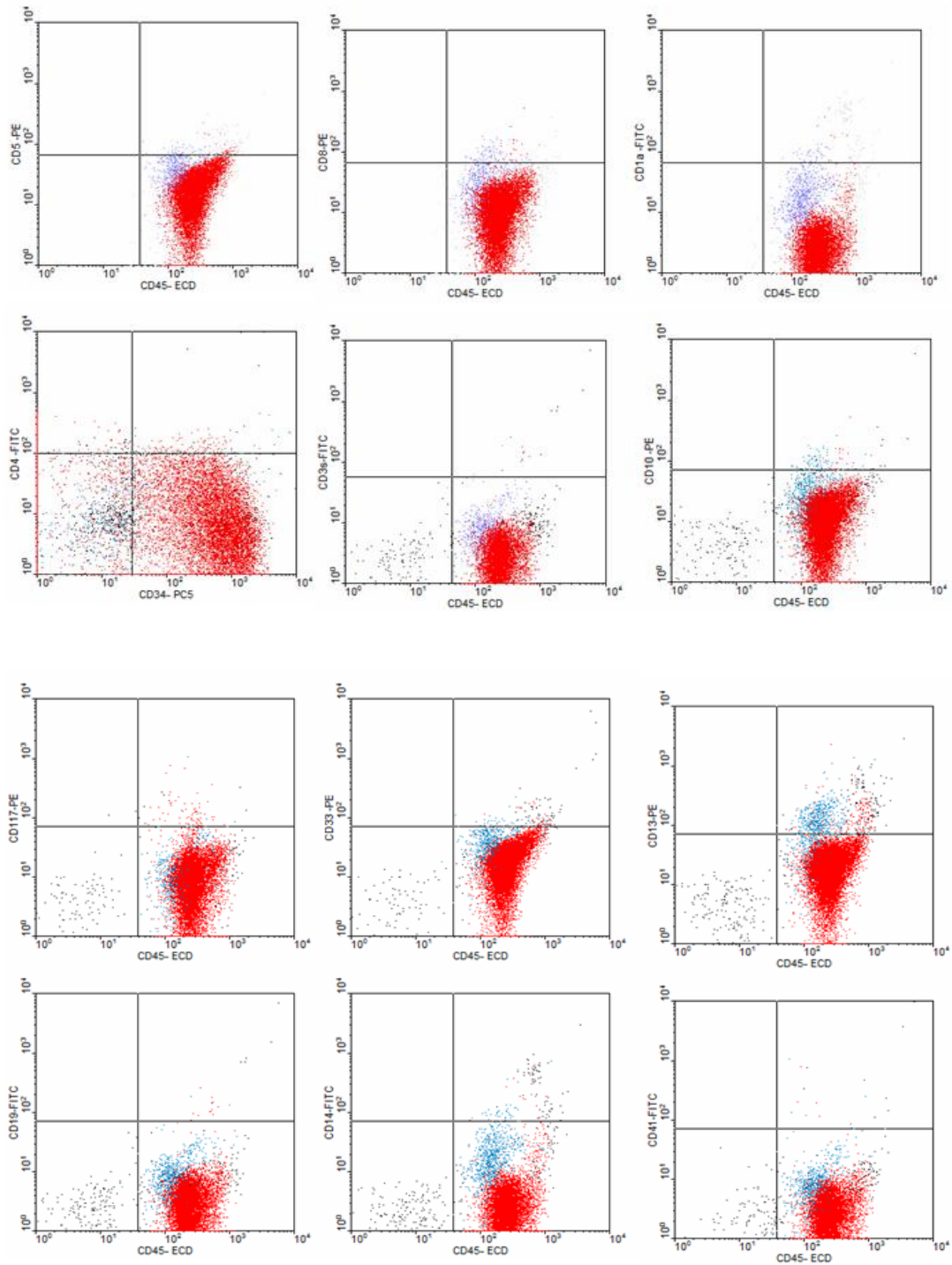
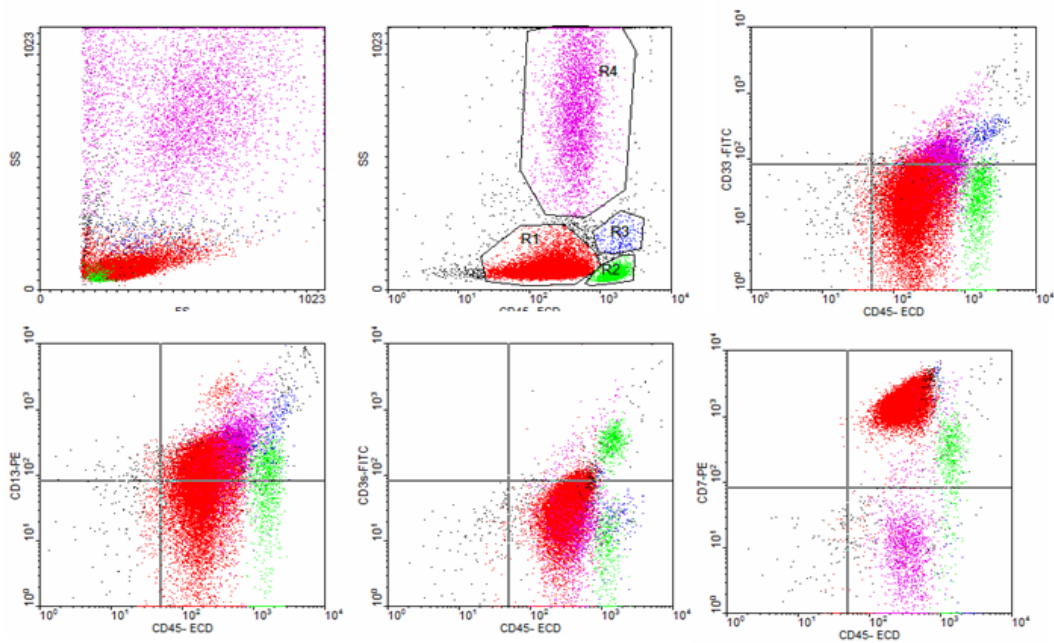
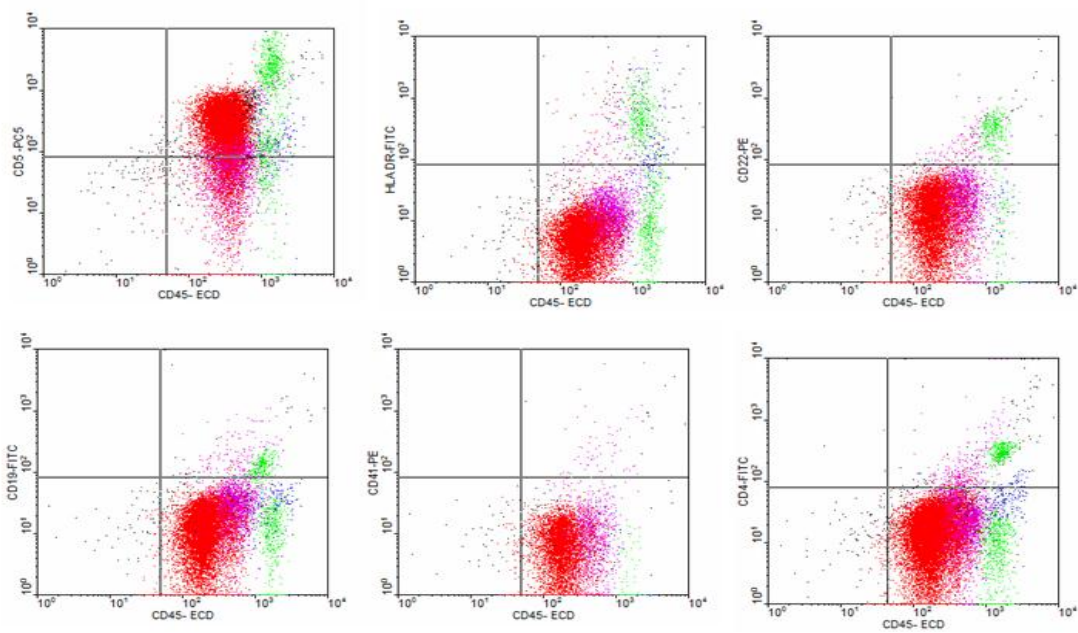


Figure 64: Profil phénotypique de la LAL T de type I(Pro-T)

La population blastique représente 94% des cellules, elle exprime le CD34, le CD3 intracytoplasmique et le CD7. Les autres marqueurs lymphoïdes T (CD5, CD2, CD1a, CD4, CD8 et CD3s), lymphoïdes B (CD79ac, CD19, CD10) et myéloïdes (MPOc, CD13, CD33, CD117) sont négatifs.



Blastes: 81%, Lymphocytes: 4%, Monocytes: 2%, Granuleux: 13%



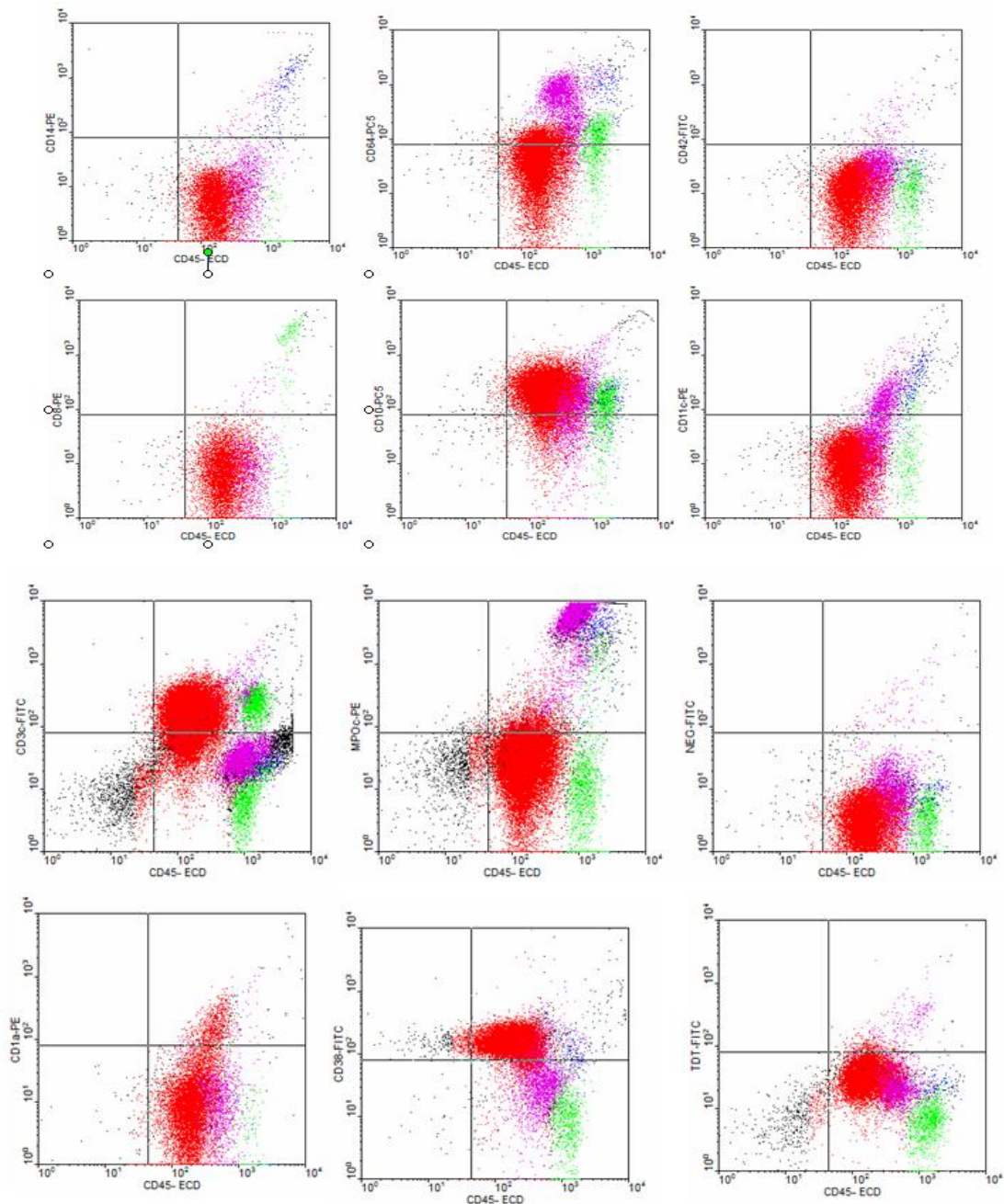
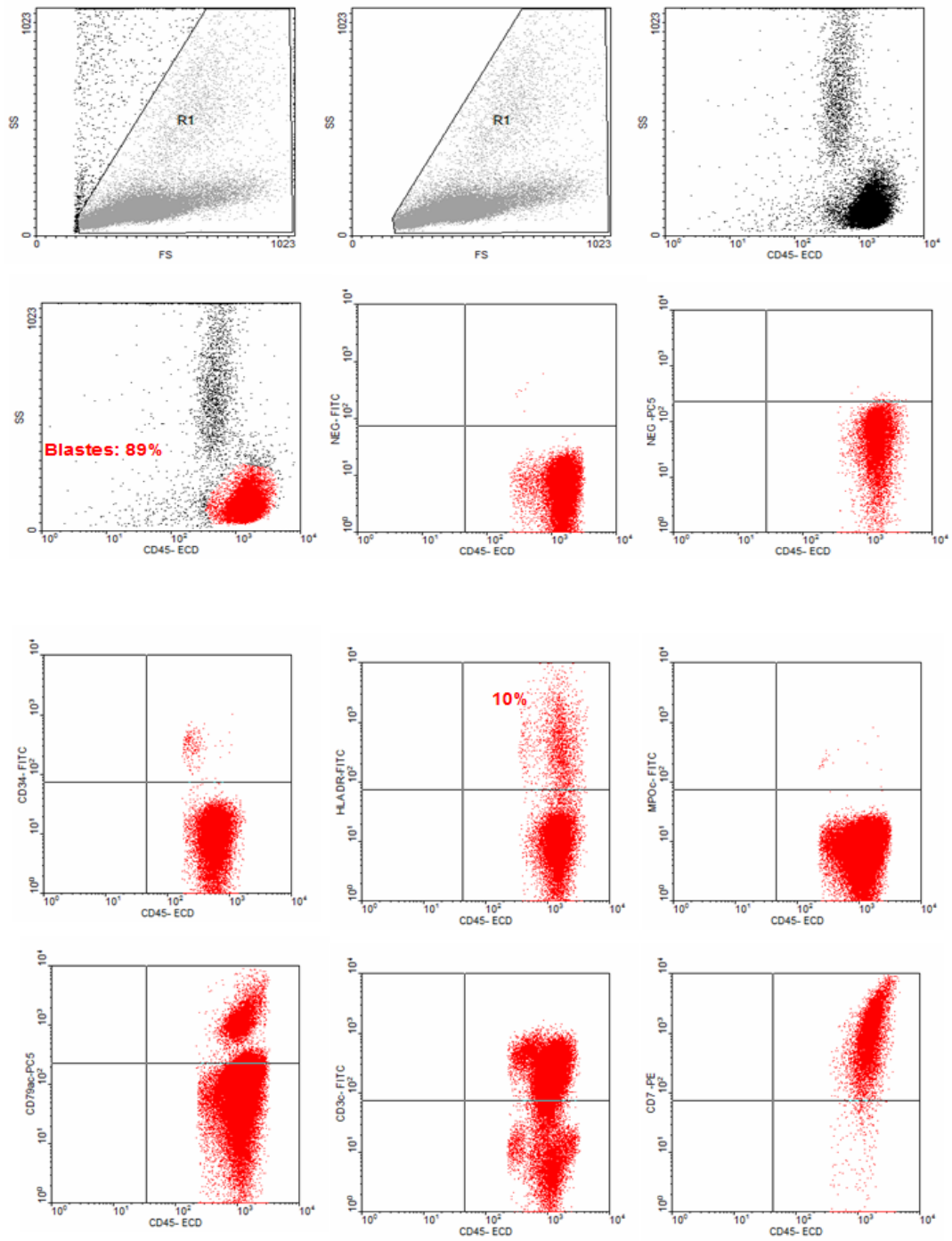
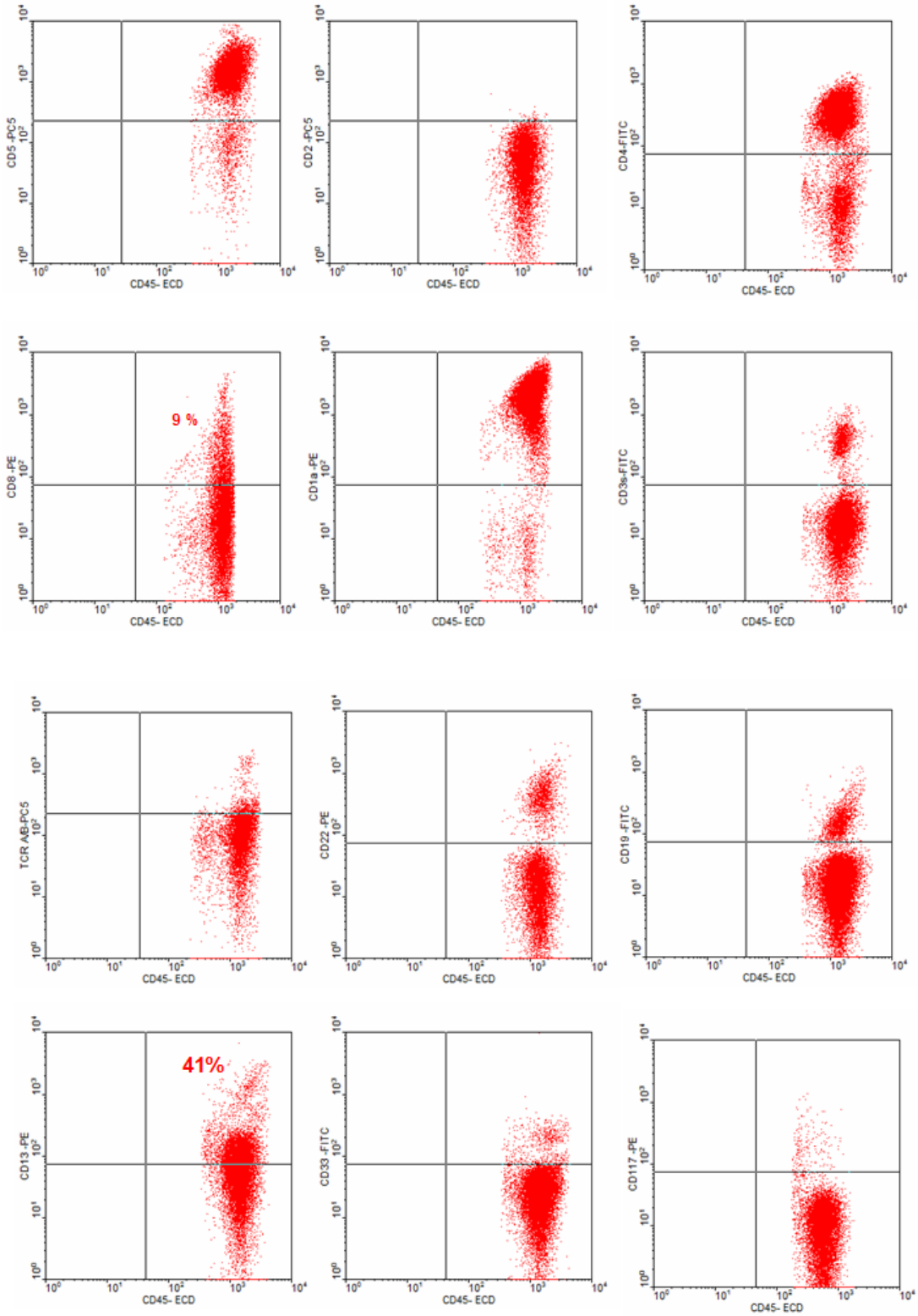


Figure 65: Profil phénotypique de la LAL T de type 2(Pré-T)

La population blastique retrouvée est de 81%, elle exprime les marqueurs T (CD3c, CD7, et CD5). Les autres marqueurs T (CD2, CD1a, CD4 et CD8), les marqueurs lymphoïdes B (CD79ac, CD19 et le CD22), Myélo-moectaires et plaquettaires (MPOc, CD33, CD64, CD14 et CD42) sont négatifs sauf le marqueur aberrant CD13.





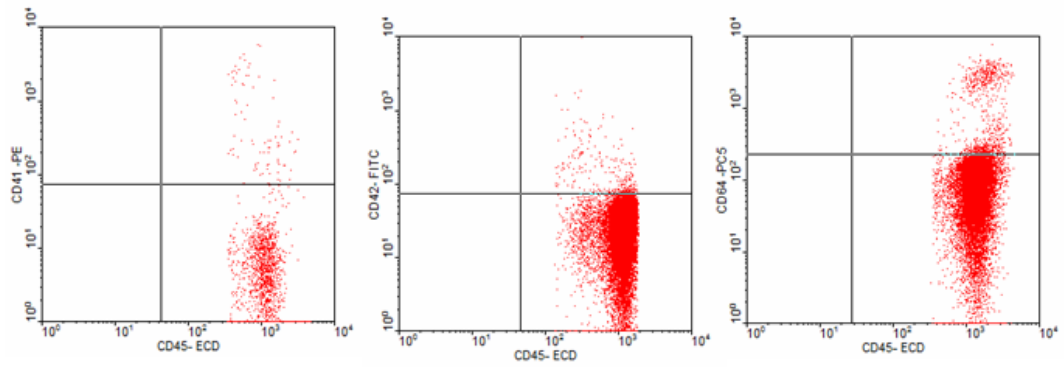
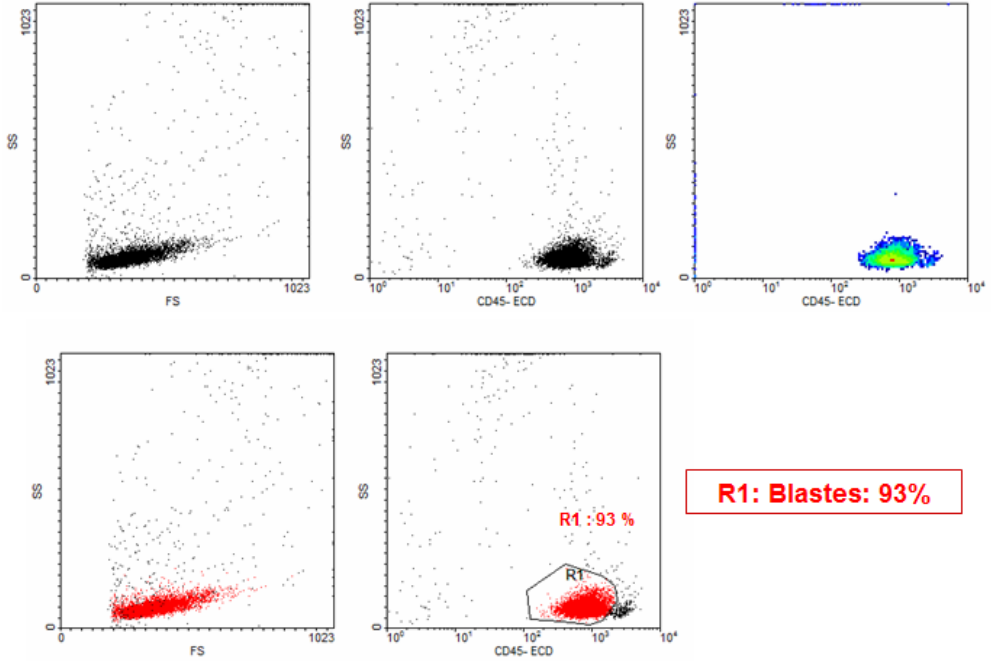
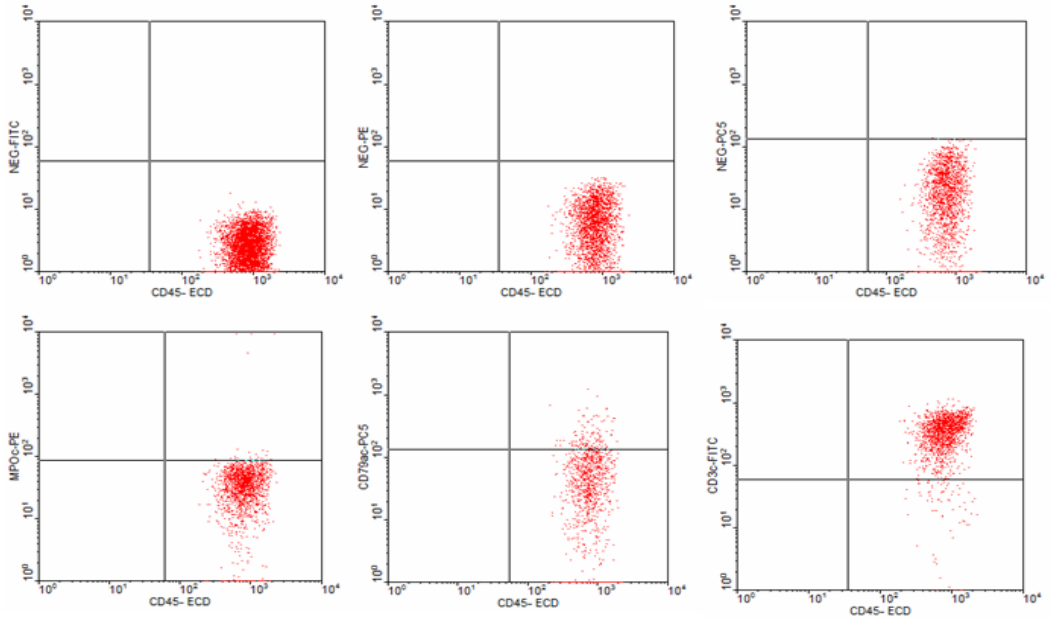


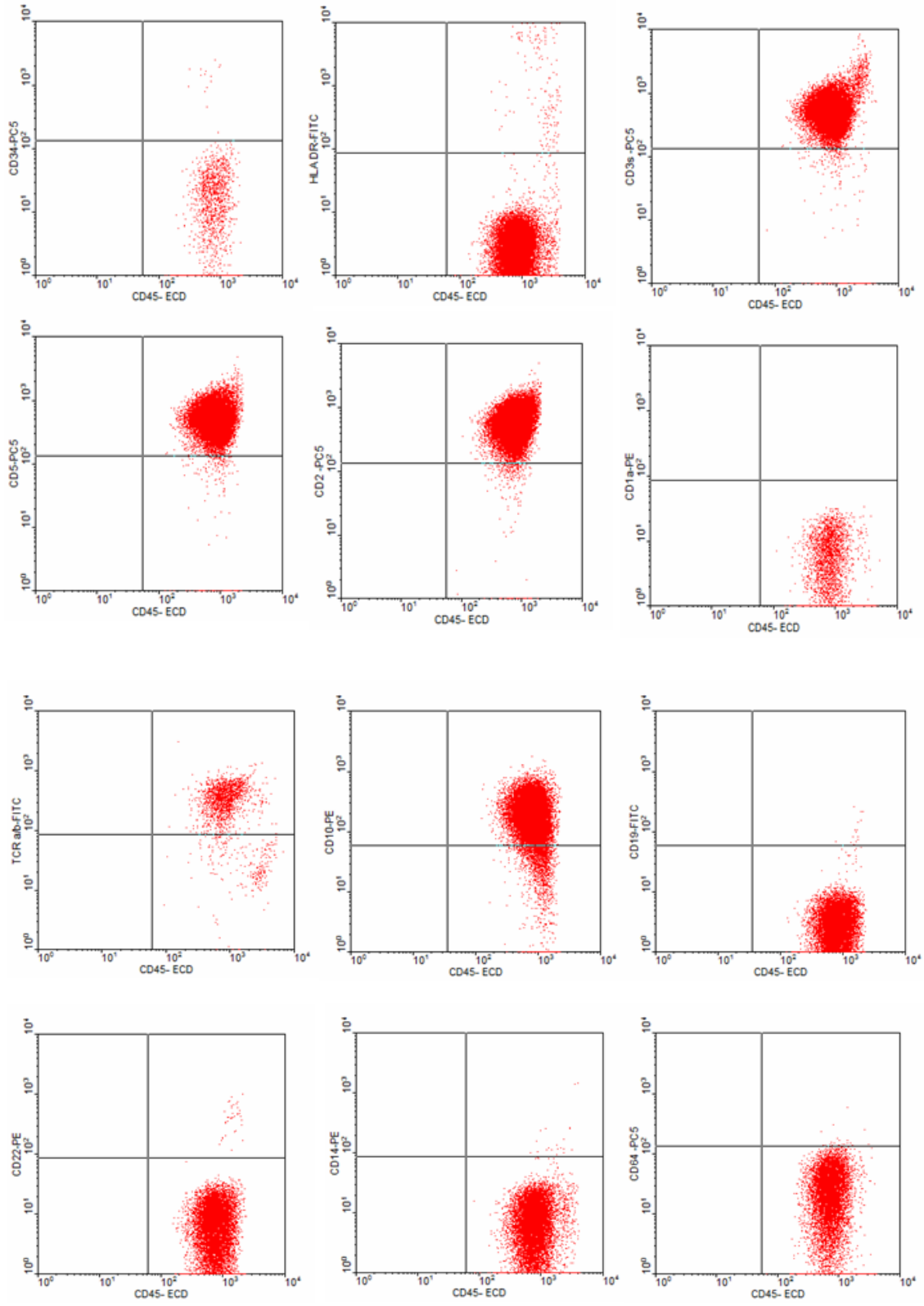
Figure 66: Profil phénotypique de la LAL T de type III (Corticale)

La population blastique représente 89%, elle exprime les marqueurs lymphoïdes T(CD3c, CD7, CD5 et CD1a) mais négative vis-à-vis des autres marqueurs T(CD2, CD3s), des marqueurs lymphoïdes B (CD79ac, CD19 et CD22), myéloïdes et plaquettaires (MPOcy, CD33, CD117, CD42, CD41 et CD64). Le CD13, marqueur aberrant est positif.



R1: Blastes: 93%





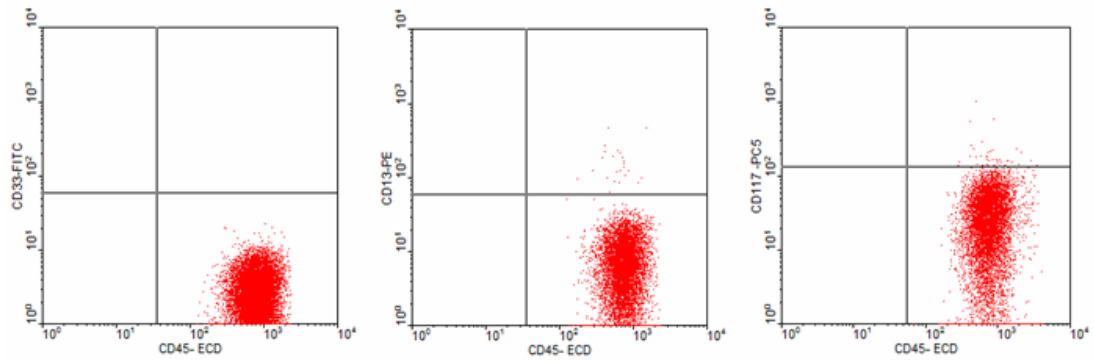


Figure 67 : Profil phénotypique de la LAL T de type 4 (Mature)

La population blastique est majoritaire, elle est de 93% et exprime les marqueurs lymphoïdes T (CD3c, CD2, CD5, CD3 de surface et TCR α/β) mais négative vis-à-vis du CD1a, des marqueurs lymphoïdes B (CD79ac, CD19, CD22) et des marqueurs myélo-monocytaires (MPOc, CD13, CD33, CD117, CD14 et CD64).

2.4.2.1 Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques

Parmi les 50 cas de LAL, 30 patients (60%) sont de phénotype B et 19 cas (38%) de phénotype T. Tandis qu'un cas (2%) est inclassable sur le plan phénotypique par insuffisance de critères de l'EGIL. (Figure 68).

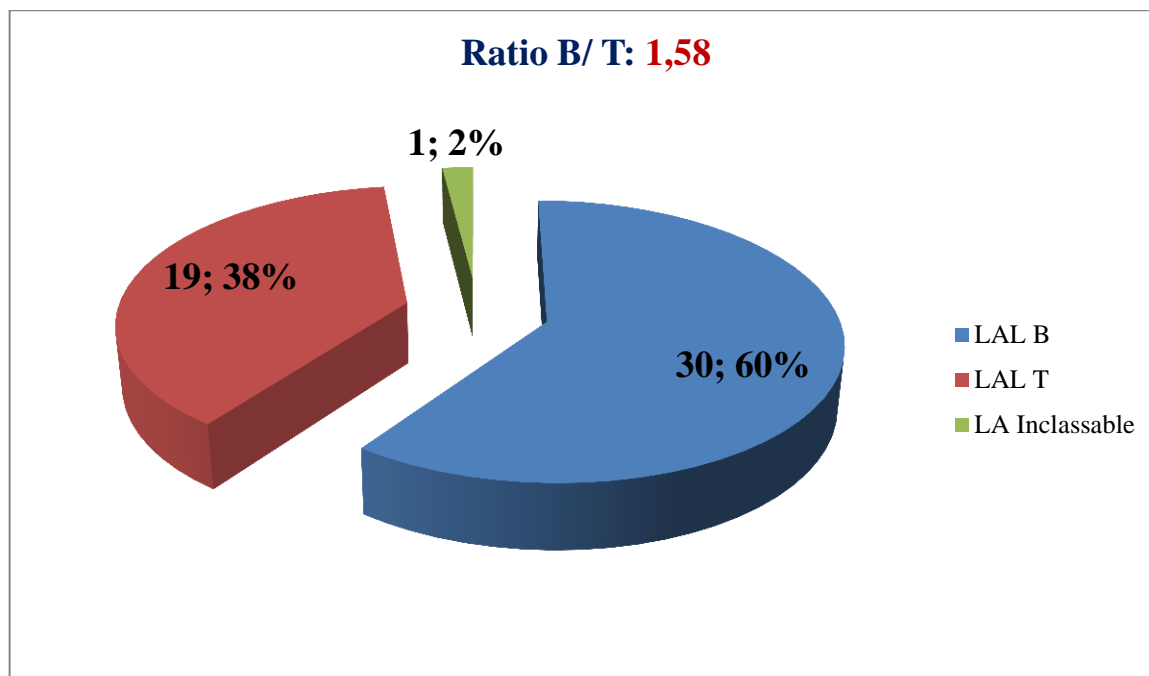


Figure 68 : Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques par CMF

2.4.2.2 Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes B, marqueurs aberrants et classification des LALB

- Le phénotype de LALB est retenu sur la co-expression de deux marqueurs majeurs, le CD79a intra cytoplasmique et le CD19, retrouvés respectivement dans 100% et 90% des cas. Le CD22 et CD10 sont mis en évidence dans 83% des cas. D'autres marqueurs spécifiques pour certains sous types de LALB comme l'IgM et l'immunoglobuline de surface (Igs) sont retrouvés dans respectivement 25% et 8% des cas. Les marqueurs d'immaturation CD34 et HLADR leurs expressions est respectivement de 67% et 97%. Dans cette forme, les marqueurs aberrants mis en évidence sont représentés par le CD13 (43%), le CD2 (12%) et le CD7 (5%) (Figure 69).

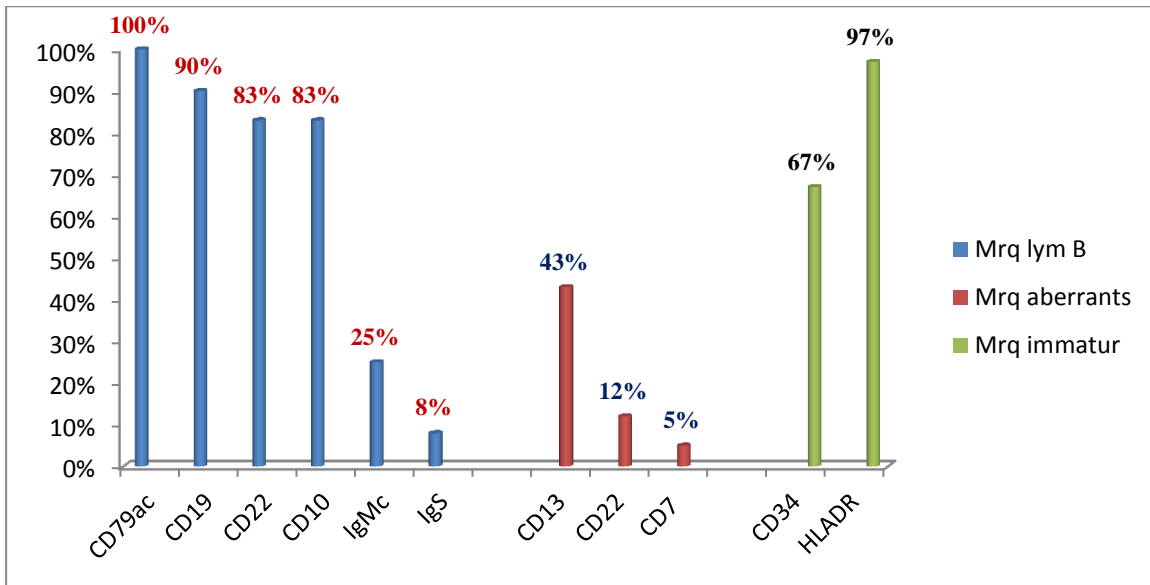


Figure 69: Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes dans la LAL B

- La détermination du profil phénotypique nous a permis de répartir les LAL B en sous classes selon les critères établis par le Groupe EGIL. Le type I (pro-B) est retrouvé dans 10% des cas, la forme B commune dite aussi pré-pré B qui correspond au type II est la plus fréquente, elle représente 63% des cas, suivie par la forme Pré-B (type III) à 20% des cas. La forme dite B mature (Type IV) n'a été retrouvée que dans 7% des cas, dans cette forme CD34 est non exprimé. (Figure 70).

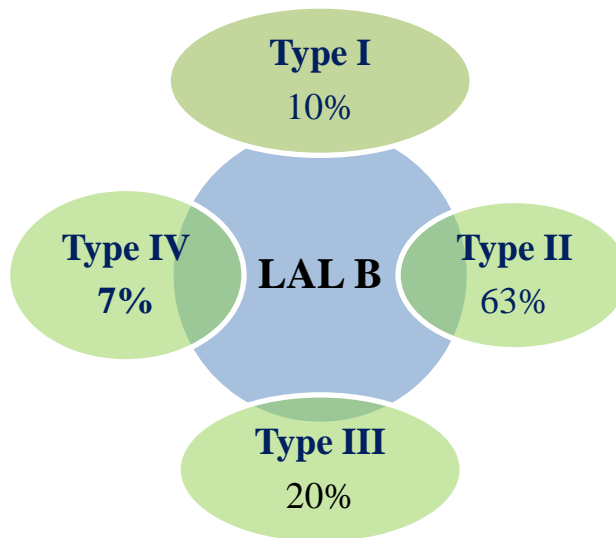
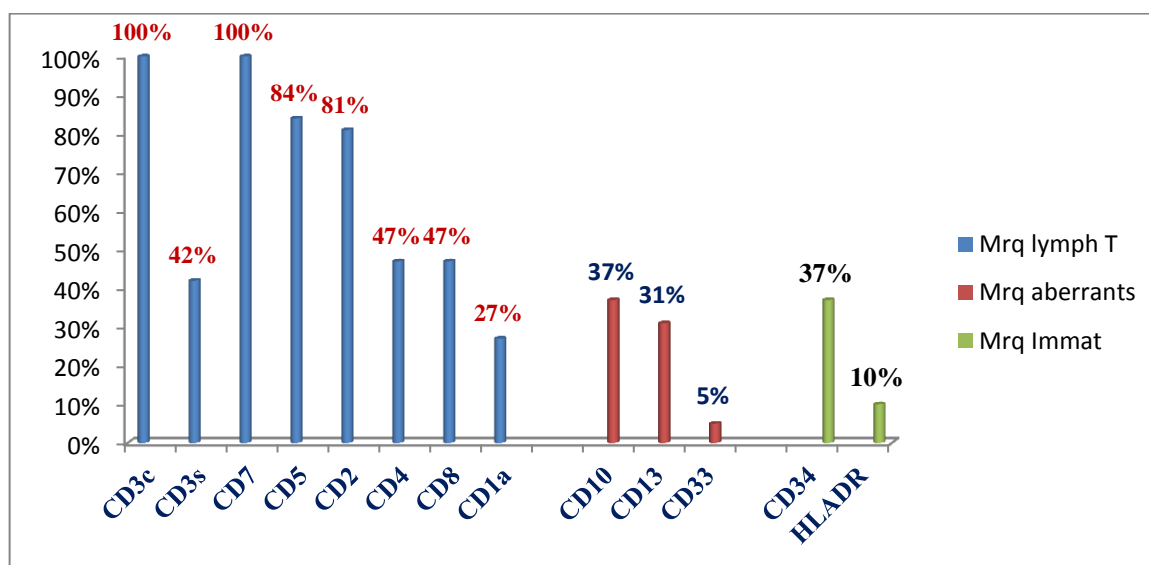


Figure 70 : Classification des LAL B selon EGIL

2.4.2.3 Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes T, marqueurs aberrants et classification des LALT

- Au même titre que la LALB, la LAL de phénotype T est diagnostiquée par l'expression de marqueurs spécifiques. Ces marqueurs sont représentés par le CD3cytoplasmique et le CD7, leur expression est retrouvée dans 100% des cas. Les CD2 et CD5 sont retrouvés dans respectivement 81% et 84% des cas. Les autres marqueurs ayant une spécificité dans la détermination des classes de LALT, leur positivité varie de 27% à 47%. Par ailleurs et contrairement à la LALB, les marqueurs d'immatrité dans la LALT sont d'une expression faible avec un degré de positivité du CD34 dans 37% des cas et celui de HLA DR dans 10% des cas. D'autre part on objective des marqueurs aberrants sur une série restreinte avec des CD13 et CD33 qui sont retrouvés dans 31% et 5% des cas. (Figure 71).



Mrq : Marqueur ; lymph : lymphoïde ; immat : Immatrité

Figure 71 : Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes dans la LAL T

- L'application du score EGIL dans la classification des LALT, nous a permis de répartir nos patients en quatre types : type I (Pro-T): 10%, type II (Pré-T): 42%, type III (corticale ou thymique): 16% et type IV mature dans 32% des cas (Figure 72).

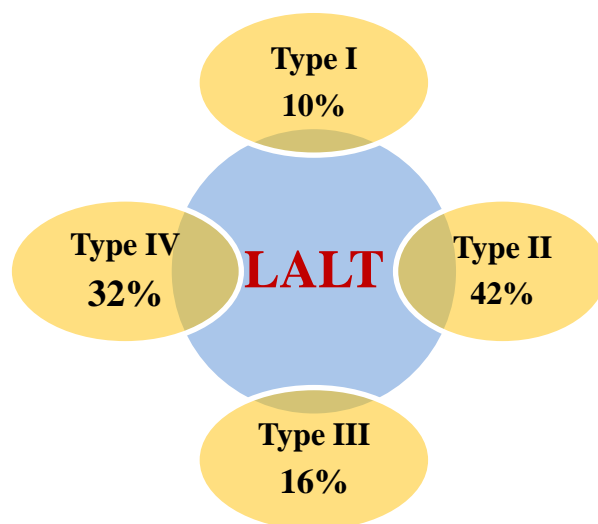


Figure 72 : Classification des LAL T selon EGIL

2.4. 2.4: Corrélation entre les données morphologiques et immunophénotypiques des LAL

Tab XXII : Relation entre classification FAB et données de la CMF dans la LAL B

CMF/ FAB	LAL1	LAL 2	LAL 3	LA Ind	Total
Type B I	1	3	0	1	5
Type B II	2	15	0	1	18
Type B III	0	5	0	0	5
Type B IV	1	0	1	0	2
Total	4	23	1	2	30
X ²	20,924				
ddl	9				
p	0,013				

Les patients classés LAL 2 selon FAB, sont en général classés en type BII selon la CMF(p : 0,013).

Tab XXIII : Relation entre la classification FAB et les données de la CMF dans la LALT

CMF/ FAB	LAL 1	LAL 2	Total
Type T I	0	2	2
Type TII	2	6	8
Type T III	0	3	3
Type T IV	0	6	6
Total	2	17	19
X ²	3,074		
ddl	3		
p	0,38		

Dans la LAL T, Il n'y a pas de relation entre la classification FAB et les données de la CMF (p : 0,38)

2.4.2.5 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et les LALB

Tab XXIV: Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et sous types de LALB

	LAL BI (n : 5)	LAL B II (n : 18)	LAL B III (n : 5)	LALB IV (n : 2)	Total %	P
CD79ac	5	18	5	2	100	NS
CD19	4	17	5	1	90	NS
CD22(n : 24)	4 /4	12/13	4/5	1/2	87	NS
CD10	1	18	5	0	83	0,000
IgMc(n : 25)	0/4	0/14	5/5	0/2	20	0,000
Igs Kappa(n : 25)	0/4	0/14	0/5	1/2	4	0,007
Igs Lambda(n : 25)	0/4	0/14	0/5	1/2	4	0,02
CD34	4	16	0	0	67	0,000
HLA DR	5	18	4	2	97	NS

- Les marqueurs CD79ac, CD19 et CD22 sont exprimés au niveau de tous les sous types de la LAL B. Il s'agit en fait de marqueurs pan-B.
- Le degré de positivité élevé du CD10, de l'IgMc et des Igs (Kappa et lambda) est corrélé respectivement avec les types BII, BIII et BIV (p: 0,000, p: 0,000, p: 0,0007 et p: 0,02).
- Quant au CD34, il s'agit d'un marqueur d'immaturité marquant les sous types BI et BII.

2.4.2.6 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et les LAL T

Tab XXV : Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et sous types de LALT

	LAL T I (n :2)	LAL T II (n : 8)	LAL T III (n : 3)	LALT IV (n : 6)	Total %	P
CD3c	2	8	3	6	100	NS
CD7 (n : 12)	2/2	8/8	2/2	-	100	NS
CD2(n : 17)	0/2	5/6	2/3	6/6	76	0,028
CD5	0	7	3	6	84	0,006
CD3s	0	0	2	6	42	0,001
TCR (n : 5)	-	0/3	0/1	1/1	20	0,05
CD 4	0	2	3	4	47	0,053
CD8	0	3	2	4	47	NS
CD1a (n : 12)	0/1	0/6	3/3	0/2	25	0,007
CD10	0	3	0	4	37	NS
CD34	1	3	1	2	37	NS
HLA DR	0	0	0	2	11	NS

- Les marqueurs CD3cy et CD7 sont exprimés au niveau de tous les sous types de la LAL T. Il s'agit en fait de marqueurs pan-T.
- Le degré de positivité élevé du CD1a, du CD3s et du TCR est corrélé respectivement avec les types TIII et TIV (p: 0,007, p: 0,001, p: 0,05).
- Pour les marqueurs de différenciation, CD2 et CD5, l'importance de leur degré de positivité n'est corrélée qu'à partir de la LAL TII (p: 0,028, p: 0,006).
- Les marqueurs de maturité CD4 et CD8, ne s'expriment qu'à partir de la LALTIII, cependant l'importance du degré de positivité n'est corrélé avec ses sous types que pour le CD4 (p: 0,053).
- Quant au CD34 et HLA DR, ils sont faiblement exprimés dans les LALT.

2.4.3 Leucémies aiguës biphénotypiques (LAB)

Notre étude retrouve 4 cas soit 2,3% de LA de lignée ambiguë. Les patients atteints de cette forme sont âgés en moyenne de 46 ans dont 3 hommes et 1 femme. Deux cas sont morphologiquement de type myéloïde, la coloration cytochimique au noir soudan est positivement faible dans un cas et forte dans l'autre cas. Pour les deux autres cas, un ayant l'aspect d'une LAL et l'autre cas indifférencié entre une LAL et une LAM5, le Noir soudan pour les deux cas est négatif.

L'immunophénotypage a permis de mettre en évidence 4 cas de leucémies aiguës biphénotypiques (un cas de type myéloïde/ Lymphoïde B, un cas de type myéloïde / lymphoïde T et deux cas de types lymphoïde B/T). Les résultats morphologiques, cytochimiques et immunophénotypiques des 4 patients figurent dans le Tableau XXVI.

Tab XXVI: Résultats morphologiques, cytochimiques et immunophénotypiques de LAB

Cas N°	Morpho MGG	Cytochimie NS	Cytométrie Score EGIL > 2 / lignée			LAB Type
			M My	M Ly B	M Ly T	
Cas 1 F	LAM Indifférenciée	+ Faible 6%	13+/33+/117+ MPOc+	79ac+/22+ 10+		My/ B
Cas 2 H	LAM 1	+ 30%	13+/33+/117+ MPOc+	-----	3s+/ 7+	My/ T
Cas 3 H	LAL 2	- 0%	13+	79ac+/ 20+	3c+/7+	LB/T
Cas 4 H	LAL/ LAM5 Indifférenciée	- 0%	----	79ac+/ 10+	3c+/7+	L B/T

NS : Noir Soudan, M M : Marqueurs myéloïdes. MLB : marqueurs lymphoïdes B. MLT : Marqueurs lymphoïdes T. LAB : Leucémie biphénotypique. My : Myéloïde

DISCUSSION

3. DISCUSSION

3.1 Caractéristiques épidémiologiques

- Incidence

Comme cela est retrouvé dans la littérature, en Algérie, les leucémies aiguës occupent la deuxième place après les lymphomes, l'incidence spécifique est variable selon l'âge et le type de leucémie, c'est ainsi que les LAM sont plus fréquentes chez l'adulte (69% dans notre étude et 70- 80% aux USA et en Europe) [53,54] et les LAL chez l'enfant. Selon les études épidémiologiques nationales, l'incidence des leucémies aiguës myéloïdes(LAM) est de 1,2/100 000 habitants[55] et celle des leucémies aiguës lymphoïdes elle est de 0,47/ 100 000 habitants[56]. L'incidence dans le monde pour les LAM est de 4,1(USA) [57], 4(Angleterre) [58], 3,47(Canada) [59], 3,4 (Australie) [60], 1,35 (Chine)[61], 6,4 (Arabie Saoudite), 12,6 (Iraq) et 5,1(Egypte) [62]. L'incidence des LAL est de 1,6 (USA) [63], 1,3(Angleterre)[64] et 0,81(Chine) [61].

- Profession

L'étude de la profession révèle 4% de cas exposés aux hydrocarbures et aux produits chimiques. Dans la littérature, le benzène et certains produits chimiques sont considérés comme cancérogènes en 1979 [65] puis confirmés en 2009[66, 67].

Pour les patients non exposés aux produits toxiques, classiquement la cause reste inconnue, cela pourrait-il incriminer d'autres facteurs ? (génétiques et micro-environnementaux) (Figure 35)[68, 69,70, 71].

-Age et sexe

Dans les LAM, L'âge médian de 45 ans rejoint les études nationales [55, 72,73], magrébine [74]et brésilienne[75].Dans les séries occidentales, l'âge médian est de 65 ans, cette différence peut être expliquée par la pyramide des âges où les jeunes en Algérie représentent plus de 70%.

La prédominance masculine (rapport H/F = 1,06) (Figure 36) est comparable à celle décrite dans la littérature [55,72, 73, 74,75].

Dans les LAL, L'âge médian de 23 ans est inférieur à celui de l'étude nationale qui est de 31 ans (Zouaoui, 2016) cela s'expliquerait par l'âge des patients inclus dans notre étude à partir de 15 ans et dans la série de Zouaoui à partir de 18 ans.

Comme cela est décrit, les LAL prédominent chez les sujets jeunes avec une prédominance masculine (sex ratio : 1,77)(Figure 36)[56,63, 64, 74].

3.2 Caractéristiques cliniques et biologiques

Le syndrome anémique retrouvé dans 91% des cas rejoint celui des séries nationales qui est de 94% - 95% [55, 72,77] et occidentales [78].

Le syndrome hémorragique retrouvé dans 59% des cas est plus élevé que celui de certains auteurs qui est de 49% [55] et de 25,5% [72], cependant les taux de la thrombopénie sévère se rejoignent (57% versus 55%).

Le syndrome infectieux est présent dans 57% des cas, en général les localisations ORL (36 cas) et bronchiques (24 cas) sont les plus fréquentes puis viennent les infections uro-génitales (12 cas) et digestives (8 cas). Ses résultats sont corroborés avec ce qui est classiquement décrit [55].

Le syndrome tumoral est variable d'une série à l'autre (47% des cas dans notre étude, 31,5- 32% dans les séries nationales)[72, 77]. Parallèlement le syndrome tumoral est plus fréquent dans les LAL que dans les LAM (82% versus 33%) comme cela est classiquement décrit [76].

Les douleurs osseuses, la SPM et les adénopathies sont retrouvées dans un quart des cas dans respectivement 26%, 24% et 25% des cas (Tableau XVI).

Le taux moyen d'Hb < à 8 g/dl, retrouvé dans 71% des cas dans les LAM et 58% des cas dans les LAL témoignent d'une anémie plus marquée dans les formes myéloïdes (Fig 38).

Le taux moyen des plaquettes (40 Giga/ l) et le taux de sévérité (57%) sont similaires dans les deux types de LA (Fig 39). Ces taux sont différents de ceux rapportés dans certaines séries (30-67%)[72,77].

Le taux moyen des GB dans les LAM (66,6 G/L) et dans les LAL (60,6G/L) est similaire. L'hyperleucocytose supérieure à 30 G/L, retrouvée dans 47% rejoint celle de Trabzi (43%).

Pour les formes hyperleucocytaires (GB > 100 G/L) nous retrouvons des taux qui se rapprochent (LAM : 19 cas (16%), LAL 7 cas (14%)(Fig 40). Ces résultats rejoignent ceux de l'étude nationale [72] et tunisienne [79].

3.3 Caractéristiques morphologiques selon FAB

Depuis plus d'une trentaine d'années, la classification des LA fait appel aux recommandations FAB (franco-Américano- Britannique) mises au point en 1976[80].

Sur la base de cette classification FAB, l'analyse morphologique après coloration au MGG et réactions cytochimiques au Noir soudan de notre série, nous retrouvons 115 cas (65%) de LAM, 49 cas (28%) de LAL et 12 cas (7%) de LA indifférenciées (Figure 41).

3. 3. 1 Leucémies aiguës myéloïdes

Dans le groupe des LAM, les LAM2 et LAM4 (dont 4 formes à Eosinophiles) sont les formes les plus fréquentes (26% et 28% respectivement), suivies des LAM1 et des LAM3 (17% chacune) puis des LAM5 (9%) (Figure 42). Ces résultats sont dans l'intervalle des séries publiées [82, 83,84, 85, 86, 87,88, 89] où les LAM1 représentent: 15-20%, LAM2: 10- 40%, LAM3: 5-15%, LAM4: 15-26% et les LAM5: 2-16% [82].

Dans notre série, nous n'avons pas recensé cytologiquement de LAM0, LAM6 ni LAM7 durant la période de l'étude. Ces formes sont très rares selon la littérature (2-3%)[83].

3. 3. 2 Leucémies aiguës lymphoïdes

Selon la classification FAB, la majorité des LAL de notre série sont des LAL de type 2(86%), les LAL1 représentent 12% et les LAL3 :2% (Figure 42).

Nos résultats ne diffèrent pas de ceux des études nationales [56]. Cependant dans les séries occidentales les LAL2 représentent 60%, LAL1 : 30% et le LAL3 :10% [76,82].

3.3.3 Formes indifférenciées

Le taux des formes indifférenciées de notre étude (7%) est dans l'intervalle des séries publiées qui varie entre 3 et 23% [90, 91, 92,93 et 94]. Ces formes sont difficiles à identifier leurs natures morphologiquement, incitant le recours à l'immunophénotypage par cytométrie en flux avec utilisation de marqueurs spécifiques afin d'identifier l'appartenance de la population blastique à un des sous types de LA.

3.4 Caractéristiques de l'immunophénotypage des leucémies aiguës par CMF

Initialement l'identification et la caractérisation des leucémies aiguës reposaient sur une démarche hiérarchisée incluant outre les renseignements cliniques, une analyse cytologique des blastes sanguins et médullaires et leurs propriétés cytochimiques.

Il est actuellement admis de façon consensuelle par le groupe d'étude immunologique des leucémies (GEIL) et l'European working group on flow cytometry and image analysis (EGIL) [95], que l'analyse immunophénotypique s'intègre dans la démarche diagnostique pour résoudre le problème de certaines formes de LA myéloïdes qui sont morphologiquement difficiles comme les LAM0, LAM6 et LAM7, déterminer le phénotypage B et T des LAL et rechercher les leucémies aiguës biphénotypiques (LAB).

3.4.1 Immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Le panel que nous avons appliqué dans cette étude est assez proche de celui proposé par l'EGIL. Il nous a permis de classer presque toutes les leucémies aiguës.

L'assignement des blastes à une lignée repose sur le seuil d'expression de cellules marquées qui doit être supérieur à 20% et aussi la négativité des résultats avec les anticorps spécifiques à d'autres lignées.

Sur l'ensemble des anticorps monoclonaux, on remarque que les marqueurs myéloïdes: CD117, CD13, CD33 et MPOc ont été exprimés entre 72% - 90%, le degré d'expression des CD34 et HLA-DR est respectivement de 57% et 72% (Figure 53).

Lorsqu'on évalue plus de 2 marqueurs, le degré de positivité diminue (63% pour 2 marqueurs et 57% pour trois marqueurs) (Figure 54).

En effet, ces résultats témoignent qu'il n'existe aucun marqueur myéloïde pathognomonique des LAM, comme cela est affirmé dans les travaux nationaux et occidentaux [86,91, 96].

3.4.1.1 Profil phénotypique de la LAM peu différenciée (LAM0)

Dans notre étude, la LAM peu différenciée dite M0 est morphologiquement difficile à reconnaître par son caractère agranulaire et par la négativité du noir soudan la confondant avec l'aspect lymphoblastique (Figure 47).

La CMF met en évidence l'expression des marqueurs myéloïdes CD13, CD33 et CD117 dans respectivement 100%, 71% et 86% (Tab XIX) et une moyenne d'immunofluorescence forte retrouvée dans respectivement 65%, 70% et 57% pour les marqueurs sus cités (Tab XVIII). Tous les cas sont positifs vis à vis du CD34 et l'HLA-DR à un degré de positivité à 86%, l'intensité

moyenne de fluorescence(MIF) est exprimée respectivement dans 78% et 66%.Ces résultats ont permis de caractériser la LAM0 à un taux de 6% dans notre étude, ce taux rejoint l'ensemble des publications nationales, maghrébines et internationales (Tab XXVII).

Tab XXVII: Fréquence de la LAM0 peu différenciée et séries publiées

Etude	N	%
Notre étude 2016	122	6
CPMC AIG 2010[86]	437	11,9
Blida 2018 [73]	338	6,8
Oran 2010[91]	316	2
HCA 2010 [97]	43	6,8
Tunisie 2010[88]	281	0,3
KSA(Arabie saoudite) 2007[98]	257	1,16
France 2003[87]	733	6
Suisse 2003[82]	484	3
Mexique 2016[92]	499	4,20
Chine 2015[93]	140	4

3.4.1.2 Profil phénotypique des LAM1 sans maturation et LAM2 avec maturation

Outre la positivité de la myéloperoxydase intra cytoplasmique(MPOcy) qui est de 100% dans les LAM1 et LAM2, le degré de positivité du CD13 est respectivement de 68% et 87%, celui du CD33 (82%, 90%). Les intensités de fluorescence moyenne (MIF) des CD13 et CD33 sont de 49/ 60% Dans la LAM1 et de 57/ 72% dans la LAM2 (Tab XVIII).

En effet, on note dans la littérature que les marqueurs d'immaturité (CD34, HLA-DR) et le CD117 sont d'une expression plus forte dans la LAM1 par rapport à la LAM2 du fait de la maturation plus marquée de cette dernière. Dans notre série, le degré de positivité est de 68% pour les CD34 et HLADR dans la LAM1 et respectivement de 73% et 83% dans la LAM2.

Par ailleurs, on constate qu'avec le marqueur CD15, testé sur 43(35%) échantillons, une absence d'expression sur l'ensemble des LAM1 et une positivité de 11% dans la LAM2, ce degré de positivité est considéré comme faible dans cette étude, mais il rejoint le CD16 comme des marqueurs de différenciation qui s'expriment à partir de la LAM2. Ce constat est décrit dans certaines publications mais non retenu comme critère fidèle de différenciation entre la LAM1 et LAM2 [99].

Nous avons identifié 17% de LAM1 et 26% de LAM2, ils sont dans l'intervalle des données nationales où les LAM1 sont comprises entre 10- 21% et les LAM2 entre 22-32,5% et internationales : LAM1 (5,8– 26%) et LAM2: (16-27,5%), cependant le taux de la LAM1 est plus faible au Mexique et en Arabie Saoudite et celui de la LAM2 en Chine(TabXXVIII).

Tab XXVIII : Fréquence des LAM 1 - LAM 2 dans différentes séries publiées

Etude	N	LAM 1 (%)	LAM 2 (%)
Notre étude 2016	122	17	26
CPMC AIG 2010[86]	437	21	22
Oran 2010[91]	316	10	26
HCA 2010 [97]	43	18,6	32,5
Tunisie 2010[88]	281	20,6	23,8
KSA (Arabie saoudite) 2007[98]	257	5,8	26,4
France 2003[87]	733	26	24
Suisse 2003[82]	484	18	27,5
Mexique 2016[92]	499	3,2	20
Chine 2015[93]	140	18	16

3.4.1.3 Profil phénotypique des leucémies aiguës promyélocytaires M3

Classiquement, la LAM3 est objectivée à la morphologie et parfois il s'agit de la variante LAM3v. Les marqueurs MPOc et CD33 sont retrouvés dans 100% des échantillons de patients, le CD13 dans 95% et le CD117 dans 52%. Cependant on note la perte d'expression des marqueurs d'immaturation CD34 et HLA-DR (Tab XIX). Ce constat est une des particularités phénotypiques de la LAM3[100]. Ces données rejoignent celles décrites dans la littérature. Le taux de LAM3 à 17% est dans l'intervalle des séries publiées, plus élevé dans certaines et plus bas dans d'autres (Tab XXIX).

Tab XXIX : Fréquence de la LAM3 dans différentes études

Etude	N	%
Notre étude 2016	122	17
Alg (Bekadja) 2018[55]	2358	15%
CPMC AIG 2010[86]	437	12,8
HCA 2010 [97]	43	13,9
Tunisie 2010[88]	281	8,2
KSA(Arabie saoudite) 2007[98]	257	24,9
France 2003[87]	733	8
Suisse 2003[82]	484	8
Mexique 2016[92]	499	35,5

3.4.1.4 Profil immunophénotypique des LAM4 et LAM5

- Le profil phénotypique de la LAM4 retrouve un degré de positivité des MPO, CD13, CD33 et CD117 respectivement à 100%, 91%,91% et 79%. La positivité de ces marqueurs est associée à la positivité des marqueurs spécifiques de la lignée monocyttaire (CD14, CD64, CD11c) qui sont respectivement de 91%,97% et 73%. Par ailleurs les marqueurs CD34 et HLA-DR sont positifs dans 67% et 97% des cas. Une des particularités rare et signalée dans cette entité est la positivité des marqueurs CD61(13%) et à moindre degré le CD41 (3%)(Tab XIX), ce sont des marqueurs plaquettaires et qui prêtent à confusion avec le diagnostic phénotypique de la LAM7. En effet leur expression n'est pas habituelle mais exceptionnelle, elle est expliquée par une adhésion des plaquettes à la surface des cellules monocytaires et monoblastiques. L'analyse de la série retrouve 32 cas (26%) de LAM4(Figure 55).

-Le profil phénotypique des LAM5 est représenté par les marqueurs spécifiques de la lignée monocyttaire, qui sont d'une positivité supérieure à celle de la LAM4. Cette positivité est de 100% pour les CD64, CD11c et HLADR. Cependant, la positivité est faible pour la MPO (33%) et le CD34 (29%)(TabXIX). Dans cette forme malgré le faible taux, l'expression des marqueurs plaquettaires (CD61 et CD41) est positive à 11%. Ces données sont rapportées dans plusieurs travaux publiés. L'analyse de la série retrouve 9cas (8%) de LAM5, concordant avec certaines publications (Tab XXX).

Tab XXX: Fréquence des LAM 4 et LAM5 dans différentes séries

Etude	N	LAM 4 (%)	LAM 5 (%)
Notre étude 2016	122	26	8
CPMC AIG 2010[86]	437	21,7	7,5
Blida 2018 [73]	338	31,6	7,9
Oran 2010[91]	316	12	37
HCA 2010 [97]	43	16,2	2,3
Tunisie 2010[88]	281	13,2	10,7
KSA(Arabie saoudite) 2007[98]	257	28	7,7
France 2003[87]	733	15	15
Suisse 2003[82]	484	20	5,5
Mexique 2016[92]	499	17,4	10,8
Chine 2015[93]	140	22	16

3.4.1.5 Profil immunophénotypique des LAM6 et LAM7

Malgré l'utilisation dans ce travail, de marqueurs spécifiques comme les CD235a (Glycophorine A) et les marqueurs plaquettaires (CD41, CD42 et le CD61), aucune entité n'a pu être mise en évidence. Ces deux formes sont rares par rapport aux autres types de LAM. Ceci est confirmé dans tous les travaux rapportés dans la littérature, comme cela est illustré dans le tableau (Tab XXXI).

Tab XXXI : Fréquence des LAM6 et LAM7 dans différentes études

Etude	N	LAM 6 (%)	LAM 7 (%)
Notre étude 2016	122	0	0
CPMC ALG 2010[86]	437	3,2	0,22
Oran 2010[91]	316	4	3
HCA 2010 [97]	43	2,3	2,3
Tunisie 2010[88]	281	4,3	1,8
KSA(Arabie saoudite) 2007[98]	257	5,4	0,38
France 2003[87]	733	2	1
Suisse 2003[82]	484	4	3
Mexique 2016[92]	499	0,8	0,4
Chine 2015[93]	140	1	1

3.4.1.6 Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et des sous types de LAM

Dans la majorité des cas, il ya une corrélation significative entre le degré de positivité et les sous types de LAM (Tab XIX), cependant aucun marqueur ne peut à lui seul typer la LAM, il est nécessaire d'utiliser le panel d'anticorps recommandé ainsi que l'application du système de scoring de l'EGIL.

- L'expression des marqueurs d'immaturation (CD34, HLADR) corrélée avec la classification FAB de notre série rejoint les études publiées [86, 87, 101,102, 89, 103, 104].

- La particularité du CD34 relève de sa positivité à 100% dans la LAM0 et s'affaiblit progressivement au cours de la différenciation cellulaire et l'HLA DR est très marqué dans la lignée monocyttaire.

- Le degré de positivité des marqueurs en fonction des sous types de LAM objective une positivité de la MPOc à 100% sauf pour la LAM5 et la LAM0 où les taux varient respectivement entre (26-36%) et (0- 3,4%) dans les différentes séries [105,102, 89, 106].

- Le degré de positivité des marqueurs CD13, CD33 élevé et similaire dans tous les types de LAM est largement retrouvé dans les différentes séries[86, 91, 97, 87, 101, 102, 89, 103, 104].

-Pour le CD117, sa positivité n'est similaire aux précédents marqueurs que dans la LAM4. Cette positivité est modérée dans les LAM3 et LAM5, ces résultats corroborent avec les travaux publiés. [105, 102, 89, 106].

- Le degré de positivité des marqueurs myélo- monocytaires (CD15, CD14, CD64, CD11c) corrélé avec la classification du FAB s'aligne sur les données publiées.

- Quant aux marqueurs spécifiques (CD41, CD61 et GPA), la corrélation est non significative vue l'absence de sous types LAM6 et LAM7 dans notre étude. Dans la littérature ces variétés sont rares. [77, 86, 90, 91, 96, 92, 93,87].

3.4.1.7 Apport du CD45 dans l'analyse des leucémies aiguës myéloïdes

- Les résultats de l'analyse des 122 échantillons de patients ayant une leucémie aiguë myéloïde montrent que la population blastique en taille structure (FSC / SSC) est en moyenne de 63% versus 73% en CD45/ structure (SSC)(Figure57). Cette différence de 10% confirme que la détermination de la population blastique en FSC / SSC est moins informative sur la taille exacte du clone blastique du fait de l'impossibilité de la séparer des autres populations par effet de chevauchement. Certes le clone blastique est souvent identifiable lorsque la moelle osseuse est massivement envahie cependant dans les infiltrations partielles, la détermination de sa taille ne peut être possible qu'avec l'utilisation du CD45. L'intensité de ce marqueur sur les cellules est variable, forte sur les lymphocytes, et faible sur les cellules blastiques. Le CD45 est un excellent discriminateur, intégré d'une manière obligatoire dans le panel des LA, Il est d'un apport considérable permettant de réduire les faux diagnostics de leucémies aiguës (LA) à expression phénotypique mixte. Par ailleurs il a permis de surseoir à l'étape de séparation des cellules par gradient densité ficoll, méthode classique déjà décrite dans la partie théorique qui a été utilisée dans le but d'enrichir le prélèvement en cellules blastiques.

- Corrélation entre taux de blastes en microscopie et par CMF en 45/SS

D'un autre côté, on a noté, qu'il existe une bonne corrélation entre les taux moyen de la population blastique mesurée par CMF après un gating par le marqueur CD45 et celui compté par microscopie optique (73,1% vs 74,9%). (Figure 58). Ce résultat confirme l'apport complémentaire de la CMF à l'analyse morphologique. Cette dernière garde sa place et reste très utile dans l'investigation de toute leucémie aiguë [107,108, 109, 110, 111].

- Il est à noter que les précurseurs érythroïdes n'expriment pas le CD45, ce qui permettrait de les individualiser par ce marqueur. Donc l'intérêt majeur du fenêtrage (gating) par le CD45 réside en la possibilité de discriminer et caractériser le faible pourcentage de blastes. Par ailleurs, il aide dans la quantification et le calcul de la clairance blastique à la phase d'attaque du traitement et de manière moins spécifique, il est intégré avec d'autres marqueurs spécifiques pour évaluer la maladie résiduelle.

3.4.1.8 Analyse des concordances des classifications FAB - CMF

Selon le tableau XX de concordance, dans 91% des cas, les résultats selon la classification FAB et CMF sont concordants mais cette concordance est partielle dans 7% des cas, en effet dans 6 cas, il s'agissait d'une LA indifférenciée morphologiquement alors que la CMF concluait à une LAM0, l'identification des marqueurs myéloïdes a permis de classer l'entité. Dans 2cas, l'analyse morphologique était entre M2/M4 mais la CMF a permis d'identifier les marqueurs myéloïdes communs et l'absence des marqueurs monocytaires (CD14, C64, CD11c). La discordance est notée dans 3 cas, 2 cas sont classés LA indifférenciée à la morphologie et la CMF n'a mis en évidence que les marqueurs myéloïdes et dans 1 cas, il s'agissait d'une LAM5 en morphologie et d'une LAM0 à la CMF. On peut dire que les résultats de la classification FAB sont concordant avec ceux de la CMF (p : 0,0001) et que dans de rares cas (9%), la CMF redresse la classification.

3.4.1.9 Marqueurs aberrants dans les LAM

Dans notre étude, nous avons retrouvés 31,1% de co-expression d'antigènes dits marqueurs aberrants. Les plus exprimés sont les CD7 et le CD2 suivis du CD56 et CD19 et à un pourcentage faible les CD5, CD22 et CD10 (Tableau XXI).

- **Les marqueurs aberrant CD7 et CD2** : Les taux sont variables selon les études (Tab XXXII).

Tab XXXII: Expression des aberrants CD7 - CD2 dans les LAM et séries publiées

PAYS/ CENTRE	N	CD7(%)	CD2(%)
Notre étude 2016	122	15,6	13
CPMC 2010 [86].	437	5	4,8
Blida 2018 [73].	338	21	7,8
France 2003 Casasnovas [87]	733	29	15
Jordanie 2016 [112].	368	43	4,5
USA Texas 2002,Renate Talhammer [102].	254	8,8	3
USA Californie, 1997. [106].	106	16	7,5
Inde 2016 [113].	492	24,4	12,2
Iran 2014 [114].	279	25	26,7
Argentine 2013 [115]	219	17	14
Pakistan 2013. [116]	185	26	---

- Le marqueur aberrant CD5

Le CD5 est un marqueur aberrant T d'expression phénotypique rare, retrouvé dans notre étude dans 1,8%. Dans les séries publiées il varie entre 4,8- 13% [87,116, 106].

- Le marqueur aberrant CD56

Le CD56 testé dans 32cas(26%) est positif dans 12,5% des cas, ce résultat est dans l'intervalle des séries publiées (Tab XXXIII).

Tab XXXIII: Expression du CD56 et séries publiées

PAYS/ CENTRE	N	CD56(%)
Notre étude 2016	122	12,5
CPMC 2010 [86].	437	5
Blida 2018 [73].	338	27
USA Texas 2002,Renate Talhammer [102].	254	13
USA Californie, 1997. [106].	106	9,8
Argentine 2013 [115]	219	22

- Les marqueurs aberrants CD19, CD22, CD10

Dans le tableau XXXIV, la positivité de ces marqueurs est aussi variable.

TabXXXIV : Expression des aberrants CD19-CD22- CD10 dans les LAM et séries publiées

PAYS/ CENTRE	N	CD19(%)	CD22(%)	CD10(%)
Notre étude 2016	122	2,5	1,19	2,5
CPMC 2010 [86].	437	6	---	---
Blida 2018 [73].	338	5,7	5	4
France 2003 Casasnovas [87]	733	11	4	3
Jordanie 2016 [112].	368	30	---	---
USA Texas 2002,Renate Talhammer [102].	254	2	---	---
USA Californie, 1997. [106].	106	29,6	0,7	2,9
Iran 2014 [114].	279	8,3	10,7	5,4
Argentine 2013 [115]	219	5	1	4
Bresil 2001. [117]	319	8,6	---	---

Par ailleurs, il est rapporté dans plusieurs publications internationales, l'existence d'une corrélation entre certaines dysplasies granuleuses, la t (8; 21) et la co-expression des CD56 et CD19 dans la LAM2. Cette combinaison a un impact de bon pronostic [106].

3.4.2 Immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques (L A L)

L'application de l'immunophénotypage des 176 échantillons de sang et de moelle osseuse de leucémies aiguës de notre série, nous a permis de retenir 50 cas de LAL (soit 28%), parmi lesquels , 30 cas (60%) sont de phénotype B et 19 cas (38%) de phénotype T, tandis qu'un cas (2%) est inclassable sur le plan phénotypique par insuffisance de critères de l'EGIL (Figure 68).Ce cas n'a exprimé que les marqueurs d'immaturation CD34 et HLA DR.Pour déterminer sa spécificité, d'autres études plus poussées par biologie moléculaire (PCR) et étude ultra structurale s'imposent [100,101].

3.4.2.1 : Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques

Le phénotype B est retenu sur la co-expression de deux marqueurs majeurs B: le CD79a intra cytoplasmique et le CD19, retrouvés respectivement dans 100% et 90%, suivi par le CD22 dans 83% des cas. Le phénotype T est retenu sur la co-expression des marqueurs majeurs qui sont le CD3 intracytoplasmique et le CD7 retrouvés dans 100% des cas. Ces marqueurs sont assez puissants pour la détermination des phénotypes B et T dans les LAL selon l'EGIL et l'OMS(Figure 69).

La prédominance des LAL de phénotype B par rapport au phénotype T dans cette étude rejoint la plupart des travaux nationaux[56,120,122]et internationaux[121,123,124,126,127,128,96,128], cependant le degré de fréquence est variable(Tab XXXV).

La fréquence plus élevée des LALB dans les séries de l'Arabie Saoudite, du Pakistan, de l'Iran, de la Thaïlande et du Chili est probablement en rapport avec l'inclusion des enfants.

TableauXXXV: Répartition des LAL B - LAL T et séries publiées

PAYS/ CENTRE	N	LAL B (%)	LAL T (%)
CPMC Alger* 2011 [120]	240	65,4	34,6
Blida** 2016 [122]	123	48,8	51,2
Notre étude* 2016	50	60	38
Etude nationale*2016[56]	548	57	38
Allemagne* Ludwig 1994[123]	121	76	24
Italie* 1997[96]	50	74	26
France* 1994 [128]	526	68,5	28,5
Brésil* 1996 [131]	72	73,6	26,4
Chili** 1996 [129]	113	85	15
Iran** 2006 [127]	60	83,4	15
Allemagne* 2012[124]	1648	65	35
Egypte** 2006 [132]	189	47,2	50
Maroc** 2015 [133]	130	69	31
Thaïlande** 2005[130]	263	80,6	19,4
Pakistan** 2005 [126]	100	82	18
KSA** 2007[125]	112	82	12
Jordanie** 2016[112]	173	76	24

Série adulte *

Série Enfant+ Adulte**

3.4.2.2: Degré de positivité des marqueurs lymphoïdesB, marqueurs aberrants et classifications.

Degré de positivité des marqueurs

Le taux des différents marqueurs selon les entités de LALB est similaire à celui des séries publiées. En effet, l'expression des marqueurs pan-B(CD79ac, CD19 et CD22) entre 83 -100%, celle des marqueurs spécifiques, (CD10, IgM et IgS) variable selon les sous types de LALB et celle des marqueurs d'immaturité (CD34, HLADR) corroborent avec les études publiées [120, 122, 126, 127, 128, 135, 136].

Les marqueurs aberrants (Tableau XXXVI)

La co-expression simultanée des antigènes myéloïdes dans les LALB existe au même degré que l'expression des aberrants lymphoïdes dans la LAM. Cependant leur impact pronostique et / ou leur corrélation avec les anomalies cytogénétiques sont peu /ou pas significatifs, contrairement aux aberrants lymphoïdes dans la LAM[137].

Les marqueurs aberrants que nous avons retrouvés dans notre série sont les CD13, CD117, CD2 et CD7. Le taux d'expression du CD13 dans les études algériennes [77, 137,139] est plus faible que dans notre étude (il varie entre 8- 16%) mais il est dans dans l'intervalle des séries internationales (Tab XXXVI).

Par ailleurs, le CD33 n'a pas été exprimé dans notre étude mais il l'a été dans plusieurs travaux. Le CD117 est faiblement exprimé dans les séries rapportées.

Le taux d'expression du CD7 (marqueur lymphoïde T) retrouvé entre 3- 8,8% est dans l'intervalle des travaux.

Le CD2 est retrouvé dans 12% et en Jordanie, il est de 6%. Quant au CD5, il n'a pas été identifié dans notre étude, mais il est retrouvé entre 4- 12,5% dans d'autres travaux (CPMC, Tunisie).

Tableau XXXVI : Aberrants myéloïdes et lymphoïdes T dans les LAL B et séries publiées.

PAYS-CENTRE / CD %	N	CD13(%)	CD33(%)	CD117(%)	CD15	CD7	CD2	CD5
Notre étude 2016	50	43	0	4	---	5	12	0
CPMC**1999 [77]	24	8,3	20,8	---	4	--	--	4
Blida** 2016 [121]	34	16	16	4	---	---	---	---
Mustapha P**2010 [137]	112	13,8	16,9	--	---	---	---	---
Tunisie** 2009[79]	80	0	15	1	--	8,75	---	12,5
Maroc** 2009[135]	216	57,4	57	---	---	3,2	---	---
Jordanie** 2016 [112]	163	37	47	--	---	3	---	---
USATexas** 2002[138]	200	51	49	1	28	5	---	---
Argentine *2013[115]	105	20	15	---	6	---	6	---

Adulte : *

Adulte et enfant**

Les différences des taux observées, s'expliqueraient-ils par l'absence de standardisation des protocoles et panels des anticorps monoclonaux et surtout par leurs combinaisons avec les fluorochromes d'une part et/ou de l'hétérogénéité dans le choix des clones des anticorps monoclonaux non identiques chez les industriels de cytométrie d'autre part ?

Classification des LAL de phénotype B (Tableau XXXVII)

La détermination du profil phénotypique nous a permis de répartir les LALB en sous classes selon les critères établis par le Groupe EGIL. Le type I (pro-B) retrouvé dans 10% des cas, la forme B commune dite aussi pré-pré B qui correspond au type II est la plus fréquente, elle représente 63% suivie par la forme Pré-B (type III) à 20%, tandis que la forme dite B mature (Type IV) n'a été retrouvée que dans 7% des cas(Figure 70). Dans ce type 4, le CD34 n'a pas été exprimé pour les deux cas, ce qui corrobore avec toutes les études.

Le taux des LAL Pro-B (Type I) varie entre 4-15%, sauf pour la Tunisie (0%), celui des LAL Pré-Pré B (Type II ou commune) entre 24,2- 84%, celui des LAL Pré-B (Type III) entre 10-52% sauf pour les données élevées de la Tunisie (73,3%) et faibles pour l'Arabie saoudite (4,75%), en fin pour les LAL mature (Type IV), nos résultats sont dans l'intervalle de ces séries (Tab XXXVII).

Tab XXXVII : Répartition des sous types de LAL B et séries publiées

Pays- Centre/ Types LAL B	Nbre	Pro-B Type I(%)	Pré-Pré B Type II(%)	Pré- B Type III(%)	B mature Type IV(%)
CPMC 2011[120]	157	12,7	24,2	52,9	10,2
Blida**2016 [122]	60	7	35	38	7
Notre étude*2016	30	10	63	20	7
HCA * 2010 [97]	15	7	53	13	27
Angleterre*2013[140]	477	10	70	15	5
Suisse 2003[141]	283	13	52	10	4
Tunisie**2009 [79]	60	0	6,6	73,3	20
Iran** 2006[127]	60	14	56	26	4
France 1994[128]	382	12,7	44	38	4,6
Allemagne 2012**[124]	1071	14	64	16	5
USA Texas* 2009 [136]	200	13	67	13	7
Arabie Saoudite**2007[125]	39	5,28	84	4,75	5,8
Thaïlande**2005[130]	263	4,7	33	42	19,7

Adulte : *

Adulte et enfant**

3.4.2.3 : Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes T, marqueurs aberrants et classifications.

Comme déjà décrit précédemment, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de phénotype T représentent 38% (19 Patients) de l'ensemble des LAL(Figure 71).

Degré de positivité des marqueurs

Le taux des différents marqueurs selon les entités de LALT est similaire à celui des séries publiées. En effet, l'expression des marqueurs pan-T (CD3c, CD7) varie entre 90 -100%, celle des marqueurs spécifiques (CD1a, CD3s) est variable selon les sous types de LALT et les marqueurs d'immaturité HLADR(11- 26%) et CD34 (37-57%), l'expression de ces derniers est donc faible par rapport aux LALB, cela corrobore avec les études publiées [86, 122, 124, 127,133, 136, 142].

Les taux d'expression des CD5, CD2, CD4 et CD8 entre 47- 93% orientent le plus souvent vers le LALT à partir des LALTII.

Le CD10 a la particularité de s'exprimer dans les LALT mais dans les critères de l'EGIL, il n'intervient pas dans le diagnostic de LALT, il est retrouvé dans différentes séries à des taux de 14- 37%[79, 121,133, 136].

Marqueurs aberrants (Tab XXXVIII)

Tableau XXXVIII : Aberrants myéloïdes et lymphoïdes B dans les LAL T et séries publiées.

PAYS-CENTRE / %	N	CD13(%)	CD33(%)	CD117(%)	CD15	CD19	CD22	CD10
Notre étude* 2016	19	32	5	5	0	0	0	37
CPMC** 1999 [77]	19	21	---	---	---	21	--	--
Blida** 2011[121]	?	6	---	6	---	19	7	22
Mustapha P** 2010 [137]	71	13,3	---	--	26,7	---	---	---
Tunisie** 2009 [79]	80	0	15	1	--	8,75	---	12,5
Maroc** 2015 [133]	40	42,5	25	---	---	2,5	5,5	14
Jordanie** 2016 [112]	162	42	17	25	---	---	---	---
USATexas** 2002[136]	117	22	---	---	---	---	---	14
Pakistan*2013 [142]	68	28	28	---	---	---	---	---

La co-expression des marqueurs aberrants les plus exprimés dans les différentes études sont le CD13, le CD33, CD19 et le CD10, leur taux d'expression est variable d'une série à l'autre mais le plus marqué est le CD13 dont les taux varient entre 13,3-42% sauf pour l'équipe de Blida (6%) et absent dans l'étude de la Tunisie.

Classification des LAL de phénotype T (TableauXXXIX)

L'application du score de l'EGIL dans la classification des LAL T, nous a permis de répartir nos patients en quatre types : 10% de type 1(Pro-T), 42% type 2(Pré-T), 16% de type 3 (dit corticale ou thymique) et 32% de type 4 mature (Figure72).

Nos résultats sont en général dans l'intervalle des différentes études (Tab XXXIX).

Tab XXXIX : Répartition selon EGIL des LAL T et séries publiées

Centre- Pays / Types LAL T	Pro-T(%)	Pré-T(%)	T Corticale(%)	T Mature(%)
CPMC 2011[120]	0	28,2	16,4	55,3
Blida 2016 [122]	22	22	24	32
HCA 2010 [97]	7	53	13	27
Notre étude 2016	10	42	16	32
UK Mike leach 2013[143]	5	45	40	10
Suisse Reinhard 2003[141]	13	52	10	4
Tunisie N. B Jmili 2009[79]	0	20	60	20
Allemagne -Ludwig 2003[123]	11	52	9	28

En effet, le taux dans les LAL Pro-T (type I) varie entre 7- 22% à l'exception du CPMC et de la Tunisie (0%), celui des LAL Pré-T (type II) varie entre 14- 53%, celui des LAL corticale(typeIII) varie entre 9- 24% à l'exception de l'Angleterre et la Tunisie où les taux sont plus élevés (40- 60%) et enfin les LAL mature (type IV) varient entre 20- 30%, leur taux est plus faible en Europe (4- 10%) et plus élevé au CPMC (55%).

3.4.2.4 Corrélations

Relation de la classification FAB / CMF

La relation de la classification FAB et la CMF est significative pour le type LAL2 /LALB comme cela est classiquement décrit chez l'adulte [58] et parallèlement la CMF a été contributive pour l'identification de la LALBIV alors que la morphologie était en faveur d'une LAL1. Néanmoins et en accord avec la littérature, un cas morphologiquement LAL3 s'est confirmé LALB IV en CMF. Cependant il n'ya pas de relation significative entre les différents types de LALT en CMF et en morphologie selon la classification FAB. Par ailleurs 2cas de LAindifférenciés se sont avérés en CMF, LALBI (1cas) et LALBII (1cas). Actuellement, la classification selon le FAB est devenue peu opérationnelle et c'est la CMF qui permet d'individualiser les sous groupes.

Relation entre le degré de positivité des marqueurs et sous types dans les LAL

Le taux du degré de positivité des marqueurs pan B/T retrouvé dans notre étude concorde avec les séries publiées [120, 122, 123,125, 136].

A la différence des LAM où l'EGIL exige un scoring pour identifier les sous types, dans les LAL, certains marqueurs spécifiques (CD10, IgMc et Igsk/L, CD1a, CD3s) sont nécessaires pour la classification en sous types. En effet, les différents taux du degré de positivité de ces marqueurs retrouvés rejoignent les séries publiées [97, 122, 140, 127, 128, 124, 136,141].

Pour les marqueurs de différenciation (CD2 et CD5) et de maturité (CD4, CD8 et TCR), leur spécificité est moindre et les taux de leur positivité concordent avec les études [97, 122, 123, 143].

3.4.3 Leucémies aiguës biphénotypiques (LAB)

Les leucémies aiguës biphénotypiques (LAB) dite aussi ambiguës sont rares, elles représentent 2 à 5% des leucémies aiguës (LA)[153, 154, 155].

C'est grâce à l'immunophénotypage et l'application d'un panel étendu, qu'on a pu mettre en évidence les 4 cas (2,3%) de LAB rapportés dans le tableau XL.

Le taux de cette entité dans notre travailrejoint la plupart des données publiées et confirme la rareté de cette entité d'une part et l'apport diagnostique de la cytométrie d'autre part[79, 86,97, 112,156, 157, 139, 140, 157].

Tab XL: Leucémie aigue biphénotypique et revue de la littérature.

LAB	N	My / B	My / T	L B / T	Total(N)	Total(%)
WHO 2008 [156]	---	---	---	---	---	< 4
Notre étude 2016	176	1	1	2	4	2,3
CPMC 2010[86]	736	---	---	---	55	7,5
Tunisie 2009[79]	152	12	1	3	16	10,5
USA 2007 [157]	684	---	---	---	---	2, 5
Inde 2015[139]	506	5	9	1	15	2,96
UK 2011 [140]	981	58	36	4 + 3(My/B/T)	101	10,29
USA.Bal2010 [157]	742	2	5	1	8	1,1
Jordanie 2016[112]	368	0	3	0	3	1

My : Myéloïde ; B : Lymphoïde B ; T: Lymphoïde T

4. Perspectives de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës

La cytométrie par ses potentiels progrès ne cesse de s'élargir aussi bien dans le diagnostic des leucémies aiguës que dans d'autres pathologies. En effet, il existe une relation des profils phénotypiques des LA avec la cytogénétique et leurs impacts pronostiques, cela est rapporté par certains travaux publiés [Bagg et al :159] soulignant la corrélation entre la LAM avec t (8 ; 21) et la forte expression du CD34, HLA DR, MPOc et CD13 et la faible expression du CD33 ; Khoury [160], et Yang [161] rapportent aussi la fréquence d'expression des marqueurs aberrant CD19 et CD56 qui ont un impact pronostic bon dans cette anomalie cytogénétique. La LAM4 à éosinophile avec inversion 16 ou t(16 ; 16) est corrélée avec la forte expression du CD34 et CD117 et la co-expression du CD2 [162,163].

Sur le plan moléculaire, la corrélation avec la CMF est retrouvée dans la LAM4 avec mutation NPM1, celle-ci exprime fortement le CD33, souvent le CD34 est négatif et l'HLA DR est négatif dans 50% des cas [Nomdedeu et al : 164]. La LAM avec mutation bi allélique CEBPA ayant un profil immunophénotypique : CD34+, CD13+, CD33+, HLA DR+, CD14 – et CD7+ a un bon pronostic [Haferlach et al : 165]. Les LAM avec la mutation FLT3-IDT ont un profil phénotypique CD34- HLADR- CD56+ CD123+ CD133-.

Parallèlement, la CMF permet le suivi et l'évaluation de la maladie résiduelle dont le seuil de sensibilité de la technique cytométrique est de 1.10^{-4} . La cytométrie présente l'avantage par rapport à la biologie moléculaire de faire la distinction entre les cellules viables et les cellules mortes.

Dans les LAL, la rémission phénotypique à J35 et à J70 du traitement est définie par un taux de blastes $< 1\%$ et $< 0,1\%$, respectivement. Elle permet également de quantifier la MRD et de prédire ainsi le risque de rechute. Les Ag spécifiques à cibler pour la LAL-T sont le CD99 et pour les LAL-B, les CD58, CD123.

Dans les LAM, la détection de la MRD est moins bien établie que pour les LAL.

Les champs d'application de la CMF sont orientés aussi vers le diagnostic d'autres hémopathies telles que : les syndromes lymphoprolifératifs, la recherche du clone pathologique dans l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, la recherche du déficit en glycoprotéine dans les thrombopathies constitutionnelles et le diagnostic des lymphomes non hodgkiniens par ponction aspiration de ganglion. Parallèlement, la CMF permet le suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique et le myélome multiple.

CONCLUSION

CONCLUSION

Après avoir mis au point un plateau technique d'application de cytométrie en flux au laboratoire du service d'hématologie du CHU de Sétif, notre étude a porté sur 176 échantillons de leucémies aiguës de novo. Dans la présentation clinique, Le syndrome anémique est retrouvé dans 91% des cas, il est sévère dans la moitié des cas, le syndrome infectieux dans 57% des cas, le syndrome hémorragique dans 59% des cas et le syndrome tumoral dans 47% des cas, celui-ci est plus marqué dans les LAL (82%) que dans les LAM (33%). Biologiquement, le taux d'hémoglobine moyen (7gr/dl) est presque similaire pour les deux formes de LA, néanmoins le degré de sévérité est plus marqué dans les LAM(71%) que dans les LAL(58%). Le taux moyen des GB est de 64,3G/L et celui des plaquettes de 40 G/L.

Selon la classification FAB, les LAM sont plus fréquentes, nous enregistrons 115(65%) LAM, 49(28%) LAL et 12(7%) LA indifférenciées. Ces formes se répartissent en 20 (17%) LAM1, 30(26%) LAM2, 2(4%) LAM2/LAM4, 21(18%) LAM3, 32(28%) LAM4, 10(9%) LAM5, 6(12%) LAL1, 42(86%) LAL2, 1(2%) LAL3.

L'immunophénotypage par cytométrie en flux est réalisé grâce à un large panel d'anticorps monoclonaux qui a permis de classer les différentes variétés de LA.

Parmi les 12 cas indifférenciés, la CMF a identifiée : 6 cas LAM0, 2 cas LAM1, 1 cas LALBI, 1 cas LALBII et 2 cas LA biphénotypiques.

Dans les LAM, on distingue, une expression variable des marqueurs myéloïdes, elle est de 90% pour la myéloperoxydase et le CD33, 87% pour le CD13 et 72% pour le CD117. Cependant le degré de positivité du marquage combiné (CD13/CD33/CD117) n'est que de 57%. En effet, ce résultat témoigne qu'il n'existe aucun marqueur myéloïde pathognomonique des LAM. Par ailleurs, on retrouve une expression des marqueurs d'immaturation (CD34, HLADR) dans respectivement 57% et 72%.

L'exploitation des marqueurs et leur degré de positivité ont permis de classer les LAM selon les critères établis par le groupe EGIL. Les formes les plus fréquentes sont représentées par les LAM2 et LAM4 à 26% chacune, suivie des LAM1(17%), LAM3 (17%) et les LAM5 (8%). Néanmoins, la CMF a permis d'identifier 7(6%) de LAM0 mais les LAM6 et LAM 7 n'ont pas été mise en évidence malgré l'utilisation de marqueurs spécifiques à ces deux entités sur l'ensemble des échantillons.

L'étude de corrélations entre les sous types des LAM et le degré d'expression des marqueurs montre une spécificité statistiquement significative de certains marqueurs par rapport à d'autres. En effet, on note une forte expression de la MPO dans tous les types de LAM sauf la LAM5 qui est faible (33%) et nulle dans la LAM0. Pour les autres marqueurs myéloïdes (CD33, CD13), leur expression est similaire dans tous les types de LAM, cependant pour le CD117, sa positivité est modérée dans la LAM3(52%) et faible dans la LAM5(33%).

D'autres marqueurs (CD14, CD64, CD11c) par leurs spécificités monocytaires, sont fortement positifs dans les LAM4 et les LAM5.

Quant aux marqueurs d'immaturation (CD34, HLADR), leur positivité est forte dans tous les types de LAM sauf la LAM5 où l'expression est faible (29%) et nulle dans la LAM3. La corrélation est aussi très significative.

Malgré la mise en évidence de corrélation significative entre le degré de positivité et les sous types de LAM, aucun marqueur ne peut à lui seul typer la LAM, il est nécessaire d'utiliser le panel d'anticorps recommandé ainsi que l'application du système de scoring de l'EGIL.

Grâce au panel étendu, nous avons mis en évidence des marqueurs aberrants qui sont parmi les critères de malignité, de différenciation entre les progéniteurs blastiques malins et normaux et aident aussi dans l'évaluation et le suivi de la maladie résiduelle. L'expression de ces marqueurs est mise en évidence dans 31% des cas, les plus exprimés sont les CD7, CD2 et CD56 retrouvés respectivement dans 15,6%,13% et 12,5% alors que pour les autres marqueurs, leur expression est plus faible.

La CMF dans les LAM est contributive, elle a permis de conforter le diagnostic avec une concordance avec la classification FAB dans 111 (91%) cas d'une part et d'éclaircir dans 9% des cas, les formes cytologiquement difficiles et/ou indifférenciées d'autre part.

Le CD45 est intégré d'une manière obligatoire dans le panel des LA, il n'a aucune spécificité vis-à-vis des sous types de LAM mais permet de discriminer la population blastique des autres, même lorsque le clone blastique est faible. En effet, on note une corrélation significative entre les taux moyens de blastes en microscopie optique et par CMF en 45/SS lorsque le clone blastique est important mais lorsque le clone est faible, la CMF est plus contributive.

Dans les LAL, Le panel d'anticorps monoclonaux utilisé a permis non seulement d'identifier les phénotypes B et T des LA et de distinguer 2 cas parmi les LA indifférenciées. Parmi les échantillons étudiés, la CMF a mis en évidence 30(60%)LALB, 19 (38%)LALT et un cas (2%) est inclassable par insuffisance de critères de l'EGIL (score inférieur à 2). Dans les LAL, il existe des marqueurs qui sont très puissants et de haute spécificité pour l'identification de certains sous types. Certains marqueurs interviennent dans la détermination du phénotype B des LAL, comme les CD79ac, le CD19 et le CD22c et d'autres pour le phénotype T dans les LALT, comme le CD3 et le CD7. Ces marqueurs sont exprimés au niveau de tous les sous types, ils sont dits pan-B et pan-T. Parallèlement, pour d'autres marqueurs, leur degré de positivité élevé et leur spécificité concordent avec un sous type précis. En effet, dans les LALB, le CD10 est corrélé avec le sous type BII, la chaîne mu(IgMc) avec le sous type BIII et les Igs de surface avec le sous type BIV et dans les LALT, les CD1a (TIII), CD3membranaire (TIV) et les CD2 et/ou CD5 par leur positivité différencient le sous type TII du TI.

Grâce aux données phénotypiques et selon les critères établis par le groupe EGIL, on a enregistré une fréquence de la LALB commune de type II (63%) suivie par le type III (forme pré-B (20%) et le type I (pro-B: 10%) et enfin la forme B mature de type IV qui n'a été retrouvée que dans 7% des échantillons analysés. Dans la LALT, Le types II(pré-T) et le type IV (mature), sont les plus fréquents et retrouvés respectivement dans 42% et 32% suivis par le type III (cortical: 16%) et le type I (Pro-T: 10%).

Les marqueurs aberrants retrouvés dans notre étude sont représentés par le CD13(43-32%) et le CD117 (4-5%) dans les deux types de LA et par le CD7 (5%) et le CD2 (12%) dans les LALB; par le CD33(5%) et le CD10(37%) dans les LALT. Les données des taux des marqueurs aberrants sont variables, cela s'expliqueraient-ils par l'absence de standardisation des protocoles et panels des anticorps monoclonaux et surtout par leurs combinaisons avec les fluorochromes d'une part et/ou l'hétérogénéité dans le choix des clones des anticorps monoclonaux non identiques chez les industriels de cytométrie d'autre part ?

Dans les leucémies biphénotypiques, grâce au panel d'anticorps monoclonaux établi dans notre étude et le système de score défini par le groupe EGIL et l'OMS, 4 cas (2,3%) de LAB

ont été identifiées. Cette entité regroupe 2cas de LAM en morphologie, redrèssés en 1LAB My/B et 1LAB My/T et 2cas, dont 1LAL et 1LAL/LAM5, redrèssés en 2LAB B/T.

Certes, les études morphologiques et cytochimiques restent déterminantes pour la caractérisation des leucémies aiguës et la CMF conforte le diagnostic. Dans les formes dites indifférenciées cytologiquement, la cytométrie en flux est d'un apport considérable pour affirmer le diagnostic de la LAM0, LAM6, LAM7 et la leucémie aiguë biphénotypique (LAB). Parallèlement, elle précise les phénotypes B et T des LA et leurs sous types. Cette détermination permet le choix des stratégies thérapeutiques qui sont différentes. Néanmoins, pour s'aligner sur les recommandations de l'OMS, la CMF doit être complétée par les études cytogénétique et biologie moléculaire.

RESUME

La présente étude a porté sur 176 échantillons de patients présentant des leucémies aiguës de novo diagnostiqués morphologiquement.

L'immunophénotypage par CMF avec un large panel d'AcM a permis de conforter le diagnostic de 111(91%) cas de LAM, 49(28%) cas de LAL et déterminer le type et la lignée de 12(7%) cas de LA indifférenciées.

Dans les LAM, le degré de positivité des marqueurs myéloïdes est fort. Il varie de 72% à 90% en monomarquage et de 57% à 63% en marquage combiné. L'expression des marqueurs CD34 et HLADR est quant à elle située entre 57% et 72%. La répartition des LAM met en évidence les formes les plus fréquentes, représentées par les LAM2 et LAM4 dont les taux sont de 26% chacune, suivies des LAM1 (17%), LAM3 (17%), LAM5 (8%) et l'identification de 7 cas de LAM0 soit un taux de 6%. Les formes de LAM6 et LAM7 n'ont, par contre, pas été mises en évidence. L'étude de corrélation entre les sous types des LAM et le degré d'expression des AcM montre une spécificité statistiquement significative de certains marqueurs par rapport à d'autres. Outre les marqueurs CD13 et CD33 qui sont d'expressions similaires, on retrouve la MPO dont l'expression est forte pour tous les types de LAM exceptées la LAM5 où elle est faible (33%) et nulle dans la LAM0. Pour le CD117, sa positivité est modérée dans la LAM3 (52%) et faible dans la LAM5 (33%). Les marqueurs CD14, CD64 et CD11c par leurs spécificités monocytaires sont fortement positifs dans les LAM4 et les LAM5. L'expression des marqueurs aberrants dans les LAM est retrouvée dans 31% des cas, les plus fréquents sont le CD7(15,6%), le CD2(13%) et le CD56 (12,5%). Les expressions des autres marqueurs sont faibles.

Parmi les 50 cas de LAL, 30(60%) sont des LALB et 19 (38%) des LALT tandis qu'un cas (2%) est inclassable. Dans les LALB, le CD10, la chaîne mu (IgMc) et les Igs sont corrélés respectivement avec les types BII, BIII et BIV. Pour les LAL T, il y a corrélation du CD1a avec les (TIII) et le CD3s avec les (TIV). Les CD2 et/ou CD5 par leur positivité différencient le sous type TII du TI. Selon l'EGIL, parmi les LALB, on note une fréquence de la forme commune type II (63%) suivie du type III (20%), puis du type I (10%) et type IV (7%). Dans la LALT, les marqueurs aberrants sont représentés par le CD13(32-43%) et le CD117 (4-5%) dans les deux types de LAL, par le CD7(5%) et le CD2(12%) dans les LALB et par le CD33(5%) et le CD10(37%) dans les LALT.

La LAB est retrouvée dans 4(2,3%) cas dont 2 LAB B/T, 1 LAB My/B et 1 LAB My/T.

ABSTRACT

This study has been conducted on 176 samples of patients with morphologically diagnosed of novo acute leukaemias.

Immunophenotyping by FCM with a large panel of Mabs has confirmed the diagnosis of 111(91%) cases of AML, 49(28%) cases of ALL and determined the type and lineage of 12(7%) cases of undifferentiated AL.

In AML, the positivity degree of myeloid markers is high. It varies from 72% to 90% in single marking and from 57% to 63% in combined marking. The expression of the CD34 and HLADR markers is between 57% and 72%. The distribution of AMLs highlights the most frequent forms, represented by AML2 and AML4 the rates of which are 26% each, followed by AML1 (17%), AML3 (17%), AML5 (8%) and the identification of 7 AML0 or a rate of 6%. The forms of AML6 and AML7, on the other hand, haven't been highlighted. The correlation study between the AML subtypes and the degree of expression of AcM shows a statistically significant specificity of some markers compared to others. In addition to the CD13 and CD33 markers, which are similar in expression, there is the MPO, which has a high expression for all types of AML except AML5 where it is weak (33%) and zero in AML0. For CD117, its positivity is moderate in AML3 (52%) and lower in AML5 (33%). The CD14, CD64 and CD11c markers, by their monocytic specificities, are strongly positive in AML4 and AML5. The expression of aberrant markers in AMLs is found in 31% of cases, the most frequent are CD7 (15.6%), CD2 (13%) and CD56 (12.5%). The expressions of the other markers are weak.

From the 50 cases of ALL, 30 (60%) are B-ALLs and 19 (38%) are T-ALLs while one case (2%) is unclassifiable. In B-ALLs, CD10, mu chain (cyIgM) and sIg are correlated with types BII, BIII and BIV respectively. For T-ALL, there is correlation of CD1a with (TIII) and sCD3 with (TIV). CD2 and/or CD5 by their positivity differentiate the TII subtype from TI. According to EGIL, among the B-ALLs, there is a prevalence of the common form type II (63%) followed by type III (20%), then type I (10%) and type IV (7%). In the T-ALL, the outlier markers are represented by CD13 (32-43%) and CD117 (4-5%) in both types of ALLs, by CD7 (5%) and CD2 (12%) in B-ALL and by CD33 (5%) and CD10 (37%) in T-ALL.

Bi-phenotypic AL (BAL) is found in 4 (2.3%) cases including 2 BAL B/T, 1BAL My/B and 1 BAL My/T.

ملخص:

شملت الدراسة الحالية 176 عينة من المرضى الذين يعانون من سرطان الدم الحاد غير الثانوي الذين تم تشخيصهم مجهرياً أكد النمط المناعي عن طريق قياس التدفق الخلوي باستخدام لوحة كبيرة من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة تشخيص 111 حالة (91%) من سرطان الدم النخاعي الحاد ، 49 (28%) من حالات سرطان الدم الليمفاوي الحاد وتحديد نوعية 12 (7%) من حالات سرطان الدم الحاد غير متمایزة.

في سرطان الدم النخاعي الحاد (AML) ، تكون درجة إيجابية مستضدات المايولويد مرتفعة. تتراوح من 72% إلى 90% في وضع العلامات أحادية ومن 57% إلى 63% في وضع العلامات الجمع. التعبير عن علامات CD34 و HLADR يتراوح بين 57% و72%. يوضح توزيع AML الأشكال الأكثر شيوعاً ، ممثلة بـ AML2 و AML4 بمعدل 26% لكل منها ، تليها AML1 (17%) ، AML3 (17%) ، AML5 (8%) وتحديد 7 حالات من AML0 أي بمعدل 6%. أما الأشكال AML6 و AML7 لم يتم تشخيصها في عملنا. تظهر دراسة الارتباط بين الأنواع الفرعية لـ AML ودرجة التعبير عن الأجسام المضادة وحيدة النسيلة خصوصية ذات دلالة إحصائية لبعض العلامات على غيرها. بالإضافة إلى علامات CD13 و CD33 التي لها تعبيرات مماثلة ، نجد MPO الذي يكون تعبيره قوياً لجميع أنواع AML باستثناء AML5 حيث يكون منخفضاً (33%) وسلبى في AML0 ، بالنسبة إلى CD117 ، تكون إيجابيتها معتدلة في AML3 (52%) ومنخفضة في AML5 (33%). أما العلامات CD14 و CD64 و CD11c بخصائصها أحادية الخلية إيجابية بقوة في AML4 و AML5. تم العثور على التعبير عن علامات شاذة في سرطان الدم النخاعي الحاد في 31% من الحالات ، والأكثر شيوعاً هي CD7 (15.6%) ، CD2 (13%) و CD56 (12.5%) مع التعبيرات عن العلامات الأخرى ضعيفة.

من 50 حالة من سرطان الدم الليمفاوي الحاد (ALL) 30 (60%) من ALLBs و 19 (38%) من ALLTs ، في حين أن واحدة (2%) غير قابلة للتصنيف. في ALLBs ، ترتبط CD10 وسلسلة (IgMc) mu و Igs بالأنواع BII و BIII و BIV على التوالي. بالنسبة إلى ALLT ، يوجد ارتباط بين CD1a و (TIII) و CD3s مع (TIV). تفرق CD2 و / أو CD5 من خلال إيجابيتها النوع الفرعي TII من TI وفقاً لمقاييس EGIL. من بين ALLBs ، هناك تكرار للنوع الشائع من النوع الثاني (63%) متبوعاً بالنوع الثالث (20%) ، ثم النوع الأول (10%) والنوع الرابع (7%). أما في ALLT ، يتم تمثيل العلامات الشاذة بواسطة CD13 (32-43%) و CD117 (4-5%) في كلا النوعين من ALL ، وبواسطة CD7 (5%) و CD2 (12%) في ALLB و CD33 (5%) و CD10 (37%) في ALLTs .

كما تم العثور في هذه الدراسة على سرطان الدم الحاد ثنائي النمط (BAL) في 4 حالات (2.3%) بما في ذلك حالتين BAL B / T ،

حالة من BAL My / B وحالة من BAL My / T .

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Moldavan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science*; 1934. 80, 188-189.
- 2- Kamentsky L.A, Melamed M.R, Derman H. spectrophotometer: New instrument for ultra-rapid cell analysis. *Science* 1965. 150. 630-631
- 3- Kamentsky L.A, Melamed M.R. Spectrophotometric cell sorter, *Science*. 1967; 156, 1364-1365
- 4- Melamed M.R, Lindmo T, Mendelsohn M.L. *Flow cytometry and sorting*. Wiley- Liss publications. 1979
- 5- Xavier Ronot, D. Grunwald, J.F. Mayol. *Principe de La cytométrie en flux*. Edition Lavoisier. 2006.
- 6- Kachel V; Fellner-Felldog H ; Menke E. *Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments..* Wiley-Liss Publications. 1990, 27-44.
- 7- Watson J.V. The early fluidic and optical physics cytometry. *Cytometry*. 1999. 15. 2-14.
- 8- Grunwald D; Ronot X. Fluorochromes and fluorescent probes. In *imaging of nucleic acids and and quantification in photonic microscopy*. CRC Press. 2001. 1-16
- 9- Wagoner A.S. Fluorescent probes for cytometry. In *Flow cytometry and sorting*. Eds. Wiley-Liss. NY. 1990. 209-225
- 10- Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artefacts, limitations and caveats. *Cytometry*. 2001. 45. 194- 205
- 11- Maecker HT, McCoy JP, et Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 17 févr 2012.
- 12- Carter P.H., Resto-Ruiz S., Washington G.C., Ethridge S., Palini A., Vogt R., Waxdal M., Fleisher T., Noguchi P.D., Marti G.E. - Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry*, & 1992, 13 : 68-74.)
- 13- Mc Carthy D.A., Macey M.G. - Novel anticoagulants for flow cytometric analysis of live leucocytes in whole blood. *Cytometry*, 1996, 23 : 196-204.
- 14- Lees O., Immunophenotypage des cellules sanguines : du prélèvement à la lecture au cytométrie : les différentes méthodes, *Rev. Fr. Lab.* 287(1996) 33-39.
- 15- Marie Héléne Ratinaud Philippe Métézeau, R. Miglierina,. *La cytométrie en flux guide pratique de la préparation à l'analyse*. Presses de l'université de Limoges. 1994. page 60

- 16- Boyum AI- Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. In Lymphocytes, isolation, fractionation and characterization (Natvig J.B., Perlmann P., Wigzell H. Eds), Scand. J. Immunol., 1976, 5, Suppl. 5 : 9.
- 17- Béné MC, Nebe T. et al : Immunophenotyping of acute leukaemia and lymphoproliferative disorders : a consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia*. 2011; 25:567-574.
- 18- Lees O, Les différentes méthodes appliquées dans l'immunophénotypage des cellules sanguines *Revue française des laboratoires*, octobre 1996, N ° 287 39
- 19- Jacob M.C., Favre M., Bensa D.C. - Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry*, 1991, 12 : 550-558.
- 20- Myers L., Wright S., Shults K., Stelzer G. - Cytoplasmic antigen analysis using the Coulter Q-Prep. I.S.A.C abstract 535, *Cytometry*, 1991, 5:101.
- 21- Lanier L.L., Warner N.L. - Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J. Immunol. Methods*, 1981, 47:25-30.
- 22- Pizzolo J.G., Melamed M.R. - Third color CD45 staining of paraformaldehyde-fixed peripheral blood lymphocytes. *Cytometry*, 1996, 23: 67-71.
23. Babcock G.F., Hartman S., Sramkoski R.M., Jackson A.L. - Use of previously fixed leukocytes for immunophenotyping. I.S.A.C abstract 544, *Cytometry*, 1991, 5 : 102.
- 24- Bene MC et al ; automated cell count in flow cytometry a valuable tool to assess CD 4 absolute levels in peripheral blood. *Am J Clin Pathol*. 110. 321 – 326; 1998
- 25- Lacombe F., Durrieu F., Briais A., Dumain P., Belloc F., Bascans E., Reiffers J., Boisseau M.R., Bernard P., Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia, *Leukemia* 11 (1997) 1878-1 886.
- 26- Rainer R.O., Hodges L., Stelzer G.T., CD45 gating correlates with bone marrow differential, *Cytometry* 22 (1995) 139-145.
- 27- Borowitz M.J., Guenther K.L., Shults K.E., Stelzer G.T., Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukaemia blasts in three-color analysis, *Hematopathology* 100 (1993) 534- 540
- 28-Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., *et al.*.Proposals for the classification of the acute leukaemias.French-American-British(FAB) co-operative group.*Br J Haematol*, 1976.33(4): 451-8
- 29 - Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;169–177

- 30-Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2006;24:3904–3911
- 31- M. Cazzola *Blood* 2016. 127 The introduction to a review series: The 2016 revision of the WHO, classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues.
- 32-Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008.
- 33-Pullen J., Shuster J.J., Link M., Borowitz M., Amylon, M., Carroll A. J., *et al.* Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia*, 1999. 13(11): 1696-707)
- 34-Valensi F. Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2003. 13-018-G-05: 7 pages
- 35-Marie christine Jacob, Marc Maynadié, Applications en hématologie et immunologie de la cytométrie, *Revue française d'immunologie.* 2006)
- 36- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 1995.9(10):1783- 1786.
- 37-Xavier Ronot, D. Grunwald, JF. Mayol. Principe de La cytométrie en flux. Edition lavoisier. 2006.
- 38- H. Merle-Béral, M. Le Garff-Tavernier Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux EMC , 2008, Hématologie, 13-000-L-10.)
- 39- Wojciech Gorczyca, Acute myeloid leukaemia , Atlas of differential diagnosis in neoplastic hematopathology, Second edition UK, 2008 , chapter 9, page 411
- 40- Fenaux P, Vanhaesbroucke C, et al. Acute monocytic leukaemia in adults: treatment and prognosis in 99 cases. *Br J Haematol* 1990; 75:41–8
- 41- Garand R, Duchayne E, Blanchard D, Robillard N, Kuhlein E, Fenneteau O, et al. Minimally differentiated erythroleukaemia (AML M6 'variant'): a rare subset of AML distinct from AML M6. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire. *Br J Haematol* 1995; 90:868-75
- 42- Killick S, Matutes E, et al. Acute erythroid leukemia (M6): outcome of bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 1999; 35:99–107)

- 43- Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Zittoun R. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia : proposal of a prognostic score. *Blood*. 2000 Aug 1 ; 96(3) : 870- 7
- 44- Liu L, McGavran L, Lovell MA, Wei Q, Jamieson BA, Williams SA, et al. Non positive terminal deoxynucleotidyl transferase in pediatric precursor B-lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2004;121: 810-5)
- 45- Jouault H. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*, 2002. 344: 25-30
- 46- Borowitz M.J., Béné M.C., Harris N.L., Porwit A., Matutes E. Acute leukaemias of ambiguous lineage. In Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Fourth Ed. Lyon, France : IARC Press, 2008
- 47- Van den Ancker W., Terwijn M., Westers T.M., Merle P.A., van Beckhoven E., Drager A.M., et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO2008 classification. *Leukemia*, 2010.24(7): 1392-6.
- 48- Weinberg O.K., Arber D.A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia*, 2010.24(11): 1844-51
- 49- Peters J.M., Ansari M.Q. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, 2011. 135(1): 44-54
- 50- Merle-Béral H., Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, 2008.13-000-L-10
- 51- Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 2009. 46(1): 100-6
- 52- Kern W., Bacher U., Haferlach C., Schnittger S., Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res ClinHaematol*, 2010.23(3): 379-90.
- 53- SEER Cancer Statistics Review, Site internet:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/ 1975-2007.-Consulté le 27/02/2011.
- 54- Deschler B., Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 2006.107(9): 2099-107.
- 55-Bekadja MA et al. 3^{ème} enquête épidémiologique nationale des leucémies aiguës myéloïdes en Algérie sur une période de 7ans (2011- 2017). 15^{ème} congrès national d'hématologie. (2018) : 22- 23

- 56- Zouaoui. Z Etude épidémiologique nationale des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. Travail coopératif du groupe Algérien d'études des LAL. Revue algérienne d'hématologie N° : 12 (Déc 2016) 5- 9.
- 57- Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Stat Factsheets: Acute Myeloid Leukemia. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2017. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
- 58- McGregor AK, Moulton D, Bown N, Cuthbert G, Bourn D, Mathew S, Dang R, Mounter P, Jones G. Incidence and outcomes for adults diagnosed with acute myeloid leukemia in the north of England: a real world study. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(7):1575–84.
- 59- Andrea Christine et al, The incidence of acute myeloid leukemia in Calgary, Alberta, Canada: a retrospective cohort stud. *BMC Public Health* (2018) 18 :94 .
- 60- Gangatharan SA, Grove CS, P'ng S, O'Reilly J, Joske D, Leahy MF, Threlfall T, Wright MP. Acute myeloid leukaemia in Western Australia 1991-2005: a retrospective population-based study of 898 patients regarding epidemiology, cytogenetics, treatment and outcome. *Intern Med J*. 2013;43(8):903–11.
- 61- Linet MS, Yin SN, Gilbert ES, et al. A retrospective cohort study of cause specific mortality and incidence of hematopoietic malignancies in Chinese benzene exposed workers. *Int J Cancer* 2015; 137: 2184–97.
- 62- Amal S. Ibrahim et al. Cancer Incidence in Egypt: Results of the National Population-Based Cancer Registry Program *Journal of Cancer Epidemiology* Volume 2014, Article ID 437971, 18 pages
- 63- Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Stat Factsheets: Acute Lymphoid Leukemia. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2017. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
- 64- Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Stat Factsheets: Acute Lymphoid Leukemia. Bethesda, MD: National Cancer Institute; UK 2017. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
- 65- Chemicals and industrial processes associated with cancer in humans: an update of IARC monographs volumes 1 to 20. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1979; suppl 1: 15
- 66- IARC. Benzene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, vol 120. Cancérogénicité du Benzene. *Lancet Oncol* 2017. [https://doi.org/10.1016/S14702045\(17\)30832X](https://doi.org/10.1016/S14702045(17)30832X)
- 67- A review of human carcinogens Part F : chemical agents and related occupations. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks hum*. 2012 ; 100F : 249- 94.

- 68- Zhang L, Lan Q, Ji Z, et al. Leukemia related chromosomal loss detected in hematopoietic progenitor cells of benzene exposed workers. *Leukemia* 2012; 26: 2494–98.
- 69- Katarzyna Jarosz. Impact of air pollution in Poland to the incidence of the lung cancer and others cancer in adults (2010-2014). *Review and Research on Cancer Treatment Volume 3, Issue 1* (2017).
- 70- Wang TH et al. Association of Smoking, Alcohol Use, and Betel Quid Chewing with Epigenetic Aberrations in Cancers. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 6;18(6).
- 71- Jacqueline CLAVEL et Jérémie RUDANT. Interactions gène-environnement et leucémies aiguës de l'enfant : analyse de l'enquête ESTELLE. *Anses – Les Cahiers de la Recherche N° 5 - Santé, Environnement, Travail – Novembre 2014.*
- 72- Benzineb. B ; Influence des facteurs pronostiques sur la réponse après une chimiothérapie d'induction dans les leucémies aiguës myéloïdes de novo chez les sujets jeunes en dehors des leucémies aiguës promyélocyaires. *Thèse de DESM. 2017*
- 73- Oukid S et al. Diagnostic des leucémies aiguës non lymphoblastiques par cytométrie en flux. *15ème congrès national d'hématologie (2018): P22*
- 74 - Mounia Elidrissi Errahhali et al. Distribution and features of hematological malignancies in Eastern Morocco: a retrospective multicenter study over 5 years. *BMC Cancer* 2016. 16:159
- 75- Capra M, Vilella L, Pereira WV, Coser VM, Fernandes MS, Schilling MA, Almeida D, Gross M, Leite M, Hellwig T, et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. *Leuk Lymphoma.* 2007;48(12):2381–6.
- 76- Troussard X., Duchenet V., Cornet E., Mouchel D., Malet M., Collignon A. Haematological malignancies: incidence in Basse-Normandie, France, for 1997-2004. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 2009. **57**(3): 151-8.
- 77- Trabzi-Azeli Anissa, Application de l'immunophénotypage à la classification des leucémies aiguës. *Thèse de DESM 1999*
- 78- Garand R Vannier J.P, Bene MC, Faureg B. A correlations between acute lymphoid leukemia immunophenotype and clinical and laboratory data at presentation, *Cancer*, Oct 1, 1989, 64: 1437- 46.
- 79- N Braham Jmili et al. Etude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques : analyse de 152 cas par cytométrie en flux. *Annales de biologie clinique.* Sep- Oct 2009 ; V 67, N° 5 : 543- 51
- 80- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al (1976) Proposals for then classification of the acute leukaemias. French–American–British (FAB) Cooperative Group. *Br J Haematol* 47(4):451–8).

- 81- Imbert M, Jouault H, Tulliez M (1996) Cytologie des leucémies aiguës. Rev Prat 46:23–9
- 82- Valensi F. Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 2003. 13-018-G-05: 7 pages.
- 83- Brionne M., Nowoczyn M. Leucémies Aiguës Myéloïdes - Nouvelle classification OMS. Laboratoire Hématologie - CHU Caen, Avril 2009.
- 84 - Bacher U., Kern W., Schnittger S., Hiddemann W., Schoch C., Haferlach T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in the novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. Ann Hematol, 2005. 84(12): 785-91.
- 85- Mugneret F., Callier P., Favre-16- Audry B. Chromosomal abnormalities in acute myeloid leukaemias. Pathol Biol (Paris), 2003. 51(6): 314-28.
- 86- F. Hariéche ; Immunophénotypage des leucémies aiguës par cytométrie en flux .
Workshop avril 2010
- 87- RO. Casasnovas, FK Slimane, R. Garand , MC Béné et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias. Relevance to patient outcome. Leukemia 2003, 17, 515- 527
- 88- N. Braham- Jmili, H. Sendi- Senana. A. Khelif, A. Saad. Leucémies aiguës myéloïdes en Tunisie : Caractéristiques épidémiologiques et cliniques et classification OMS. J. Afr. Cancer. (2010) 2 : 25- 32
- 89- Ollivier Legrand, Jean-Yves Perrot, Marion Baudard, Annie Cordier, Régine Lautier, Ghislaine Simonin, Robert Zittoun, Nicole Casadevall, and Jean-Pierre Marie. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. Blood, 1 August 2000 x Vol 96, Numb 3.
- 90- S. Oukid ; Immunophénotypage des leucémies aiguës au CAC. Blida. Workshop 2010
- 91- D. Saidi. Immunophénotypage des leucémies aiguës à Oran. Workshop 2010
- 92- David Gomez et al. Acute leukemia characteristics are different around the world. Mexican perspective. Clinical lymphoma, myeloma and leukaemia. 2016
- 93- Xian Yu Yuan. Identification of prognostic subgroups among acute myeloid leukaemia. Leukemia research. China 2015
- 94- Matutes E, Pickl WE, Veer MV, Morilla R, Swansbury J, Stobl H, Attarbaschi A, Hopfinger J, Ashley S, Bene MC, et al. Mixed phenotype acute leukemia (MPAL): Clinical and laboratory features, classification and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008. Blood 2011; 117:3163–3317.
- 95- Rothe G., Schmitz G. for the working Group On Flow Cytometry And Image Analysis, Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic

malignancies, *Leukemia IO* (1996) 877-895. [161 Shah V.O., Civin C.I., Loken M.R., Flow cytometric.

96- Venditti and al. AML-M0 and other FAB subtypes. *Blood*, Vol 89, No 2 (January 15), 1997: 621-629

97- SE. Belakehal et al. Résultats de l'immunomarquage des leucémies aiguës, Expérience du service d'hématologie HCA. 3^{ème} Workshop, HCA 2010.

98- Mansoor Quli Khan*, Soad Ali, Vijay P. Gupta, and Arif Shah. Immunophenotypic Study of Leukaemia Cases. *The Pacific Journal of Science and Technology* , Volume 8. Number 2. November 2007

99- H. Merle-Béral, M. Le Garff-Tavernier. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. EMC 2008. 13-000- L- 10

100- Di Noto R, Mirabelli P, Del Vecchio L. Flow cytometry analysis of acute promyelocytic leukemia: the power of "surface hematology." *Leukemia*.2007; 21:4-8.

101- S. Oukid et al, L'immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes , Expérience du centre CAC Blida. Congrès magrébin d'hématologie.2014 ; Abstract

102- Renate Thalhammer Scherrer et al. The immunophenotype of 325 adult acute leukemias. Relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117: 380- 389

103- MUHAMMAD M. KHURRAM. Frequency of aberrant expression of markers in cases of acute leukemia. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* 2010; 18:2,55-60

104- Luis Cotto Santana et al. Acute myeloid leukemia in Puerto Rico. 10 years retrospective study. *Blood*.2016; 128. 5182.

105- Ihsan M. Osman, Amira A.K Humeida et al. Flow cytometric immunophenotypic Characterization of Acute leukaemia (AML) in Sudan. *International Journal of Hematological disorders*, 2015, Vol. 2, N°1, 10- 17

106- Khalidi Hasan, Jeffrey Medeiros et al. The immunophenotype of Adult Acute myeloid leukemia. High Frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, FAB classification and Karyotypic abnormalities. *Hematopathology*. California. USA. 1997

107- Lacombe F., Durrieu F., Briais A., Dumain P., Belloc F., Bascans E., Reiffers J., Boisseau M.R., Bernard P., Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia, *Leukemia* 11 (1997) 1878-1 886.

- 108- Borowitz.M.J, Guenther KR, Shults KE, Steizer G.T. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right angle light scatter to gate on leukemic blasts in three color analysis. *Hematopathology* 100 (1993) 534 – 540
- 109- Rainer R.O, Hodges L, Stelzer G.T, CD45 gating correlates with bone marrow differential cytometry 22 (1995) 139- 145
- 110- Veronique Latger- Cannard, Nathalie Jamain, Jean Francois Lesesve, Jacqueline Buisine. Immunophénotypage des leucémies aiguës : Utilisation du CD45 en troisième couleur pour améliorer la discrimination des cellules blastiques. *Revue Française des Laboratoires*. Janvier/février 2000, No 319 ; 37- 43
- 111- Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111 : 3941-7.
- 112- Asim Momani et al. Aberrant antigen expression in patients with acute leukemias: Experience of King Hussein medical center in Jordan. *JRMS* June 2016; Vol 23. N° 2
- 113- Nitumani Khakhlari et al .A study of aberrant phenotypes in acute leukemia by flow cytometry. *Int J Med Res Prof.*2016; 2(4); 50-53.
- 114- Mehdi Jahedi et al; Aberrant phenotype in Iranian patients with acute myeloid leukemia. *Advanced pharmaceutical Bulletin*. 2014, 4(1): 43- 47
- 115- Viviana Novoa, Neri A Nunez et al. Immunofenotipos aberrantes en leucemias agudas en una Población Hospitalaria de Buenos Aires. *Medicina* (2013), 73; 9- 13
- 116- Naghmana Mazhar. Aberrant expression of CD markers in acute leukaemia. *Ann. Pak. Inst. Med. Sci.* 2013; 9(2): 99-102
- 117- Bahia DM, Yamanmoto M, Chauffaille ML, Kimura EY, Bordin JO, Flicheiras A, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: A high frequency and its clinical significance. *Hematologica*. 2001, 86: 801- 807
- 118- Béné MC, Cantastoldi G, Knapp W, Ludwig W.D, Matutes E, Orfao A, Van't Veer M.B. European group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995, 9 : 1783- 86
- 119- Brito- Babapulle F, Pullon H et al. Clinico pathological features of acute undifferentiated leukaemia with a Stem cell phenotype .*B J of Haematology*, 1990, 76: 210- 14
- 120- Harièche. F. Données immunophénotypiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. Etude monocentrique de 240 cas. CMPC- Alger. Congrès national d'hématologie. 2011
- 121- Oukid S et al. Profil phénotypique des leucémies aiguës lymphoblastiques au CAC de Blida. Congrès national d'hématologie. 2011

- 122- Oukid S et al, L'immunophénotypage dans les leucémies aiguës lymphoïdes à propos de 123 patients. Poster SFH 2016.
- 123- Ludwig WD, Reiter A, Löffler H et al. Immunophenotypic features of children and adult acute lymphoblastic leukemia : Experience of the german multicentre trials ALL- BFM and GMALL. *Leukemia and lymphoma*; 1994, Vol 13. Suppl 1 : 71 – 76
- 124- Nicola Gökbüget, Alexander Hauswirth, Michael Kneba, Oliver G. Ottmann, Urs Schanz .Germany Classification of ALL in GMALL) February 2012
- 125- Mansoor Quli Khan*, Soad Ali, Vijay P. Gupta, and Arif Shah.Immunophenotypic Study of Leukaemia Cases.The Pacific Journal of Science and Technology, Volume 8.Number 2. November 2007
- 126- MR Khawaja, SS Allana, AN Akbarali, SN Adil, M. Khurshid, S PervezKarachi, Pakistan. Flow cytometric and demographic analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia in Pakistan population. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2005;17(4)
- 127- Hossein Asgarian Omran et al. Immunophenotypic subtyping of leukemia cells from Iranian patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. Association to disease outcome.Iran.J.Immunol.Vol. 4 N°. 1 Winter 2007.
- 128- Boucheix C, David B, Sebban C et al. Immunophenotypic of adult acute lymphoblastic leukemia clinical parameters and outcome : Analysis of a prospective trial including 562 tested patients (LALA 87). *Blood*, Vol 84. N° 5- Sep, 1994 : 1603- 12
- 129- Cabrera ME, Labra S, Ugarte S, Matutes E, Greaves MF. Immunophenotype. Clinical and laboratory features of acute Lym-phoblastic leukemia in Chile. Study of 500 children and 131 adults. *Rev Med Chil*. 1996; 124: 293-9.
- 130 Wiwanitkit V. A summary on the immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in Thailand. *Hematology*. 2005; 10: 35-7.
- 131 : Rego EM, Garcia AB, Viana SR, Falcao RP. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. *Leuk Res*. 1996; 20: 349-55.
- 132- Hamouda F, El-Sissy AH, Radwan AK, Hussein H, Gadallah FH, Al-Sharkawy N. Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukaemia; experience at the national cancer institute, Cairo university, Egypt. *J Egypt Nat Canc Inst* 2006; 19: 87-95.
- 133- A. Lahjouji, F. Bachir, S. Bennani, A. Quessar, S. Amzazi. The immunophenotype of adult T acute lymphoblastic leukemia in Morocco. *Exp Oncol* 2015 37, 1, 64–69
- 134- S. Oukid ; Profil phénotypique des leucémies aiguës lymphoblastiques au CAC. Blida. Congrès national d'hématologie, 2011.

- 135- Fatima Bachir et al. Characterization of Acute lymphoblastic leukemia subtypes in Moroccan Children. *International Journal of pediatrics*.2009
- 136- Adam C. Seegmiller, Steven H. Kroft, Nitin J. Karandikar, and Robert W. McKenna. University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas. Characterization of Immunophenotypic Aberrancies in 200 Cases of B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;132:940-949
- 137- Y.ZERKA, O.CHAFA. Immunophénotypage des LAL de l'enfant. Expérience du CHTS M. Benabadji. Workshop avril 2010
- 138- Gert J. Ossenkoppele, Arjan A. van de Loosdrecht and Gerrit Jan Schuurhuis. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 2011, 153, 421–436
- 139- Sukumaran R, Nair RA, Jacob PM, Nair Anila KR, Prem S, Binitha R, Kusumakumary P. Flow cytometric analysis of Mixed phenotype acute leukemia: Experience from a tertiary oncology center. *Indian J Pathol Microbiol* 2015;58:181-6
- 140- Matutes E, Pickl WE, Veer MV, Morilla R, Swansbury J, Stobl H, Attarbaschi A, Hopfinger J, Ashley S, Bene MC, et al. Mixed phenotype acute leukemia (MPAL): Clinical and laboratory features, classification and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008. *Blood* 2011; 117:3163–3317.
- 141- Reinhard Zenhäusern, Caroline Zwicky, Max Solenthaler et al . Leucémies aiguës de l'adulte en Suisse. *Forum Med Suisse*. N° 29/30 juillet 2003
- 142- Naghmana Mazhar. Aberrant expression of CD markers in acute leukaemia. *Ann. Pak. Inst. Med. Sci.* 2013; 9(2): 99-102.
- 143- Mike Leach, FRCPath, Mark Drummond PhD, FRCPath; *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*, This edition first published by John Wiley & Sons Glasgow, UK : 2013: 81- 82
- 144- Stefan Faderl, Sima Jeha, Hagop M. Kantarjian, *The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia* ; American Cancer Society , *CANCER* October 1, 2003 / Volume 98 / Number 7. 1334- 54).
- 145- Valensi F. Classification des leucémies aiguës : nouvelles approches de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). *Rev Fr Lab* 2002; 344 : 19-24.
- 146- Campos L et al. Surface markers expression in adult acute myeloid Leukemia / Correlation with characteristics, morphology and response to therapy. *B J of Haematology*, 1989; 72: 161- 66).
- 147- Wang JC. Y, Beauregard P et al. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am J of Heamatology*. 1995, 50: 188 – 89

- 148- Van't Veer M.B et al. Acute lymphoblastic leukemia in adults. Immunological sub types and clinical features at presentation. *Annals of hematology*, 1993;66: 277- 282
- 149- Hossein Asgarian Omran et al, Immunophenotypic Subtyping of Leukemic Cells from Iranian Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia: Association to Disease Outcome. *Iran.J.Immunol.* Vol. 4 N°. 1 Winter 2007.
- 150- Shen HQ, Tang YM, Yang SL, Qian BQ, Song H, Shi SW, et al. Immunophenotyping of 222 children with acute leukemia by multi-color flow cytometry. *Zhonghua Erkezazhi.* 2003, 41 (5): 334-7.
- 151- Ihsan M. Osman et al. Flowcytometric Immunophenotypic Characterization of Acute Myeloid Leukemia (AML) in Sudan. *International Journal of Hematological Disorders*, 2015, Vol. 2, No. 1, 10-17
- 152- Kenkichi Kita et al. Clinical importance of CD7 Expression in acute myelocytic leukemia. *Blood*, Vol81, No 9 (May 1). 1993: pp 2399-2405
- 153- Weinberg O.K., Arber D.A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia*, 2010.**24**(11): 1844-51.
- 154- Troussard X., Maarouf N. Biphenotypic leukaemia (BAL) : myth, reality, prospects. *Spectra biologie*, 2006.**152**: 34-38)
- 155- Braham-Jmili N, Omri H, Fekih S, Hizem S, Ben Youssef Y, Ben Mohamed S, et al. Leucémies aiguës biphénotypiques, à propos trois cas. *Feuill Biol* 2006; 271: 65-8.
- 156- Borowitz MJ, Bene MC, Harris NL, Porwit A, Matutes E. Acute leukemia of ambiguous lineage. In: WHO classification of hematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed. IARC, Lyon, France: 2008. pp 150–155.
- 157- Aribi A, Bueso-Ramos C, Estey E, Estrov Z, O'Brien S, Giles F, et al. Biphenotypic acute leukemia. *Br J Haematol.* 2007; 138:213–6.
- 158- Xianfeng Frank Zhao et al; Diagnosis of biphenotypic acute leukaemia: a paradigmatic approach. Baltimore USA. *Int J Clin Exp Pathol* 2010. 3(1). 75- 86
- 159- Bagg, A. Lineage ambiguity, infidelity, and promiscuity in immunophenotypically complex acute leukemias genetic and morphologic correlates. *The American Journal of Pathology*, 2007, 128, 545–548.
- 160- Khoury, H., Dalal, B.I., Nevill, T.J., Horsman, D.E., Barnett, M.J., Shepherd, J.D., Toze, C.L., Conneally, E.A., Sutherland, H.J., Hogge, D.E. & Nantel, S.H.) Acute myelogenous leukemia with t(8;21) – identification of a specific immunophenotype. *Leukaemia & Lymphoma*, 2003 44, 1713–1718.

- 161- Yang, D.H., Lee, J.J., Mun, Y.C., Shin, H.J., Kim, Y.K., Cho, S.H., Chung, I.J., Seong, C.M. & Kim, H.J. () Predictable prognostic factor of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia with t(8:21) after high dose cytarabine or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *American Journal of Hematology*, 2007, 82, 1 – 5.
- 162- Dunphy, C.H et al . Comprehensive review of adult acute myelogenous leukemia: cytomorphological, enzyme cytochemical, flow cytometric immunophenotypic, and cytogenetic findings. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1999, 13, 19–26.
- 163- Medeiros, B.C., Kohrt, H.E., Arber, D.A., Bangs, C.D., Cherry, A.M., Majeti, R., Kogel, K.E., Azar, C.A., Patel, S. & Alizadeh, A.A. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2). *Leukemia Research*, 2010, 34, 594–597.
- 164- Paietta, E., Goloubeva, O., Neuberg, D., Bennett, J.M., Gallagher, R., Racevskis, J., Dewald, G., Wiernik, P.H. & Tallman, M.S. Eastern Cooperative Oncology Group. A surrogate marker profile for PML/RAR alpha expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtype. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 2004, 59: 1–9.
- 165- Nomdedeu, J., Bussaglia, E., Villamor, N., Martinez, C., Esteve, J., Tormo, M., Estivill, C., Queipo, M.P., Guardia, R., Carricondo, M., Hoyos, M., Llorente, A., Junca` , J., Gallart, M., Domingo, A., Bargay, J., Mascaro´ , M., Moraleda, J.M., Florensa, L., Ribera, J.M., Gallardo, D., Brunet, S., Aventin, A. & Sierra, J., on behalf of the Spanish CETLAM Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leukemia Research*, 7, 7. 2010 [Epub ahead of print. Doi:10.1016/ j.leukres.2010.05.015].
- 166- Haferlach, C., Mecucci, C., Schnittger, S., Kohlmann, A., Mancini, M., Cuneo, A., Testoni, N, Rege-Cambrin, G., Santucci, A., Vignetti, M., Fazi, P., Martelli, M.P., Haferlach, T. & Falini, B. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*, 2009, 114, 3024–3032.

ANNEXES

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE DES PATIENTS INCLUS DANS L'ETUDE DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Consentement à lire, à expliquer son contenu avant de le signer.

Ne pas hésiter à poser des questions si certains aspects semblent peu clairs ou si des précisions supplémentaires semblent nécessaires.

Intitulé de l'étude : **L'immunophénotypage des leucémies aigues par cytométrie en flux.**

Lieu de réalisation : laboratoire du service d'hématologie du CHU de Sétif

Nom du Médecin : Dr **Hamouda Hakim**

Patient(e) : Nom et Prénom :

Age : **Origine/ adresse** : **Sexe** : **M - F**

INVITATION A PARTICIPER :

Je déclare avoir été informé(e), oralement et par écrit, de la manière la plus simple qui soit et dans la langue ou le dialecte que je maîtrise le mieux par le médecin indiqué ci-dessus, des objectifs et / ou du déroulement de l'étude concernant :

L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.

Je certifie avoir lu et/ou compris l'information orale et écrite qui m'a été remise sur cette étude.

J'ai reçu des réponses satisfaisantes aux questions que j'ai posées sur ma participation à cette étude.

J'ai été informé(e) que cette étude portera exclusivement sur des échantillons de sang et moelle osseuse que je dois subir systématiquement pour une raison de diagnostic de routine de la maladie et qui seront utilisés pour cette étude sans recours à une nouvelle prise de sang et ou de moelle osseuse.

J'ai été informé(e) de la possibilité de poursuivre tous mes traitements antérieurs.

J'ai été informé(e) du caractère facultatif des analyses médicales prévues dans cette étude, que je peux accepter ou refuser sans aucune conséquence sur mon suivi médical.

Bienfaits : J'ai compris que ma participation à cette étude permettra plus de précision dans le diagnostic, aide à l'avancement de la recherche et du savoir.

Confidentialité et anonymat : Je sais que mes données personnelles ne pourront être communiquées que sous une forme anonyme.

Conservation des données : J'ai reçu les garanties que les échantillons biologiques recueillis seront utilisés exclusivement pour cette étude ainsi que les résultats des analyses biologiques seront conservés de façon sécurisée.

Participation volontaire : Je prends part de façon volontaire à cette étude. Je peux avec toute liberté et sans avoir à fournir de justification, révoquer mon consentement à participer à cette étude, sans pour cela en subir quelques inconvénients que ce soit dans mon suivi médical ultérieur.

Acceptation :

Je déclare, accepter de mon plein gré de participer à cette étude et je n'ai subi aucune contrainte pour donner mon consentement.

En lieu et date :

Signature du patient/ de la patiente

ATTESTATION DU MEDECIN RESPONSABLE

Entant que médecin responsable de cette étude, je m'engage à mener cette étude selon les dispositions éthiques et déontologiques, à protéger l'intégrité physique, psychologique et sociale des personnes tout au long de l'étude.

J'atteste par ma signature avoir expliqué à ce/ cette patient/e la nature, l'importance et la portée de cette étude.

En lieu et date :

Signature du médecin

Dr Hamouda. H

FICHE TECHNIQUE DE LA CMF DANS LES LEUCEMIES AIGUES

(Données épidémiologiques, cliniques, biologiques, cytologiques)

Nom : Prénom : Age : Sexe : M / F
Adresse : W/ Profession :
Date Diagnostique : / / FC N° : / 20....
CDD :

► **Caractéristiques cliniques :**

PS : 0 1 2 3 4

Pâleur : Oui (Préciser degré) : Non Ictère : Oui / Non

Syndrome hémorragique :

Cutané : Type :

Muqueuse : Non/Oui (préciser) :

Autres types d'Hgie :

Syndrome tumoral :

Douleurs osseuses : Oui Non

ADP : Non Oui : localisée si Oui : Siège
Généralisée :

SPM : Non Oui : Stade / Taille(DS : cm)

Autres signes tumoraux :

Syndrome infectieux :

Fièvre : Non Oui :

Foyer infectieux : Non Oui (Préciser) :

Type de l'infection :

► **Données hématimétriques :**

Hb : VGM : fl CCMH..... % Plaquettes : G/ L

GB : G/l PNN : VA : Lymphocytes :

Monocytes : Autres éléments :

► **Données cytologiques :**

● **Données du sang :** Blastes circulants (%) :

Type de blastes circulants : Myéloïdes : Lymphoïde Autres :

● **Données de myélogramme :**

% De blastes : Type de Blastes :

Mégacaryocytes : Présents Rares Absents

Granuleux (%)..... Erythroblastés (%)..... Autres :

Dysplasie Granuleuse : Oui Non Dysplasie Erythroïde : Oui Non

► **Données cytochimiques** (Noir soudan B) : Négatif :... Positif (%)

◆ **CLASSIFICATION FAB :**

LAM (Type) : LAL (Type) :

LA Indifférenciée :

**FICHE TECHNIQUE DES DONNEES IMMUNOPHENOTYPIQUES
DES LEUCEMIES AIGUES PAR CMF**

► **Données de la CMF**

Type d'échantillon : Sang Moelle osseuse

Taille des blastes (%) en FS / SS :

Taille des blastes (%) en SS/ 45 :

CD	Expression%	Positif : 1 Négatif : 0	CD	Expression%	Positif : 1 Négatif : 0
CD45			CD79a cy		
CD34			CD19		
HLA DR			CD22		
TDT	NT	NT	CD10		
			CD20		
CD117			IgMc		
CD 13			Ig k/ λ		
CD33			CD 3cy		
MPOcy			CD3 s		
CD15			TCR		
CD16	NT	NT	CD2		
CD14			CD7		
CD64			CD5		
CD11c			CD4		
GPA			CD8		
CD41			CD1a		
CD61			CD56		
CD42			CD38		

DIAGNOSTIC RETENU PAR CMF

LAM (Type) :

LAL : Phénotype B / Type (EGIL):

Phénotype T / Type (EGIL) :

LA Biphénotypique (Type) :

Concordance entre FAB et CMF : OuiONon O

Tableaux : Les principaux CD utilisés pour le diagnostic en hématologie

Tab A

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD1	Thymocytes corticaux	Super famille des Ig	LAL T III, Histiocytoses à Cell de langerhans
CD2	Ly T, NK	Super famille des Ig Molécule d'adhésion	LAL T sauf T I, SLP T, Qlqs cas de LAM avec inv(16) Mastocytoses néoplasiques
CD3	Ly T	Super famille des Ig Associé au TCR sur la membrane des LT mature Expression cytoplasmique aux stades précoces de différenciation T	LAL T (Expression cytoplasmique) SLP T
CD4	Ly T Helper Monocytes (+ faible)	Super famille des Ig Reconnaissance du CMH de classe II	LAL T sauf T I SLP T Leucémie à Cell plasmocytes dendritiques Qlqs cas de LAM à différenciation monocyttaire
CD5	Ly T Cell de l'immunité innée B1	Super famille des récepteurs de type scavenger receptor Molécule d'adhésion	LAL T sauf T I SLP T Certains SLP B(LLC, LNH zone de manteau)
CD7	Ly T, NK	Super famille des Ig Molécule d'adhésion	LAL T, SLP T, Qlqs LAM de mauvais Pc
CD8	Ly T cytotoxique	Super famille des Ig Reconnaissance du CMH de classe I	LAL T sauf T I Qlqs SLP T
CD9	Ubiquitaire	Tetraspanine Adhésion et migration cell	LAL B LAM 3 Variante

Tab B

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD10	Hématogonies, PNN, Cellules épithéliales intestinales et rénales Précurseurs B et T Sous Pop B et T	Famille des métallo-protéases Ectopeptidase	LAL B sauf B-I(- Ag CALLA) Lymphome folliculaire Phénotype centrogerminatif
CD11a CD11b CD11c	Lymphocytes, PNN, Monocytes	Famille des intégrines	CD 11a est absent des LAM 3 CD11c : est+++ dans HCL
CD13	Cell myéloïdes, monocytes, Cell épithéliales intest et rénales	Famille des métallo- endopeptidase Ectopeptidase	LAM Ag aberrant de certaines LAL
CD14	Monocytes	Famille des protéines riche en leucine Protéine GPI ancrée	LAM 4 et LAM 5 FAB
CD15	Granuleux , Expression + faible sur les monocytes	Carbohydrate Antigène lewis -x	LAM Qlqs LAL B
CD16	PNN, Cell NK, une partie monocytes	Super famille des Ig Protéine GPI ancrée	SLP NK Exceptionnel dans les LAM
CD19	Ly B	Super famille des Ig Associée au BCR	LAL B , SLP B, Qlqs LAM

Tab C

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD20	Ly B	Molécule transmembranaire (tétraspanine), canal ionique	Qlqs LAL B La plupart des SLP B
CD22	Ly B	Super famille des Ig Sialoadhésine	LAL B (parfois intra cytop) LLC : expression faible
CD23	Sous pop de Ly B	Famille de lectines de type C Récepteur de faible affinité pour les IgE Facteur de croissance des LB	LLC
CD24	Ly B, PNN	Petit peptide de 12 aa Marqueur de différenciation B	LAL B
CD25	Ly T activés, Ly T reg	Famille des récepteurs de cytokine chaîne α du récepteur à l'IL-2	HCL Mastocytoses néoplasiques
CD26	Ly T activés	Peptidase, Co-récepteur VIH	Absent des cell de Sézary
CD 30	Ly T activés	Famille des récepteurs du TNF Molécule de signalisation	Lymphome T anaplasique à Grdes Cell, HDK
CD33	Monocytes, Cellules myéloïdes immatures	Super familles des Ig Molécule d'adhésion	LAM Expression aberrante dans certaines LAL
CD34	Pro géniteurs	Sialomucine Molécule d'adhésion	LAL LAM

Tab D

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD35	Erythrocytes, PNN, PNE, monocytes, LyB	Famille des régulateurs de complément	LAM
CD36	Monocytes, lignée érythrocytaire, lignée mégacaryoblastique	Super famille des récepteurs de type scavenger receptor Molécule d'adhésion	LAM LAM 6 FAB
CD38	Lymphocytes activés, monocytes, Hématogonies, plasmocytes	Ectoenzyme, ADP ribosyl cyclase Activation cellulaire et transduction du signal	Qlqs LAL et LAM Proliférations plasmocytaires Facteur péjoratif de la LLC
CD41 CD42 CD61	Plaquettes, mégacaryocytes	GP IIb, GP Ib, GP IIIa, intégrines (41 et 61), mucine(42) impliquées dans l'hémostase et la coagulation	LAM 7 FAB
CD43	Lymphocytes	Leucosialine Molécule d'adhésion	Surexpression dans la LLC
CD45	Marqueurs panleucocytaires	Tyrosine phosphatase Signalisation	Discrimination des sous populations leucocytaires avec le Cells Side scatter(SSC)

Tab E

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD52	Lymphocytes	Petit peptide de 12 aa Fonction inconnue	LAL SLP
CD56	NK, Cell plasmocytoides dendritiques	Super familles des Ig Molécule d'adhésion	LAM Proliférations plasmocytaires Monocytes dystrophiques Qlqs carcinomes
CD57	NK, L T CD8+ activés	Carbohydate	LGL
CD58	Toutes les Cell nucléés	LFA- 3 Molécule d'adhésion	MRD des LAL
CD64	Monocytes Hématogonies	Super familles des Ig FcyRI	LAM avec différenciation monocyttaire, certaines LAM3
CD65	PNN	Carbohydate	Qlqs LAM Qlqs LAL B
CD68	PNN, monocytes	Superfamille des récepteurs de type Scavenger Receptor Compartiment lysosomal	Qlqs LAM
CD71	Cell érythrocytaires, Cell proliférantes	Récepteur de la transferrine	La plupart des LA LAM 6 FAB
CD79	Lymphocytes B	Composant du BCR Expression membranaire du BCR Transduction du signal	Cell lymphoïdes B

Tab F

CD	Expression cellulaire	Famille moléculaire, fonction	Utilisation pour le diagnostic
CD94	NK	Récepteur de type Killer lectine - like	NK
CD99	Ly T, Thymocytes	MIC2 Activation du Ly T	MRD des LAL
CD103	Ly B	Integrine αE Molécule d'adhésion	Leucémie à tricholeucocytes (HCL)
CD117	Pro géniteurs myéloïdes, Mastocytes	Super familles des Ig Récepteur du SCF Tyrosine kinase	LAM Mastocytose Plasmocytes normaux
CD123	PN Basophiles Cell plasmocytoides dendritiques	Famille des récepteurs de l'EPO Chaîne α du récepteur à IL- 3	Qlqs LAM (+ spécifique des Cell souches leucémiques) Qlqs LAL B Cell plasmocytoides dendritiques
CD133	Pro géniteurs myéloïdes	Molécules transmembranaires, prominin -1 Organisation de la membrane plasmique	LAM LAL
CD158	NK	Récepteur spécifique CMH-I des NK	NK
CD200	Lymphocytes activés	Super famille des Ig Molécule d'adhésion	Différencie la LLC du LNH du manteau
CD235a	Cellules érythroïdes	Glycophorine A	LAM 6 FAB

LISTE DES TABLEAUX

Tab. I	Données statistiques analysés à distance de l'acquisition par Win MDI 2.9	10
Tab. II	Degré d'excitation et d'émission des tandems	13
Tab.III	Classification FAB: Aspects morphologiques des 8 variétés de LAM	33
Tab. IV	Classification FAB (French- American- British) des LAL	38
Tab. V	Classification OMS des LAM 2008 révisée en 2016	40
Tab.VI	Correspondance OMS 2008 et FAB	40
Tab.VII	Marqueurs complémentaires de l'analyse des LA	43
Tab.VIII	Profil immunophénotypique des LAM selon EGIL	46
Tab. IX	Classification immunophénotypique des LAL B selon EGIL	47
Tab. X	Classification immunophénotypique des LAL T selon EGIL	48
Tab. XI	Classification EGIL des LAL T	48
Tab.XII	Système du score de l'EGIL pour les LA biphénotypiques (LAB)	49
Tab. XIII	Classification OMS 2008 : leucémies aiguës de lignée ambiguë	50
Tab.XIV	Panel d'anticorps monoclonaux 4 couleurs spécifique à la leucémie aigue	56
Tab. XV	Données statistiques des populations fenêtrées en CD45/ SS	60
Tab.XVI	Caractéristiques cliniques des leucémies aiguës	64
Tab. XVII	Aspects cliniques des leucémies aiguës lymphoblastiques B et T	65
Tab. XVIII	Moyenne d'immunofluorescence (MIF) des marqueurs myéloïdes et d'immatunité	84
Tab.XIX	Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et sous types de LAM	86
Tab. XX	Concordance entre classification FAB et CMF	89
Tab.XXI	Répartition des antigènes aberrants et leur fréquence dans les LAM	89
Tab. XXII	Relation entre classification FAB et données de la CMF dans la LAL B	116
Tab. XXIII	Relation entre la classification FAB et les données de la CMF dans la LALT	116
Tab. XXIV	Corrélation selon le degré de positivité des marqueurs et sous types de LALB	117

Tab. XXV	Corrélation selon le Degré de positivité des marqueurs et sous types de LALT	117
Tab. XXVI	Résultats morphologiques, cytochimiques et Immunophénotypiques des LAB	119
Tab. XXVII	Fréquence de la LAM 0 peu différenciée et séries publiées	123
Tab. XXVIII	Fréquence des LAM 1 - LAM 2 dans différentes séries publiées	124
Tab. XXIX	Fréquence de la LAM3 dans différentes études	124
Tab. XXX	Fréquence des LAM 4 et LAM5 dans différentes séries	125
Tab. XXXI	Fréquence des LAM6 et LAM7 dans différentes études	126
Tab. XXXII	Expression des aberrants CD7 - CD2 dans les LAM et séries publiées	128
Tab. XXXIII	Expression du CD56 et séries publiées	129
Tab. XXXIV	Expression des aberrants CD19-CD22- CD10 dans les LAM et séries publiées	129
Tab. XXXV	Répartition des LAL B - LAL T et séries publiées	131
Tab. XXXVI	Aberrants myéloïdes et lymphoïdes T dans les LAL B et séries publiées	132
Tab. XXXVII	Répartition des sous types de LAL B et séries publiées	133
Tab. XXXVIII	Aberrants myéloïdes et lymphoïdes B dans les LAL T et séries publiées.	134
Tab. XXXIX	Répartition selon EGIL des LAL T et séries publiées	134
Tab. XL	Leucémie aigue biphénotypique et revue de la littérature	135

LISTE DES FIGURES

Fig.1	Principe d'hydro focalisation et mouvements de particules dans la veine liquide	5
Fig.2	Schéma général du principe d'analyse par cytométrie en flux	6
Fig.3	Schéma du principe d'excitation et d'émission de la fluorescence multiparamétrique	6
Fig.4	Cytogramme biparamétrique des cellules du sang normal en taille (FSC) et Structure (SSC)	7
Fig.5	Différents types de filtres utilisés en CMF	8
Fig.6	Paramètres mesurables de l'impulsion	9
Fig.7	Fluorochromes et leurs spectres (nm) d'excitation et d'émissions	13
Fig.8	Réglage des PMT et seuil sur cellules sanguines normales non marquées	14
Fig.9	Ajustement de l'autofluorescence sur cytomètre 4 couleurs	14
Fig.10	Chevauchement des spectres d'émissions des FITC, PE et RD (red texas)	15
Fig.11	Compensation de la fluorescence FITC/ PE	16
Fig.12	Compensation de la fluorescence PE/ FITC	16
Fig.13	Histogramme monoparamétré	17
Fig.14	Histogrammes biparamétré (Dot Plot, Densité Plot)	17
Fig.15	Gating d'une population (R2) puis d'une sous population blastique(R3)	18
Fig.16	Répartition des cellules de la moelle normale en FSC/SSC et 45/SSC	30
Fig.17	Intérêt de discrimination du CD45/SSC vs FSC/SSC	31
Fig.18	Aspects morphologiques d'une LAM 0 au MGG	33
Fig.19	Aspect morphologique et cytochimique d'une LAM1	34
Fig.20	Myéloblastes différenciés dans la LAM2	34
Fig.21	LAM3 au MGG (a) la forme classique avec fagots et (b) la variante (M3v)	35
Fig.22	Aspects morphologiques des LAM4	36
Fig.23	Aspects morphologique d'une LAM5	36

Fig.24	Aspect cytochimique d'une LAM5	36
Fig.25	Aspect d'une LAM6 : forme de M6 avec Erythroblastes vacuolés	37
Fig.26	Aspect d'une LA mégacaryocytaire LAM7 avec des pseudopodes cytoplasmiques	37
Fig.27	Aspects morphologiques des LAL :LAL2 et LAL3	38
Fig.28	Expression du clone de promyélocytes LAM3 et LAM 3v en CD45/ SS	44
Fig.29	Profil phénotypique par CMF d'une LAM 7	45
Fig.30	Contrôle de qualité du cytomètre EPICS XL par Flow check	58
Fig.31	Image du logiciel WIN MDI 2.9	58
Fig.32	Logiciel WIN MDI 2.9 avec LMD (données d'un patient)	59
Fig.33	Analyse d'un dot plot par logiciel WIN MDI 2.9	59
Fig.34	Répartition des patients par wilaya de résidence	61
Fig.35	Répartition selon la profession	62
Fig.36	Répartition selon le sexe	62
Fig.37	Répartition des leucémies aiguës par tranche d'âge	63
Fig.38	Répartition des taux d'hémoglobine dans les LAM et les LAL	66
Fig.39	Répartition des plaquettes dans les LAM et les LAL	66
Fig.40	Répartition des GB dans les LAM et les LAL	67
Fig.41	Répartition des leucémies aiguës selon FAB	67
Fig.42	Répartition des types de leucémies aiguës LAM et LAL selon FAB	68
Fig.43	Résultats de la coloration au Noir soudan	68
Fig.44	Aspects iconographiques des LA : M0, M1, M2 et LAM3 au MGG	69
Fig.45	Aspects iconographiques des LA : M4 – M5 et LAL au MGG	70
Fig.46	Degré d'utilisation des marqueurs myéloïdes et d'immaturation dans les LAM	71
Fig.47	Profil phénotypique de la LAM0	73
Fig.48	Profil phénotypique de la LAM1	75

Fig.49	Profil phénotypique de la LAM2	77
Fig.50	Profil phénotypique d'une LAM3	79
Fig.51	Profil phénotypique de la LAM4	81
Fig.52	Profil phénotypique de la LAM5	83
Fig.53	Degré de positivité des marqueurs myéloïdes et d'immatunité dans les LAM	85
Fig.54	Degré de positivité des marqueurs myéloïdes en monomarquage et en marquage combiné dans les LAM	85
Fig.55	Répartition des leucémies aiguës myéloïdes par CMF	86
Fig.56	Apport du CD45 dans la sélection de la population blastique	87
Fig.57	Clone de blaste en taille /structure versus SS/45	88
Fig.58	Corrélation entre taux de blastes en microscopie et en CMF (45/SS)	88
Fig.59	Marqueurs lymphoïdes et d'immatunité testés dans les LAL	90
Fig.60	Profil phénotypique de la LAL B de type I (Pro-B)	93
Fig.61	Profil phénotypique de LAL B de type II (Pré-Pré B)	96
Fig.62	Profil phénotypique de LAL B de type III (Pré- B)	99
Fig.63	Profil phénotypique de LAL B type IV (mature)	102
Fig.64	Profil phénotypique de la LAL T de type I(Pro-T)	104
Fig.65	Profil phénotypique de la LAL T de type 2(Pré-T)	106
Fig.66	Profil phénotypique de la LAL T de type III (Corticale)	109
Fig.67	Profil phénotypique de la LAL T de type 4 (Mature)	112
Fig.68	Répartition des leucémies aiguës lymphoblastiques par CMF	113
Fig.69	Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes dans la LAL B	114
Fig.70	Classification des LAL B selon EGIL	114
Fig.71	Degré de positivité des marqueurs lymphoïdes dans la LAL T	115
Fig.72	Classification des LAL T selon EGIL	116

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
Ad : Adulte
ACD : Acide Citrate Dextrose
AcM : Anticorps monoclonal
ADC : analogic to digital converter
Ag : Antigène
APC : Allophycocyanine
APC : Cy7 : Allophycocyanine / Cyanine 7
BC: Beckman coulter
BD: Becton-Dickinson
BOM: biopsie ostéo- médullaire
CA : Corps d'Auer
CAC : centre anti- cancer
CALLA : Common antigen lymphoid leukemia acute
CD: Clusters de différenciation
cCD3: CD3 intra cytoplasmique
cCD79a: CD79a intra cytoplasmique
CD45 : marqueur panleucocytaire
cIgM: Immunoglobine M intra cytoplasmique
CIVD : Coagulation intra vasculaire disséminée
CMF : Cytométrie en flux
CPMC : Centre pierre marie et curie
CV : coefficient de variation
Dot plot : Histogramme
EDTA : Ethylène Diamine Tetra acetic Acid
Eft : Enfant
EGIL: European Group for the immunological Characterization of leukemias
ELN: European leukemia net
FAB: franco-Américano- Britannique
FACS: fluorescence activated cell sorter
FITC: fluorescéine isothiocyanate
FL: Fluorochrome
FSC: Forward scatter
GB : Globules blancs
GBEA : Guide de bonne exécution des analyses médicales
GPA: Glycophorine A
GR: Globules rouges
Early T : T précoce
HBSS: Hank's balanced salt solution
HCA : Hôpital central de l'armée

HCL: Hairy cells leukaemia
Hcl: Acide chlorhydrique
HDK: Maladie de Hodgkin
HLA: Human leucocytes antigen
HPM : Hépatomégalie
IgMc : IgM intracytoplasmique
IFM : l'intensité de fluorescence moyenne
Ig s : immunoglobulines de surface
Inv 16: Inversion du chromosome 16
ISAC: international society of analytical cytology
κ: Chaîne légère Kappa
LA : Leucémie aigue
LAI : leucémie aigue indifférenciée
LAM : Leucémie aigue myéloïde
LAL : Leucémie aigue lymphoïde
LAL B : LAL de phénotype B
LAL T : LAL de phénotype T
LA B : Leucémie aigue Biphénotypique
LAM 3v : LAM 3 variante
LAM 4 eos : LAM 4 à Eosinophile
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LCA : Leukocyte Common antigen
LLC: leucémie lymphoïde chronique
LNH : Lymphome non Hodgkinien
Ly B : Lymphocyte B
Ly T : Lymphocyte T
λ: Chaîne Lambda
μc: Chaîne mu intracytoplasmique
MGG : May Grunwald Giemsa
MIF : intensité moyenne de fluorescence
MLB : marqueurs lymphoïdes B
MLT : marqueurs lymphoïdes T
MM : marqueurs myéloïdes
MO : Moelle osseuse
MPAL : Leucémie aigue phénotypiquement mixte
MPO : Myélopéroxydase
MPOc : Myélopéroxydase intracytoplasmique
MRD : Minimal residual disease
MRD : Maladie résiduelle : Minimal residual disease
MSL : Milieu de séparation de lymphocytes
MW : Milli wat
Nacl : Chlorure de sodium
NaF: fluorure de sodium
NASDA : naphtol-ASD-acétate

Nb : Nombre
NK : Natural Killer
Nm : nanomètre
NS : Noir soudan
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAS : acide périodique Schiff
PBS : Phosphate buffered salin
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDi : photodiodes
PD : photo détecteurs
PE : Phycoérythrine
PE/ TR: Phycoérythrine/ Texas red
PE/ Cy-5 : Phycoérythrine / Cyanine 5
PE/ Cy- 7 : Phycoérythrine / Cyanine 7
PerCP : Peridinine chlorophylle-protéine
PMT : Photomultiplicateur
PNN : Polynucléaire neutrophile
QSP : Quantité suffisante pour
R : Région
PS : performans status
SFH : Société française d'hématologie
sIg: Immunoglobine de surface
sIgM: Immunoglobine M de surface
SLP : Syndrome lymphoprolifératif
SMD : syndrome myélodysplasique
SMP : Syndrome myéloprolifératif
SPM : Splénomégalie
SS : Side scater
SSC : Side scatter
SVF : Sérum de Veau fœtal
TdT: Terminale désoxynucléotidyl transférase
UV : Ultra violet

RESUME

La présente étude a porté sur 176 échantillons de patients présentant des leucémies aiguës de novo diagnostiqués morphologiquement.

L'immunophénotypage par CMF avec un large panel d'AcM a permis de conforter le diagnostic de 111(91%) cas de LAM, 49(28%) cas de LAL et déterminer le type et la lignée de 12(7%) cas de LA indifférenciées.

Dans les LAM, le degré de positivité des marqueurs myéloïdes est fort. Il varie de 72 % à 90% en monomarquage et de 57% à 63% en marquage combiné. L'expression des marqueurs CD34 et HLADR est quant à elle située entre 57% et 72%. La répartition des LAM met en évidence les formes les plus fréquentes, représentées par les LAM2 et LAM4 dont les taux sont de 26% chacune, suivies des LAM1 (17%), LAM3 (17%), LAM5 (8%) et l'identification de 7 cas de LAM0 soit un taux de 6%. Les formes de LAM6 et LAM7 n'ont, par contre, pas été mises en évidence. L'étude de corrélation entre les sous types des LAM et le degré d'expression des AcM montre une spécificité statistiquement significative de certains marqueurs par rapport à d'autres. Outre les marqueurs CD13 et CD33 qui sont d'expressions similaires, on retrouve la MPO dont l'expression est forte pour tous les types de LAM exceptées la LAM5 où elle est faible (33%) et nulle dans la LAM0. Pour le CD117, sa positivité est modérée dans la LAM3 (52%) et faible dans la LAM5 (33%). Les marqueurs CD14, CD64 et CD11c par leurs spécificités monocytaires sont fortement positifs dans les LAM4 et les LAM5. L'expression des marqueurs aberrants dans les LAM est retrouvée dans 31% des cas, les plus fréquents sont le CD7(15,6%), le CD2(13%) et le CD56 (12,5%). Les expressions des autres marqueurs sont faibles.

Parmi les 50 cas de LAL, 30(60%) sont des LALB et 19 (38%) des LALT tandis qu'un cas (2%) est inclassable. Dans les LALB, le CD10, la chaîne mu (IgMc) et les Igs sont corrélés respectivement avec les types BII, BIII et BIV. Pour les LAL T, il y a corrélation du CD1a avec les (TIII) et le CD3s avec les (TIV). Les CD2 et/ou CD5 par leur positivité différencient le sous type TII du TI. Selon l'EGIL, parmi les LALB, on note une fréquence de la forme commune type II (63%) suivie du type III (20%), puis du type I (10%) et type IV (7%). Dans la LALT, les marqueurs aberrants sont représentés par le CD13(32-43%) et le CD117 (4-5%) dans les deux types de LAL, par le CD7(5%) et le CD2(12%) dans les LALB et par le CD33(5%) et le CD10(37%) dans les LALT.

La LAB est retrouvée dans 4(2,3%) cas dont 2 LAB B/T, 1 LAB My/B et 1 LAB My/T.

Mots clés : Cytométrie en flux, Immunophénotypage, Leucémies aiguës, Anticorps monoclonaux, Classification EGIL.

Directeur de thèse : Professeur Hamdi-Lezzar Selma

Chef de service Hématologie

Centre hospitalier universitaire Saadna Abdenour de Sétif

Auteur : Docteur Hamouda Hakim

Maitre assistant en hématologie

Service d'hématologie – CHU de Sétif