

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

FACULTE DE MEDECINE

Département de Pharmacie

THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat En Sciences Médicales.

**Application de la cytométrie en flux multiparamétrique à
la détection de la maladie résiduelle dans les leucémies
aigues lymphoblastiques de l'enfant**

Soutenue par : **Dr HADDAD Nabila**

Maitre assistante en Hémobiologie- Transfusion sanguine. CHU Blida

Directeur de Thèse :

Professeur BRADAI Mohamed

Chef de service d'Hématologie. CAC Blida.

Devant les membres du jury

Pr BOUDJERRA Nadia	Présidente	Professeur en Hématologie
Pr KEDJI Leila	Examinatrice	Professeur en Pédiatrie
Pr BOUCHEDOUB Youssef	Examineur	Professeur en Immunologie
Pr LARFI Yacine	Examineur	Professeur en Hémobiologie

07 juillet 2021

Remerciements

A mon Directeur de thèse, Monsieur le Professeur BRADAI Mohamed,

Merci de m'avoir accordée votre confiance et d'avoir accepté de m'encadrer.

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre service, et avoir réuni toutes les conditions pour que ce travail aboutisse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance, de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur BOUDJERRA Nadia, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et à qui nous exprimons notre profond respect et nos sincères remerciements.

A Madame le Professeur KEDJI Leila, je suis très honorée de vous compter parmi les membres de ce jury. Je vous remercie d'avoir accepté l'évaluation de ce travail.

A Monsieur le Professeur LARFI Yacine, vous me faites l'honneur de siéger parmi le jury de cette thèse. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous portez à ce travail et d'accepter l'expression de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur BOUCHEDOUB Youssef, merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant de faire partie de mon jury et de juger mon travail.

Je remercie tout particulièrement,

Monsieur le Professeur MEGHLOUI Ali, ancien Chef d'unité d'immunologie au CHU BLIDA. J'ai beaucoup appris auprès de vous, votre disponibilité et votre rigueur scientifique sont un exemple pour nous. Nous vous considérons comme le père fondateur de l'immunologie et de toute la biologie médicale à Blida. Merci pour votre aide et vos conseils précieux. Je vous prie de croire, à ma profonde reconnaissance et à mes sentiments les plus respectueux.

Monsieur le Professeur DJIDJIK Réda, chef de service d'immunologie du CHU Béni-Messous et toute son équipe pour leur aide, en particulier Dr BELAID Brahim et la biologiste ZINEB.

L'équipe médicale de l'unité d'oncologie du service de pédiatrie du CHU Blida en particulier Dr GUEMGHAR Samia, Dr AIT SAADI Nadia et Dr SAADOUNI Ryma. Merci d'avoir accepté de collaborer pour la réalisation de ce travail.

L'équipe médicale de l'unité d'oncologie du service de pédiatrie B du CHU Béni-Messous en particulier le Chef de service Pr CHERIF Nacira et Dr KHEMISSI Warda, ainsi que Dr MOHAND OUSSAID Aida du service de Pédiatrie A. Merci d'avoir accepté de collaborer pour la réalisation de ce travail.

L'équipe médicale du service d'hématologie du CAC de Blida : Professeurs, maitres assistants, assistants et résidents, en particulier Pr ABAD, Pr TAOUSSI, Pr OUKID, Pr LAMRAOUI, Pr BOUCHAKOUR, Pr GUEZLANE, Dr BELABIOD, Dr REKAB, Dr BRAHIMI, Dr BOUCHERIT et Dr ZIANI.

Tout le personnel du laboratoire du service d'hématologie du CAC de BLIDA, en particulier Mr BENALIOUAT Yacine, Mme LAARADJ Kheira et Dr BOUCHAREF Asma.

Tous les infirmiers, secrétaires et agents du service d'hématologie du CAC de BLIDA que j'ai croisé durant mon travail. Merci pour votre accueil et votre gentillesse.

L'équipe du service d'épidémiologie du CHU de Blida : Monsieur le Professeur BEZZAOUCHA Abdeljalil et Monsieur le Professeur BOUAMRA Abderezak. Merci de nous avoir initié à la lecture critique d'articles médicaux et à l'analyse statistique sur le logiciel SPSS.

Madame le Professeur TALBI May, ancienne Chef de service du laboratoire central du CHU de BLIDA.

Mon Chef de service Madame le Professeur ABDI Samia, et tous mes collègues et amis du laboratoire central du CHU de BLIDA.

Tout le personnel paramédical du laboratoire de l'unité Hassiba BENBOUALI du CHU de BLIDA, en particulier Mr KHERBACHE Mohamed.

Madame le Professeur Elisabeth MACINTYRE, ancienne Chef de service du laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, Merci de m'avoir accordé cette chance de formation au sein de votre service.

Monsieur Dr Ludovic LHERMITT MCU-PH, responsable du secteur cytométrie au laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, pour sa gentillesse, son encadrement et sa générosité scientifique.

Tous les techniciens du secteur de cytométrie au laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France: Mr Bernard, Mme Danielle, Mme Naima, Mme Aurore, Melle Aurore, Mr Jean marie et Melle Noémie, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur participation à ma formation.

Monsieur le Professeur Vahid ASNAVI, Chef de service du laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, Merci de m'avoir accordé le stage de perfectionnement au sein de votre service, merci pour votre enseignement et votre bonne humeur.

Madame Fathia GAUTHIER, secrétaire médicale et administrative du laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Madame Dr Chantal BROUZE, responsable du secteur cytologie au laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, pour sa gentillesse et sa participation à ma formation.

Madame Dr Eugénie DURYON, Assistante hospitalo-universitaire au laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, pour sa gentillesse et sa participation à ma formation.

Monsieur Dr Joffrey FERIEL, ancien interne au laboratoire d'Oncohématologie de l'Hôpital Necker- Enfants Malades, Paris France, pour sa gentillesse et son aide.

Mes amies Dr AIT KACI Samira, Dr BELKACEM Salima et Dr AGOURNAZ Sonia, pour leur gentillesse et leur aide.

*Mes chers parents, que Dieu le tout puissant vous protège et vous accorde : santé et longue vie.
Mes frères, sœurs, beaux-frères et belle-sœur.*

Mes adorables neveux et nièce : Rayane, Wassim, Youssef et la princesse Rym.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADC : Convertisseur analogique-numérique

ADN : Acide desoxyribo nucléique

ALOT : Acute Leukemia Orientation Tube

APC: Allophycocyanin

APCCy7 : Allophycocyanin Cyanine 7

APCH7 : APC-Hilite7

ARI : risque standard

ARII : risque intermédiaire.

ARN : Acide ribo nucléique

ARNm : Acide ribo nucléique messenger

BCR : B cell receptor

BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region-Abelson

BFM : Berlin-Francfort-Münster

c IgM : Ig M intra cytoplasmique

CAC : Centre anti cancer

CAR T Cell : récepteur d'antigène chimérique des cellules T.

CD : cluster de différenciation

CFU-C : Colony forming unit culture.

CFU-S : Colony forming unit spleen

CLP : Common lymphoid progénitor

CMF : Cytometrie en flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.

CMP : Common myéloïd progénitor

COG : Children's Oncology Group

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CV : Coefficient de variation

DN : Double négatif

DP : Double positif

EBV : Epstein- Barr Virus

EGIL : European Group for Immunophenotyping of Leukemias

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer-childhood

ETP : Early Thymic Progenitor

EVNT : évènement

FAB : French-American-British Group

FISH : Hybridation par fluorescence in situ

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

FN : Faux négatif

FP : Faux positifs

FRET : Fluorescence par résonance de transfert d'énergie.

FSC : Forward Scatter Channel

FSC-H : Forward Scatter Channel Height

GB : Globule blanc

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques

GMAAL : German Multicenter Study Group for Adult ALL

Hb : hémoglobine

HLA : Humain leucocyte antigène
HR : Haut risque
HV450 : Horizon V450
HV500 : Horizon V500
IC : Intervalle de confiance
ICR : Incidence cumulative de rechute.
Ig : Immunoglobulines
IKZF1 : Ikaros
IL7 : Interleukine
ITK : Inhibiteurs des tyrosines kinases
LA : leucémie aigue
LAIP : Leukemia associated immuno
phénotype
LAL : Leucémie aigue lymphoblastique
LAM : Leucémie aigue myéloblastique
LMC : Leucémie myéloïde chronique
LT-CSH : Cellules souches pluripotentes à
longue durée de vie
MFI : Intensité de fluorescence moyenne
MGG : May-Grünwald Giemsa
MN : Mononuclée
MO : Moelle osseuse
MPO : Myéloperoxydase
MRD : Maladie Résiduelle minimale
NGS : Séquençage de nouvelle génération
NK : Natural killer
NRP : Population négative de référence.
OMS : Organisation mondiale de la santé
p ICR : Probabilité d'incidence cumulative
de rechute
PB : Pacific Blue
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Phycoérythrine

PECy7 : Phycoérythrine-cyanine 7
Percp Cy5.5 : Phycoérythrine-cyanine 5.5
PMT : Photomultiplicateur
PNN : Poly nucléaire neutrophile
PRP : Population positive de référence.
RAG : Recombination activating gène
RC : Rémission complète
RQ-PCR : Reverse quantitative
Polymerase Chain Reaction
RT-PCR : Reverse transcriptase
Polymerase Chain Reaction
s IgM : Ig M de surface
SCF : Stem Cell Factor
SD : standard déviation
SDF-1 : Stem différenciation factor
SG : Survie globale
SI : Stain index, indice de coloration
SLNW : Marquage-lyse-sans lavage
SLW : Marquage-lyse- lavage
SLWF : Marquage-lyse-lavage- fixation
SNC : Système nerveux central
SP : Simple positif
SR : Risque standard
SSC : Side Scatter Channel
SSE : Survie sans évènements
SSR : Survie sans rechute
ST-CSH : Cellules souches à courte durée
de vie
TCR : T cell receptor
Tdt : Désoxy nucléotidyl transférase
terminale.
TSLP : Thymic stromal lymphopoiétine
VHR : Very high risk, très haut risque

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION..... 1

REVUE DE LA LITTERATURE

I ONTOGENESE DES CELLULES LYMPHOÏDES 3

1 Hématopoïèse..... 3

2 Lymphopoïèse 4

2.1 Lymphopoïèse T 4

2.1.1 Ontogénèse lymphoïde T 5

2.1.1.1 Stade I : les thymocytes doubles négatifs 5

2.1.1.2 Stade II : les thymocytes doubles positifs..... 7

2.1.1.3 Stade III : les thymocytes simple positifs 8

2.1.2 Régulation de la lymphopoïèse T..... 8

2.2 Lymphopoïèse B 9

2.2.1 Structure des immunoglobulines 9

2.2.2 Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines..... 10

2.2.3 Ontogénèse lymphoïde B 10

2.2.3.1 Le stade pré-pro-B 11

2.2.3.2 Le stade pro-B 12

2.2.3.3 Le stade pré-B 12

2.2.3.4 Le stade B immature 12

2.2.4 Régulation de la lymphopoïèse B 13

2.2.4.1 Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokine 13

2.2.4.2 Rôle des facteurs de transcription 14

2.2.4.3 Signal fourni par le pré BCR 14

II LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE DE L'ENFANT 15

1 Définition 15

2 Epidémiologie 15

3 Facteurs de risque 16

3.1 Facteurs génétiques 16

3.2 Les radiations ionisantes. 16

3.3 Les médicaments cytostatiques et agents chimiques cancérigènes 16

3.4 Les agents infectieux 16

4	Mécanisme physiopathologique.....	17
5	Signes cliniques	17
6	Diagnostic biologique.	18
6.1	Hémogramme.....	18
6.2	Frottis sanguin.....	18
6.3	Myélogramme: élément clé du diagnostic	18
6.4	Coloration cytochimique ou cyto-enzymatique	18
6.5	Immunophénotypage.....	19
6.6	Recherche d'anomalies génétiques	19
6.7	Ponction lombaire	20
7	Classification des LAL	20
7.1	Classification morphologique	20
7.2	Classification immunologique	20
7.3	Classification OMS	21
8	Traitement	24
8.1	Protocole de chimiothérapie	24
8.2	Greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH)	24
8.3	Thérapie ciblée	24
8.4	Immunothérapie	24
9	Facteurs pronostiques.....	25
9.1	Facteurs liés à l'hôte	25
9.1.1	Âge.....	25
9.1.2	Ethnie.....	26
9.1.3	Pharmacogénomie	26
9.2	Facteurs liés à la maladie	26
9.2.1	Leucocytose	26
9.2.2	Syndrome tumoral.....	26
9.2.3	Immunophénotype	27
9.2.4	Cytogénétique	27
9.2.5	Anomalies géniques.....	28
9.3	Facteurs composites (Réponse au traitement)	28
9.3.1	L'évaluation morphologique	28
9.3.2	La maladie résiduelle (MRD).	28
III	LA MALADIE RESIDUELLE (MRD) DANS LES LAL	29
1	Concept et définition	29

2	Historique	29
3	Application clinique de la recherche de la MRD	30
3.1	Impact pronostique de la MRD	30
3.2	Points de suivi et seuils pronostiques.....	31
3.3	Nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la MRD.....	33
4	Aspects techniques de la MRD	33
4.1	Prélèvement	33
4.2	Moyens d'étude	34
4.2.1	Techniques moléculaires	34
4.2.1.1	Analyse du réarrangement des gènes des IG/ et TCR par PCR quantitative	34
4.2.1.2	Recherche des transcrits de gènes de fusion par la RQ-transcriptase inverse-PCR... 34	
4.2.2	Techniques de cytométrie en flux (CMF)	35
4.2.2.1	MRD par technique CMF multicolore classique (4 à 6 couleurs)	35
4.2.2.2	MRD par CMF multiparamétrique de nouvelle génération EuroFlow	35
4.2.3	Choix de la méthode	36
IV	CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)	37
1	Définition	37
2	Historique	37
3	Composition du cytometre en flux	37
4	Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	38
V	APPLICATION DE LA CMF MULTIPARAMETRIQUE A LA DETECTION DE LA MRD DANS LES LAL	41
1	Principe de détection de la MRD par CMF.....	41
1.1	Spécificité: signature phénotypique de la leucémie.....	41
1.2	Sensibilité de maladie résiduelle phénotypique	43
2	Progrès de la maladie résiduelle phénotypique.....	43
2.1	Développement de la CMF multiparamétrique :.....	44
2.1.1	Les lasers.....	44
2.1.2	Les fluorochromes.....	44
2.1.3	Logiciel d'analyse de données	44
2.2	CMF multiparamétrique de nouvelle génération: standardisation Euroflow.....	45
2.2.1	Choix des combinaisons d'anticorps pour la préparation des panels	45
2.2.2	Sélection des fluorochromes	46
2.2.3	Optimisation de la configuration de l'instrument	48
2.2.3.1	Réglage des PMT	48

2.2.3.2	Réglage des paramètres FSC/SSC	48
2.2.3.3	Surveillance des performances de l'instrument	49
2.2.3.4	Procédures de compensation	49
2.2.4	Procédure de marquage des échantillons	49
2.2.4.1	Procédures de marquage et de lyse des érythrocytes	50
2.2.4.2	Marquage intracellulaires	51
2.2.4.3	Traitement des échantillons de cellules avec un faible nombre de cellules nucléées	51
2.2.4.4	Acquisition des échantillons dans le cytomètre à flux	51
2.2.5	Stratégie d'analyse EuroFlow pour le diagnostic et le suivi immunophénotypique des hémopathies malignes	52
2.2.5.1	Fusion des fichiers de données de cytométrie de flux	52
2.2.5.2	Génération de fichiers de données de référence.....	53
2.2.6	Contrôle de qualité	53
2.3	Evolution des activités Euroflow	53

PARTIE PRATIQUE

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	54
II. PATIENTS, MATERIEL ET METHODES.....	55
1 Population d'étude:	55
1.1 Type d'étude.....	55
1.2 Critères d'inclusion.....	55
1.3 Critères d'exclusion.....	55
2. Matériel d'étude.....	56
2.1 Prélèvement des patients.....	56
2.2 Prélèvement des témoins.....	56
3. Méthodes	56
3.1 Phases de l'étude.....	56
3.1.1 Phase de recrutement des patients.....	56
3.1.2 Phase du diagnostic immunophénotypique des leucémies aigues par CMF.....	57
3.1.2.1 Etape d'orientation.....	57
3.1.2.2 Classification EGIL des LAL et identification des LAIP des cellules leucémiques.....	57
3.1.3 Phase d'évaluation de la MRD par CMF.....	57
3.2. Les étapes de l'immunophénotypages par CMF.....	59

3.2.1	Choix des combinaisons d'anticorps pour la préparation des panels.....	59
3. 2. 1.1	Panel d'orientation ALOT.....	59
3. 2. 1.2	Panel d'anticorps des LALB.....	60
3. 2. 1.3	Panel d'anticorps des LALT.....	63
3.2. 2	Titration des réactifs d'anticorps.....	66
3.2. 3.	Réglage du cytometre.....	67
3.2.3.1.	Surveillance des performances du cytometre :.....	67
3.2.3.2	Réglage des PMT pour les mesures de fluorescence	69
3.2.3.3.	Règlage des parametre FSC/SSC	71
3.2.3.4	Matrice de compensation:	72
3.2.4.	Préparation des échantillon.....	74
3.2. 4.1	Procédure de marquage des échantillon:	74
3.2. 4.1.1	Marquage de surface	74
3.2. 4.1.2	Marquage intra cytoplasmique	74
3.2.4.2.	Procédure d'acquisition	75
3.2. 5.	Stratégie d'analyse de la MRD.....	77
3.2.6	Quantification de la MRD	80
3.2. 7	Evaluation de l'hémodilution des échantillons au moments du point d'évaluation.....	82
3.3	Analyse statistique.....	82
III	RESULTATS	83
1.	Caractéristiques de la population d'étude recrutée au diagnostic	83
2.	Résultats du diagnostic phénotypique:.....	84
2.1	Répartition des patients LAL selon le phénotype	84
2.2	Résultats de la classification EGIL:.....	85
2.2.1	Classification EGIL des LALB.....	85
2.2.2	Classification EGIL des LALT.....	85
3.	Données cytogénétiques	86
4.	Données de la stratification thérapeutique.....	86
5.	Echantillons analysés pour l'identification des LAIP et le suivi de la MRD.....	87
6.	Applicabilité de la MRD par CMF dans les LAL	88
6.1.	Applcabilité de la MRD dans les LALB.....	88
6.1.1.	Marqueurs associés aux LAIP dans les LALB.....	88
6.1.2	Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALB	89
6.1.3	Exemple de LAIP dans les LALB.....	91

6.2	Applcabilité de la MRD dans les LALT.....	104
6.2.1	Marqueurs associés aux LAIP dans les LALT	104
6.2.2	Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALT.....	105
6.2.3	Exemple de LAIP dans les LALT.....	106
6.3.	Incidence des différents types de LAIP dans les LAL.....	111
7.	Résultats de l'évaluation de la MRD.....	112
7.1	Fréquence de la MRD du total des échantillons testés.....	112
7.2	Spécificité des évènements identifiés au point d'évaluation.....	113
7.3	Sensibilité des tests MRD.....	119
7.3.1	Fréquence des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-4}	119
7.3.2	Médiane des évènements acquis des tests MRD.....	119
8.	Facteurs influençants les résultats de la MRD.....	120
8.1	Facteurs influençants la sensibilité des résultats de la MRD.....	120
8.1.1	Richesse des prélèvements en GB.....	120
8.1.2	Hémodilution des prélèvements.....	121
8.2	Facteurs influençant la spécificité des résultats.....	123
8.2.1	Les hématogones.....	123
8.2.2	Modulation antigénique après chimiothérapie d'induction.....	124
8.2.3.	Hétérogénéité clonale de la population blastiques au diagnostic	125
8.3.	Interprétation biologique des résultats de la MRD.....	126
9.	Analyse des résultats de la MRD et des rechutes.....	127
9.1	Patients avec MRD positive.....	127
9.2	Patients avec MRD négative.....	128
9.3	Détermination séquentielle de la MRD.....	128
10.	Analyse du cout d'un test MRD.....	129
	IV. DISCUSSION.....	130
	CONCLUSION.....	142
	PERSPECTIVES.....	144
	BIBLIOGRAPHIE	
	ANNEXES	
	RESUME	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de physiologique et des différentes lignées sanguines.	4
Figure 2 : Représentation schématique des étapes de maturation des cellules T.....	9
Figure 3 : Ontogénèse des lymphocytes B.	14
Figure 4 : Composants majeurs d'un cytomètre en flux	38
Figure 5 : Identification des leucocytes dans le sang total	39
Figure 6 : Exemple de marquage de sang total avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8	39
Figure 7 : Spectre d'émission des différents fluorochromes.....	40
Figure 8 : Les phases de l'étude	58
Figure 9 : Courbe SI/Ratio	67
Figure 10 : Courbe MFI+/MFI-.....	67
Figure 11 : Rapport des performances du cytomètre	68
Figure 12 : Matrice des voltages.	70
Figure 13 : Exemple de réglage des paramètres FSC/SSC	71
Figure 14 : Stratégie de gating utilisée pour chaque tube monomarcqué pour le calcul de compensation. A : avec des leucocytes du sang périphérique, et B : avec des billes de compensation (CompBeads de BD).	72
Figure 15 : Feuille d'analyse du tube mixte	73
Figure 16 : Hydrofocalisation dynamique des cellules en fonction de la vitesse d'acquisition	75
Figure 17 : Diagramme des étapes de l'immunophénotypage des LAL par CMF pour la détection de la MRD.....	76
Figure 18 : Histogramme FSC/SSC	77
Figure 19 : Histogramme FSC-A/FSC-H.....	77
Figure 20 : Cellules CD19 positive	78
Figure 21 : Cellules CD3 positive	78
Figure 22 : Graphique d'intersection des zones blastiques	79
Figure 23 : Histogramme FS/SS du LAIP identifié	79
Figure 24 : Masque d'analyse de vérification de la qualité du marquage.....	81
Figure 25 : Répartition des patients LAL selon le phénotype.....	84
Figure 26 : Répartition des LAL B selon le stade de maturation EGIL.....	85
Figure 27 : Répartition des LAL T selon le stade de maturation EGIL.....	85
Figure 28 : Répartition des patients selon le protocole thérapeutique	86
Figure 29 : Diagramme de flux des prélèvements d'identification des LAIP au diagnostic et des prélèvements MRD.	87
Figure 30 : Phénotype d'hématogones stade 3 avec 03 LAIP.....	91
Figure 31 : Phénotype d'hématogones stade 1/2 avec un LAIP peu informatif	92
Figure 32 : Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 avec 02 LAIP.....	93
Figure 33 : Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 avec 01 LAIP.....	94
Figure 34 : Phénotype d'hématogones stade 2 avec 03 LAIP.....	95
Figure 35 : Phénotype d'hématogones stade 1 avec 03 LAIP.....	96
Figure 36 : Phénotype d'hématogones stade 2 avec 02 LAIP.....	97
Figure 37 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 03 LAIP.....	98
Figure 38 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 03 LAIP.....	99
Figure 39 : Phénotype de LALB CD10 négatif avec 02 LAIP	100
Figure 40 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 01 LAIP.....	101

Figure 41 : LALB CD10 négatif avec 02 LAIP	102
Figure 42 : phénotype d'hématogones stade 3 avec 01 LAIP	103
Figure 43 : LALT III avec 02 LAIP : CD34+ et CD16/CD56 +.....	106
Figure 44 : LALT III avec 02 LAIP : CD99++/ TDT + et CD2 négatif.....	107
Figure 45 : LALT II avec 01 LAIP : TDT++/ CD99 ++.....	108
Figure 46 : LAL TIII avec 03 LAIP : TDT+/CD99+, CD1A + et CD34++CD16/CD56++ .	109
Figure 47 : LALT IV avec 02 LAIP : CD99++ et CD34++.....	110
Figure 48 : Fréquence de la MRD positive	112
Figure 49 : MRD positive sans hématogones.....	113
Figure 50 : MRD négative avec présence d'hématogones.....	114
Figure 51 : Exemple de maturation des hématogones (cas N°2).	115
Figure 52 : MRD négative sans hématogones.....	116
Figure 53 : MRD positive avec hématogones.....	117
Figure 54 : MRD T négative avec des cellules T périphériques.....	118
Figure 55 : Fréquence des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-4}	119
Figure 56 : Médiane des évènements acquis en fonction du niveau de sensibilité.....	119
Figure 57 : Comparaison de la richesse des prélèvements en GB au deux points d'évaluation de la MRD	120
Figure 58 : Répartition des résultats MRD avec une sensibilité de 10^{-3} en fonction du point d'évaluation	120
Figure 59 : Résultat de l'évaluation du degré de l'hémodilution des prélèvements de la MRD avec la méthode cytologique et sa corrélation avec le pourcentage des cellules CD34+.....	122
Figure 60 : Exemple de modulation antigénique après chimiothérapie d'induction.....	124
Figure 61 : Exemple de plusieurs sous clones blastiques au diagnostic	125
Figure 62 : Diagramme de flux de la cohorte des patients suivis par la MRD.....	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Classification EGIL des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B	21
Tableau II :	Classification EGIL des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) T	21
Tableau III :	Leucémies aiguës lymphoïdes avec anomalies génétiques récurrentes.....	23
Tableau IV :	Principales anomalies cytogénétiques rencontrées dans les LAL-T.....	27
Tableau V :	Résultats des premiers essais thérapeutiques avec MRD décisionnelle.....	31
Tableau VI :	Points de suivi et seuils pronostiques des premières études des protocoles LAL pédiatriques et adultes.	32
Tableau VII :	Caractéristiques des différentes méthodes de la MRD	36
Tableau VIII :	Caractéristiques cliniques et biologiques des 20 patients LAL au diagnostic	83
Tableau IX :	Marqueurs associés aux LAIP dans les LALB	88
Tableau X :	Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALB	89
Tableau XI :	Marqueurs associés aux LAIP des LALT	104
Tableau XII :	Différents LAIP identifiés dans les LALT	105
Tableau XIII :	Incidence des différents types de LAIP dans les LAL	111
Tableau XIV :	Résultat de l'évaluation du degré de l'hémodilution des prélèvements de la MRD.....	121
Tableau XV :	Comparaison du pourcentage d'hématogones du total des GB aux deux points de suivi.	123
Tableau XVI :	Comparaison de la composition des cellules B CD19+ en hématogones aux deux points de suivi.....	123
Tableau XVII :	Résultats de la MRD des patients évalués et leurs seuils de sensibilité.	126
Tableau XVIII:	Coût d'un test MRD pour les LALB et T.....	129
Tableau XIX :	Comparaison de l'incidence des différents types de LAIP des LALB avec les données de la littérature.....	131
Tableau XX :	Comparaison de la richesse cellulaire des prélèvements de MO entre les deux points de suivi (induction/ consolidation) des différentes études.	133
Tableau XXI :	Proportion des hématogones immatures aux deux points de suivi dans les différentes études.....	135
Tableau XXII:	Comparaison de la valeur pronostique de la MRD dans les LAL de l'enfant avec les données de la littérature.....	140

INTRODUCTION :

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) représentent la première cause de cancer chez l'enfant **(1-3)**.

Au cours des trente dernières années, les progrès dans les protocoles thérapeutiques ont donné lieu à une grande amélioration du pronostic. La survie globale des enfants traités pour une LAL se situe aujourd'hui entre 80 et 90 % **(1,2)**. Cependant, les rechutes restent un problème majeur avec un risque global d'environ 20%. **(1-3)**

L'objectif des protocoles thérapeutiques actuels est la stratification des patients avec une grande précision, afin de leur proposer un traitement dont l'intensité est proportionnelle au risque de rechute. **(3)**

Plusieurs facteurs pronostiques permettent d'identifier plus tôt ces patients à risque. Les facteurs pronostiques conventionnels pour estimer le risque de rechute que sont l'âge, le sexe et le clone malin (nombre de globules blancs, l'immunophénotype et l'anomalie cytogénétique) sont de bon indicateurs, mais aucun n'est complètement fiable **(1, 4-6)**.

L'évaluation de la réponse au traitement par la quantification de la maladie résiduelle minimale (MRD) s'est affirmée comme le prédicteur pronostique le plus puissant dans les LAL. Par conséquent, elle a été utilisée pour stratifier le risque de rechute et orienter la thérapie dans toutes les études pédiatriques. **(1,7-10)**

L'évaluation de la MRD n'est plus un outil de recherche; elle fait désormais partie intégrante de la gestion des protocoles thérapeutiques des LAL de l'enfant et de l'adulte dans les pays développés (Europe et USA). **(11)**

Diverses méthodes de détection de la MRD chez les patients atteints de LAL ont été mises au point.

La quantification des réarrangements clonaux des IG / TCR utilisant la PCR quantitative allélique (RQ-PCR des IG/TCR) et la détection par cytométrie de flux (CMF) multiparamétrique des immunophénotypes aberrants associés aux leucémies sont les méthodes d'évaluation de la MRD les plus couramment utilisées.

La RQ-PCR des IG/TCR est actuellement considérée comme le gold standard pour la surveillance de la MRD dans la plupart des protocoles thérapeutiques Européens des LAL. Cependant, l'expertise technique et l'instrumentation nécessaire, limitent son application aux centres spécialisés. **(11-13)**.

La CMF permet une approche alternative de la MRD dans les LAL pour une application plus répandue, car cette technique est déjà établie pour le diagnostic des hémopathies malignes dans la plupart des laboratoires d'onco-hématologie à travers le monde. **(14-17)**.

Cependant, avec les techniques de CMF classiques (4 à 6 couleurs), les résultats dépendent de l'expérience et des connaissances des experts locaux des différents laboratoires. **(11)**

Or, la standardisation et la reproductibilité inter laboratoires des résultats de la MRD par CMF sont indispensables avant que cette méthodologie puisse être mise en œuvre dans les essais thérapeutiques multicentriques des LAL.

Afin de diminuer cette subjectivité et variabilité de mesure dans l'immunophénotypage par CMF, le consortium EuroFlow a développé en 2012 une approche entièrement standardisée pour l'immunophénotypage en onco- hématologie qui couvre l'ensemble de l'analyse par CMF, du processus de la configuration de l'instrument et des panels d'anticorps jusqu'à la stratégie d'analyse des données. **(11, 16)**

En Algérie, les résultats des protocoles de chimiothérapie des LAL de l'enfant menés au cours de ces dernières années se sont révélés décevants. Le taux de survie globale étant de 68,3%. **(18)**

L'importance pronostique de la MRD dans les LAL est bien établie, mais fait toujours défaut dans notre pratique pour stratifier les patients et adapter le traitement selon le risque de rechute.

L'introduction de cet outil pronostique dans nos protocoles thérapeutiques est une nécessité.

La cytométrie en flux multiparamétrique Euroflow (≥ 8 couleurs) est la technique de choix pour son évaluation, car il s'agit d'une technique simple, rapide et moins coûteuse que la RQ-PCR des IG/TCR. Elle est actuellement hautement standardisée et des sensibilités comparables ont été obtenues entre les deux techniques **(11,12,13)**.

Dans une première étude en Algérie, nous décrivons notre expérience dans la mise en place de la détection de la MRD dans les LAL de l'enfant, par la technique de cytométrie en flux multiparamétrique Euroflow (8 couleurs) au laboratoire du service d'hématologie du CAC de Blida, en mettant l'accent sur les aspects méthodologiques, les procédures de validation, l'applicabilité ainsi que le coût du test.

**REVUE
DE
LA LITTERATURE**

I ONTOGENESE DES CELLULES LYMPHOÏDES :

La réalisation et l'interprétation correctes de la cytométrie en flux appliquée aux leucémies aiguës lymphoblastiques impliquent une bonne connaissance des marqueurs utilisables et de leur expression au cours des schémas physiologiques de différenciation de l'hématopoïèse et particulièrement de la lymphopoïèse B et T. **(19)**

1 Hématopoïèse:

Les lymphocytes B et T sont issus, comme toutes les autres cellules sanguines, des cellules souches hématopoïétiques présentes, chez le fœtus, dans le sac vitellin, le foie, la rate et la moelle osseuse et, chez l'adulte, dans la moelle osseuse.

Chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques sont organisées suivant une hiérarchie qui tient compte de leur capacité à s'autorenouveler et à se différencier.

Les cellules souches hématopoïétiques les plus précoces se divisent très peu et constituent le stock primordial à l'origine de toutes les lignées sanguines matures. Par ailleurs, on a pu définir des cellules souches pluripotentes à longue durée de vie (LT-CSH) et à courte durée de vie (ST-CSH), suivant leur capacité permanente ou transitoire à repeupler le système hématopoïétique d'un receveur dépourvu de progéniteurs endogènes.

La descendance des CSH génère des progéniteurs doués d'une plus grande capacité à se différencier. A ce stade de leur différenciation, les cellules hématopoïétiques sont devenues multipotentes et s'autorenouvellent très peu ou presque pas ; en revanche, elles vont devoir très rapidement choisir de s'engager vers la lignée lymphoïde pour générer des cellules T et B matures ou vers la lignée myéloïde (génération des macrophages, des granulocytes, des érythrocytes et des plaquettes). Ce schéma d'engagement vers l'une ou l'autre des lignées a permis d'isoler, à partir de la moelle osseuse, le précurseur lymphoïde commun (CLP pour common lymphoid progenitor) et le précurseur myéloïde commun (CMP pour common myeloid progenitor). Cependant un précurseur qui possède les potentialités pour se différencier en cellules granulocytaire, macrophagique et lymphoïde mais incapable de générer des érythrocytes et des mégacaryocytes a été mis en évidence. Ainsi, si la plupart des cellules T, B et NK sont issues du CLP, d'autres peuvent dériver de précurseurs T/myéloïdes et B/myéloïdes. **(20)**. (Figure 1.)

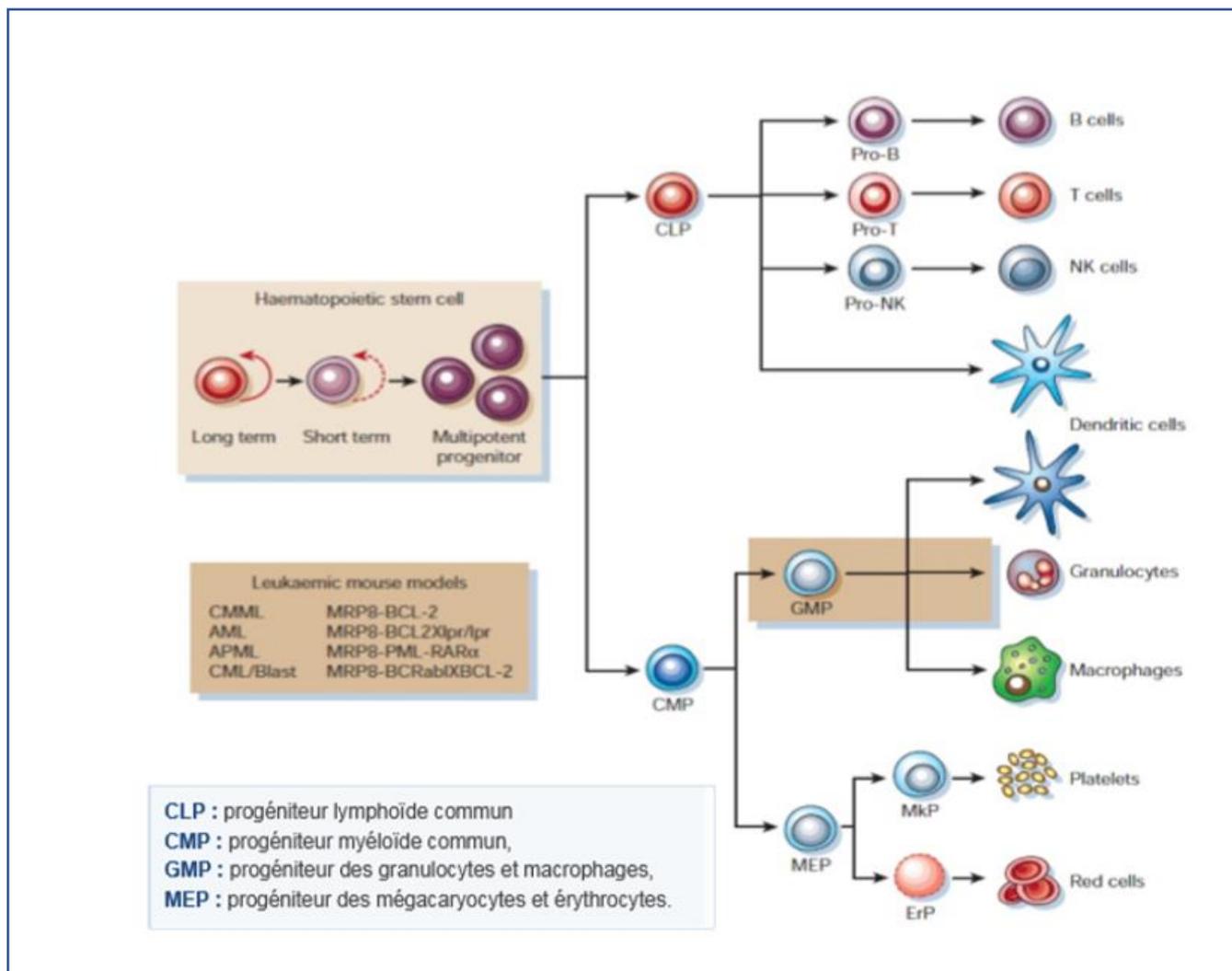


Figure 1 : Représentation de l'hématopoïèse physiologique et des différentes lignées sanguines. (21)

2 Lymphopoïèse :

2.1 Lymphopoïèse T :

C'est l'ensemble des étapes de différenciation des lymphocytes T depuis la moelle osseuse jusqu'à leur sortie du thymus.

Durant cette différenciation, les précurseurs lymphocytaires T acquièrent un récepteur de surface spécifique de l'antigène (TCR).

Le TCR est un complexe multimoléculaire comportant :

- Un module de reconnaissance de l'antigène ou TCR proprement dit.
- Un module de transduction du signal d'activation dans le lymphocyte T suite à cette reconnaissance ou complexe CD3.

On distingue deux types de TCR en fonction des chaînes qui le constituent : TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Ces derniers représentent un type de lymphocytes T particulier, minoritaire dans le sang circulant (< 10 % des lymphocytes T, faisant partie des cellules de l'immunité innée). (22)

2.1.1 Ontogénèse lymphoïde T

C'est à l'intérieur du thymus que les précurseurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse terminent leur maturation pour aboutir à la formation de lymphocytes T matures dits naïfs.

Les différentes étapes de la maturation thymique sont marquées par l'apparition ou la disparition de certains récepteurs ou antigènes de membranes, ainsi que par le réarrangement de gènes codant certaines chaînes de récepteurs T (Figure 2).

A l'heure actuelle l'ensemble de ces données permet de distinguer trois grandes étapes :

2.1.1.1 Stade I : les thymocytes doubles négatifs :

Les progéniteurs des cellules T issus des cellules souches de la moelle osseuse, entrent dans le thymus par des veinules à la jonction cortico médullaire.

Ces thymocytes précoces sont dépourvus des corécepteurs CD4 et CD8. C'est pourquoi on les appelle doubles négatifs. Ils expriment des marqueurs de prolifération tels que CD71 (le récepteur de la transferrine) et CD38, un marqueur commun à tous les précurseurs hématopoïétiques et le récepteur CCR7 de chimiokine.

Sous l'influence de chimiokine comme CCL19 et CCL21, ils migrent à travers le cortex thymique vers la zone externe sous capsulaire.

Le contact avec le stroma thymique va engager la différenciation de ces cellules, d'où l'apparition à leur surface des premiers marqueurs spécifiques de cellules T à savoir, les molécules CD2 et CD7 chez l'homme.

Les plus précoces de ces progéniteurs, les ETP (Early Thymic Progenitor, également nommés DN1), restent pluripotents, capables de produire toutes les sous populations de cellules T et continuent à exprimer le marqueur CD34 des cellules souches, et expriment également en abondance la molécule d'adhérence CD44 et le récepteur de SCF de c kit (CD117). (23)

Les thymocytes DN1 sont CD34+ c kit(CD117) + CD44 high CD25- et présentent des gènes du TCR en configuration germinale. (20, 22)

Après que ces cellules DN1 ont rencontré l'environnement thymique, au cours de leurs maturations en cellules DN2, ils perdent l'expression de CD34 et commencent à exprimer la chaîne alpha du récepteur de l'IL2 (CD25), devenant c kit (CD117) +, CD44 low et CD25+.

Ces cellules ne peuvent plus se différencier qu'en cellules T et cellules dendritiques lymphoïdes.

Au stade critique de développement DN2, commence le réarrangement des gènes codant les chaînes gamma, delta et beta du TCR ; en revanche, le locus TCR alpha ne réarrange pas à ce stade, vraisemblablement parce que la région d'ADN comprenant ce locus est fortement compactée et ainsi rendue non accessible à la machinerie de recombinaison.

Alors que les cellules progressent vers le stade DN3, l'expression de ckit CD117 et CD44 est stoppée et les réarrangements TCR gamma, TCR delta et TCR beta progressent. (24)

Tout ceci se produit indépendamment du fait que par la suite la cellule progresse vers la lignée T alpha bêta ou T gamma delta. En effet, on retrouve des réarrangements gamma, delta et bêta dans les cellules T matures des deux lignées.

Les cellules destinées à devenir des cellules T gamma delta (un petit pourcentage des thymocytes :5 à 10 %) divergent à la transition entre les stades DN2 et DN3 et mûrissent en cellules T gamma delta sans grand changement de leur phénotype de surface, ils demeurent doubles négatives, CD4- CD8-, excepté une petite sous population qui exprime CD8. (20, 22)

La plupart des cellules DN2 sont destinées à donner des cellules T alpha beta.

Les cellules devenues DN3 (c kit-, CD44-, CD25+), expriment moins de CCR7 et arrivent dans la zone sous capsulaire.

L'expression transitoire des recombinases RAG1 et RAG2 (recombination activating gène), en même temps qu'une augmentation de l'accessibilité à la chromatine autour d'un allèle des gènes de la chaîne β du TCR, aboutit au réarrangement de la chaîne β et à l'engagement dans la lignée T.

Enfin, les cellules qui réarrangent de manière productive, sur au moins un des chromosomes des gènes codant la chaîne β du TCR, vont l'exprimer à leur surface. Or, la chaîne β ne peut s'exprimer à la surface thymocytaire de manière isolée et les thymocytes pré T ne présentent pas de réarrangement des gènes codant la chaîne alpha conventionnelle.

En fait, une variante de la chaîne alpha, ou chaîne pré T alpha, a été décrite, qui est exprimée par la plupart des thymocytes immatures et qui, associée à la chaîne β des cellules pré T et à CD3, constitue un pré TCR.

L'expression d'une chaîne β fonctionnelle va bloquer le réarrangement des gènes codant toute autre chaîne β . A ce point, le thymocyte immature exprime CD3 mais est toujours CD4⁺ CD8⁻.

La perte ultérieure du CD25 signifie que la cellule est passée au stade DN4, qui se différencie ensuite en thymocytes double positive CD4, CD8. (22)

Le stade de cellule DN3 est une étape essentielle de la différenciation intra thymique, car seuls les thymocytes qui expriment un pré TCR vont être engagés dans la transition vers le stade de thymocytes doubles positifs et que s'amorce une importante prolifération cellulaire.

Ces modifications phénotypiques vont de pair avec le déroulement des processus de sélection positive et négative.

2.1.1.2 Stade II : les thymocytes doubles positifs.

Il concerne, à un moment 85% des cellules du thymus. Il se caractérise par l'apparition de CD1 et la coexpression de CD4 et CD8 (d'où le terme de thymocytes doubles positifs).

C'est à ce stade que le réarrangement des gènes codant la chaîne alpha du TCR prend place.

Le gène de la chaîne alpha du TCR est réarrangé lorsqu'à nouveau RAG1 et RAG2 sont exprimés transitoirement soit au stade DN4 ou immédiatement à la suite de l'expression de CD4 et CD8 (DP).

Un TCR conventionnel va donc s'exprimer à faible densité, associé au complexe CD3, à la surface de ces thymocytes.

Plus de 95% de ces thymocytes doubles positifs vont mourir par apoptose dans le thymus à la suite du processus dit de **sélection négative**. Les survivants mûrent vers le stade final de thymocyte simple positif.

Les thymocytes doubles positifs commencent à réexprimer CCR7 en abondance, ce qui les fait revenir en arrière dans le cortex, traverser la jonction cortico médullaire et gagner ainsi la médullaire au stade de SP (simple positif).

2.1.1.3 Stade III : les thymocytes simple positifs

Cette étape est marquée par de grands bouleversements phénotypiques tels que l'augmentation d'expression du complexe récepteur T/CD3, la perte de CD4 ou CD8, donnant lieu à l'apparition de cellules dites simples positives, et la perte de CD1. (20)

A côté des lymphocytes T $\alpha\beta$ « classiques » et les lymphocytes T $\gamma\delta$, il existe une autre population de lymphocytes T, connus sous le nom de lymphocytes NKT.

Les lymphocytes NKT représentent un groupe hétérogène de lymphocytes T. Ils possèdent des caractéristiques phénotypiques propres aux lymphocytes T (notamment un TCR et la présence de CD3), mais également aux lymphocytes NK (expression des molécules CD56 et CD16). La fréquence dans le sang des lymphocytes NKT est assez variable (0,001 à 3 % des lymphocytes circulants). (20)

2.1.2 Régulation de la lymphopoïèse T:

Les mécanismes moléculaires, en particulier les signaux qui tendent l'engagement vers la lignée T sont en partie élucidés. On a mis en évidence l'importance de certains facteurs de transcription spécifique de lignée tels que **IKAROS** et **GATA3** pour la lignée T.

Les molécules de la familles **Notch** jouent également un rôle important dans l'engagement vers la lignée T. il s'agit de récepteurs transmembranaires ayant un rôle dans la transduction de signaux qui régulent la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation et/ou l'apoptose cellulaires. (20)

Le développement des cellules T est gravement altéré chez les souris dont le gène Notch a été inactivé, la signalisation par Notch1 étant nécessaire pour l'engagement des cellules DN1 et DN2 dans la voie menant aux cellules T. En effet, les ligands Notch-1, qui portent les noms exotiques de JAG1 et JAG2 et gamma like sont exprimés sur les cellules épithéliales thymiques de manière très régulière.

En plus des facteurs mentionnés ci-dessus, le développement des thymocytes dépend de manière critique de **IL7** qui est nécessaire pour le passage au stade DN3. Cette cytokine est produite par les cellules épithéliales thymiques.

La signalisation partant du récepteur de l'IL7 et de c kit (CD117) contribuent également à l'intense prolifération précoce des thymocytes avant le réarrangement des gènes du TCR. La lymphopoiétine, TSLP (thymic stromal lymphopoiétine), agissant en tant que ligand supplémentaire de la chaîne alpha du récepteur de l'IL7. (23)

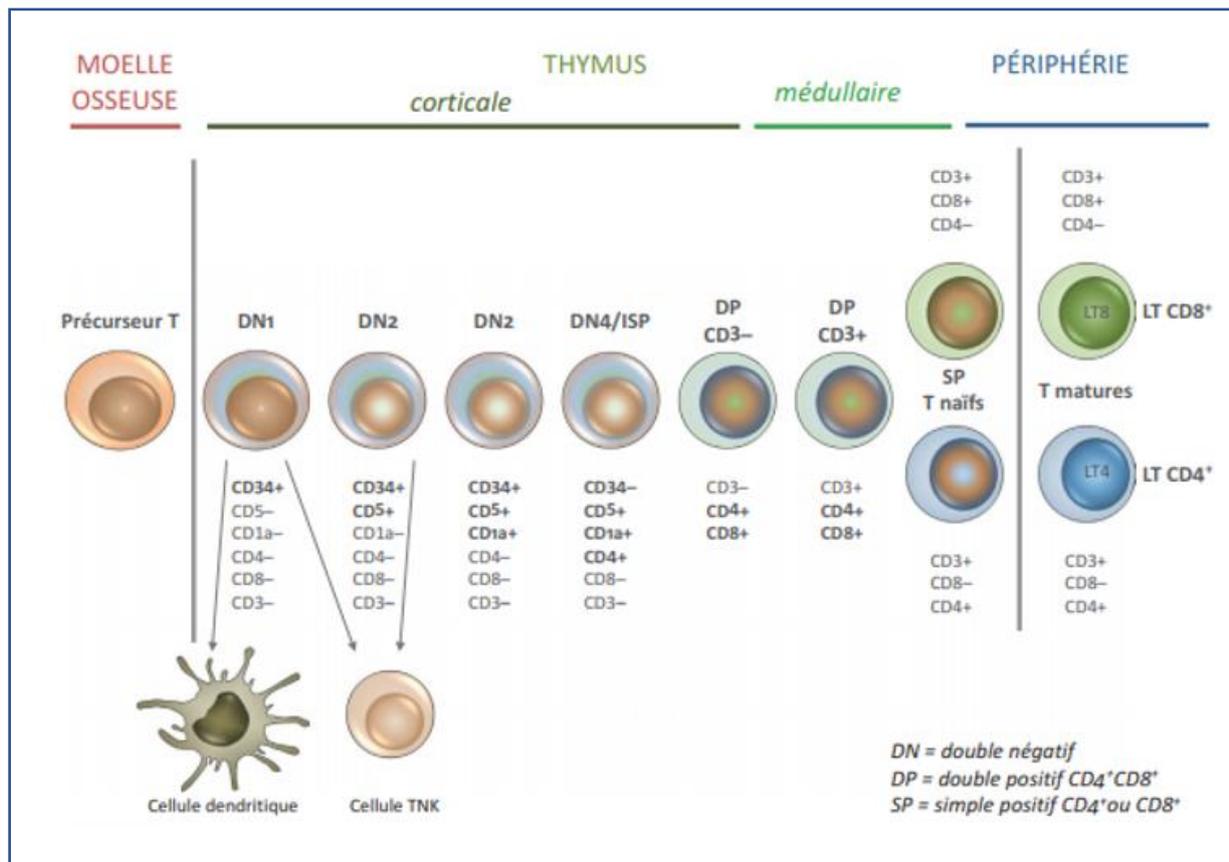


Figure 2 : Représentation schématique des étapes de maturation des cellules T. (22)

2.2 Lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B désigne l'ensemble des étapes qui conduisent la cellule souche hématopoïétique (CSH) à se différencier en un lymphocyte B (LB) mature.

Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'immunoglobulines (Ig) de surface. Ces immunoglobulines, produites par la cellule elle-même, jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (BCR).

2.2.1 Structure des immunoglobulines :

Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques composées de deux chaînes lourdes H (pour heavy) identiques, et deux chaînes légères L (pour light) identiques. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V.

L'association spatiale des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène ou paratope.

La nature des chaînes lourdes détermine les classes d'immunoglobulines ou isotypes. On décrit ainsi cinq types de chaînes lourdes : IgG ou γ (gamma), IgA ou α (alpha), IgM ou μ (mu), IgD ou δ (delta) et IgE ou ϵ (epsilon). Les chaînes légères sont soit κ (kappa) soit λ (lambda).

Le BCR est associé à des molécules responsables de la transduction du signal après contact avec l'antigène : les chaînes Ig α ou CD79a et Ig β ou CD79b.

D'autres molécules sont présentes à la surface du lymphocyte B, associées aux différentes fonctions de ces cellules.

Leur expression varie en fonction de l'état de différenciation et/ou d'activation des lymphocytes B. Les lymphocytes B après activation se différencient en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (anticorps) de la même spécificité que leur BCR. (26)

2.2.2 Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines

La formation des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en loci sur des chromosomes différents.

Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il y a deux loci pour les gènes des chaînes légères. Les gènes codant les chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 2 et les gènes des chaînes légères λ sont situés sur le chromosome 22

La partie variable de la chaîne lourde résulte de la recombinaison au hasard entre un des gènes VH (de variabilité), un des gènes DH (de diversité) et un des gènes JH (de jonction).

Chaque domaine constant de la chaîne lourde (CH1, CH2, CH3) est codé par un gène unique qui peut être réarrangé au cours de la phase de différenciation dépendante de l'antigène.

La partie variable de la chaîne légère est codée par une recombinaison au hasard entre un gène V et un gène J. Un seul segment C κ code pour la partie constante de la chaîne kappa. Pour la chaîne lambda, il existe au moins 6 gènes C λ différents, chacun étant précédé d'un seul gène J qui lui est propre. (26, 25)

2.2.3 Ontogénèse lymphoïde B :

On peut séparer l'ontogénèse des lymphocytes B en deux phases principales, dépendantes ou non de la présence d'antigène.

La première phase de différenciation et de maturation des lymphocytes B est indépendante de l'antigène. Elle se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de lymphocytes B matures naïfs exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène.

La seconde phase d'activation et de différenciation finale est dépendante des antigènes du soi d'abord puis du non-soi en périphérie, au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène.

Activation et différenciation des lymphocytes B indépendante de l'antigène:

Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) issus des CSH possèdent la capacité de reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde (cellules T, B et NK) in vivo. Les lymphocytes B sont générés durant toute la vie.

Très tôt dans leur développement, les lymphocytes B vont exprimer des anticorps à leur surface, issus du réarrangement somatique des gènes des immunoglobulines, qui sont les récepteurs pour l'antigène.

C'est au cours de l'ontogénèse des lymphocytes B dans le foie fœtal ou, après la naissance, dans la moelle osseuse, que le réarrangement des gènes codant les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines se déroule.

Ce processus, qui conduit la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B dit « immature », est régulé de façon telle que chaque cellule B qui en dérive exprime et produit des immunoglobulines d'une même et unique spécificité. C'est ce qui permet de générer un répertoire de récepteurs B pour l'antigène d'une grande diversité.

Une fois générée, la cellule B immature migre vers les organes lymphoïdes périphériques, où vont se dérouler les différentes étapes de la maturation qui aboutissent au plasmocyte producteur d'immunoglobulines et au lymphocyte B mémoires.

Comme pour les lymphocytes T, les grandes étapes de la différenciation et de la maturation des lymphocytes B sont associées à l'expression de différents récepteurs de surface (Figure 3) (25).

De la cellule souche au lymphocyte B immature on distingue :

2.2.3.1 Le stade pré-pro-B :

Dans la moelle osseuse, les précurseurs B les plus immatures constituent une sous-population de cellules appelées pré-pro-B qui ne sont pas totalement engagées dans la voie B et n'ont pas encore réarrangé les gènes des immunoglobulines. Les cellules pré-pro-B expriment

très faiblement les gènes RAG-1 et RAG-2. Par contre, l'expression du gène codant pour Ig α (CD79a) est détectée dès ce stade sous forme de protéines CD79a intracytoplasmiques.

2.2.3.2 Le stade pro-B :

À ce stade, les réarrangements des gènes d'immunoglobulines commencent à se mettre en place, selon une cinétique contrôlée, permettant ainsi de distinguer deux populations.

Les réarrangements débutent au locus IGH, simultanément sur les deux chromosomes 14, par la jonction d'un segment DH avec un segment JH. Ces événements caractérisent le stade pro-B précoce au cours duquel apparaît le marqueur CD19. (25,26)

Ces premiers réarrangements sont suivis dans les cellules pro-B tardives par l'assemblage, sur un seul allèle cette fois, d'un segment VH avec les segments DJH réarrangés. Seuls les segments VDJ en phase de lecture correcte et sans codon-stop codent pour une région variable fonctionnelle, et permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique marquant le passage au stade pré B. A ce stade, on note aussi l'apparition de récepteur pour l'IL7, cytokine jouant un rôle clé dans la lymphopoïèse.

2.2.3.3 Le stade pré-B :

Ce stade est marqué par l'expression d'une petite proportion de la chaîne lourde μ à la surface des cellules pré-B, en association avec une pseudo-chaîne légère formée de la liaison non covalente des protéines $\lambda 5$ et Vpré-B. Ce complexe forme le pré-BCR qui permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et d'entrer dans une phase d'expansion clonale. Suite à cette expansion clonale, les gènes RAG (recombination activating gène) sont réexprimés pour réaliser les réarrangements VJ des gènes des chaînes légères. Ces réarrangements sont monoalléliques et débutent sur un des deux locus IGK. Si aucun réarrangement productif sur chacun des deux allèles ne s'est produit, ils se poursuivent au locus IGL comme indiqué précédemment. Enfin, on note à ce stade l'expression du marqueur CD20.

2.2.3.4 Le stade B immature

Ce stade est caractérisé par la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudo-chaîne légère et donne naissance à une IgM de surface conférant à la cellule sa spécificité de reconnaissance de l'antigène.

Tout comme pour l'expression du complexe μ , par la cellule pré B, l'expression des Ig M par la cellule B immature enclenche un phénomène de rétro-inhibition (feed back) qui bloque tout nouveau réarrangement des gènes codant les chaînes légères.

Ce sont ces mécanismes très stricts, dans la régulation de la capacité de réarrangement des gènes des immunoglobulines, qui rendent compte de l'expression d'une seule et unique spécificité d'immunoglobuline par chaque clone lymphocytaire B. C'est au stade de cellule B immature qu'apparaît le marqueur CD21.

À ce stade, interviennent, par ailleurs, des processus de sélection positive et négative, mais dont les mécanismes ne sont encore que partiellement élucidés. Cependant, au cours du processus de sélection négative, les lymphocytes B immatures possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminés. Ces cellules vont alors produire un long transcrite d'ARN pré-messager couvrant les régions constantes des chaînes μ et δ . Un épissage de ce pré-ARNm associe la région variable VDJ recombinée aux domaines constants de l'un ou l'autre isotype.

Ces cellules B immatures naïves coexpriment ainsi les deux types d'immunoglobulines avec la même spécificité (IgM, IgD). On parle de cellules $\mu\delta$ qui quittent alors la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront subir les dernières étapes de maturation. (25,26)

Activation et différenciation des lymphocytes B dépendante de l'antigène:

Les cellules B immatures qui sortent de la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, **le stade B transitionnel**. C'est à ce stade qu'a lieu la sélection périphérique au cours de laquelle les lymphocytes B auto-réactifs seront éliminés. Les lymphocytes B qui survivent à la sélection périphérique, environ 50 %, expriment une IgM et une IgD de surface et se différencient soit en lymphocytes B conventionnels spécifiques d'un antigène et seront essentiellement impliqués dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T (thymo-dépendante), soit en lymphocytes B de la zone marginale impliqués eux dans les réponses humorales indépendantes des lymphocytes T (thymo-indépendante). (25)

2.2.4 Régulation de la lymphopoïèse B :

2.2.4.1 Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokine :

Les premières étapes du développement sont strictement dépendantes du microenvironnement particulier apporté par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules stromales régulent la croissance, la maturation et la survie des précurseurs par l'intermédiaire de facteurs solubles (**IL7**, Stem Cell Factor ou SCF, SDF-1) et de contacts directs avec les cellules en développement.

2.2.4.2 Rôle des facteurs de transcription :

Au cours de la différenciation lymphocytaire, des facteurs de transcription, en se fixant sur différentes séquences promotrices et activatrices de gènes cibles, sont impliqués dans la quiescence, la survie et la mort des progéniteurs B, ainsi que dans l'induction de l'engagement des cellules dans une lignée spécifique. Un certain nombre de ces facteurs de transcription apparaissent ainsi fondamentaux : **Ikaros**, **E2A**, **EBF**, **Pax5** et **LF1**.

2.2.4.3 Signal fourni par le pré BCR :

Le pré-BCR joue aussi un rôle critique dans l'exclusion allélique en induisant une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG qui arrête la recombinaison des gènes de chaînes lourdes sur le 2eme allèle.

Les gènes codant les recombinaisons **RAG1** et **RAG2** sont actifs dans les cellules proB précoces et tardives et dans les cellules préB. L'activité de l'enzyme **Tdt**, impliquée dans l'addition de N nucléotides, s'éteint au stade de lymphocyte pré B. (25,26)

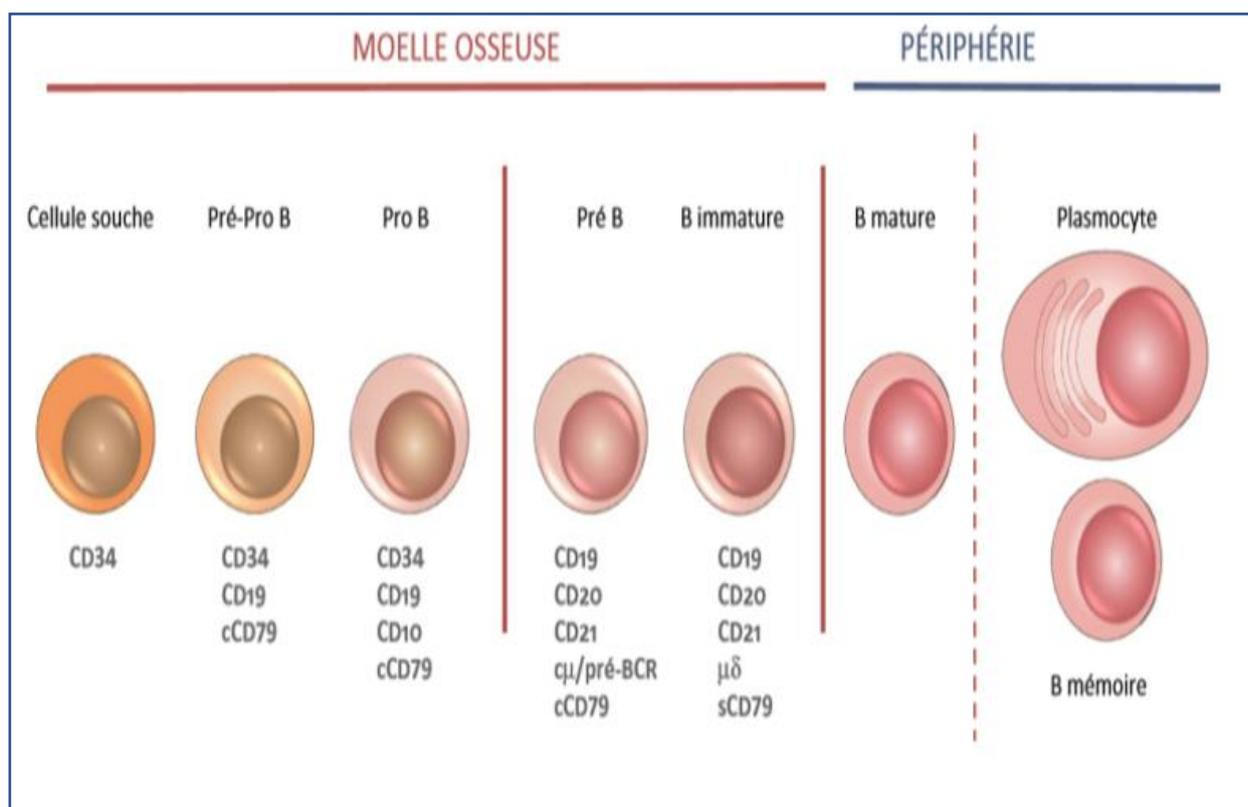


Figure 3 : Ontogénèse des lymphocytes B. (25)

II LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE DE L'ENFANT

1 Définition

La leucémie aigue est une hémopathie maligne résultant de l'expansion clonale d'un précurseur hématopoïétique bloqué à un stade précoce de la maturation, appelé blaste. Lorsque le blocage de maturation porte sur un précurseur lymphoïde, la leucémie aiguë est dite lymphoblastique (LAL). Elle est caractérisée par la suppression de l'hématopoïèse normale, l'infiltration des organes extramédullaires (ganglions, rate, foie, système nerveux central) et la libération de cellules leucémiques dans le sang périphérique. (27)

2 Epidémiologie

La leucémie aiguë est le cancer le plus fréquent chez l'enfant représentant environ 30 % de l'ensemble des tumeurs pédiatriques. (1,27)

Chez l'enfant, 80 % des leucémies aiguës sont des LAL. Les LALB représentent 75% des cas, les LALT 25% environ. (27)

La maladie est légèrement plus fréquente chez le garçon que chez la fille. Le pic d'incidence se situe entre 1 et 4 ans. L'incidence dépend également de l'origine ethnique : la maladie est deux fois moins fréquente chez l'enfant de race noire que chez l'enfant blanc, avec une sur représentation relative des LALT chez les enfants noirs. En fait, la plus grande fréquence observée chez les enfants blancs paraît être surtout liée à une augmentation d'incidence de la forme B commune de la petite enfance. (1)

Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 1,9 chez l'homme et de 1,2 chez la femme. À l'inverse des LAM, le pic d'incidence se situe chez le sujet jeune avec un taux d'incidence standardisée de 3,4/100 000 h/an chez l'homme et de 2,5/100 000 h/an chez la femme avant 15 ans.

En France, les données du registre national des leucémies de l'enfant donnent un taux d'incidence standardisé sur la population mondiale des LAL de 3,57/100 000 h/an en 2000-2004. Cette incidence est de 1,4 avant 1 an mais passe à 6,14 entre 1 et 4 ans, à 3,1 de 5 à 9 ans puis à 1,9 de 9 à 14 ans.

Aux USA, les proliférations B ont un taux d'incidence 3,5 fois plus élevé que les proliférations T (11,7 vs 2,6/100 000 h/ an) et où on note une moins grande fréquence des LAL B dans la population noire. (28)

En Algérie, l'incidence des LAL de l'enfant est de 1.8 cas/ 100 000 habitants/an en 2013, avec une médiane d'âge de 5 ans. Les LAL B représentent 86% des cas et les LAL T 14%. (18)

3 Facteurs de risque :

3.1 Facteurs génétiques :

Le premier événement génétique à potentiel leucémogène prend place in utero. Démonstré initialement grâce au modèle particulier des LAL survenant chez les jumeaux monozygotes, ce point a été confirmé chez les non jumeaux, en étudiant l'ADN néonatal sur les buvards prélevés en salle de naissance pour les tests de dépistage génétique.

L'équivalent moléculaire de la translocation retrouvée dans les blastes au diagnostic de LAL peut ainsi être retrouvé dès le premier jour de vie. La latence, jusqu'à 14 ans dans certaines publications, implique que d'autres événements transformant sont nécessaires. (6, 27, 29)

La LAL est particulièrement fréquente chez l'enfant atteint de trisomie 21 (le risque est multiplié par un facteur 20 environ) ainsi que dans d'autres maladies génétiques : ataxie-télangiectasie, syndrome de Bloom, maladie de Shwachman. (1)

3.2 Les radiations ionisantes.

L'exposition à des radiations ionisantes augmente le risque de leucémie aiguë lymphoïde et myéloïde. Ce rôle a été analysé pour trois types différents d'exposition : avant la conception, pendant la vie intra-utérine et après la naissance. Certains auteurs ont mis en évidence une augmentation du risque chez les enfants nés d'un père ayant vécu à proximité d'une centrale nucléaire mais ceci n'a pas été confirmé dans d'autres études. Le risque lié à l'exposition pendant la vie intra-utérine ou après la naissance est bien documenté mais n'est actuellement en cause que dans un très faible pourcentage de cas de LAL de l'enfant. (1,27)

3.3 Les médicaments cytostatiques et agents chimiques cancérigènes :

Sont impliqués dans la majorité des cas des leucémies aiguës myéloïdes ou des myélodysplasies plutôt que des LAL. (1,26)

3.4 Les agents infectieux :

Le rôle d'agents infectieux qui agiraient comme cofacteurs de la leucémogénèse a été suggéré de longue date (hypothèse de Greaves) mais n'est démontré que dans le cas du virus Epstein-Barr (EBV), qui est impliqué dans la leucémie de Burkitt (LAL3). (1,27).

4 Mécanisme physiopathologique:

Dans le processus de formation des cellules B et T immunocompétentes, les cellules lymphoïdes sont caractérisées par des réarrangements clonaux des gènes codant pour la synthèse des immunoglobulines (Ig) et ceux pour le récepteur des cellules T (TCR).

Des tests cytogénétiques et de génétique moléculaire ont trouvé des anomalies chromosomiques numériques et structurelles clonales dans les blastes lymphoïdes chez > 70 % des patients, impliquant généralement les gènes de synthèse des Ig et du TCR.

Les modifications génétiques qui surviennent à la suite de réarrangement pathologique des chromosomes (par ex., BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX) entraînent un arrêt de la différenciation des cellules lymphoïdes progénitrices, une prolifération anormale et une expansion clonale. L'expression pathologique des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Rb, P53, P16, P15, P14, P57) résulte d'anomalies génétiques (délétion, amplification, mutation) ou de dérégulation épigénétique (en particulier l'hyperméthylation des agents promoteurs).

L'identification des anomalies chromosomiques par la génétique moléculaire (marqueurs clonaux) permet de confirmer le diagnostic, d'identifier les facteurs de risque et d'évaluer la maladie résiduelle minimale. (27)

5 Signes cliniques :

L'expression clinique des leucémies aiguës est déterminée par deux processus : l'insuffisance médullaire et le syndrome tumoral et dont l'association donne des tableaux variables :

Signes d'insuffisance médullaire :

- Syndrome anémique : pâleur cutanéomuqueuse, asthénie et dyspnée d'effort.
- Syndrome infectieux : en rapport avec la neutropénie.
- Syndrome hémorragique avec pétéchies et ecchymoses, épistaxis, gingivorragie témoignant d'une thrombopénie.

Syndrome tumoral : fait de

- Hépatomégalie et/ou splénomégalie : 70 %
- Adénopathies : 60 %
- Atteinte du SNC/des méninges avec céphalée, nausées, vomissements, troubles de la vision, troubles du SNC : < 10 %
- Atteinte médiastinale avec adénopathie : 15 %

- Infiltration parenchymateuse accompagnée d'atteinte fonctionnelle (foie, reins, tractus gastro-intestinal, testicules, etc.) : < 10 %.
- En cas de LAL-T : tumeurs médiastinales, infiltration cutanée fréquente. **(1, 27)**

6 Diagnostic biologique.

6.1 Hémogramme :

C'est l'examen de première intention, à la recherche de cytopénies. **(30)**

- Anémie normocytaire normochrome arégénérative. (Hb : Médiane de 7,5 g/dl [LAL-B] et de 9 g/dl [LAL-T]).
- Le taux de GB est variable, il peut être normal, élevé ou abaissé, mais le plus souvent on retrouve une hyperleucocytose, parfois majeure (GB > 50 G/L dans 15 % des LAL-B et 55 % des LAL-T). L'équilibre leucocytaire montre une neutropénie. (PNN <1,5 G/L, 75%).
- Thrombopénie quasi constante (médiane à 54 G/L).

6.2 Frottis sanguin

La formule leucocytaire au microscope optique après coloration au MGG (May Grumwald Giemsa), montre la présence dans la majorité des cas des blastes circulants de morphologie lymphoïde avec un pourcentage variable.

Une numération formule sanguine normale et l'absence de blastes leucémiques dans le sang périphérique n'éliminent pas le diagnostic de leucémie aiguë, d'où l'utilité du myélogramme. **(27, 30)**

6.3 Myélogramme: élément clé du diagnostic

- Indispensable pour établir le diagnostic de leucémie aiguë.
- Par ponction de moelle osseuse au niveau de la crête iliaque chez l'enfant.
- Permet d'affirmer le diagnostic de leucémie aiguë par la présence de plus de 20% de blastes dans la moelle osseuse (selon l'OMS 2001).

La moelle osseuse est généralement hypercellulaire, infiltrée massivement (le nombre de blastes > 90 %). Dans de rares cas, on retrouve une fibrose réticulinique (moelle pauvre pauciblastique) ou nécrose médullaire, d'où l'utilité de la biopsie médullaire. **(30)**

6.4 Coloration cytochimique ou cyto-enzymatique :

Elle Consiste à mettre en évidence une enzyme (MPO) à l'intérieur de la cellule blastique permettant ainsi son identification. Une coloration MPO négative (blastes + < 3 %) permet

l'orientation du diagnostic vers l'origine lymphoïde des blastes, mais le diagnostic d'une LAM indifférenciée ne peut être exclue, d'où l'intérêt de l'immunophénotypage. (30)

6.5 Immunophénotypage

L'immunophénotypage sur moelle osseuse est un complément indispensable au myélogramme.

Il consiste à mettre en évidence l'expression variable par les cellules leucémiques d'antigènes membranaire ou cytoplasmique regroupés en « CD » (cluster de différenciation).

Cette caractérisation se fait par la technique de cytométrie en flux (CMF) multicolore à l'aide d'anticorps monoclonaux marqués par une substance fluorescente. (30)

Intérêt :

- Identifier les blastes myéloïdes morphologiquement/cytochimiquement indifférenciés (LAM0, LAM7) et permettre le diagnostic de leucémie aiguë lymphoblastique.
- Dans les LAL, intérêt majeur, il permet de distinguer les LALB des LALT et de préciser le degré de maturation.
- Permet de diagnostiquer les LA bi phénotypiques.
- Rechercher l'expression aberrante des marqueurs par le clone leucémique, ce qui permettra de suivre l'évolution de la maladie par mesure de la maladie résiduelle. (27)

6.6 Recherche d'anomalies génétiques :

Elle repose sur l'utilisation combinée de techniques complémentaires de cytogénétique et de biologie moléculaire.

- **Cytogénétique :**

La cytogénétique classique (caryotype) permet de rechercher les anomalies chromosomiques de nombre (aneuploïdies) ou de structure (translocations surtout).

La FISH est adaptée à la détection de translocations cryptiques (non détectées au caryotype).

- **Biologie moléculaire :**

La PCR va permettre de mettre en évidence des anomalies restées indétectables sur le caryotype et en FISH.

Dans le cadre des LAL, on recherche la présence de transcrits de fusion et les réarrangements des gènes des Ig/TCR.

La présence de ces anomalies permet d'affirmer le caractère clonal de la prolifération lymphoïde, et d'identifier les marqueurs moléculaires qui permettront le suivi de la maladie résiduelle en biologie moléculaire. (30)

6.7 Ponction lombaire

A la recherche de l'envahissement du SNC

- Décompte cytologique : nombre de GB/mm³ et de GR/mm³.
- Envahissement du LCR (liquide céphalorachidien) si > 5 éléments/mm³ et présence de blastes à la Cytospin.
- Le LCR est envahi dans environ 3 % des LAL (10 % des LAL-T). (30)

7 Classification des LAL :

A l'issue de ce bilan initial, on peut ainsi schématiquement séparer les différentes sous-entités de LAL

7.1 Classification morphologique

La classification morphologique FAB (French-American-British Group) proposée en 1976, reconnaissait trois groupes : L1, L2 et L3.

LAL1 : petites cellules monomorphes avec de petits nucléoles.

LAL2 : cellules polymorphes plus grandes avec un ou plusieurs nucléole(s) bien visible(s), faible rapport noyau/cytoplasme.

LAL3 de type Burkitt : grandes cellules avec nucléoles bien visibles, mal structurés et cytoplasme basophile comportant souvent des vacuoles.

Cette classification a perdu son intérêt dans les LAL. Elle permet néanmoins de repérer les rares formes L3 ou LAL de Burkitt (3 % de l'ensemble), actuellement exclues des protocoles de traitement de LAL, car traités avec succès comme les lymphomes B matures. (28, 31)

7.2 Classification immunologique

L'immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) a permis d'attribuer à la maladie son appartenance à la lignée B ou T et d'individualiser différents sous-groupes.

Ces constatations constituent la base de la classification immunophénotypique de L'European Group for Immunophenotyping of Leukemias (EGIL) proposée en 1995.

Cette classification est largement utilisée aujourd'hui, elle reconnaît quatre sous-groupes au sein des LAL B (Tableau I), et quatre sous-groupes au sein des LAL T (Tableau II), en fonction du degré de maturation des blastes. (5,31)

Son application impose d'avoir recherché sur les blastes l'ensemble des marqueurs entrant en jeu pour l'application de cette classification :

Pour la lignée B : CD19 et au moins un autre marqueur de lignée (CD79a intracytoplasmique, CD22, CD24, CD20), CD10, les chaînes lourdes mu intracytoplasmiques et les immunoglobulines de surface. (5)

Tableau I : Classification EGIL des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B.

	CD19, cCD79a	CD10	cIgM	sIgM
BI	+	-	-	-
BII	+	+	-	-
BIII	+	+/-	+	-
BIV	+	+/-	+/-	+

Pour la lignée T : Les quatre stades de la classification des LAL-T sont caractérisés par l'expression intracytoplasmique de CD3. Les LAL T-I sont très immatures et n'expriment que CD7 en surface. L'apparition de CD2 et/ou CD5 signe le stade T-II. La présence de CD1a en surface signe la nature thymocytaire de la prolifération et le stade T-III. Les formes les plus matures T-IV sont caractérisées par la disparition de CD1a et l'expression à la fois cytoplasmique et membranaire de CD3, associé au TCR. (5)

Tableau II : Classification EGIL des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) T.

	cCD3	CD7	CD2, CD5	CD1a	sCD3
TI	+	+	-	-	-
TII	+	+	+	-	-
TIII	+	+	+	+	-
TIV	+	+	+	-	+

7.3 Classification OMS

Cette classification proposée par l'OMS (organisation mondiale de la santé) en 2001, révisée en 2008 puis en 2016, intègre aux données morphologiques et immunophénotypiques déjà utilisées dans les précédentes classifications des groupes FAB et EGIL, des données génétiques et cliniques dans le but de définir des entités biologiquement homogènes et cliniquement pertinentes. La valeur pronostique de certaines anomalies génétiques est désormais bien établie.

Cette classification se divise en deux groupes : les LAL associées à des anomalies génétiques récurrentes et les LAL non associées à des anomalies génétiques récurrentes. (31-33)

- Leucémies aiguës lymphoïdes avec anomalies génétiques récurrentes

Ces anomalies récurrentes permettent un classement d'environ 60 % des LAL B et ne concernent pas, à quelques exceptions près, les LAL T (Tableau III) (5, 31).

- Leucémies aiguës lymphoïdes sans anomalies génétiques significatives

D'autres anomalies cytogénétiques et génétiques peuvent être mises en évidence dans les LAL, mais ne sont pas associées à des entités particulières. Ces anomalies sont plus fréquentes dans les LAL T que dans les LAL B.

Dans les LAL B, on peut citer les délétions du gène *Ikaros* et les altérations de *PAX5*.

Dans les LAL T, des mutations de *NOTCH1* ou de son partenaire *FBW7* sont retrouvées dans plus de 70 % des cas, sans corrélation phénotypique.

D'autres altérations, comme les délétions de *TAL1* ou *C-Myb*, l'hyperexpression de *HOX11* ou *HOX11L2*, ou la fusion *NUP214-ABL*, sont associées préférentiellement à certains sous- groupes phénotypiques de LAL T. (5,33)

Tableau III : Leucémies aiguës lymphoïdes avec anomalies génétiques récurrentes (5,31).

Anomalie cytogénétique récurrente	Anomalie moléculaire correspondante	Lien avec la classification EGIL	Pronostic
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	BII parfois pré-B (BIII) ou plus rarement pro-B (BI). 3% des enfants.	Défavorable
t(v;11q23) principalement t(4;11)(q21;q23) et t(11;19)(q23;p13.3)	Réarrangement de KMT2A (MLL)	Souvent LAL BI 3 % des LAL-B de l'enfant dont 60 % des LAL-B si enfant <1an	Défavorable
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	Très souvent LAL BII 25% enfants	Favorable
Hyperploïdie	Absence	Très souvent LAL BII 20- 25% enfants	Favorable
LAL à cellules de Burkitt : t(8;14) (q24;q32) ou l'une de ses variantes, t(2;8) ou t(8;22).	C-Myc (8q24)	LALB mature (BIV). 2% chez l'enfant	
Hypoploïdie 23 à 43 chromosomes	Absence	2% enfants	Défavorable
t(5;14)(q31;q32)	IL3-IGH (conduisant à la surexpression d'IL3)	Très rare (<1%)	Défavorable
t(1;19)(q23;p13.3)	TCF3-PBX1	Souvent LAL BIII 6 % des enfants	Favorable
Amplification intrachromosomique sur le chromosome 21 : iAMP21* 5 copies ou plus du gène (ou 3 copies supplémentaires ou plus sur un seul chromosome 21 anormal en métaphase FISH).	Absence	2% des enfants (surtout avec faible taux de leucocytes)	Défavorable
Translocation impliquant des tyrosines kinases ou des récepteurs de cytokines	BCR-ABL1-like	10 à 15 % des enfants	Défavorable
Early T-cell precursor ALL (ETP-ALL)*	Absence fréquente de réarrangements IG/TCR Hétérogénéité génétique (anomalies communes à la fois aux LAL-T et aux leucémies aiguës myéloblastiques)	Immunophénotype immature par définition (absence de CD1a et CD8, faible expression de CD5, expression de marqueurs myéloïdes et/ou de cellules-souches)	Initialement considérées de mauvais pronostic, mais meilleur pronostic dans des études récentes.

8 Traitement :

L'approche thérapeutique standard de première ligne pour le traitement des patients pédiatriques atteints de LAL, consiste en des schémas de chimiothérapie de plusieurs médicaments suivis d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) dans les groupes à haut risque.

Au cours de la dernière décennie, les agents moléculaires ciblés et l'immunothérapie sont apparus comme de nouvelles stratégies thérapeutiques. **(1, 2, 6)**

8.1 Protocole de chimiothérapie :

La chimiothérapie comprend trois phases: l'induction de la rémission, la consolidation (ou l'intensification) et l'entretien, et dure de 2 à 2,5 ans. **(1, 6)**

8.2 Greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH)

Sont candidats à une greffe en première rémission les formes de très mauvais pronostic (cytogénétique très défavorable ou réponse lente en début de traitement) ainsi que les formes les plus graves du nourrisson de moins de 1an. **(1)**

8.3 Thérapie ciblée :

Les inhibiteurs des tyrosines kinases (ITK) ciblant la mutation génétique BCR-ABL1 ont révolutionné le traitement des LALB BCR-ABL +. Dans la LAL Ph positive pédiatrique, l'ajout d'un ITK à une chimiothérapie intensive post-induction a donné des taux de survie similaires ou supérieurs à ceux des patients ayant reçu une GCSH. **(4, 6)**

8.4 Immunothérapie:

L'immunothérapie a considérablement amélioré le taux de réponse et les résultats chez les patients atteints de LALB récidivante / réfractaire. **(6)**

Le Blinatumomab est un anticorps bispécifique engageant les cellules T, qui se lie au CD3 sur les cellules T et au CD19 sur les lymphoblastes B, entraînant la libération de cytokines inflammatoires, la prolifération des cellules T et la lyse des cellules CD19 +. **(4, 6)**

Les CAR T Cell sont des cellules T modifiées par un récepteur d'antigène chimérique qui est spécifique des antigènes des cellules B. Dans cette approche, un anticorps reconnaissant les antigènes des cellules B, est exprimé par les propres cellules T cytotoxiques génétiquement modifiées du patient. Il en résulte, l'activation des lymphocytes T d'une manière majeure indépendante du complexe d'histocompatibilité, donnant une puissante réponse cytotoxique. Bien que les CAR T Cell puissent être curatives en elles-mêmes, certains les considèrent comme une thérapie de transition vers une allo greffe de CSH ultérieure. **(2, 6).**

Au cours des trente dernières années, les progrès dans les protocoles de chimiothérapie, fruit d'une collaboration internationale fructueuse, a donné lieu à une grande amélioration dans le pronostic global des LAL de l'enfant. Les taux de survie sans événement à 5 ans étaient entre 70 et 80 % dans les années 90. Actuellement, les taux de survie à 5 ans sont d'environ 90%. (1,2)

Cependant, des inconvénients importants des thérapies conventionnelles persistent, y compris des toxicités sévères et le développement d'une chimiorésistance conduisant à une rechute. (1,2,6)

En conséquence, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est de la plus haute importance pour améliorer les résultats du traitement.

Les objectifs des protocoles thérapeutiques actuels sont doubles ; améliorer la prise en charge des LAL de haut risque de rechute, et la sélection toujours plus précise des patients bons répondeurs dans la perspective de réaliser un allègement thérapeutique afin de limiter au maximum le risque de séquelles à long terme, source de préoccupation majeure pour l'hématologue pédiatre. (3)

9 Facteurs pronostiques :

Un très grand nombre de facteurs pronostiques ont été décrits au fil des protocoles, mais l'impact clinique de la plupart de ces facteurs a été gommé par l'efficacité des chimiothérapies modernes. Les facteurs pronostiques qui gardent actuellement une signification sont :

- Les facteurs liés à l'hôte.
- Les facteurs issus de la caractérisation initiale de la maladie (la leucocytose initiale, l'immunophénotype, les anomalies cytogénétiques et moléculaires).
- Les facteurs issus de la réponse au traitement (corticosenibilité, chimiosensibilité et la maladie résiduelle). (1, 5)

9.1 Facteurs liés à l'hôte

9.1.1 Âge

L'âge est l'un des facteurs pronostiques principaux dans la LAL. Il est intimement corrélé aux facteurs pronostiques liés à la maladie. La LAL de l'enfant est globalement considérée comme de meilleur pronostic que celle de l'adulte. Cette différence de pronostic est non seulement liée aux différences de caractéristiques entre la LAL de l'enfant et celle de l'adulte, mais également aux disparités de prise en charge des enfants et des adultes.

Chez l'enfant et l'adolescent, la tranche d'âge associée à un pronostic favorable va de 1 à 10 ans. La gravité des LAL du nourrisson (< 1 an) est principalement liée à la fréquence élevée (80 %) des réarrangements de l'oncogène *MLL* observés dans cette population. Le pronostic est considéré comme moins bon chez les enfants de plus de 10 ans. Les LAL de l'adolescent de plus de 15 ans sont souvent considérées comme à haut risque, du fait des caractéristiques qui se rapprochent de celles des adultes. **(1, 5)**

9.1.2 Ethnie

Les études menées chez l'enfant ont montré un moins bon pronostic pour les patients de race noire. Cette observation est en partie liée à des différences de caractéristiques des LAL entre ethnies. Les enfants de race noire ont des maladies souvent plus hyperleucocytaires et plus tumorales. Cette disparité tient aussi, probablement, à des différences pharmacogénomiques. **(6)**

9.1.3 Pharmacogénomie

Les récents progrès de la biologie moléculaire ont permis de mettre en exergue le rôle important de la génétique dans la survenue de la maladie mais aussi dans la variabilité interindividuelle de réponse au traitement. Le polymorphisme des gènes qui codent des protéines impliquées dans le métabolisme ou le transport des agents cytotoxiques, ou celui des cibles de ces agents, peut modifier la réponse antileucémique. Ainsi, les nombreux travaux sur la pharmacogénétique de la 6-mercaptopurine ont conduit à des recommandations internationales d'adaptation posologique en fonction du génotype individuel. D'autres polymorphismes d'enzymes ou de récepteurs ont été impliqués dans une résistance à la chimiothérapie ou une toxicité accrue, notamment pour le méthotrexate et les corticoïdes. **(5)**

9.2 Facteurs liés à la maladie :

9.2.1 Leucocytose

La leucocytose initiale est l'un des facteurs pronostiques les plus importants, quel que soit le groupe de patients considéré. Ainsi on définit le risque standard pour les patients avec une LAL B ayant une leucocytose initiale inférieure à 50 G/L. Ceux ayant une leucocytose supérieure à 50G/L appartiennent au groupe de haut risque. **(1,5)**

9.2.2 Syndrome tumoral

L'existence d'un syndrome tumoral (adénopathies, hépatosplénomégalie) au diagnostic de la leucémie est un facteur pronostique classique défavorable associé à un risque plus élevé de rechute. L'atteinte initiale du SNC a longtemps été considérée comme de mauvais pronostic. Il semble que ce paramètre soit d'impact plus modéré avec les schémas

thérapeutiques plus récents, notamment en raison de la prise en charge post induction adaptée à ces localisations initiales. (5)

9.2.3 Immunophénotype

La classification entre LAL de la lignée B et T est fondamentale sur le plan pronostic et thérapeutique. Les LAL de la lignée T ont longtemps été considérées comme de mauvais pronostic chez l'enfant. Les LAL pro-B ainsi que les LAL pré-B CD10- conservent un pronostic défavorable dans les protocoles actuels. L'association entre le phénotype et les données de cytogénétique et de biologie moléculaire est importante et modifie probablement le poids de l'immunophénotype dans le pronostic. (1,5)

9.2.4 Cytogénétique

Les anomalies cytogénétiques détectées dans les LAL sont devenues un des éléments essentiels de la décision thérapeutique et de la stratification pronostic. L'impact de ces anomalies concerne souvent les LAL de la lignée B. (Tableau 3). (5, 31)

Dans les LAL T, les caryotypes sont plus fréquemment normaux ou pseudodiploïdes. Les translocations sont moins fréquentes et impliquent fréquemment les locus qui codent les chaînes du récepteur T pour l'antigène (*TCRA/TCRD* en 14q11, *TCRB* en 7q35). Dans ces cas, les translocations aboutissent à la surexpression de protéines impliquées dans la leucémogénèse. (Tableau IV). Ces anomalies, parfois cryptiques, sont souvent détectées par FISH ou par biologie moléculaire. (5)

Tableau IV : Principales anomalies cytogénétiques rencontrées dans les LAL-T.

Anomalie cytogénétiques	Fréquence	Pronostic
Surexpression de TAL1 (<i>SIL-TAL1</i>)	60% des LALT de l'enfant	Bon pronostic.
Surexpression de <i>TLX1/HOX11</i>	8 % des LALT enfant	Bon pronostic
Surexpression de <i>TLX3/HOX11L2</i>	30 % des LALT	Mauvais pronostic
<i>NUP214-ABL1</i>	4 % à 6 % des LAL T	Pronostic discuté.
<i>CALM-AF10</i>	13 % des LAL T	Mauvais pronostic

9.2.5 Anomalies géniques

Il s'agit essentiellement de délétions ou de mutations, ainsi que de la modification d'expression de certains gènes.

Dans les LAL B, des mutations du gène *IKZF1* (*Ikaros*, 7p12) ont été identifiées dans près de 80 % des LAL Ph1+. Elles ont également été retrouvées dans 20 % des LAL de l'enfant et s'associent à un risque plus élevé de rechute. (5)

Dans les LAL T, les cas présentant des mutations dans **NOTCH1** (50- 60% des LALT), un gène exprimant un récepteur transmembranaire impliqué dans le développement des lymphocytes T, et les gènes **FBW7** sont considérés comme des patients à faible risque, tandis que les patients dépourvus de ces mutations ou présentant des mutations impliquant **RAS / PTEN** sont définis comme des cas à haut risque. (2, 5)

93 Facteurs composites (Réponse au traitement) :

Plusieurs outils d'évaluation de la qualité de la réponse au traitement ont été développés dans les leucémies. Les groupes pédiatriques ont souvent été à l'initiative de la mise en place de ces outils pronostiques. On peut distinguer les critères morphologiques (corticosenibilité, chimiosensibilité) et l'évaluation de la maladie résiduelle lors de la rémission. (1)

9.3.1 L'évaluation morphologique :

Corticosenibilité : Définie par une blastose sanguine inférieure à 1G/L après 7 jours de corticothérapie.

Ce critère est particulièrement intéressant dans les LALT au cours desquelles il est fréquemment observé (40% des cas) et de pronostic défavorable. (1)

Chimiosensibilité : Définie par un taux de blaste médullaire inférieur à 5% à la fin de la chimiothérapie d'induction (j35-42). Ce critère est désormais abandonné au profit de l'évaluation de la maladie résiduelle. (1, 5)

9.3.2 La maladie résiduelle (MRD).

La maladie résiduelle est l'ensemble des cellules malignes persistant dans l'organisme lors de la phase de rémission complète cytologique (non détectables par les méthodes morphologiques classiques limitées par un seuil de détection de 5%). (1, 5)

Il a été démontré que la mesure de la MRD est le meilleur indicateur de la réponse au traitement et du risque de rechute. La MRD reflète l'influence collective de la génétique des cellules leucémiques, du microenvironnement et des facteurs de l'hôte. (8-10)

III LA MALADIE RESIDUELLE (MRD) DANS LES LAL

1 Concept et définition :

Pendant des décennies, la morphologie a été la méthode de choix pour évaluer la réponse au traitement chez des patients atteints de différentes hémopathies malignes, pour la détection précoce de la rechute. Cependant, la morphologie a une sensibilité limitée. **(16)**

Dans les leucémies aiguës, la rémission morphologique est définie par un taux de blaste inférieur à 5% dans la moelle osseuse. Cela correspond à un niveau de détection d'une cellule maligne sur 20 cellules normales. L'induction d'une rémission morphologique peut résulter d'une réduction de deux log au maximum (de 10^{12} à 10^{10}) cellules leucémiques. Ainsi, de nombreux patients jugés en rémission morphologique complète, ont finalement rechuté en raison de la persistance de cellules leucémiques minimales résiduelles (Minimal residual disease : MRD) sans être détectées. Pour cette raison, des méthodes plus sensibles ont été développées dans les années 80 pour la détection de la MRD. **(16, 34)**

Ces méthodes peuvent détecter une cellule anormale dans 1000 cellules, ce qui correspond à un niveau de MRD de 0,1% (10^{-3}), jusqu'à une cellule anormale dans un million de cellules, ce qui correspond à une MRD de 0,0001% (10^{-6}).

Pour la plupart, le niveau de MRD actuellement acceptable est un niveau de MRD de 10^{-4} . **(34)** Techniquement, la MRD est la persistance des cellules leucémiques résiduelles dans la MO, qui est en rémission morphologique. **(16,34)**.

2 Historique :

Les premières études sur la détection de la MRD dans la LAL remontent aux années 1980, en utilisant la microscopie à immunofluorescence. En particulier dans la leucémie aigue lymphoblastique T, il est apparu possible de surveiller avec précision la diminution et la prolifération des cellules leucémiques, grâce à l'immunophénotype aberrant des blastes des LALT, dans le sang et dans la moelle osseuse (coexpression ectopique de la Tdt et du CD3 intra cytoplasmique). **(35,36)**

À ce moment-là, un immunophénotype aberrant aussi spécifique n'était pas encore identifié pour les blastes des LALB. En outre, la présence des précurseurs lymphoïdes B normaux (hématogones) dans la moelle osseuse de régénération post-chimiothérapie a causé trop de bruit de fond pour la détection des blastes des LALB. Par conséquent, de nombreuses autres technologies ont été évaluées pour la détection de la MRD, comme l'identification des

aberrations phénotypiques par la technique de cytométrie de flux et l'identification des aberrations génétiques par des techniques de biologie moléculaires. **(37,38)**

L'impact pronostique de la MRD a été identifié à la fin des années 1990 dans des études pédiatriques. **(7,8,39)**

Au cours de la décennie 2005-2015, l'application de la recherche de la MRD à la leucémie aigüe lymphoblastique a considérablement augmenté, passant d'un nombre limité de groupes d'étude en Europe et aux États-Unis à une application mondiale. **(11,40)**

3 Application clinique de la recherche de la MRD

3.1 Impact pronostique de la MRD :

Plusieurs études cliniques ont évalué la MRD et sa capacité à prédire les rechutes cliniques. Le statut de la MRD s'est avéré être l'un des prédicteurs les plus puissants de la survie sans rechute et de la survie globale (SG) dans les LAL, permettant une affectation du groupe à risque dans différents protocoles de chimiothérapie. **(7,8,10,39)**

De nombreuses études rapportent que la positivité de la MRD à la fin d'induction est un facteur prédictif d'un plus haut risque de rechute, indépendamment des autres facteurs de risque et que ce risque est proportionnel au niveau de MRD détectée. **(9,39)**.

La valeur pronostique de la détection de la MRD avant et après la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques a également été évaluée pour l'adaptation du traitement individuel. Une méta-analyse récente sur 21 rapports publiés, incluant plus de 2000 patients, a confirmé qu'une MRD positive avant l'allogreffe de CSH est associée à une survie globale et survie sans rechute réduites. **(12,13)** En ce qui concerne le contexte post-greffe de CSH, la surveillance MRD a été beaucoup moins utilisée, principalement en raison, de l'utilisation du chimérisme des donneurs pour la détection précoce des rechutes. Néanmoins, il a été démontré qu'une évaluation de la MRD par analyse du réarrangement des gènes des IG / TCR permettait la détection précoce et plus spécifique de la rechute par rapport à l'analyse du chimérisme. **(13)**

Le but ultime de l'évaluation de la MRD est de guider les décisions thérapeutiques en reconnaissant les patients qui ont très bien répondu au traitement et doivent donc être épargnés par la suite du traitement et en les distinguant des patients chez lesquels le traitement doit être poursuivi ou intensifié pour minimiser le risque de rechute clinique. **(16)**

Les études à grande échelle ont montré que les stratégies thérapeutiques basées sur la MRD améliorent encore les résultats chez les patients impliqués, des deux LAL, B et T (Tableau V). **(10,34,41)**.

Tableau V : Résultats des premiers essais thérapeutiques avec MRD décisionnelle.

Groupe	N° Patient/Période	Stratégie thérapeutique	Pronostic
St. Jude Total Therapy XV (NCT00137111) USA (10)	498 LAL infantile (2000- 2007)	Intensification	SR : MRD <1% J19 ou 0,01% à 0,99% à J 46. HR : MRD ≥ 1% à J19 ou ≥ 0,1% à J46 SSE à 10 ans des patients avec MRD ≥ 1% au J19 : 69,2% (IC à 95% 49,6–82,4, n = 36) vs 95,5% (91,7–97,5, n = 244) (p <0,001) pour le groupe provisoire à faible risque. 65,1% (50,7–76,2, n = 56) vs 82,9% (75,6–88,2, n = 142) (p = 0,008) pour le groupe provisoire RS. MRD ≥ 1% à J19 mais MRD <0,01% à J 46 SSE à 10 ans de 88,9% (43,3 à 98,4).
DCOG (Children's Oncology Group) ALL10 USA (41)	166 enfants de 1 à 19 ans, atteints de LAL, inclus dans le groupe risque standard. Octobre 2004 à avril 2012.	Réduction	MRD mesurés par PCR MRD1 = J33 et MRD2= J79. Protocole II a été réduit chez les patients SR en supprimant complètement la deuxième partie IIB. La p de survie de 99%±1% et la p ICR de 5%±2%. SSE cumulée à 5 ans était de 95%±2%.

3.2 Points de suivi et seuils pronostiques:

À la fin des années 1990, les premières études cliniques à grande échelle de MRD des LAL de l'enfant ont évalué la valeur pronostique des différents niveaux de MRD et à plusieurs points de suivi (pendant l'induction, la fin de l'induction et en post-consolidation). **(7,8,39)**

Le statut de la MRD au jour 33 (fin de l'induction) et au jour 78 (fin de la consolidation) semblaient être les plus informatifs et ont été utilisés pour identifier trois groupes à risque (risque faible, intermédiaire et haut risque) avec des taux de rechutes significativement différents à 3 ans **(7, 39)**. Les patients à faible risque basé sur la MRD, sont négatifs pour la MRD aux deux points de suivi (définis comme aucune MRD détectable, en utilisant des méthodes qui atteignent une sensibilité de 10^{-4}). Les patients à haut risque basés sur la MRD ont des niveaux élevés de MRD (10^{-2} à 10^{-3}) à la fin de la consolidation; et les patients à risque

intermédiaire basés sur la MRD ont des niveaux de MRD modérés à faibles (10^{-3} à 10^{-4}) à la fin de la consolidation. **(7,8,11)**

La valeur prédictive de rechute du niveau de la MRD reste cependant dépendante du traitement; L'interprétation des résultats de la MRD doit donc prendre en compte différents aspects, en particulier la technique utilisée, sa sensibilité, les moments de mesure de la MRD et la stratégie thérapeutique. **(40)**.

Dans ce contexte, plusieurs groupes d'étude des LAL, pédiatriques et adultes (Tableau VI), ont établi des points de suivi informatifs dans leurs protocoles thérapeutiques respectifs qui sont utilisés pour la stratification des groupes de risques. **(7,8,39,42)**.

Tableau VI : Points de suivi et seuils pronostiques des premières études des protocoles LAL pédiatriques et adultes.

Protocole thérapeutique	N° patients	Période	Méthodologie	Suivi (médiane)	Point de suivi MRD et seuil pronostique
EORTC 58881 (7)	178 LAL pédiatriques	Novembre 1989- mars 1996.	PCR sur des cellules MN de la MO	38 mois.	MRD1 : Fin d'induction, MRD2 : fin de consolidation. HR: MRD1 $\geq 10^{-2}$ et MRD2 $\geq 10^{-3}$.
Total therapy XIII A et XIII B (8)	195 LAL pédiatriques	Décembre 1991- février 1998	CMF 3 couleurs sur cellules MN de la MO.	04 ans	HR : MRD > 1% à J33 ou MRD > 0,1% à la semaine 14.
BFM 95 (39)	108 LAL pédiatriques	Avril 1996- octobre 1998	CMF 4 couleurs sur GB de la MO	03 ans	HR : MRD $\geq 0,1\%$ à J33 et MRD $\geq 0,01\%$ à la semaine 12
GMAAL (42)	580 LAL adultes	Avril 1999- juillet 2009.	RQ-PCR	05 ans	MRD1 : J70 et MRD2 : Semaine 16. HR : MRD2 $\geq 10^{-4}$

3.3 Nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la MRD:

Diverses stratégies ont été essayées pour cibler la MRD et améliorer les résultats des LAL haut risque. Il s'agit de la chimiothérapie intensive, de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, et de l'immunothérapie par des anticorps monoclonaux. (4, 6)

Chez les patients qui ont une MRD positive après l'induction et la consolidation, la poursuite de la chimiothérapie conventionnelle n'offre pas réellement une chance de surmonter cette résistance au traitement. Sur cette base, la greffe de CSH est proposée à ces patients comme le traitement le plus intensif disponible. Cependant, pendant la préparation de la greffe de CSH, y compris la recherche de donneurs, de nombreux patients rechutent. (42)

En outre, le taux de rechute est plus élevé après la greffe de CSH chez les patients présentant un niveau élevé de MRD avant la greffe. (12,13) De nouveaux médicaments avec des mécanismes d'action alternatifs sont donc nécessaires pour obtenir une rémission moléculaire et un pont vers l'allo greffe de CSH. (42)

Le développement de l'anticorps bispécifique Blinatumomab est un excellent exemple de cette approche. Les études initiales chez les patients pédiatriques LALB en rechute / réfractaire ont montré des résultats prometteurs, avec 40 à 60% des patients atteignant une rémission complète (2).

Dans une étude randomisée des adultes atteints de LAL-B réfractaire / récidivante, les patients ayant reçu du Blinatumomab avaient un meilleur taux de rémission complète et une meilleure survie que ceux ayant reçu la chimiothérapie standard, et des incidences plus faibles de neutropénie fébrile, d'infection et de septicémie (6).

Il a également été démontré qu'il était capable d'éradiquer la MRD dans la LAL, ce qui pourrait améliorer le pronostic des patients après la greffe de CSH. Chez les patients plus âgés sans l'option de transplantation, le traitement par immunothérapie peut être la seule chance. (42)

4 Aspects techniques de la MRD :

4.1 Prélèvement :

Plusieurs études cliniques à grande échelle ont évalué les niveaux de MRD dans des échantillons appariés de sang et de MO dans les LAL B et les LAL T. Ces études ont confirmé que les taux sanguins de MRD dans les LAL T étaient comparables ou inférieurs jusqu'à 1 log par rapport aux taux médullaires. Cependant, dans les LAL B, les taux sanguins de MRD étaient inférieurs de 1 à 3 logs à ceux de la MO, ce qui rend les études de MRD par prélèvement sanguin

impossibles chez les patients LAL B. Par conséquent, pour les LAL B et LALT, l'échantillon de MO est une condition préalable. (11,13)

4.2 Moyens d'étude :

Au cours d'une période de 25 ans, plusieurs technologies basées sur la PCR et la cytométrie en flux ont été développées pour des outils de MRD applicables en routine, en particulier en raison de la collaboration internationale à long terme avec un échange ouvert de connaissances et d'expériences. (11)

4.2.1 Techniques moléculaires :

4.2.1.1 Analyse du réarrangement des gènes des IG/ et TCR par PCR quantitative

A la fin des années 1980 (1989-1991) avec l'invention de la technique de PCR, de nombreux laboratoires ont commencé à utiliser l'analyse par PCR du réarrangement des gènes des Ig/TCR comme cibles PCR pour l'évaluation de la clonalité et la détection de la MRD dans les LAL.

L'étape d'identification des réarrangements Ig/TCR est réalisée grâce à des PCR multiplexes utilisant de nombreuses amorces capables de reconnaître les différents segments V, D et J pour les loci d'intérêt. Ces loci étant d'une grande complexité, la mise au point de ces systèmes PCR a été rendue possible par un effort collaboratif de nombreux groupes depuis une vingtaine d'années. Des protocoles de PCR standardisés pour la mise en évidence de ces réarrangements ont ainsi permis de généraliser le suivi de la MRD dans les LAL, avec des sensibilités élevées de 10^{-4} à 10^{-5} . Plus de 90-95% des LAL présentent au moins un réarrangement des loci qui permet leur suivi par PCR quantitative. Néanmoins, cette méthode est laborieuse, nécessite des connaissances et une expérience approfondie. La détection et le séquençage des réarrangements Ig/TCR au moment du diagnostic et la conception des amorces correspondantes prennent 3 à 4 semaines, et l'analyse des échantillons de suivi nécessite une semaine. (11,43)

4.2.1.2 Recherche des transcrits de gènes de fusion par la RQ-transcriptase inverse-PCR

D'abord développée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), la détection des transcrits de fusion BCR-ABL1 par PCR avec transcriptase inverse (RT-PCR), s'est imposée dans les LALB Ph+, en particulier chez l'adulte en raison de sa fréquence élevée avec l'âge. Dans les LAL de l'enfant, cette technique PCR est beaucoup moins utilisée (LAL Ph+ représente 3% des LAL de l'enfant). Le seuil de sensibilité de la méthode RQ-RT-PCR est de 10^{-4} à 10^{-6} , et elle est relativement facile à mettre au point avec des protocoles de PCR standardisés et les ensembles d'amorces-sondes sont déjà disponibles sous forme de décades. Néanmoins, la standardisation complète de toutes les étapes n'est pas encore disponible. (11,43)

4.2.2 Techniques de cytométrie en flux (CMF)

4.2.2.1 MRD par technique CMF multicolore classique (4 à 6 couleurs)

En comparaison avec l'analyse par PCR quantitative des réarrangements Ig/TCR, la détection de phénotypes aberrants par cytométrie de flux, a été explorée comme étant une technique MRD moins coûteuse et plus rapide, lorsque les cytomètres 4 et 6 couleurs étaient disponibles en 1998 à 2002. (11)

Cependant, de nombreuses études comparatives de PCR et de cytométrie en flux ont montré que la MRD par cytométrie en flux classique n'a pas été sensible en dessous du seuil de 10^{-4} dans la majorité des LAL.

De plus, l'identification de petits nombres de cellules blastiques dans la LALB, est avérée particulièrement difficile au moment de la post induction lorsque les cellules B de régénération (hématogones) sont présentes en grand nombre.

Il faut souligner aussi qu'au cours de l'évolution des leucémies, il est possible qu'une partie des blastes, après un traitement d'induction par exemple, subissent une modification de leur immunophénotype initiale rendant le suivi plus difficile. (14,43)

De plus, le phénotype au diagnostic, peut aussi être hétérogène avec de multiples populations plus ou moins représentées. Une population minoritaire au diagnostic peut passer inaperçue et être à l'origine de la rechute. (43)

Un autre inconvénient de la MRD par la cytométrie en flux classique est que les procédures de marquage appliquées, les panels d'anticorps et les stratégies de gating diffèrent de manière significative entre les laboratoires, ce qui rend ces procédures très subjectives. Par conséquent, les résultats de la MRD par cytométrie en flux, ont une comparabilité inter laboratoires beaucoup moins importante que les méthodes basées sur la PCR. (11).

4.2.2.2 MRD par CMF multiparamétrique de nouvelle génération EuroFlow

Le consortium EuroFlow a introduit de nouveaux concepts dans la recherche de la MRD par cytométrie en flux. Une sensibilité de 10^{-4} à 10^{-5} a été obtenue. Cela nécessite des approches entièrement standardisées, y compris le réglage de l'instrument, la procédure de marquage, l'acquisition des cellules et l'analyse multiparamétrique des données avec des stratégies de gating standardisées. Au cours de la dernière décennie, la plupart des laboratoires de diagnostic sont passés rapidement de cytomètres à 3 et 4 couleurs à des cytomètres à 8 et 10 couleurs (11,44,45).

4.2.3 Choix de la méthode

Toutes les méthodes ont des avantages et des inconvénients (tableau VII) et idéalement, tout devrait être disponible, mais ce sera probablement impossible pour la plupart des centres. La méthode à utiliser pour mesurer la MRD est largement déterminée par les ressources, l'expertise et la rapidité avec laquelle les résultats doivent être disponibles. **(11, 46)**

La plupart des essais cliniques Européens ont utilisé la technique de biologie moléculaire (réarrangement des gènes des Ig/TCR par PCR quantitative) pour établir les seuils pronostiques de la MRD dans leurs protocoles thérapeutiques, alors qu'aux USA et dans plusieurs pays asiatiques la MRD par CMF est l'approche préférée. **(11-13,43).**

En comparaison avec les techniques moléculaires, la détection de la MRD par cytométrie de flux (CMF) a l'avantage d'avoir une large application, d'être rapide et à moindre coût **(11,46).**

Tableau VII : Caractéristiques des différentes méthodes de la MRD **(11)**

Caractéristiques	RQ-PCR Ig/TCR	Transcrit de fusion RQ-PCR	CMF(≥8 couleurs) Euroflow
Sensibilité	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴ 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁵
Applicabilité	90- 95%	20% - 40% LALB (BCR-ABL, en fonction de l'âge) 10% - 15% LALT	95%
Avantages	Sensible Standardisée ADN stable Gold standard en Europe	Sensible Marqueur génétique stable Rapide Pas très couteuse	Rapide Grande applicabilité Information supplémentaires (identification des populations physiologiques) Protocole standardisé, avec possibilité d'analyse automatisée.
Inconvénients	Laborieuse Evolution clonale (FN) Amplification non spécifique (FP) Nécessite une grande expertise Couteuse.	Applicabilité limitée Manque de standardisation Instabilité de l'ARN Risque de contamination	Nécessite un enrichissement cellulaire pour atteindre une sensibilité de 10 ⁻⁵ Nécessite une expertise

IV CYTOMETRIE EN FLUX (CMF) :

1 Définition :

La cytométrie en flux est une technique biologique objective, sensible et quantitative, permettant l'analyse individuelle des cellules en suspension, à une vitesse de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de cellules par seconde.

Elle fait appel à de nombreux concepts, et a bénéficié des progrès réalisés dans des domaines très divers (mécanique des fluides, quantification des signaux optiques, technologie des lasers, et le développement de l'informatique.). (47)

2 Historique :

La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. (48). Les prémices de la cytométrie en flux remontent à 1934, quand Moldavan essayait de dénombrer une population cellulaire, en utilisant un faisceau lumineux interrompu par le passage des cellules mises en suspension dans un tube capillaire.

Durant les années 50-70, l'apparition des photomultiplicateurs permettait d'améliorer la quantification des signaux optiques. Puis l'avènement du laser comme source lumineuse a amélioré la focalisation du faisceau. Sa monochromaticité et sa puissance ont permis d'exciter des molécules fluorescentes spécifiquement fixées sur des composants cellulaires. Enfin, l'intégration de l'informatique a permis de multiplier les données analysées simultanément, d'augmenter leur rapidité d'obtention et d'automatiser les appareils. (49)

3 Composition du cytometre en flux :

Le cytomètre en flux est un instrument complexe qui possède trois systèmes : le **système fluide** qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au point d'interrogation, le **système optique** comprenant les lasers comme source de lumière, et les filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers le **système électronique** (les détecteurs), qui va convertir la lumière en signaux électroniques analysables par l'ordinateur (Figure 4). (48,49)

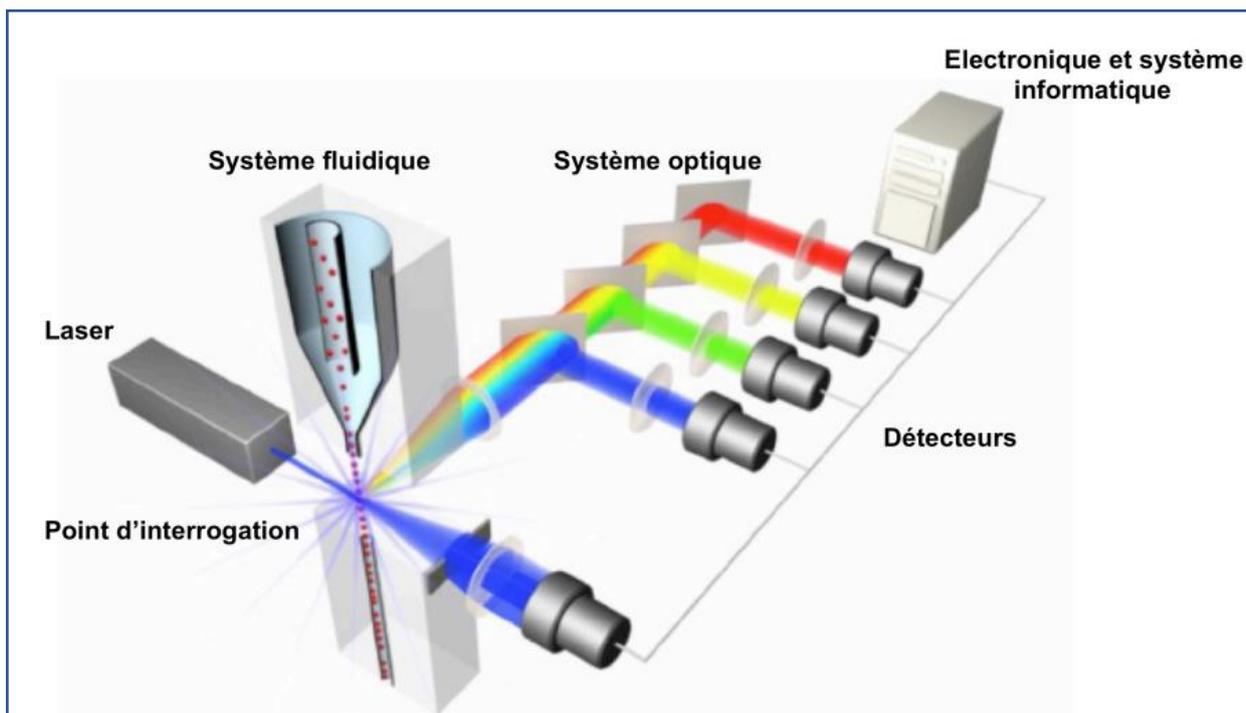


Figure 4 : Composants majeurs d'un cytomètre en flux (48)

4 Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux :

Le principe de la CMF est basé, sur la focalisation hydrodynamique de l'échantillon, devant un faisceau lumineux excitateur et l'acquisition de signaux transmis ou émis par chaque cellule circulante dans le flux.

La suspension cellulaire monodispersée est injectée dans l'axe d'une veine liquide, les cellules sont entraînées par un liquide de gaine (fluide sous pression) et défilent une par une en raison de plusieurs milliers par seconde.

La veine liquide est traversée par un faisceau lumineux de type laser (49,50). Les cellules ainsi éclairées émettent un certain nombre de signaux optiques :

- Une lumière diffusée ("light scatter") dans l'axe du laser, on parle de diffusion aux petits angles ou Forward Scatter Channel) « FSC », présentatrice de la taille des cellules.

- Une lumière diffusée à 90 °, donnant des informations sur la structure cellulaire, on parle de diffusion aux grands angles ou SSC (Side Scatter Channel). Le signal est proportionnel à la complexité du contenu cellulaire ou « granulosité ».

L'analyse des deux paramètres FSC (taille) et SSC (la structure) des cellules, permet d'identifier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes. (Figure 5)

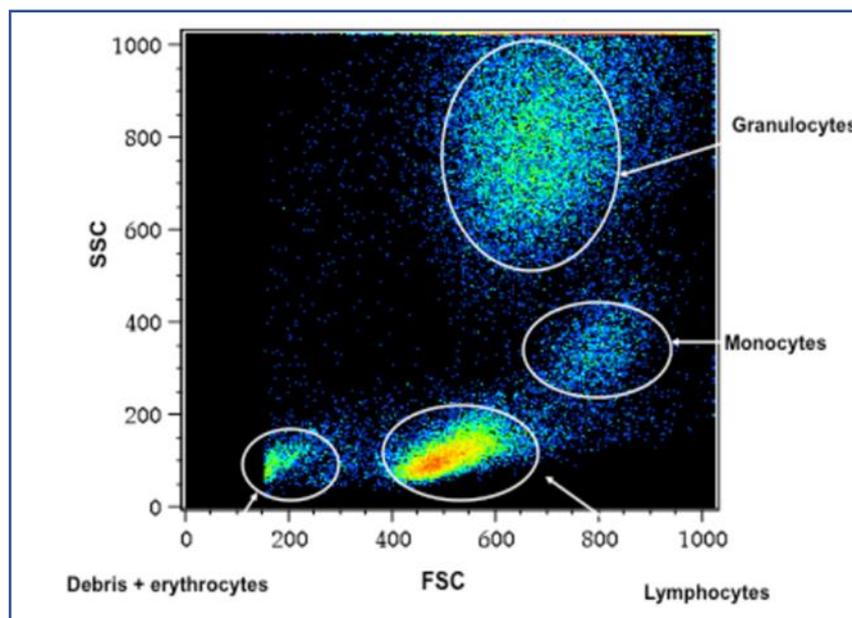


Figure 5: Identification des leucocytes dans le sang total (48)

-Une ou plusieurs fluorescences émises lorsque les cellules ont été au préalable marquées par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes, dans le cas de l'immunophénotypage des leucocytes. (Figure 6). Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, d'où une émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée. (49,50)

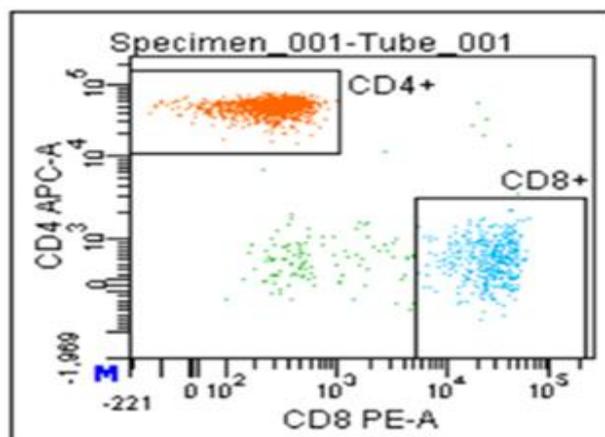


Figure 6 : Exemple de marquage de sang total avec les anticorps anti-CD4 et antiCD8 (50)

- Les différents signaux lumineux sont focalisés, séparés en fonction de leur direction et de leur longueur d'onde au moyen de filtres et de miroirs, puis ils sont acheminés vers des

photodétecteurs (photodiodes ou photomultiplicateurs : PMT) qui les transforment en signaux électriques.

- Les signaux électriques sont enfin digitalisés par un convertisseur analogique/digital qui transcrit l'amplitude de chaque signal en un numéro de canal, dont la valeur codée en bits est utilisable par l'unité informatique. Celle-ci peut représenter les données reçues sous forme d'histogrammes monoparamétriques, où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules, ou d'histogrammes biparamétriques (cytogrammes) présentant deux signaux simultanément. (49,50)

5. Compensation du chevauchement spectral :

La plupart des fluorochromes utilisés en cytométrie de flux multicolore ont des spectres d'émission de fluorescence relativement larges (Figure 7). Par conséquent, le signal émis par un fluorochrome sera détecté par le photomultiplicateur (PMT) qui lui est dédié, mais également par le PMT voisin vers lequel il « fuit ». Ce débordement spectral de la lumière dans les canaux voisins secondaires, peut conduire à des signaux faussement positifs.

Au niveau de chaque PMT, les signaux non spécifiques provenant des autres fluorochromes, peuvent être calculés et soustraits mathématiquement. Le terme « compensation de fluorescence » est utilisé pour décrire ce processus de calcul et de soustraction. (44)

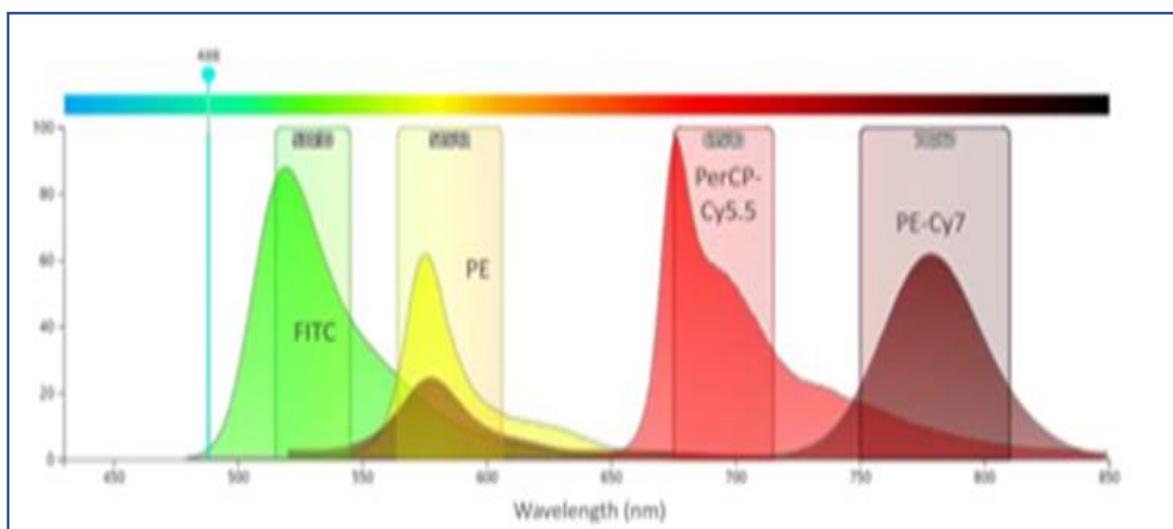


Figure 7 : Spectre d'émission des différents fluorochromes (48).

V APPLICATION DE LA CMF MULTIPARAMÉTRIQUE A LA DÉTECTION DE LA MRD DANS LES LAL:

1 Principe de détection de la MRD par CMF

Le principe de la recherche de la MRD par CMF est basé sur la détection, au cours du suivi, de cellules leucémiques résiduelles ayant la même signature phénotypique que celle identifiée au diagnostic. (51)

La stratégie est simple et repose sur :

- l'identification au diagnostic d'une signature phénotypique de la leucémie, déviant des populations lymphoïdes normales,
- l'analyse au décours du traitement d'un grand nombre d'événements à la recherche du phénotype leucémique.

De la qualité de la signature phénotypique dépend la spécificité de la technique, et le nombre d'événements détermine la sensibilité. (43)

1.1 Spécificité: signature phénotypique de la leucémie

Une condition préalable à toute technique de MRD, est la capacité de distinguer les cellules leucémiques des cellules normales, même lorsqu'elles sont présentes en faible nombre dans un échantillon. (51)

Les différentes propriétés phénotypiques qui peuvent distinguer les cellules leucémiques des cellules hématopoïétiques normales, définissent la signature phénotypique de la leucémie ou LAIP « Leukemia-associated aberrant immunophenotype », déviant du schéma d'expression des populations lymphoïdes normales résiduelles ou régénératives.

Deux critères majeurs peuvent être utilisés pour reconnaître un phénotype associé à une leucémie:

- L'existence d'un phénotype ectopique
- La présence d'aberrations antigéniques.

L'expression d'un phénotype ectopiques » est caractéristique des LAL (par exemple : la présence de cellules qui coexpriment les antigènes des cellules T et un marqueur d'immaturation comme la TdT en dehors du thymus). (14,40, 51)

Dans les aberrations antigéniques, nous incluons quatre catégories principales:

- LAIP de type infidélité de lignée : c'est à dire l'expression aberrante de marqueurs d'un autre type de cellules hématopoïétiques. Exemple : un blaste lymphoïde B présentant des marqueurs myéloïdes (tels que le CD13 ou le CD33).
- LAIP de type expression asynchrone d'antigènes liée à la maturation: présence de deux antigènes qui ne sont jamais co-exprimés dans l'hématopoïèse normale. (Exemple : co-expression du CD34 en tant que marqueur d'immaturité, avec le CD20, marqueur de maturité du lymphocyte B).
- LAIP de type surexpression d'un antigène de différenciation: réactivité pour un antigène qui se trouve à des niveaux anormalement élevés par rapport aux cellules normales. (Par exemple l'antigènes CD58 peut être surexprimé par les lymphoblastes B).
- LAIP de type perte ou sous expression d'un antigène de différenciation : on parle de trou phénotypique tel que la perte du CD2 sur les blastes lymphoïdes T ou la diminution d'expression des antigènes CD38 et CD81 sur les blastes B. **(14,40,43,51)**.

L'identification de ces phénotypes caractéristiques de la leucémie (LAIP), requiert la connaissance de l'expression des différents antigènes des cellules hématopoïétiques normales à chaque stade de maturation, mais aussi pendant la phase de régénération médullaire riche en hématogones. **(14,40,43,51)**.

Sur le plan phénotypique, les hématogones sont caractérisés par une évolution dynamique des antigènes de manière continue, des premiers précurseurs de la lignée B vers les lymphocytes B matures. Plusieurs stades de maturation sont décrits dans la littérature **(11, 43)** :

- Hématogone stade 1 (stade précoce) : caractérisé par l'expression du marqueur d'immaturité CD34, une forte expression du CD10 et du CD38, avec une faible expression du CD45. Le CD20 n'est pas exprimé.

- Hématogone stade 2 (intermédiaire) : caractérisé par la perte d'expression du CD34, la diminution progressive de l'expression du CD10 et l'augmentation progressive de l'expression du CD45 et du CD19. CD38 est un peu moins fort. Le CD20 n'est toujours pas exprimé à ce stade.

- Hématogone stade 3 (tardif) : caractérisé par une faible expression du CD10 et du CD20.

- Hématogone stade 4 : la négativité de l'expression du CD10 et la forte expression du CD20 signera le passage en lymphocyte B mature, le CD 38 est faiblement exprimé (sauf pour les plasmocytes).

1.2 Sensibilité de maladie résiduelle phénotypique

La CMF permet l'analyse à l'échelon cellulaire, mais l'interprétation se fera toujours à l'échelon de la population, tout comme la cytologie. Ceci conditionne directement la sensibilité de la technique : une sensibilité de 10^{-4} nécessitera la détection d'une population d'un cluster minimal de 10 événements, le cluster se définissant comme un groupe d'événements de phénotype homogène. En revanche, la CMF ne peut caractériser un événement unique comme pathologique ce qui implique qu'à sensibilité égale, il est nécessaire d'analyser un plus grand nombre d'événements par CMF. Les recommandations actuelles préconisent l'acquisition d'un minimum de 1 million d'événements **(43,52)**.

La fiabilité des résultats de la MRD par CMF va être directement dépendante de la qualité du prélèvement. L'échantillon doit être riche et représentatif.

Lors de la réalisation de la ponction de moelle, il est important de ne pas prélever une trop grande quantité, car il y a un risque d'obtenir un prélèvement hémodilué et donc moins représentatif de la composition médullaire. Les 1^{ere} études de la MRD dans les LAL de l'enfant ont révélé que seule la première aspiration de MO devait être utilisée en raison d'une dilution significative par contamination sanguine dans les aspirations ultérieures au même endroit. Pour la même raison, l'aspiration de gros volumes est déconseillée: il est conseillé de collecter un volume ≤ 2 ml de la 1^{ere} aspiration médullaire. **(11,53)**

L'échantillon doit aussi être de qualité, la CMF est très sensible à la viabilité cellulaire. L'analyse de la MRD sur un prélèvement décongelé est une utopie compte tenu de l'importante mortalité cellulaire induite et des modulations antigéniques induites par le processus de cryopréservation **(43)**. Pour ces raisons, la MRD ne peut être envisagée que sur prélèvement frais et de moins de 24 h. **(11,43)**

2 Progrès de la maladie résiduelle phénotypique

Plusieurs évolutions technologiques sont en train de bousculer la MRD par CMF. Naturellement la distinction entre lymphoblastes pathologiques et populations physiologiques résiduelles/régénératives est d'autant plus résolutive que l'on peut combiner plusieurs marqueurs dans un même tube afin de caractériser précisément la nature de chaque événement. L'avènement de la cytométrie multiparamétrique au début des années 2000 (8-10 couleurs) a considérablement transformé l'évaluation de la MRD par CMF. L'émergence de nouveaux fluorochromes synthétiques et d'instruments plus résolutifs capables de lire plusieurs couleurs

font que la cytométrie multiparamétrique est progressivement plus adaptée et performante à la caractérisation d'événements rares. (43)

2.1 Développement de la CMF multiparamétrique :

Dans les années 1980, les cytomètres les plus perfectionnés, possédaient 2 lasers. L'instrument était capable de détecter les fluorochromes organiques comme la fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et l'allophycocyanine (APC). (48)

A l'heure actuelle, grâce au développement des 3 composantes majeures de la cytométrie : l'instrument proprement dit (en particulier les lasers), les réactifs (anticorps et fluorochromes), et les logiciels d'analyse de données, il a été possible d'analyser couramment jusqu'à huit marquages simultanés, et sur certains instruments de recherche jusqu'à 17 marquages simultanés sur chaque cellule. (50)

2.1.1 Les lasers

Aujourd'hui, les laboratoires de diagnostic utilisent des cytomètres avec deux à trois lasers. En recherche, certains cytomètres ont 4 ou 5 lasers. Les 3 lasers les plus couramment utilisés aujourd'hui sont des lasers à argon (bleus ; 488 nm), lasers à hélium-néon (rouges, 633 nm) et laser violet (405 nm). (48,50)

2.1.2 Les fluorochromes

Les années 1990 ont vu l'arrivée des fluorochromes tandem, qui consistent à associer deux molécules. La première molécule (PE ou APC) est activée par le laser, elle émet une lumière qui active le deuxième fluorochrome (cyanines ou Alexa fluors) qui émettra une couleur de longueur d'onde différente. Ce procédé s'appelle FRET qui signifie « fluorescence par résonance de transfert d'énergie ». D'un coup, le répertoire des fluorochromes s'est élargi, et a permis d'augmenter rapidement le nombre de paramètres mesurables. Actuellement, il y a plus de 30 fluorochromes, qui peuvent être couplés aux anticorps monoclonaux. (48,50)

2.1.3 Logiciel d'analyse de données

Il est relativement simple d'analyser une expérience avec 4 paramètres mesurés. Cependant, au fur et à mesure que le nombre de paramètres mesurés augmente, la quantité d'information augmente aussi de façon exponentielle, et l'analyse des données devient de plus en plus complexe. Heureusement, les logiciels d'analyse de cytométrie se sont adaptés à cette masse de données à gérer, avec en particulier :

-Les calculs automatisés de compensation, les corrections de shift d'intensité du signal et la correction bi exponentielle des signaux logarithmiques, qui tous concourent à la création de

data les plus précis et reproductibles possibles. Alors que sur les machines analogiques des années 1980 (ex : BD FACSCalibur), les calculs de compensation sont faits manuellement. **(48,54)**

-Stratégie d'analyse hiérarchique : la sélection de populations d'intérêt par une série de fenêtrages adaptés et consécutifs, Par exemple, l'analyse d'un syndrome lymphoprolifératif B comportera une étape d'isolement des cellules CD19+ sur lesquelles seront conditionnées toutes les autres analyses. Cela rend l'analyse beaucoup plus compréhensible et logique. Cependant, cette stratégie d'analyse est guidée par les réponses recherchées, et donc des connaissances du chercheur des populations cellulaires étudiées. **(54)**

2.2 CMF multiparamétrique de nouvelle génération: standardisation Euroflow

Cette évolution de la CMF multiparamétrique, s'accompagne d'une complexité croissante de l'analyse des données CMF où le biologiste doit intégrer simultanément l'expression de plus d'une dizaine de paramètres. **(55, 56)**

De plus, plusieurs laboratoires continuent à s'appuyer sur leurs propres panels d'anticorps et de réglages de l'instrument, ce qui introduit des niveaux considérables de subjectivité dans l'analyse. Les résultats dépendent finalement de l'expérience et des connaissances d'experts locaux et des panels appliqués dans différents laboratoires. **(57,58)**

Afin de limiter au maximum cette subjectivité et variabilité de mesure dans l'immunophénotypage par cytométrie en flux, plusieurs groupes d'experts ont tenté de standardiser le processus complet de la cytométrie en flux qui est essentiel pour obtenir une des données de qualité et reproductibles dans le temps en intra et inter laboratoires. **(59).**

De telles mesures standardisées sont indispensables pour la surveillance des hémopathies malignes par une maladie résiduelle minimale hautement sensible.

En 2012, le consortium EuroFlow a développé une approche entièrement standardisée pour l'immunophénotypage en onco- hématologie qui couvre l'ensemble de l'analyse de cytométrie en flux, du processus de la configuration de l'instrument et des panels d'anticorps jusqu'à la stratégie d'analyse des données. **(44,45).**

2.2.1 Choix des combinaisons d'anticorps pour la préparation des panels :

Sur la base de la stratégie innovante d'immunophénotypage conçue par le groupe EuroFlow, dans laquelle de nouveaux outils de fusion de données sont utilisés pour améliorer le diagnostic et le suivi thérapeutiques des hémopathies malignes, une exigence minimale de panels 8 couleurs était prévue. **(44,45)**

Les panels des leucémies aiguës ont été conçus de manière à pouvoir être appliqués en deux étapes consécutives.

La première étape comprend un seul tube à 8 couleurs, l'ALOT (Acute Leukemia Orientation Tube), complété par un 2eme panel multi-tubes conçu pour une caractérisation complète des cellules blastiques.

Le choix du deuxième panel, c'est-à-dire le panel d'anticorps pour la classification de LAL B, LALT, ou de LAM ainsi que le panel de la maladie résiduelle, dépend des résultats obtenus avec l'ALOT.

L'ALOT a été conçu pour une analyse rapide et efficace d'un échantillon connu pour contenir des blastes selon la cytomorphologie, le consortium Euroflow a donc opté pour une sélection limitée de marqueurs intracellulaires et liés à la membrane pour s'adapter à un seul tube de 8 couleurs. **(45)**

La conception des panels d'anticorps MRD dans les LALB, repose sur le développement de combinaisons d'anticorps, qui donnent un aperçu de la voie complète des cellules B normales (hématogones) dans la moelle osseuse, avec l'inclusion de marqueurs aberrants qui permettent de détecter la déviation immunophénotypique des blastes de la LAL B des cellules B physiologiques normales (également dans la moelle osseuse de régénération). **(44, 45)**

Cette évolution a nécessité plus de 5 tables rondes de conception, de test, d'évaluation et de nouvelle conception (avec 50 à 100 cas de LALB par table ronde et par test) pour définir des combinaisons fiables d'anticorps et de fluorochromes.

Le panel MRD des LALT a été conçu en parallèle du panel d'anticorps ALOT et du panel MRD LAL B. En conséquence, la justification de sa conception était similaire à celle utilisée pour ces deux autres protocoles. **(45)**

2.2.2 Sélection des fluorochromes:

La sélection de la combinaison la plus appropriée de fluorochromes est une étape clé et préalable dans la conception d'un panel immunophénotypique multicolore. **(60)**

Les fluorochromes doivent être sélectionnés non seulement sur la base de leurs caractéristiques intrinsèques, mais aussi de leur compatibilité avec les autres marqueurs et avec l'instrument utilisé (longueur d'onde d'émission du laser) **(61)**

- Il faut faire correspondre les fluorochromes par leur indice de coloration (SI) en associant les fluorochromes les plus brillants aux antigènes les plus faibles (une faible densité antigénique). Les antigènes intracellulaires sont généralement d'expression plus faibles et/ou plus discrètes que les antigènes de surface.

Exemple:

CD8 Pacific Blue moins brillant (SI = 80) CD8 = 90 000 molécules par cellule

CD7 PE brillant (SI = 302) CD7 = 20 000 molécules par cellule.

- Il faudra aussi éviter au mieux le phénomène de chevauchement spectral. Ceci produit parfois un résultat faussement positif. Bien qu'il soit possible d'éliminer de tels résultats en supprimant le signal électroniquement (selon un procédé appelé compensation), il est recommandé de l'éviter et/ou le minimiser. Cela implique un choix de fluorochromes ayant des spectres d'émission les plus éloignés les uns des autres.
- Le choix de la combinaison de fluorochromes la plus adéquate dépend également de la configuration optique spécifique du cytomètre de flux, c'est-à-dire du nombre et type de laser qu'il contient, le nombre de détecteurs disponibles pour chaque laser et l'ensemble des filtres spécifiques pour chaque laser. **(44,61)**

Sur la base des connaissances existantes, de l'expérience et de la qualité prouvée des réactifs évalués, plusieurs fluorochromes ont été présélectionnés. Pour d'autres positions de fluorochromes, des comparaisons approfondies étaient nécessaires.

En conséquence, les fluorochromes FITC, PE, APC, PerCPCy5.5 (Phycoérythrine-cyanine 5.5) et PECy7 (Phycoérythrine-cyanine 7) ont été présélectionnés en raison de la vaste expérience disponible avec ces fluorochromes. En revanche, APCCy7 (Allophycocyanin

Cyanine 7), Alexa Fluor 700 et APCH7 (APC-Hilite7) ont été comparés pour le deuxième détecteur du laser rouge, et PacB (Pacifique blue) contre HV450 (Horizon V450) et PacO (pacifique orange) contre la protéine fluorescente Am Cyan (Cyanine) et HV500 (Horizon V500) ont été évalués pour le premier et le deuxième détecteur du laser violet (émission à 405/407 nm), respectivement. **(44)**

L'expression de l'antigène a été évaluée à la fois par l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) et par l'indice de coloration (SI). **(61)**

Une comparaison détaillée des profils de fluorescence et des besoins de compensation pour le débordement de fluorescence dans d'autres détecteurs de ces fluorochromes a été effectuée **(44, 45) :**

- En termes de besoins de compensation de fluorescence, un débordement plus élevé dans d'autres canaux a été observé pour l'AmCyan, lorsqu'un fort signal AmCyan pour un marqueur était combiné avec un signal faible d'un autre marqueur conjugué avec FITC dans les mêmes populations cellulaires, en raison de son chevauchement relativement plus élevé avec le premier détecteur du laser bleu.

- La comparaison des APCCy7, AF700 et APCH7 a été effectuée par étapes successives.

L'APCCy7 a montré une intensité relativement élevée, tandis que son principal inconvénient était l'instabilité dans le temps, entraînant une dégradation relativement élevée, associée à un débordement spectral dans le premier canal du laser rouge et l'apparition dans ce canal d'événements faussement positifs.

L'AF700 a montré peu de débordements dans ce dernier canal, mais ce colorant a nécessité l'utilisation d'un miroir et d'un filtre différents que ceux disponibles par défaut dans les cytomètres de flux. De plus, l'intensité de la fluorescence de l'AF700 s'est traduite par une discrimination sous-optimale de certains antigènes exprimés à des niveaux relativement faibles.

Enfin, l'APCH7, un fluorochrome tandem a montré un SI et MFI inférieur à son équivalent APCCy7, mais les principaux avantages des conjugués APCH7 comprenaient : une stabilité améliorée et un meilleur profil de compensation, tout en maintenant la configuration optique par défaut de l'instrument.

Enfin, la combinaison de PacB (ou HV450), PacO (ou HV500), FITC, PE, PerCPCy5.5, PECy7, APC et APCH7 a été sélectionnée. (44)

2.2.3 Optimisation de la configuration de l'instrument :

Les paramètres EuroFlow pour le réglage de l'instrument, sont conçus pour mesurer à la fois les signaux faibles et les signaux générés par des molécules avec des niveaux d'expression très élevés (par exemple, l'expression de CD38 sur des plasmocytes normaux). (44)

2.2.3.1 Réglage des PMT :

Les tensions PMT pour chaque canal de fluorescence ont été définies afin d'atteindre des valeurs MFI (médianes d'intensité de fluorescence) cibles.

Pour cela, un lot de billes Rainbow 8 pics avec des valeurs MFI pour les pics les plus brillants ont été utilisées.

Les voltages des PMT sont réglés pour atteindre ces valeurs cibles de MFI. (44)

2.2.3.2 Réglage des paramètres FSC/SSC :

Les paramètres FSC/SSC EuroFlow visent à atteindre deux objectifs:

- Toutes les populations cellulaires (des petits érythroblastes aux éosinophiles et aux plasmocytes) sont centrées dans les limites de l'échelle.
- Une résolution adéquate entre les populations cellulaires (lymphocytes, monocytes et granulocytes) est obtenue, avec les deux procédures de marquage, surface et intracellulaire.

Les paramètres FSC et SSC sont ajustés pour atteindre des MFI de 55000 ± 5000 et 13000 ± 2000 , respectivement.

L'inclusion du paramètre FSC-H permettra la discrimination des doublets, contribuant ainsi à la précision des résultats. (44, 62)

2.2.3.3 Surveillance des performances de l'instrument

Des billes Rainbow à 8 pics ont été acquises selon les paramètres EuroFlow.

La MFI du pic le plus brillant dans chaque canal de fluorescence a été comparé à la valeur MFI cible correspondante.

Les critères suivants devaient être atteints pour valider le réglage de l'instrument:

- Valeurs MFI de chaque fluorochrome est égale à la MFI cible $\pm 15\%$.
- Coefficient de variation (CV) du pic le plus brillant 04% pour les canaux du laser bleu et violet, et 06% pour les canaux du laser rouge et le canal PECy7. (44)

2.2.3.4 Procédures de compensation:

Des expériences de configuration de compensation, ont montré que des matrices de compensation génériques pouvaient être utilisées pour tous les réactifs d'anticorps dans les panels EuroFlow conjugués aux fluorochromes : PacB (HV450), PacO (HV500), FITC, PE et APC, ainsi que pour le fluorochrome tandem PerCPCy5.5.

En revanche, des valeurs différentes étaient requises pour les fluorochromes tandem PECy7 et APCH7, pour chaque anticorps conjugué au même fluorochrome tandem. Ces fluorochromes tandem présentent un débordement de fluorescence variable pour le canal du fluorochrome donneur en fonction de la proximité et de la quantité du fluorochrome accepteur utilisé.

Sur la base de la comparaison des matrices de compensation de fluorescence obtenues au cours du temps pour le même instrument, il a été conclu qu'il n'est pas nécessaire de répéter l'expérience de compensation lorsque les réactifs et la collecte de signaux sur l'instrument sont stables. (44)

2.2.4 Procédure de marquage des échantillons :

Les protocoles EuroFlow pour la préparation et le marquage des échantillons ont été conçus sur la base de l'expérience antérieure et des données expérimentales disponibles dans la littérature ainsi que sur les résultats d'expériences spécifiques réalisées par le consortium EuroFlow (44).

À l'heure actuelle, plusieurs protocoles et réactifs sont disponibles pour le marquage des leucocytes. La plupart des protocoles incluent une étape de marquage, une étape de lyse des érythrocytes et une ou plusieurs étapes de lavage.

Les érythrocytes peuvent être lysés en utilisant du chlorure d'ammonium ou d'autres réactifs disponibles dans le commerce par exemple, FACS Lysing Solution, QuickLysis (Cytognos SL, Salamanque, Espagne) et VersaLyse (Beckman Coulter).

Pour la procédure de marquage des antigènes intracellulaires (par exemple le CD3 cytoplasmique, la MPO et la TdT), les leucocytes doivent être fixés et perméabilisés. À cet effet, plusieurs réactifs, tels que BD Perm / Wash buffer (BD Biosciences), Fix & Perm (ANDER GRUB Bio Research GmbH, Vienne, Autriche), IntraStain (Dako) et IntraPrep (Beckman Coulter) sont disponibles dans le commerce.

La meilleure procédure de marquage devrait remplir les critères suivants:

- De grandes différences dans les valeurs MFI des canaux FSC et SSC entre les principales populations de leucocytes.
- Une perte cellulaire minimale.
- Une préservation de l'intensité de fluorescence des fluorochromes.
- Stabilité des fluorochromes en tandem.
- Un faible bruit de fond de fluorescence.

Compte tenu de cela, le consortium EuroFlow a évalué plusieurs procédures de marquage d'échantillons contenant des cellules hématopoïétiques malignes. **(44,45)**

2.2.4.1 Procédures de marquage et de lyse des érythrocytes

Dans l'ensemble, quatre solutions de lyse (chlorure d'ammonium, solution FACSLyse, QuickLysis et VersaLyse) et trois procédures de marquage (marquage-lyse- lavage(SLW), marquage-lyse-lavage- fixation (SLWF) et marquage-lyse-sans lavage (SLNW) ont été évaluées pour déterminer celle qui répondait le mieux aux critères énumérés ci-dessus. Les échantillons marqués ont été conservés à 4 ° C : 1h, 3h et 24 heures, jusqu'à l'acquisition.

Une comparaison qualitative des caractéristiques FSC et SSC des principales populations cellulaires du sang périphérique pour les quatre solutions de lyse et entre les trois procédures de marquage testées, a montré que la solution FACS lyse avec la procédure de marquage SLW (marquage-lyse- lavage), ont donné la meilleure discrimination entre les différentes populations cellulaires.

Par la suite, l'effet des différentes solutions de lyse et des procédures de marquage sur les intensités de fluorescence a été évaluée.

Tant l'étape de lavage que l'étape de fixation finale ont induit une certaine diminution de la MFI de tous les anticorps évalués. Dans l'ensemble, la solution FACS lyse a donné les valeurs MFI les plus élevée.

Sur la base des données dérivées des performances des quatre réactifs de lyse et des différents protocoles de préparation des échantillons, il a été décidé d'utiliser la procédure de marquage SLW (marquage, lyse, lavage) avec la solution de lyse : FACS Lyse pour tous les marquages, membranaires et de surface cellulaire.

Aussi, pour le marquage membranaire des chaînes légères Kappa, Lambda et l'IgM de surface, deux étapes de lavage avant l'incubation des anticorps se sont avérées nécessaires, à cause des d'immunoglobulines plasmatiques qui saturent les sites antigéniques de ces immunoglobulines de surface. Cette procédure donne des intensités de fluorescence maximales des immunoglobulines de surface. (44)

2.2.4.2 Marquage intracellulaires :

Pour le marquage des antigènes intracellulaires, des procédures spéciales sont nécessaires pour perméabiliser et fixer les cellules.

Sur la base de la vaste expérience des laboratoires EuroFlow, les réactifs Fix & Perm ont été sélectionnés à cet effet; aucune comparaison supplémentaire avec d'autres réactifs disponibles dans le commerce n'a été effectuée. (44)

2.2.4.3 Traitement des échantillons de cellules avec un faible nombre de cellules nucléées :

Les protocoles de préparation des échantillons et les différentes solutions de lyse ont été évalués pour le marquage des échantillons de moelle et de sang total.

Cependant, chez certains patients, le nombre de cellules peut être assez faible. Par exemple, dans des échantillons de moelle osseuse, prélevés au cours au suivi thérapeutique, chez des enfants traités par chimiothérapie.

Un protocole de lyse en vrac des érythrocytes avec du chlorure d'ammonium avant le marquage des cellules avec les anticorps, a été développé pour augmenter la concentration des cellules nucléées dans l'échantillon. (45)

2.2.4.4 Acquisition des échantillons dans le cytomètre à flux

Comme le délai entre le marquage des échantillons et l'acquisition de données dans le cytomètre en flux peut avoir un impact sur la MFI des marqueurs individuels (en particulier ceux détectés par les réactifs contenant les fluorochromes en tandem APC-H7 et PE-Cy7), les échantillons ont été acquis immédiatement après le marquage, ainsi que 1h, 3h et 24h après la fin de la procédure du marquage des échantillons.

Les résultats ont montré que la MFI a diminué au fil du temps. Les données sont devenues un peu plus variables lorsqu'elles ont été acquises 3 h et en particulier 24 h après le marquage.

Sur la base de ces résultats, il a été convenu que tous les échantillons devraient être acquis dans l'heure suivant la fin de la procédure de marquage. S'ils ne sont pas mesurés immédiatement, ils doivent être conservés à 4 ° C dans l'obscurité. (44)

Pour les tubes de dépistage et d'orientation EuroFlow (tube d'orientation pour la leucémie aiguë (ALOT), un minimum de 50000 cellules doivent être acquises afin d'atteindre une sensibilité suffisante pour la reconnaissance des populations anormales. (45)

2.2.5 Stratégie d'analyse EuroFlow pour le diagnostic et le suivi immunophénotypique des hémopathies malignes:

Malgré les avantages évidents de la cytométrie de flux multiparamétrique, la complexité significativement accrue de l'analyse et de l'interprétation des données de plusieurs paramètres évalués simultanément dans un plus grand nombre de cellules, pourrait avoir un impact sur la qualité des résultats.

Afin de réduire cette complexité d'interprétation, le consortium EuroFlow a construit de nouvelles approches pour une analyse objective des données. (63, 64)

Les outils nécessaires pour utiliser la nouvelle approche analytique ont été mis en œuvre dans le logiciel d'analyse *Infinicyt*, qui permet leur utilisation dans la pratique courante par tout autre groupe à travers le monde. (44, 45)

2.2.5.1 Fusion des fichiers de données de cytométrie de flux :

L'outil ou la fonction de fusion a été utilisée pour fusionner différents fichiers de données correspondant à des tubes distincts du même échantillon, chacun marqué avec une combinaison unique de réactifs du panel d'anticorps EuroFlow. Il en résulte un nouveau fichier de données fusionné unique qui contient toutes les informations mesurées dans le même échantillon.

Le nombre total des paramètres attribués à chaque événement cellulaire individuel inclus dans le nouveau fichier est pratiquement illimité, et est égal à celui du nombre de paramètres mesurés dans l'ensemble des fichiers fusionnés pour un nombre donné de tubes marqués d'un échantillon. Cela permet de visualiser des tracés de points bivariés auparavant « impossibles » pour des événements individuels (par exemple, les modèles de marquage pour deux réactifs conjugués avec le même fluorochrome). (44, 64)

2.2.5.2 Génération de fichiers de données de référence

La génération des fichiers de données de référence vise à construire des bibliothèques de cas de référence à comparer entre eux ou avec un nouveau cas qui a été marqué avec le même panel d'anticorps EuroFlow (44, 63).

2.2.6 Contrôle de qualité :

Afin de contrôler la qualité des données dans les laboratoires individuels qui ont mis en œuvre les procédures opératoires standardisées (SOP) d'Euroflow, un programme d'évaluation de la qualité EuroFlow a été développé. Il consiste à distribuer des échantillons de contrôle deux fois par an aux différents laboratoires participants et d'évaluer leurs résultats dans le centre coordinateur. (65)

2.3 Evolution des activités Euroflow :

Depuis 2012, EuroFlow continuent ses activités dans l'amélioration du diagnostic et du suivi des hémopathies malignes.

Un exemple de ce développement du protocole Euroflow, est la construction de grandes bases de données avec des prélèvements, de sujets normaux et de patients atteints de leucémie et de lymphome, analysés avec les SOP et les panels d'anticorps EuroFlow. Ces bases de données servent de modèles pour une analyse et une interprétation automatisées des résultats. (66,67).

Il est à noter que la reproductibilité complète intra et inter laboratoire est essentielle pour mettre en œuvre la nouvelle approche guidée par le logiciel EuroFlow pour la classification automatisée des cellules individuelles en populations cellulaires spécifiques, car ce concept est basé sur une comparaison directe des fichiers de bases de données bien définies contre des fichiers de données acquis dans différents laboratoires suivant des protocoles standardisés (56).

EuroFlow a développé aussi des panels d'anticorps 8 couleurs pour le suivi de la maladie résiduelle dans différents types d'hémopathies malignes comme le myélome (68) et les leucémies aiguës lymphoblastiques B. (69). Grâce à l'utilisation de ces nouveaux panels, avec le protocole de lyse en vrac, qui a permis l'acquisition d'un grand nombre de cellules (> 4 millions), une sensibilité d'au moins 10^{-5} a été obtenue. (68,69)

**PARTIE
PRATIQUE**

I OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Objectif principal :

L'objectif de notre travail est la mise en place, en pratique quotidienne, du suivi de la maladie résiduelle chez les enfants atteints de LAL par la technique de cytométrie en flux multiparamétrique 8 couleurs.

Objectif secondaire :

Application de la MRD dans la stratification thérapeutique des LAL pédiatriques.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Population d'étude :

1.1 Type d'étude :

Il s'agit d'une étude descriptive prospective réalisée sur des enfants atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques.

Ces patients ont été recrutés entre juillet 2018 et juillet 2019, à partir des services d'onco-hématologie pédiatriques du CHU BLIDA et du CHU Béni-Messous (Pédiatrie A et Pédiatrie B) ainsi que du service d'hématologie du CAC de BLIDA.

1.2 Critères d'inclusion :

- Tout enfant dont l'âge était inférieur ou égal à 16 ans (≤ 16 ans) atteint de LAL a été inclus dans l'étude.

1.3 Critères d'exclusion :

- Patients âgés de plus de 16 ans.
- Les leucémies aiguës myéloblastiques.

Notre étude a été approuvée par le conseil scientifique de la faculté de Médecine de Blida et le comité d'expertise de la thèse, ce dernier n'a pas exigé le consentement éclairé en raison de la nature observationnelle du protocole. Cependant, l'approbation des médecins traitants des patients pour l'utilisation secondaire des prélèvements de diagnostic et de suivi pour l'étude a été obtenue.

2. Matériel d'étude :

2.1 Prélèvement des patients :

Il s'agit de prélèvement de 2 cc de moelle osseuse prélevé sur tube EDTA, avec en parallèle des étalements sur lames permettant d'évaluer au microscope optique, la qualité et la richesse du prélèvement.

Pour cette étude, les échantillons ont été prélevés localement au niveau des services d'hospitalisation et envoyés à notre laboratoire dans un délai qui n'a pas dépassé 24 h.

2.2 Prélèvement des témoins :

Nous avons utilisé des échantillons de sang périphérique prélevés sur tube EDTA provenant de patients adultes et non porteurs d'hémopathie afin de réaliser les mises au point techniques:

- Réalisation des courbes de saturation pour certains anticorps nouvellement utilisés (titration).
- Réglage du cytomètre FACS BD Canto II® : détermination des settings FSC/ SSC et de la matrice de compensation.

3. Méthodes :

3.1. Les phases de l'étude :

L'étude se répartie en trois grandes phases (Figure 8)

3.1.1 Phase de recrutement des patients

Au cours de la période de recrutement, pour chaque patient dont le diagnostic de leucémie aigüe a été confirmé sur la base du résultat de l'analyse cytologique de la moelle osseuse (présence de plus de 20% de blastes), un immunophénotypage a été demandé par les médecins traitants, pour assigner la leucémie à une lignée (lymphoïde ou myéloïde).

De ce fait, pour chaque patients, 2 cc de moelle osseuse prélevée sur tube EDTA, avec des étalements sur lames, ainsi qu'un prélèvement de sang périphérique sur EDTA, a été adressée à notre laboratoire pour immunophénotypage, accompagnée d'une fiche de renseignements contenant les données cliniques et les résultats du bilan biologique d'orientation (hémogramme, frottis sanguin et myélogramme). Ces données sont résumées en annexe 3.

Avant de procéder au diagnostic phénotypique par CMF, nous avons réalisé un hémogramme, ainsi qu'une deuxième évaluation de la blastose sanguine et médullaire.

3.1.2 Phase du diagnostic immunophénotypique des leucémies aigües par CMF

3.1.2.1 Etape d'orientation :

Le diagnostic immunophénotypique des leucémies aigües se fait en deux étapes consécutives :

La première étape consiste à faire un screening en appliquant un panel d'orientation ALOT (Acute Leukemia Orientation Tube).

Ce panel permet d'assigner la leucémie aigüe à une lignée (myéloïde, lymphoïde B ou lymphoïde T).

3.1.2.2 Classification EGIL des LAL et identification des LAIP des cellules leucémiques :

La deuxième étape, consiste à appliquer deux panels d'anticorps :

- Panel d'anticorps pour la classification EGIL des LAL (LALB ou LALT).
- Panel de la maladie résiduelle pour l'identification des LAIP (LAIP des LALB ou LAIP des LAL T).

Le choix des panels de la deuxième étape, c'est-à-dire le panel d'anticorps pour la classification EGIL des LAL, ainsi que le panel de la maladie résiduelle, dépend des résultats obtenus avec l'ALOT.

La classification EGIL et l'identification des LAIP des cellules leucémiques ont été réalisées sur un échantillon de sang ou de moelle osseuse prélevé au moment du diagnostic avant tout traitement.

3.1.3 Phase d'évaluation de la MRD par CMF:

Au moment de l'évaluation de la MRD, on applique uniquement le panel de la MRD qui a servi pour l'identification des LAIP au diagnostic.

La MRD a été réalisée sur des échantillons de MO, prélevés sur EDTA à la fin de l'induction (MRD1: jours 35–42), et après la première consolidation (MRD2 : jours 70–95).

Tous les échantillons de la MRD remplissaient les critères de la rémission cytologique (moins de 05% de blastes à l'examen cytologique de la MO).

Pour chaque patient nous avons recueilli les informations concernant le traitement reçu et l'évolution de la maladie (rémission complète, rechute, décès) à partir des dossiers médicaux. Ces données sont résumées en annexe 7.

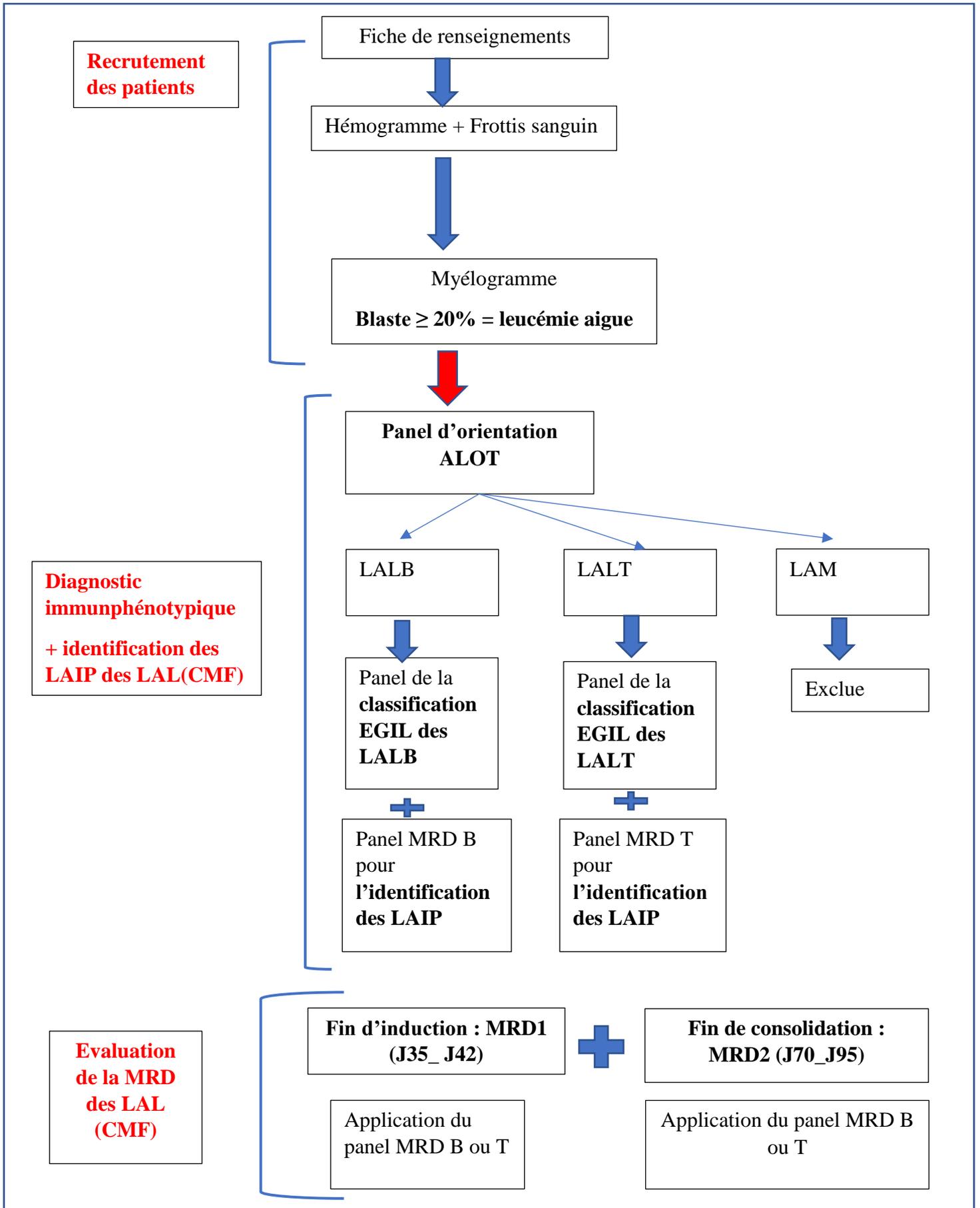


Figure 8 : Les phases de l'étude

3.2 Les étapes de l'immunophénotypage par CMF : (Figure 17)

Toutes les étapes de l'immunophénotypage par CMF, depuis le choix des anticorps du panel d'orientation ainsi que celui de la maladie résiduelle B et T, jusqu'à la stratégie d'analyse étaient inspirées des recommandations des protocoles EuroFlow. (44,45)

3.2.1 Choix des combinaisons d'anticorps pour la préparation des panels :

Pour la quantification de la MRD, on a utilisé un panel 8 couleurs avec des associations des mêmes marqueurs et clones durant toute la période d'étude. Ce panel est déjà utilisé en routine hospitalière par une équipe d'un laboratoire hospitalo- universitaire en France. Cette équipe fait partie du groupe Euroflow et France Flow. Les anticorps ont été achetés auprès de BD Biosciences.

Pour le choix des anticorps des panels du diagnostic, on a tenu compte de la disponibilité des fluorochromes au sein de notre laboratoire pour ne pas engendrer des coûts supplémentaires.

3.2.1.1 Panel d'orientation ALOT :(Acute Leukemia Orientation Tube)

Les critères de sélection des anticorps de l'ALOT afin d'orienter de manière optimale l'échantillon de leucémie aiguë dépendent de la spécificité associée à la lignée et de la sensibilité des antigènes reconnus. (45)

Un marqueur d'orientation idéal est constamment exprimé par toutes les cellules d'une même lignée et ne montre aucune réactivité entre les lignées.

La plupart des marqueurs spécifiques à la lignée, exprimés aux premiers stades de maturation sont des marqueurs intracellulaires (par exemple, MPO, CD79a, CD3 intra cytoplasmique).

La différenciation des cellules hématopoïétiques s'accompagne d'un schéma spécifique d'intensité du CD45, corrélé à la fois à la lignée et au stade de maturation.

Le **CD45** est un antigène dit « pan-leucocytaire », présent à la surface de tous les leucocytes humains, et il n'est pas exprimé par les hématies et les plaquettes. Il est fortement exprimé par les lymphocytes matures, alors qu'il est faiblement exprimé sur les stades plus immatures. Ainsi, le CD45 était un marqueur majeur pour l'identification de la population cellulaire blastique sur la base de sa faible expression et l'exclusion des cellules résiduelles normales.

En raison des contraintes d'utiliser un seul tube 8 couleurs, il a été choisi d'inclure un seul marqueur d'immaturité supplémentaire pour affiner le gating des cellules blastiques et confirmer davantage le caractère immature de la population pathologique.

Le choix entre la TdT et le CD34 a été discuté. Le **CD34** avait l'avantage d'identifier les cellules immatures de toutes les lignées et a été finalement sélectionné. (45)

Des marqueurs associés à la lignée ont ensuite été ajoutés pour le gating final des cellules blastiques :

La **MPO** a été sélectionnée comme marqueur myéloïde hautement spécifique.

Le **CD3 intra cytoplasmique** a été inclus en tant que marqueur spécifique de la lignée T, qui doit être interprété en combinaison avec le CD3 de surface afin d'identifier un modèle **CyCD3+/sCD3-**, le phénotype le plus fréquent des LALT.

Le **CD19** a été sélectionné comme marqueur de lignée B très sensible, qui est exprimé au cours des premiers stades de l'engagement des cellules B ainsi que dans pratiquement tous les cas de LALB.

Le **CyCD79a** a été ajouté pour améliorer l'attribution de la lignée B. Il est spécifiquement et strictement exprimé par les cellules de la lignée lymphoïde B, dès le stade pro-B et persiste jusqu'au stade plasmocytaire.

Le CyCD79a a été préféré par rapport au CyCD22 parce que CD22 n'est pas spécifique de la lignée B, il est également exprimé à des niveaux élevés dans les basophiles normaux, les mastocytes et certaines cellules dendritiques.

Enfin, le **CD7** a été sélectionné parce qu'il est positif dans pratiquement tous les cas de LALT et dans un sous-ensemble de LAM, généralement Cy MPO négatif. (45)

3.2.1.2 Panel d'anticorps des LAL B :

- Panel pour la sous-classification des LAL B.

Les informations sur le stade de maturation des LAL B reposent sur l'expression de CD10, l'IgM intra cytoplasmique, l'IgM de surface, et les chaînes légères kappa et lambda.

Notre panel de diagnostic de LALB, comprenait 3 tubes 4 couleurs avec CD45 Percp Cy5.5 et CD19 APC comme marqueurs de gating.

Les marqueurs sIg M FITC et cIgM PE ont été inclus dans le même tube.

Pour les chaînes légères, nous avons utilisé la combinaison Kappa FITC/Lambda PE.

Nous avons également introduit des marqueurs myéloïdes : CD13 FITC/ CD33 PE. Ils sont principalement exprimés dans les LALB II.

Panel MRD B :

Le panel MRD des LAL B se compose d'un panel d'anticorps à trois tubes de 8 couleurs.

Ce panel permet la caractérisation des hématogones et l'identification des LAIP de la MRD B.

Afin de permettre la liaison des données des différents tubes, une combinaison optimale de marqueurs de gating (marqueurs présents dans chaque tube) et de marqueurs de caractérisation des LAIP a été utilisée comme une stratégie de base pour construire le panel. (45)

06 marqueurs de gating ont été inclus dans ce panel :

Le CD19 a été choisi car il est exprimé à un stade précoce de l'engagement des cellules B et dans pratiquement tous les cas de LAL B. Il est présent sur tous les lymphocytes B normaux, y compris les pro-lymphocytes B et les lymphoblastes. C'est un marqueur pan-B. Un conjugué sensible **CD19 PECy7** a été choisi en raison de la luminosité de ce fluorochrome. (45)

Le CD45 a également été conservé comme marqueur particulièrement efficace dans la LAL B pour le gating des cellules blastiques et l'exclusion des cellules normales résiduelles, en particulier les cellules B matures CD45 fort, et identifier des sous-populations immatures parmi les cellules normales de lignée B (hématogones). (45)

Le CD10, anciennement appelé CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen) est fréquemment mais variablement exprimé dans les LAL B, et représente à la fois un marqueur d'immaturité et un marqueur de la lignée B avec un modèle d'expression variable le long du développement normal des cellules B. (45)

CD34 est un marqueur d'immaturité, qui n'est pas lié à la lignée et est fréquemment (mais pas toujours) exprimé dans les LAL B. Lorsqu'il est exprimé, il est utile pour l'identification des cellules blastiques. Le réactif **CD34 PerCPCy5.5** a été sélectionné à cause de ses excellentes propriétés de fluorescence. (45)

Le CD20 apparait à un stade intermédiaire de maturation et est présent sur tous les lymphocytes B mature (à partir de la cellule pré-B).

Le CD38 est exprimé aux premiers stades des cellules de la lignée B (hématogones) puis est perdu durant leur maturation. Les lymphocytes B les plus matures au repos n'expriment pas l'antigène CD38. L'activation des cellules B en plasmocytes entraîne une forte expression du CD38. Il est souvent sous exprimé par les lymphoblastes, et de manière hétérogène. (45)

La combinaison CD10 FITC / CD38 APC / CD20 V450 a été choisi afin de garder le canal PE libres pour les marqueurs de caractérisation de la MRD B (LAIP).

La combinaison des marqueurs de gating (CD19, CD45, CD10, CD34, CD20, CD38), sélectionnée, était très efficace dans la discrimination des cellules B de régénération (hématogones) par rapport aux blastes B leucémiques. (45)

Les marqueurs aberrants peuvent encore améliorer la discrimination entre les précurseurs des cellules B de régénération et les blastes B leucémiques. En conséquence, les antigènes : CD58, CD66c, CD123, CD44, CD81 et CD49f ont été sélectionnés.

CD58 : c'est une glycoprotéine transmembranaire GPI ancrée qui se lie au CD2 et dont l'interaction induit diverses réponses immunitaires. Il est exprimé par de nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. (70,71). Il est souvent surexprimé par les cellules blastiques B par rapport aux précurseurs de cellules B normales de régénération (hématogones). (45).

CD123 : C'est un récepteur à l'interleukine 3 (IL3), il est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules myéloïdes. Il est souvent surexprimé dans les LAM et LAL avec **une rare modulation antigénique au cours de la maladie**. L'avantage de ce marqueur est qu'il n'est pas exprimé par les hématogones, ce qui fait de lui un marqueur discriminant et robuste pour la MRD. (70,72).

CD66c : Les isotypes CD66 sont principalement exprimés par les granulocytes en phase terminale, mais il existe également une expression aux stades promyélocyte, myélocyte et métamyélocyte (73). Il s'agit d'un marqueur myéloïde fréquemment exprimé par les lymphoblastes dans les LAL B de l'enfant. Son expression dans les LAL B est associée à la présence de BCR-ABL1 ou d'une hyperdiploïdie, bien que non spécifique d'une anomalie moléculaire (45).

CD44 : c'est une molécule d'adhésion qui n'est pas exprimée par les hématogones. Ce qui fait de ce marqueur un autre discriminant utile entre les hématogones et les blastes leucémiques dans les LALB. (74).

CD81 : est une molécule de tétraspanine qui est fortement exprimée par les précurseurs normaux des lymphocytes B, mais se trouve à des niveaux anormalement bas dans les cellules blastiques de patients atteints de LALB. (45)

CD49f : il est exprimé par les thymocytes et les monocytes. Dans la lymphopoïèse B normale, le CD49f est indétectable, alors que dans la plupart des cas de LALB, l'expression de CD49f est modérée à forte. (75)

3.2.1.3 Panel d'anticorps des LAL T :

Panel de la sous-classification de LALT.

Notre panel de la sous classification est un panel 5 couleurs avec 03 tubes.

Ce panel contient les marqueurs de la lignée T: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Les marqueurs CD7, CD5, CD2, CD1A sont déjà inclus dans le panel MRD T.

Les marqueurs de gating comprenaient : CD45 APCH7, s CD3 Percp Cy5.5 et cCD3 APC.

Dans la population lymphocytaire T normale, les lymphocytes T expriment le CD4 ou le CD8, jamais les 2 simultanément. Les cellules pouvant exprimer à la fois du CD4 et CD8 sont les thymocytes doubles positifs qui sont exclusivement localisés au niveau du thymus. La co-expression du CD4 et du CD8 au niveau médullaire ou du sang signe donc la présence de cellules leucémiques. Il était donc logique de placer CD4 et CD8 dans le même tube (45) et la combinaison CD4 FITC/ CD8 PE est utilisée.

Pour le TCR, nous avons utilisé la combinaison TCR $\gamma\delta$ FITC et TCR $\alpha\beta$ PE.

Nous avons également introduit des marqueurs myéloïdes : CD13 FITC/ CD33 PE. Ils sont principalement exprimés dans les LALT très immature.

Panel MRD T.

Le panel MRD T est composé de 2 tubes 8 couleurs. Ce panel comporte une combinaison de marqueurs de gating commune pour les 02 tube, avec des marqueurs LAIP qui sont principalement représentés par des marqueurs qui déterminent la nature immature des lymphocytes T.

Les marqueurs de gating incluent : cyCD3, sCD3, CD7, CD5, et CD45RA. Ils sont exprimés à la fois sur les cellules immatures et matures, avec des niveaux d'intensité d'expression connus sur les cellules matures.

CD3 intra cytoplasmique : il est constamment exprimé dans les LAL T et généralement à des niveaux élevés, permettant un gating facile des cellules blastiques. Cependant, CyCD3 doit être interprété en combinaison avec le sCD3 pour exclure les cellules T résiduelles matures normales, ce qui nécessite l'évaluation combinée de CyCD3 et sCD3. (45)

CD7 : marqueur d'immaturité, il a été pratiquement toujours exprimé dans les LALT, mais il n'est pas spécifique à la lignée. (45)

CD5 : est généralement exprimé dans les LALT, mais il peut être faible ou négatif, en particulier dans un sous-ensemble de LAL T précoce.

Bien que le PerCPCy5.5 est un fluorochrome relativement faible, le CD5 PerCPCy5.5 a remarquablement bien fonctionné dans la LALT. (45)

Le CD45 est le plus souvent exprimé à une intensité élevée sur les blastes de LAL T, ce qui les fait chevaucher avec des cellules lymphoïdes T matures (45), il a été donc remplacé par le **CD45RA** qui est faiblement exprimé par les blastes T.

Sur la base de ces considérations, le squelette du panel MRD T était : cyCD3 PE CY7 et sCD3 APCH7, CD7 APC, CD5 PercpCy5.5 et CD45 RA V510.

Les marqueurs LAIP des LALT incluent : le CD34, la TdT, le CD99 et le CD1a.

CD34 : C'est l'un des premiers marqueurs apparaissant sur une variété de cellules progénitrices, y compris les progéniteurs hématopoïétiques. Il est rapidement perdu au cours des premiers stades de la maturation des lymphocytes T dans le thymus, au stade du prothymocyte précoce. CD34 est exprimé sur une minorité de LALT, mais il est utile pour la détection de MRD lorsqu'il est présent. (76)

CD99 : Est une glycoprotéine qui a été isolée pour la première fois en tant qu'antigène qui a fortement réagi avec des anticorps spécifiques des LALT. La protéine participe à l'adhésion des cellules T et est largement exprimée sur une variété de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Parmi les cellules hématopoïétiques, de loin, l'expression la plus élevée est

observée parmi les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes immatures, en particulier sur les précurseurs de cellules T thymiques immatures avec une perte progressive au cours de la maturation. Ce marqueur est avéré particulièrement utile pour la détection des blastes T dans la moelle osseuse. Il est exprimé dans la majorité des cas de LAL-T. (76, 77)

L'expression de CD99 est relativement faible et il était donc important d'utiliser un fluorochrome brillant, comme le PE. (45)

La **TdT** est une ADN polymérase qui participe à l'addition de nucléotides pendant le réarrangement des récepteurs des cellules T et B. Elle est fortement exprimée sur les thymocytes corticaux immatures, mais elle est perdue sur les cellules T matures normales en dehors du thymus.

La TdT est presque uniformément exprimée dans les LAL B et T et sur un sous-ensemble de cas de LAM. Sa présence sur des cellules T médullaires ou sanguines est donc anormale. Seuls de rares cas de LAL-T TdT négative au diagnostic correspondent à des phénotypes très immatures de LAL-T.

La TdT est largement considérée comme l'un des meilleurs marqueurs pour la détection de la maladie résiduelle de LAL-T (77). La détection de TdT peut être difficile, mais le réactif TdT FITC sélectionné donne une fluorescence fiable et robuste. (45)

La combinaison TdT/ CD99 est un des meilleurs marqueurs de suivi de la maladie résiduelle dans les LAL-T. (78)

CD1a : est un antigène exprimé exclusivement par les thymocytes corticaux. Son acquisition signe le passage d'un progéniteur très immature à un progéniteur engagé dans la différenciation de la lignée T.

Les thymocytes exprimant le CD1a étant exclusivement localisés au niveau du thymus, la présence de CD1a au niveau médullaire ou sanguin est pathologique.

Dans le cas d'une LAL-T, la positivité du CD1a permettra donc de la classer en LAL-T corticale, et il sera un marqueur essentiel au suivi de la maladie résiduelle puisqu'il ne sera exprimé que par les blastes leucémiques. (78) Le CD1a a été placé dans le canal V421 avec des résultats satisfaisants.

De plus, certaines LAL T expriment de façon aberrante les antigènes **CD16** et **CD56** ou présente un trou phénotypique avec le **CD2**. Dans ces cas, ces marqueurs représenteront un LAIP et seront utiles au suivi de la maladie résiduelle.

L'utilisation de ces marqueurs (CD16, CD56 et CD2), dans ce panel permet également de cibler et d'exclure de l'analyse, les cellules NK.

3.2.2 Titration des réactifs d'anticorps :

Pour chaque anticorps utilisé dans le marquage des cellules, le fournisseur recommande un volume à utiliser de 5 à 20 μ l. Afin d'optimiser notre méthode et de limiter le volume en anticorps, des courbes de saturation ont été réalisées pour certains anticorps utilisés dans nos panels MRD. Les autres anticorps déjà utilisés en routine dans notre laboratoire pour d'autres analyses, ont été utilisés avec le volume habituel.

Pour chaque concentration étudiée, la MFI des populations lymphocytaires positives et négatives pour le marqueur ainsi que le SD de la population négative étaient mesurées.

Pour chaque volume testé on calcul :

- Ratio entre la MFI de la PRP et la NRP.
- Indice de coloration (SI): $(\text{MFI de PRP} - \text{MFI de NRP}) / \text{SD de NRP}$

On utilise des graphiques linéaires pour mieux afficher et interpréter les résultats:

-L'un montrant les courbes MFI des deux populations de référence. (Figure 8)

-L'autre montrant les courbes du ratio et du SI. (Figure 9).

On sélectionne le volume optimal qui devrait être bien dans la phase plateau de la courbe MFI de PRP.

Des courbes de saturation ont été réalisées pour les anticorps suivants : CD3-PECY7, CD20V450, CD19-PECY7, CD38-APC et CD45 V500.

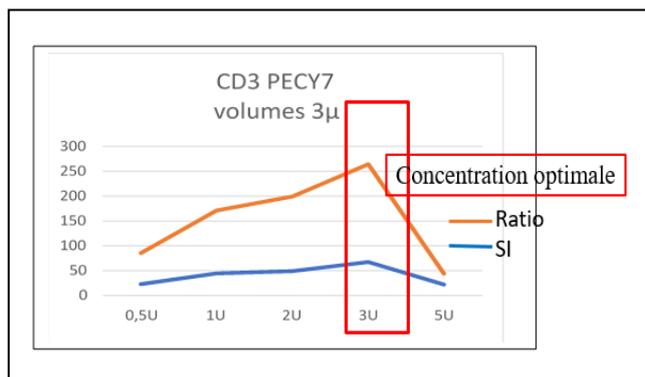


Figure 9 : Courbe SI/Ratio

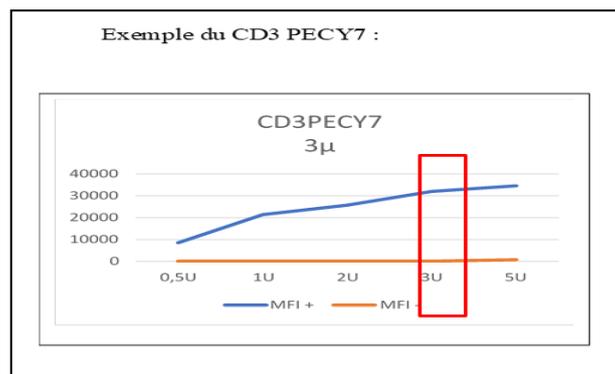


Figure 10 : Courbe MFI+/MFI-

3.2.3 Réglage du cytomètre de flux

Le cytomètre utilisé est un BD FACS CantoII® de chez Beckton Dickinson, en configuration 08 couleurs (4.2.2) et utilisant 3 lasers (un laser bleu émettant à 488 nm, un laser rouge émettant à 633 nm et un laser violet émettant à 405 nm) et doté du logiciel d'analyse : FAC DIVA version 6.03

Nous avons utilisé les 8 fluorochromes suivants :

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine, **PE** : Phycoérythrine, **Percp Cy5.5** : Phycoérythrine-cyanine 5.5, **PECy7** : Phycoérythrine-cyanine 7, **APC**: Allophycocyanin, **APCH7** : APC-Hilite7. **PB**: Pacific Blue, **Horizon V450** (HV450), **Horizon V500** (HV500).

3.2.3.1 Surveillance des performances de l'instrument

La surveillance des performances de l'instrument a été effectuée quotidiennement (à chaque démarrage à froid) après une stabilisation du laser de 30 minutes.

La ligne de base est faite par l'ingénieur BD avec un lot des billes CST (Cytometer Setup and Tracking beads).

Le passage journalier des billes CST permet de contrôler le cytomètre FACS CantoII. Il permet d'évaluer les lasers, leurs alignements, leurs CV, et les voltages de chaque canal pour des moyennes de fluorescence déterminées.

Les critères suivants devaient être atteints pour valider les CST :

- Valeurs delta PMT < 50.
- Coefficient de variation (CV) du pic le plus brillant doit être $\leq 6\%$ pour les canaux du laser bleu, violet et rouge, et $\leq 8\%$ pour le canal PECY7. (Figure 11).

MATERIEL ET METHODES

Chaque fois que les performances de l'instrument échouaient, des procédures de nettoyage en profondeur sont requises. Lorsque les performances n'ont pas été restaurées pour répondre aux critères de contrôle de qualité, une visite de service de maintenance a été demandée.

Detector Settings						CV			
Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference Target Value	Bright Bead % Robust CV	Mid Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV	
Blue	FSC	FSC	125000	124979	-1	1.22	124898	1.20	
Blue	F	SSC	125000	123760	-1	2.92	124507	2.86	
Blue	E	FITC	26323	26467	0	1.86	1153	7.36	
Blue	D	PE	35315	35324	0	1.60	1267	7.03	
Blue	B	B3	55078	53434	-3	2.72	1604	12.96	
Blue	A	PE-Cy7	51953	49166	-6	4.07	777	25.94	
Red	C	APC	72724	71557	-2	2.87	3758	10.50	
Red	A	R2	74201	73626	-1	2.81	1524	11.83	
Violet	B	Pacific Blue	28938	28748	-1	3.25	1364	8.07	
Violet	A	V2	105043	103327	-2	3.15	4654	6.46	

Detector Settings (Continued)						DELTA PMTV			
Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	P/F
Blue	FSC	FSC	21704	1.82	507	2	N/A	N/A	Pass
Blue	F	SSC	63218	2.26	376	4	N/A	N/A	Pass
Blue	E	FITC	145	27.62	429	1	0.0433	87	Pass
Blue	D	PE	283	21.71	385	1	0.3424	286	Pass
Blue	B	B3	266	32.68	542	-7	0.0173	71	Pass
Blue	A	PE-Cy7	94	80.87	560	-6	0.0223	8	Pass
Red	C	APC	339	35.61	529	-33	0.0176	50	Pass
Red	A	R2	165	46.63	492	8	0.0050	2516	Pass
Violet	B	Pacific Blue	152	39.97	434	8	0.0537	1554	Pass
Violet	A	V2	338	22.68	486	5	0.0117	22	Pass

Specifications

Figure 11 : Rapport des performances du cytomètre

3.2.3.2 Réglage des PMT (voltage) pour les mesures de fluorescence :

Le réglage des PMT (voltage) a été réalisé avec des billes positives pour tous les fluorochromes : les billes CST de BD en utilisant le module application setting.

Ces billes serviront pour le réglage des PMT et pour le contrôle de qualité quotidien du bon fonctionnement du cytomètre (CV, delta PMT ...).

Le logiciel Diva avec les billes CST, utilise l'écart-type du bruit de fond électronique des détecteurs (SD_{EN}), déterminé à la ligne de base pour définir des tensions PMT suffisamment élevées ($10 \times SD_{EN}$) pour minimiser le CV des populations négatives / faibles. Ce qui favorise une sensibilité plus élevée pour les signaux faibles.

Les valeurs cibles des MFI sont basées sur la fluorescence des billes CS&T Bright utilisées pour cette ligne de base.

Le module application setting dans BD CS&T nous permet d'ajuster la tension PMT de l'instrument et les paramètres de puissance du laser de manière optimale : Chaque fois que CST « Check Performance » est exécuté, les PMT sont ajustés de sorte que les valeurs cibles des MFI soient atteintes. Ainsi, des mesures de fluorescence équivalentes seront effectuées même si les performances de l'instrument changent (diminution de la puissance du laser; désalignement).

Pour les études à long terme où il est important d'avoir une MFI constante, il faut créer et utiliser une seule ligne de base. Pour cela, on conserve un flacon du lot de billes utilisé pour créer cette ligne de base (MFI cible). Lors de la première utilisation d'un nouveau lot de billes, on ne va pas créer une nouvelle ligne de base, mais plutôt réinitialiser les valeurs cibles du nouveau lot de billes sur le lot de billes d'origine.

Au début de l'étude, nous avons utilisé les billes CST pour le réglage des voltages. Par la suite, pour avoir un réglage standard avec le laboratoire de référence, nous avons décidé d'utiliser les billes Rainbow BD validées par France Flow.

Avec les Rainbow beads, la tension de chaque PMT a été réglée pour atteindre la MFI du 7eme pic du lot des billes. (Figure 12). Le protocole détaillés est disponible sur le site Euroflow (www.euroflow.org).

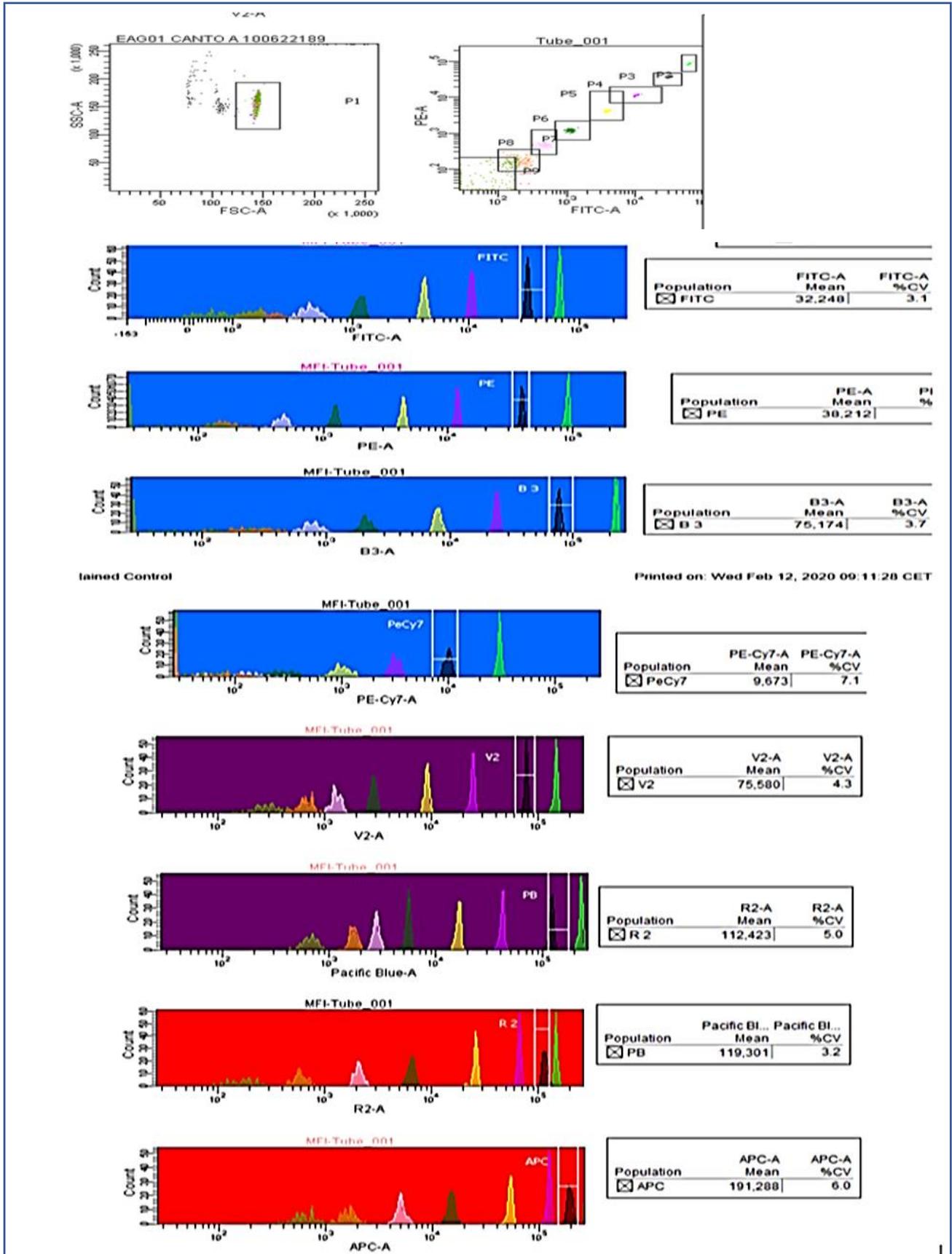


Figure 12: Matrice des voltages.

3.2.3.3 Réglages des paramètres FSC/SSC :

Les lymphocytes ont été utilisés comme population de référence biologique interne pour le réglage adéquat des paramètres FSC/SSC.

Pour cela, 50 μ l d'un échantillon de sang périphérique obtenu d'un sujet sain (témoin) a été utilisé.

Avant le passage des cellules au cytomètre, les globules rouges ont été lysés pendant 10 minutes en utilisant 2 ml de solution de lyse (FACS lyse de BD Biosciences diluée au 1/10 dans de l'eau distillée, selon les recommandations du fabricant).

Ensuite, l'échantillon a été centrifugé (6 min à 1400 tr/mn), le culot cellulaire a été lavé avec 2 ml de solution tampon phosphate (PBS), à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions et enfin remis en suspension dans 300 μ l de PBS, et passé dans le cytomètre de flux en mode « faible débit » dans la première heure après la préparation de l'échantillon.

Les tensions PMT ont été ajustées de telle sorte que les lymphocytes gatés atteignent des valeurs SSC et FSC moyennes de 55000 ± 5000 et 13000 ± 2000 , respectivement. (Figure 13)

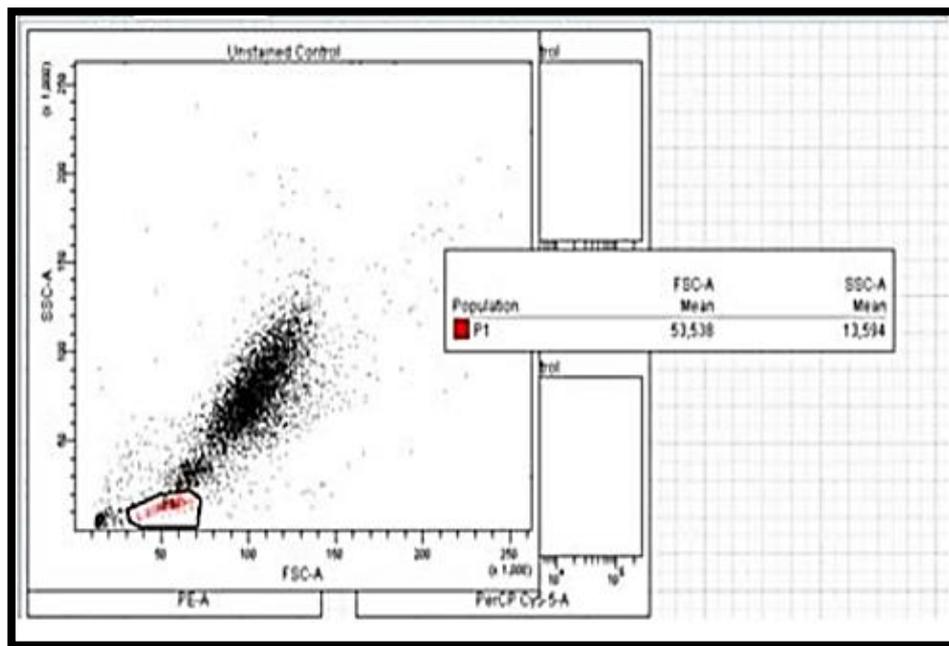


Figure 13 : Exemple de réglage des paramètres FSC/SSC

3.2.3.4 Matrice de compensation

La matrice de compensation a été définie après que la tension des PMT soit définie, en raison de son impact sur l'intensité de la fluorescence et le débordement dans les canaux secondaires.

-La matrice de compensation est établie grâce à l'utilisation de monomarquages des cellules sanguines ou de billes de compensation CompBeads de BD. (Figure 14).

-On passe chaque tube correspondant à un anticorps spécifique au cytomètre.

-Il faut acquérir en vitesse low, au minimum 1000 évènements positifs pour chaque anticorps.

-Une fois que tous les tubes sont passés, nous avons calculé la matrice de compensation.

-Le calcul de la matrice de compensation se fait d'une manière automatique par le logiciel FACSDIVA sur le Canto II.

Une matrice de compensation générique a été utilisée pour tous les réactifs d'anticorps conjugués aux fluorochromes : V450, V500, FITC, PE et APC, ainsi que pour le fluorochrome tandem PerCPCy5.5. En revanche, pour les fluorochrome tandem APCH7 et PECY7, des contrôles de compensation spécifiques pour chaque anticorps conjugué au même colorant tandem ont été utilisés (exp : CD19 PE.CY7, CD3 PECY7, CD45 APC H7, CD3 APC H7).

La procédure détaillée utilisée pour concevoir la matrice de compensation requise pour une utilisation de routine des panels, est disponible sur le site EuroFlow (www.euroflow.org).

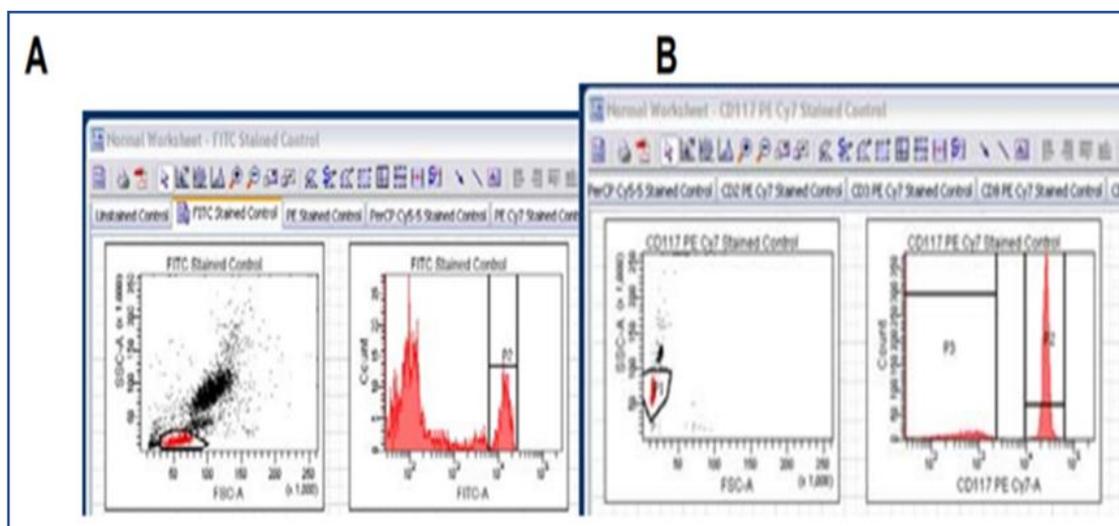


Figure 14 : Stratégie de gating utilisée pour chaque tube monomarké pour le calcul de compensation. A : avec des leucocytes du sang périphérique, et B : avec des billes de compensation (CompBeads de BD).

MATERIEL ET METHODES

La configuration contenant la tension PMT pour chaque canal de fluorescence et la matrice de compensation calculée par le logiciel, ont été enregistrées.

Pour valider la matrice de compensation, on prépare un « mixed tube » contenant des cellules mono marquées avec les anticorps les plus courants pour chaque fluorochrome en les ajoutant à volume égale et on passe le tube au cytomètre.

La feuille d'analyse du mixed tube est faite en créant des dots blots de fluorescence en portant chaque fluorochrome par rapport aux autres. Tous les dots blots sont mis en mode bi-exponentiel. (Figure 15).

Chaque fois que la surveillance de l'instrument échouait, les tensions PMT ont été réinitialisées et l'expérience de configuration de la compensation a été répétée.

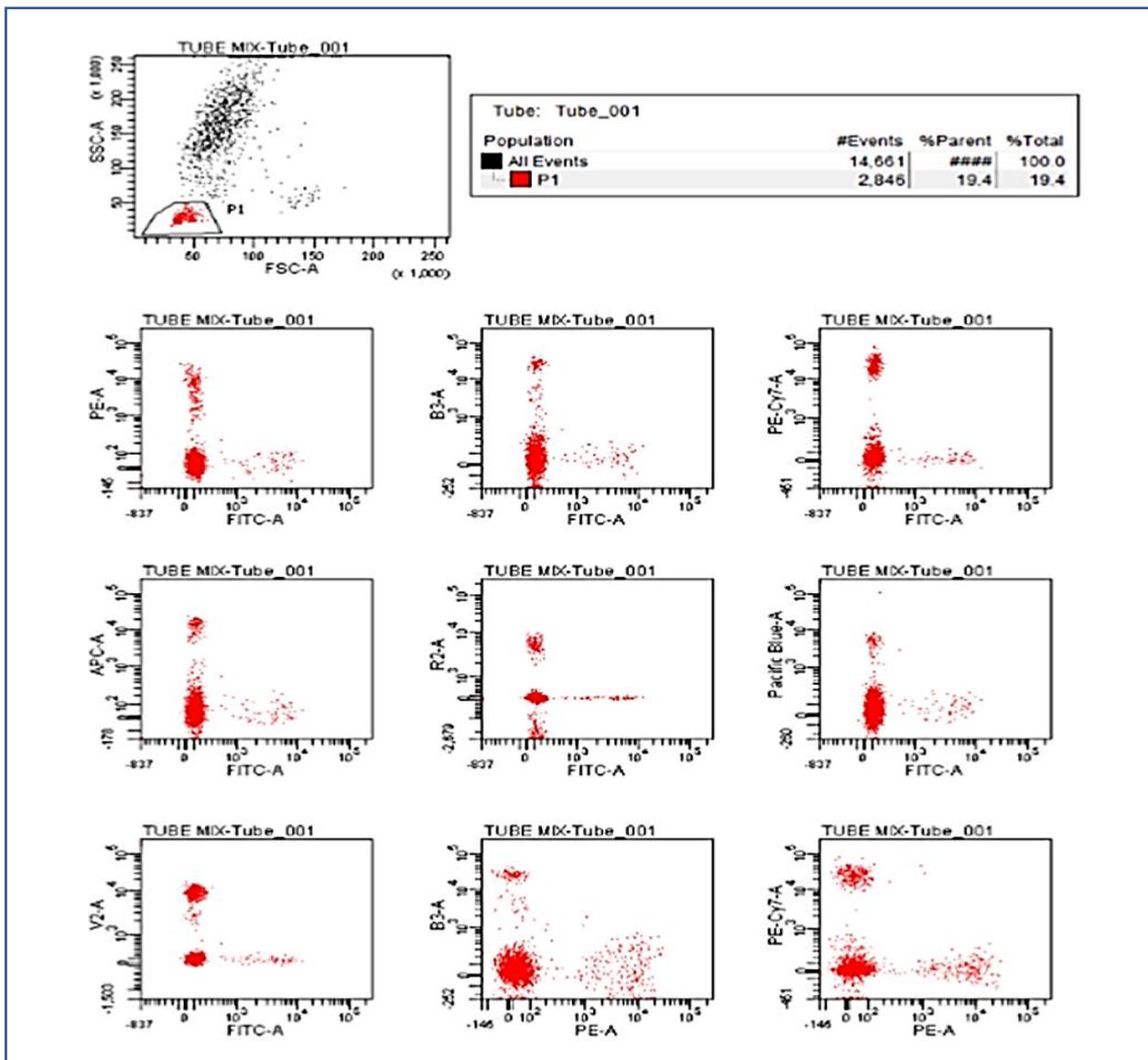


Figure 15: Feuille d'analyse du tube mixte

3.2.4 Préparation des échantillons : (figure 17)

3.2.4.1 Procédure de marquage des échantillons :

Dans un premier temps, on réalise une numération de la moelle, pour évaluer la richesse.

Une dilution est effectuée en ajustant le volume du diluant (PBS) de façon à avoir un nombre de globules blancs de 01 million/100 μ l.

Pour la MRD B, nous avons procédé à un marquage de surface de tous les anticorps. Pour la MRD T, en plus du marquage de surface, nous avons réalisé un marquage cytoplasmique pour la TdT et le CD3 cytoplasmique.

3.2.4.1.1 Etapes du marquage de surface :

- Dépôt de 100 μ l du prélèvement dans un tube et ajouter les anticorps monoclonaux du panel sélectionné.
- Incubation des cellules avec les anticorps pendant 20 min à +4°C dans l'obscurité.
- Ajouter 2cc de Facs lyse® BD (diluée au 1/10 dans de l'eau distillée) pour lyser les globules rouges.
- Incubation pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante.
- Centrifugation à une vitesse de 1400 tours pendant 6 minutes.
- Élimination du surnageant.
- Lavage avec 3 cc de PBS pour éliminer l'excès d'anticorps non fixés.
- Centrifugation à une vitesse de 1400 tours pendant 6 minutes.
- Élimination du surnageant et on récupère le culot cellulaire.
- Lavage avec 3 cc de PBS.
- Récupération du culot avec 300 μ l de PBS et passage au cytomètre.

3.2.4.1.2 Etapes du marquage intra cytoplasmiques :

Le marquage des antigènes cytoplasmiques (CD3 intra et la TdT) a été effectué après perméabilisation avec le Kit Intrasur de BD, constitué de deux réactifs : Un agent fixateur (A) et un liquide de perméabilisation (B) :

- Ajout de 100 μ l de réactif A au culot cellulaire nécessitant un marquage intra cytoplasmique et contenant déjà les anticorps pour le marquage membranaire.
- Incubation 5mn à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Lavage avec 3 cc de PBS.
- Centrifugation à 1400 tours/6min.

- Élimination le surnageant et ajouter 100 μ l de réactif B, puis ajouter les anticorps monoclonaux.
- Incubation 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Cette étape de perméabilisation de la membrane cellulaire va permettre le marquage des antigènes intra cytoplasmiques.

- Lavage avec 3 cc de PBS, centrifuger à 1400 tours/6min.
- Récupération du culot dans 300 μ l de PBS, et passage au cytometre.

Les tubes une fois préparés, il faut les acquérir sur le cytomètre dans, au maximum, 1h après le marquage conservé +4°C.

3.2.4.2 Procédure d'acquisition :

Les cellules remises en suspension dans 300 μ l de PBS étaient passées au le cytomètre afin d'acquérir au moins 20 000 cellules pathologiques pour les prélèvements au diagnostic.

Pour les prélèvements de la maladie résiduelle, il fallait acquérir tout le tube afin de recueillir le plus d'évènements possible (un million de cellules si c'est possible).

L'acquisition se fait en vitesse médium pour une meilleure résolution. (Figure 15).

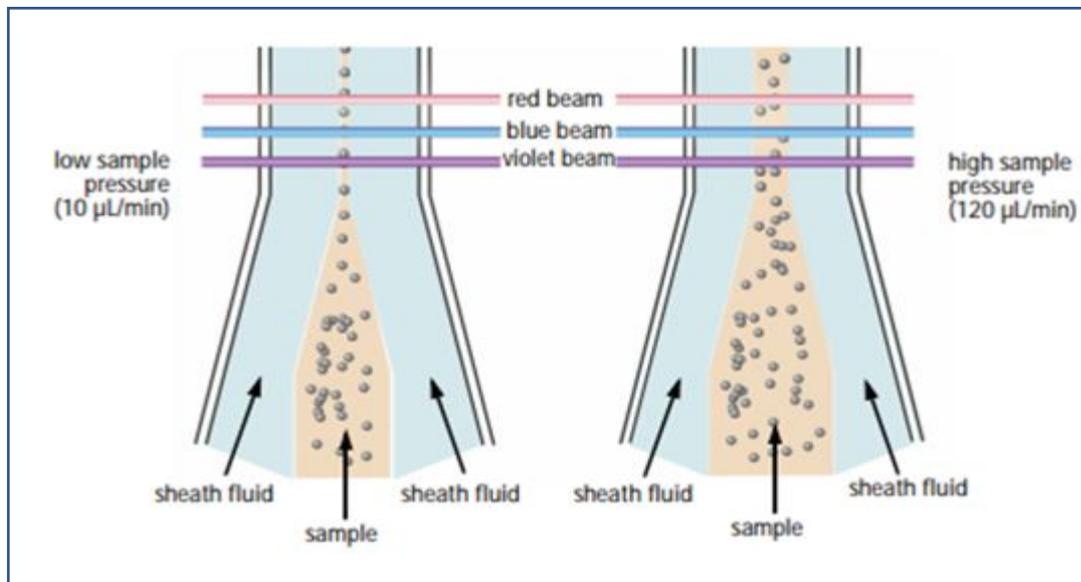


Figure 16 : Hydrofocalisation dynamique des cellules en fonction de la vitesse d'acquisition

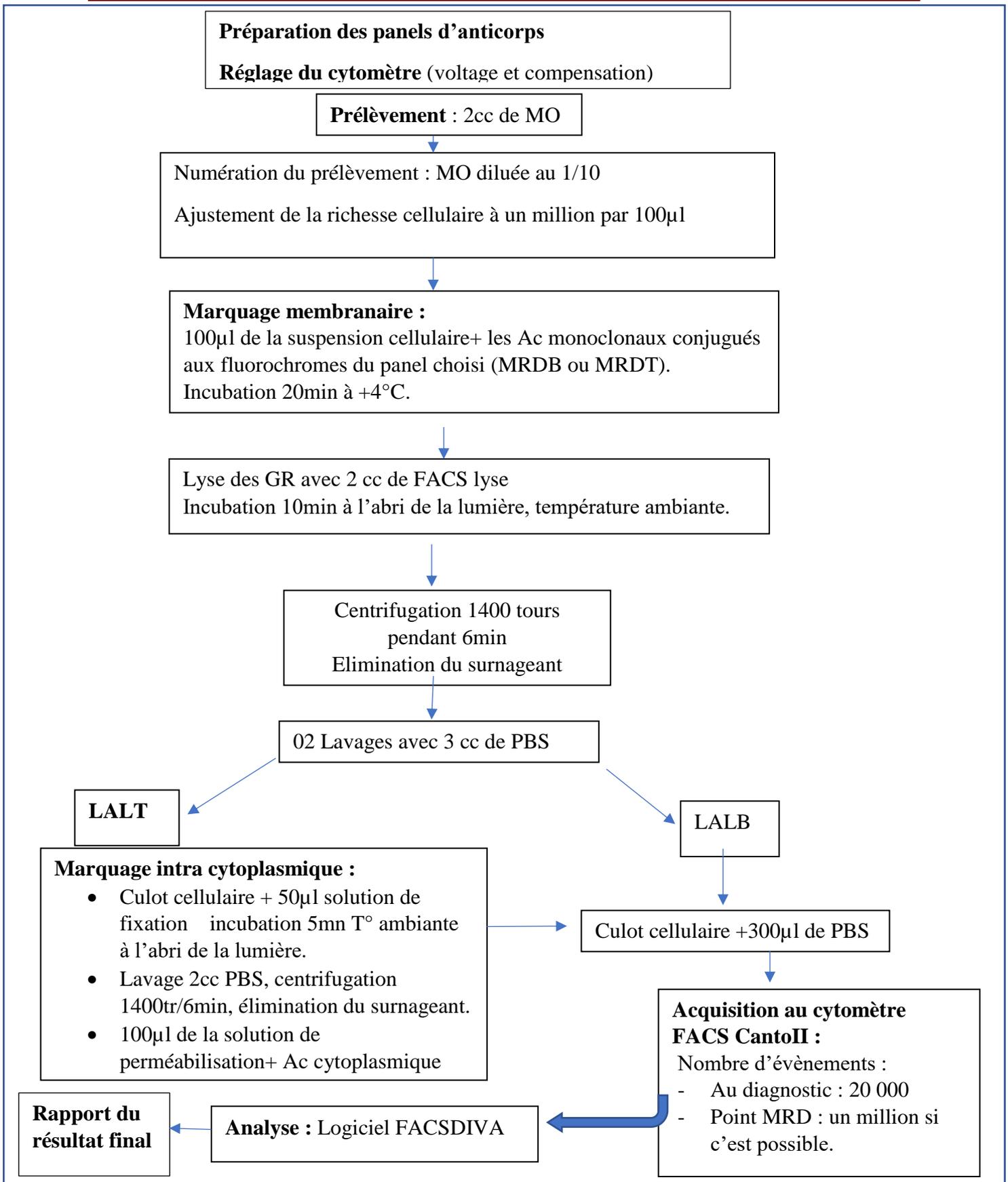


Figure 17 : Diagramme des étapes de l'immunophénotypage des LAL par CMF pour la détection de la MRD.

3.2.5 Stratégie d'analyse de la MRD

Un seul protocole pour l'analyse des données MRD a été utilisé durant toute l'étude.

L'histogramme taille/structure (FS/SS) : permet de visualiser l'ensemble des événements acquis par l'automate et d'éliminer les éléments de petite taille (débris cellulaires, GR non lysés...). (Figure 18)

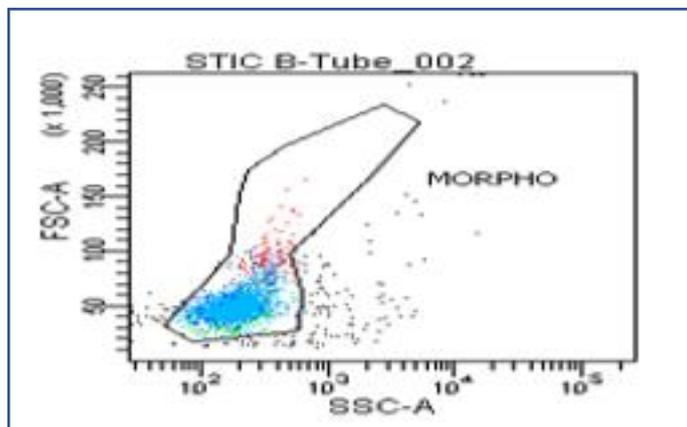


Figure 18 : Histogramme FSC/SSC

L'histogramme FSC- A /FSC-H :

L'inclusion du paramètre FSC-H permettra la discrimination des doublets.

Les doublets correspondent au passage devant le laser de 2 cellules collées

Les événements correspondant à des passages de cellules isolées seront observés dans la fenêtre singulet autour de la bissectrice de l'histogramme "FSC-A/FSC-H. (Figure 19)

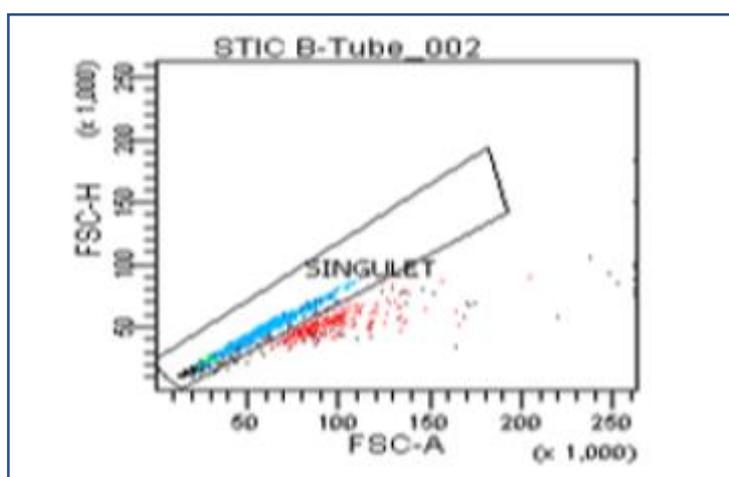


Figure 19: Histogramme FSC-A/FSC-H

Les cellules de la lignée B ou T ont été sélectionnées en fonction de la positivité CD19 ou cCD3, y compris toutes les cellules normales ou leucémiques. (Figure 20, figure 21).

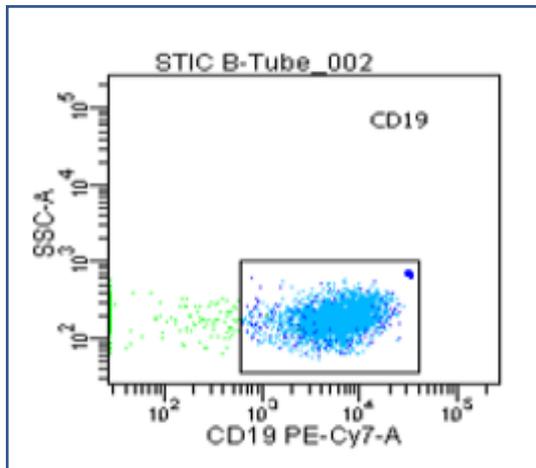


Figure 20 : Cellules CD19 positive

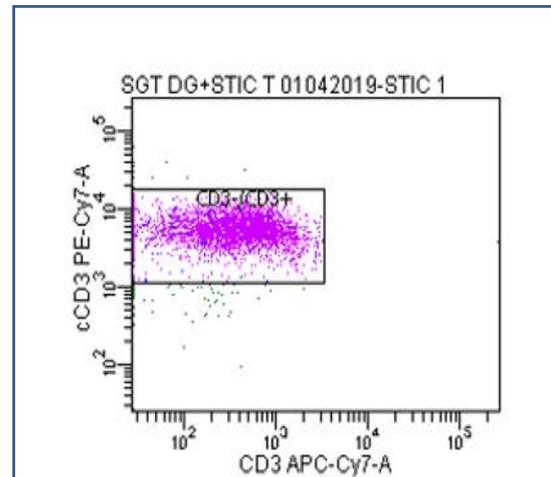


Figure 21 : Cellules CD3 positive

Ensuite, le gating a été ajusté pour exclure les cellules B ou T normales, en particulier les hématogones en régénération dans le cas de la LALB.

Pour identifier précisément toute population discrète ayant un immunophénotype informatif différent de la normale, l'immunophénotypage du diagnostic a été utilisé comme point de départ.

Le but de l'analyse des cellules leucémiques au diagnostic est de mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs marqueurs aberrants (LAIP) qui permettront le suivi de la maladie résiduelle. Par conséquent, au moment du diagnostic on pourrait soit décider quels sont les tubes les mieux adaptés pour surveiller le patient en particulier ou utiliser tous les tubes pour avoir un contrôle interne supplémentaire et plus précis des mesures.

Lors de la recherche de maladie résiduelle, les cellules du prélèvement de la MRD sont analysées sur le même masque d'analyse que celui du diagnostic. Les fenêtres positionnées sur les blastes sur chaque histogramme restent positionnées de manière strictement identique.

Le graphique d'intersection des zones blastiques nous donne donc le nombre d'évènements ayant un phénotype identique à celui du diagnostic. (Figure 22)

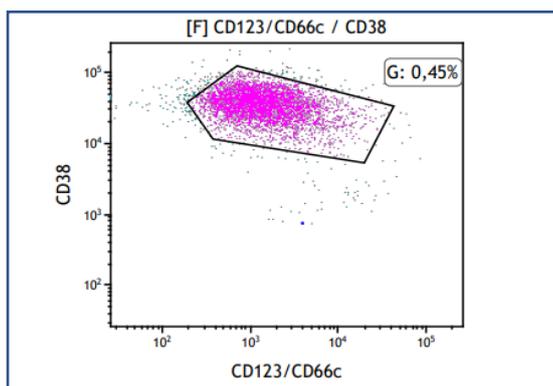


Figure 22 :Graphique d'intersection des zones blastiques

Les cellules ainsi définies sont visualisées sur un histogramme « FS/SS » montrant le degré d'homogénéité du cluster ainsi défini. (Figure 23)

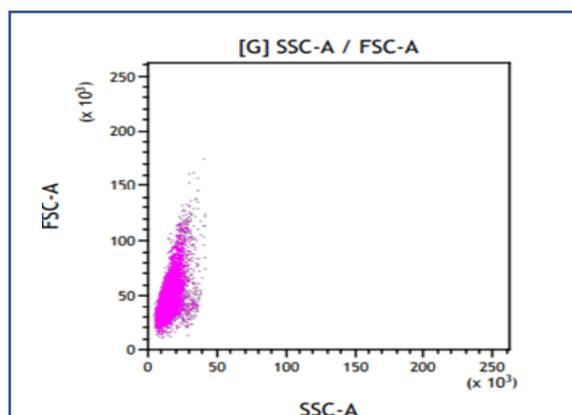


Figure 23 :Histogramme FS/SS du LAIP identifié

Il est important de définir le nombre minimum de cellules qu'un cluster MRD doit contenir afin de pouvoir la quantifier de manière fiable.

Bien qu'il n'existe pas de consensus concernant ce paramètre, la majorité des études fixent le seuil de cellules entre 10 et 30. Pour cette étude, nous avons défini un minimum de 10 événements groupés pour considérer la MRD détectable et 30 événements pour une MRD quantifiable.

LAIP positif : cluster de 10 à 30 événements (évts).

- Acquisition < 300 000 evts :
Sensibilité : 10^{-3} ou 0,1%
- Acquisition de $\geq 3\ 000\ 000$ evts
Sensibilité : 10^{-4} ou 0,01%

En cas de résultats divergents entre les combinaisons d'anticorps, la valeur MRD la plus élevée dérivée de la combinaison d'anticorps monoclonaux la plus informative, c'est-à-dire la résolution la plus claire des blastes leucémiques des cellules normales, a été sélectionnée.

3.2.6 Quantification de la MRD:

Le résultat de la MRD a été donné en pourcentage des cellules leucémiques dans la population totale des cellules nucléées selon la formule suivante :

$$\text{MRD (\%)} = \frac{\text{Nbre moyen d'évnts LAIP X 100}}{\text{Nbre total de cellules nucléées (CD45 pos)}}$$

Les niveaux d'interprétation étaient respectivement:

- (1) « positif » « quantifiable » pour les valeurs $\geq 10^{-4}$.
- (2) « positif » détectable » ($< 10^{-4}$) pour les niveaux inférieurs au seuil cible.
- (3) « indétectable si aucun cluster ne pouvait être observé au seuil cible requis.

Pour chaque anticorps présent dans le panel, un graphique CD/SS est réalisé afin de vérifier que tous les anticorps de la combinaison ont bien été distribués. (Figure 24)

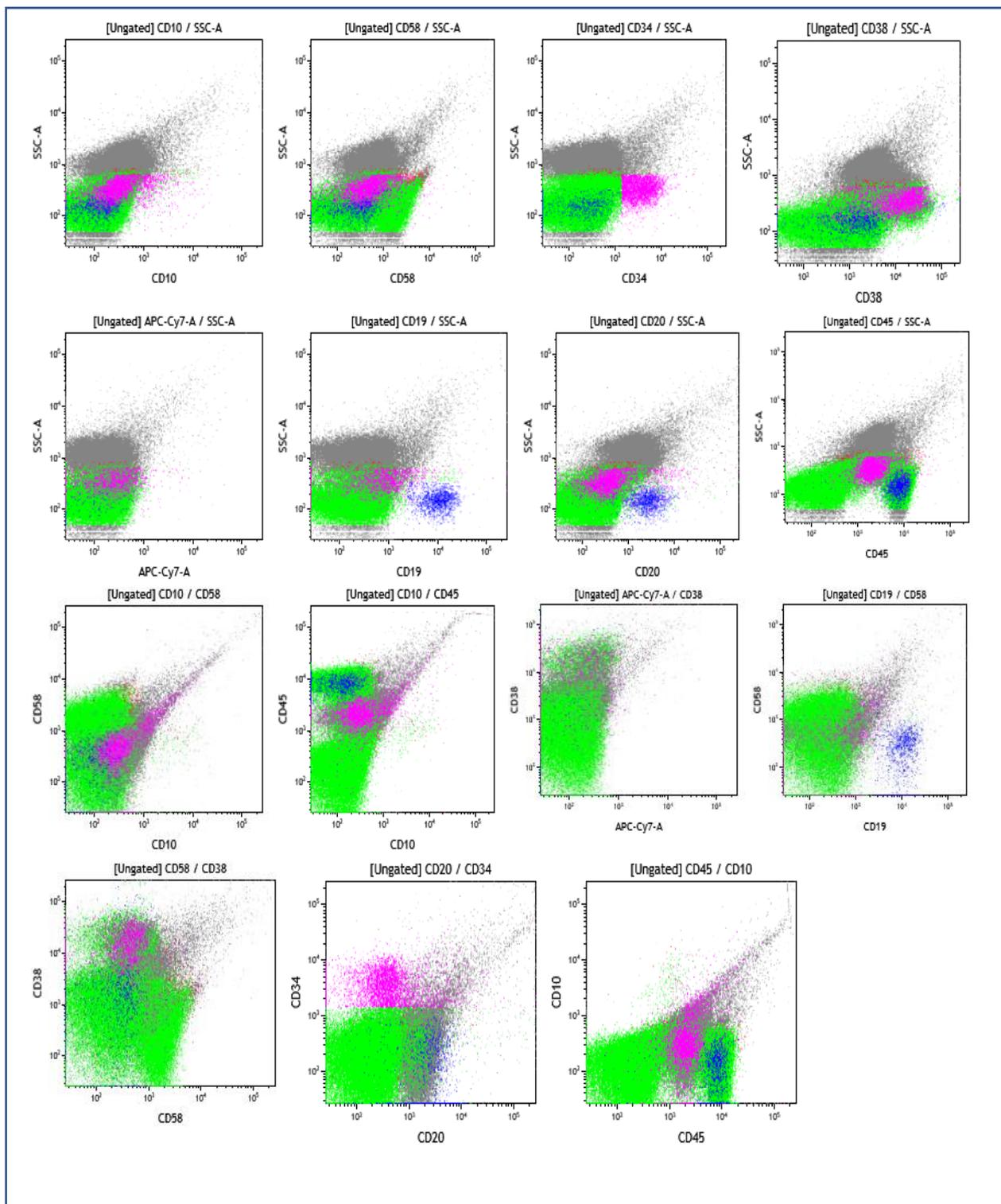


Figure 24 : Masque d'analyse de vérification de la qualité du marquage.

3.2.7 Evaluation de l'hémodilution des échantillons du point de suivi :

Pour l'évaluation du degré d'hémodilution des prélèvements de MO, en plus de l'analyse cytologiques des frottis médullaires colorés au MGG, deux autres méthodes ont été utilisées :

- Analyse en cytométrie en flux, par la détermination du pourcentage des cellules CD34.

Selon les données de la littérature (73,78), les cellules progénitrices positives pour CD34 étaient positivement corrélées à la pureté de la moelle osseuse, car ces populations sont principalement distribuées dans la moelle osseuse.

Un échantillon de moelle osseuse est considéré hémodilué s'il contient moins de 2 % de cellules CD34 positive du total des leucocytes. (73,78).

Cette analyse n'a pas engendré un coût supplémentaire vu que nos panels MRD contenaient déjà ce marqueur.

- La méthode de Holdrinet et al.

$$\left[1 - \left(\frac{\text{érythrocytes moelle}}{\text{érythrocytes sang}} \right) \times \left(\frac{\text{leucocytes sang}}{\text{leucocytes moelle}} \right) \right] \times 100$$

Cette méthode est basée sur le fait que le nombre d'érythrocytes dérivés du compartiment de la moelle osseuse est relativement petit par rapport au nombre total d'érythrocytes mesuré dans une aspiration de MO.

Par conséquent, on peut calculer la fraction de cellules leucocytaires périphériques à partir des rapports entre les érythrocytes et le nombre de leucocytes à la fois dans l'aspiration de moelle osseuse et dans un échantillon de sang périphérique obtenu simultanément.

Plus le pourcentage est élevé, moins l'échantillon de moelle est contaminé par du sang.

Au-dessus de 70%, le prélèvement de moelle est considéré comme pur. En dessous de ce seuil, le degré de dilution devient significatif et la MRD est ininterprétable (73).

3.3. Analyses statistiques :

L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS v 20.0 et le logiciel de calcul Open épi.

Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Les variables continues ont été analysées avec des tests t sur échantillons indépendants.

III. RESULTATS :

1. Caractéristiques de la population d'étude recrutée au diagnostic

Entre juillet 2018 et juillet 2019, 30 immunophénotypages de leucémies aiguës pédiatriques, ont été réalisés, dont 20 sont revenus en faveur d'une LAL. Ce qui représente un taux de LAL de 66.66%. Les caractéristiques clinico-biologiques des 20 patients sont résumées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Caractéristiques cliniques et biologiques des 20 patients LAL au diagnostic

Paramètres	Nombre de patients n (%) N=20
Sex ratio (M/F)	1(10/10)
Age médian (VE)	04 ans (07 mois- 16 ans)
Groupes d'âge	
< 1 an	02 (10%)
1 ≥ âge < 10 ans	14 (70%)
≥ 10 ans	04 (20%)
Syndrome tumoral	
Splénomégalie	13 (65%)
Adénopathie	15 (75%)
Signes cliniques d'insuffisance médullaire	
Syndrome hémorragique	05 (25%)
Syndrome infectieux	06 (30%)
Syndrome anémique	15 (75%)
Hb < 7g/dl (%)	07 (35%)
Hémogramme (Médiane)	
GB (G/L)	18 (1.2 - 276.6)
Hb (g/dl)	8.2 (4.1- 12)
Plaquettes (G/L)	46.5 (6- 231)
Degré de l'hyperleucocytose.(G/L)	
< 10	7 (35%)
10 ≥ GB < 50	6 (30%)
50 ≥ GB ≤ 100	4 (20%)
>100	3 (15%)
Données cytologiques (médiane)	
Blastose sanguine	51% (5- 97)
Blastose médullaire	90 % (58- 98)

2. Résultats du diagnostic phénotypique :

2.1 Répartition des patients LAL selon le phénotype

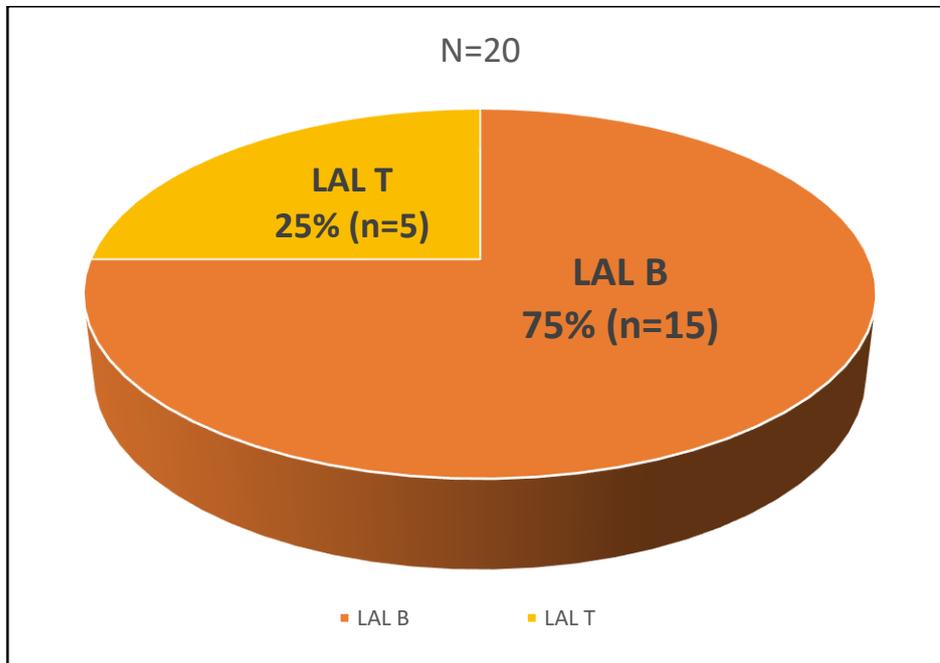


Figure 25 : Répartition des patients LAL selon le phénotype

Notre cohorte de LAL est caractérisée par la prédominance du phénotype B.

2.2 Résultats de la classification EGIL des LAL :

2.2.1 Classification EGIL des LALB :

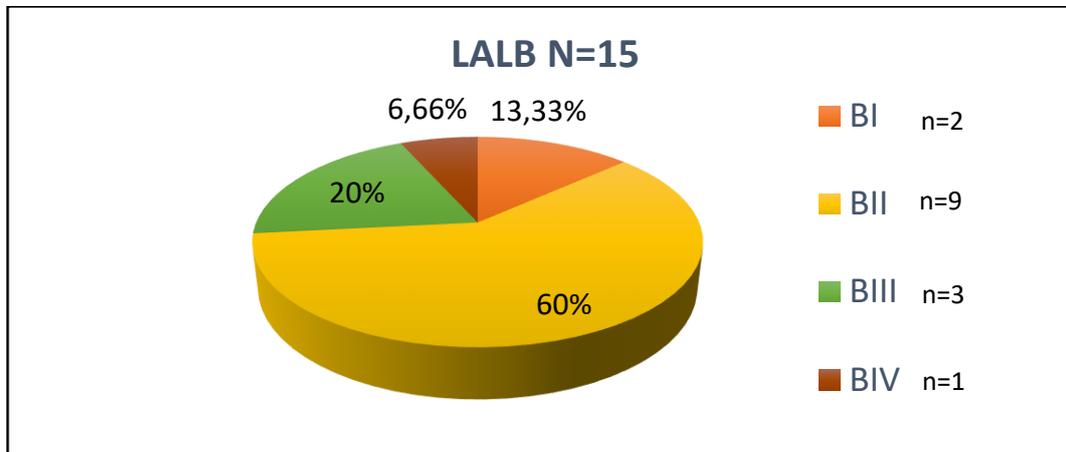


Figure 26 : Répartition des LAL B selon le stade de maturation EGIL

La LALB commune (BII) représente le stade de maturation le plus fréquent de la cohorte.

2.2.2 Classification EGIL des LALT

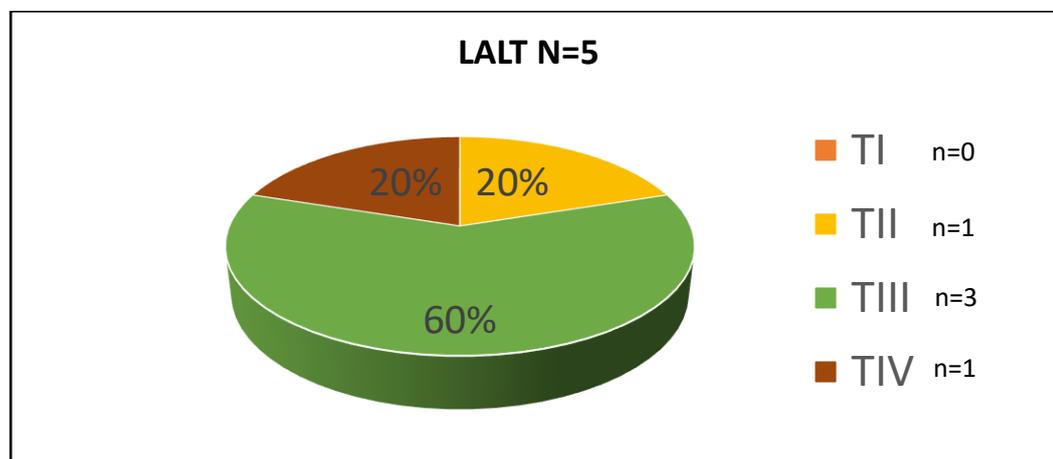


Figure 27 : Répartition des LAL T selon le stade de maturation EGIL

On note l'absence de LALTI dans notre cohorte.

3. Données cytogénétiques :

La recherche des anomalies cytogénétiques a concerné uniquement les patients atteints d'une LALB. Les anomalies recherchées étaient principalement: la t (9,22) et les anomalies quantitatives (hypoploïdie et hyperploïdie), ainsi que les translocations (8,14), (8,22) et (8,2) caractéristiques de la LALB IV (Burkitt).

Sur les 15 patients atteints d'une LALB, 8 ont bénéficié d'un examen cytogénétique, dont deux sont revenus positifs : une t (8,22) a été identifiée chez le patient avec LALBIV (Burkitt), et une amplification du chromosome 21 a été identifiée chez un patient avec LALB II.

On note l'absence de LAL Phi+ dans cette cohorte.

Les résultats du bilan cytogénétique des patients est résumé dans l'annexe 3.

4. Données de la stratification thérapeutique :

Les patients de notre cohorte ont été inclus dans différents protocoles thérapeutiques (Annexes 4,5,6) :

INTERFANT 06 : 02 patients âgés de moins de 1 an.

GRAALL2005 : 01 patient âgé de 16 ans.

EORTC 2002 : 16 patients âgés entre 1 et 15 ans.

Un seul patient avait une LALB mature, était traité comme un lymphome B.

La majorité de nos patients étaient classés dans le groupe risque standard.

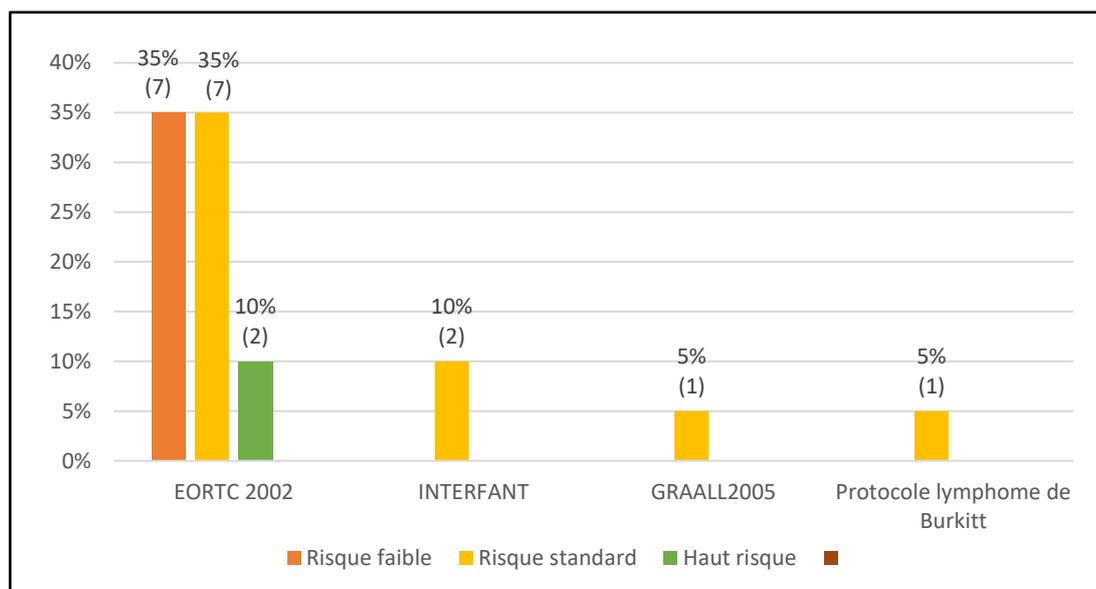


Figure 28 : Répartition des patients selon le protocole thérapeutique

5. Echantillons analysés au diagnostic pour l'identification des LAIP et au cours du suivi pour l'évaluation de la MRD.

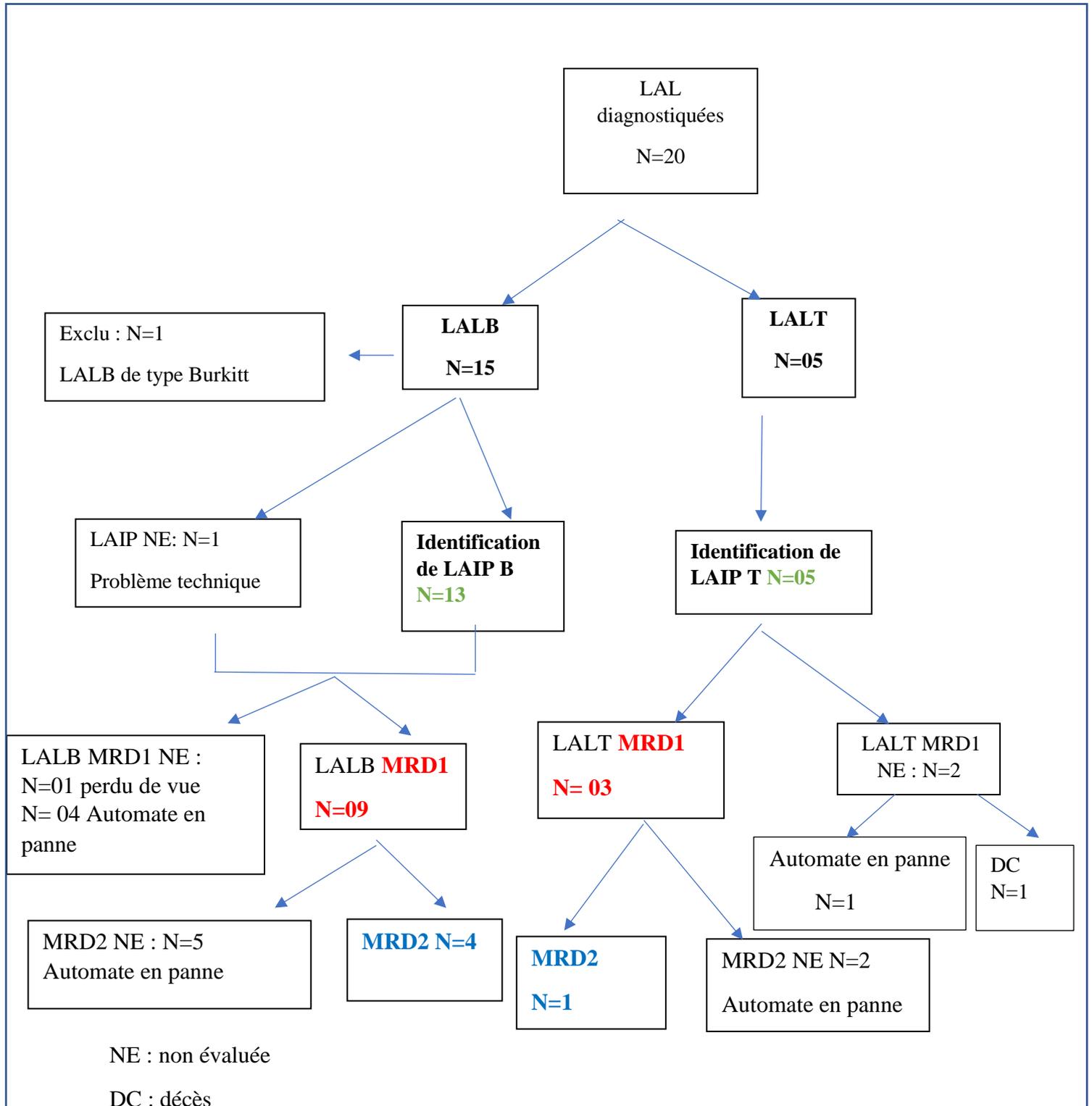


Figure 29 : Diagramme de flux des prélèvements d'identification des LAIP au diagnostic et des prélèvements MRD.

6. Applicabilité de la MRD par CMF dans les LAL :

6.1 Applicabilité dans les LALB :

6.1.1 Marqueurs associés aux LAIP dans les LALB

Tableau IX : Marqueurs associés aux LAIP dans les LALB

Marqueur informatif	Type de LAIP	Fréquence
CD58 positif fort	Surexpression	07 (53.84%)
CD34 positif homogène	Surexpression	03 (23.07%)
CD44 positif	Surexpression	07(53.84%)
CD123/CD66c positif	Infidélité de lignée	08 (61.53%)
CD49f positif	Infidélité de lignée	06 (46.15%)
CD15 positif	Infidélité de lignée	01 (7.7%)
CD33 positif	Infidélité de lignée	01 (7.7%)
CD45 négatif ou faible	Sous expression	05 (38.46%)
CD38 faible	Sous expression	10 (76.92%)
CD81 faible	Sous expression	11 (84.61%)
CD10 négatif/CD20 négatif	Asynchronisme	02 (15.38%)

Les marqueurs associés aux LAIP dans les LALB les plus couramment identifiés, par rapport aux progéniteurs normaux des lymphocytes B, comprenaient l'expression aberrante des marqueurs CD123/CD66c, CD49f et CD44 (Dans 61.53%, 46.15% et 53.84% des cas, respectivement) ainsi que la surexpression du CD58 dans 53,84% des cas.

Une sous expression du CD38 et du CD81 a été retrouvée respectivement dans 76.92% et 84.61% des cas.

6.1.2 Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALB :

Sur 15 patients LALB, 13 ont bénéficié de la recherche de LAIP au diagnostic (Figure 29), dont 12 avaient au moins un LAIP informatif (92.3%).

Les caractéristiques des LAIP identifiés sont résumées dans le tableau X.

Tableau X : Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALB

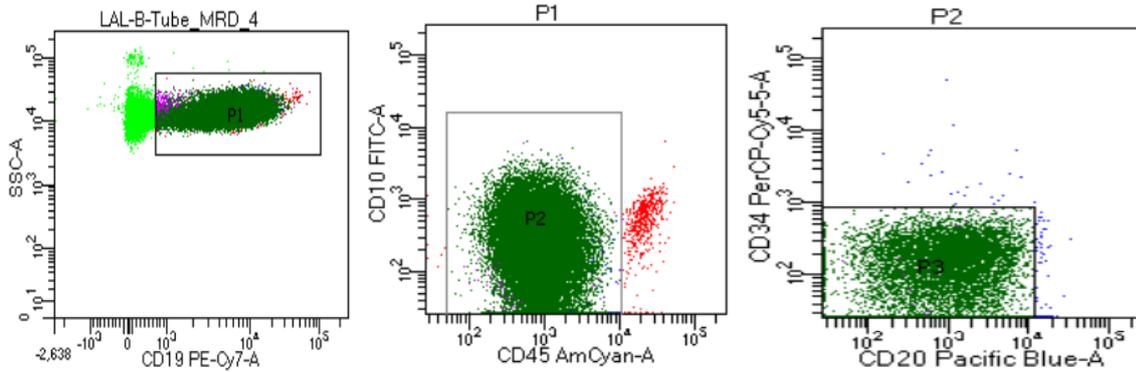
Patient	LAIP	Le nombre de LAIP	Type de LAIP
01 Z.M LALBIII	CD45+CD10 - CD34 - CD20+ CD38 hétérogène CD81 hétérogène CD58+ CD123/CD66 + CD49F+/ CD44+	Phénotype d'hématogones stade 3 avec 03 LAIP informatifs	Infidélité de lignée Sous expression CD38 CD81 Surexpression CD58
02 C.F LALBII	CD45+CD10++CD34+ / CD20 - CD38 faible/CD58+ CD44+/CD34+	Phénotype d'hématogones stade1/2 LAIP peu informatif	Sous expression CD38 sur expression CD58 Asynchronisme de maturation
03 A.Y LALBII	CD45+CD10++CD34+/CD20+ CD38 fort/CD58 faible CD123/CD66+ CD81faible/CD49F++	Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 avec 02 LAIP informatifs	Asynchronisme de maturation Infidélité de lignée Sous expression du CD81
04 B.R LALBII	CD45+CD10++ CD34+ CD20- CD38 faible/CD58 faible CD81 faible/CD49F++	Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 Avec 01 LAIP informatif	Sous expression CD38 CD81 Infidélité de lignée
05 B.Y LALBII	CD45-CD10+CD34-CD20- CD38 fort CD123/CD66c +++, CD81 faible/CD44+.	Phénotype d'hématogones stade 2 Avec 03 LAIP informatifs	Sous expression CD81 Infidélité de lignée
06 G.S LALBII	CD45+CD10++CD34+ CD20 - CD58+++ CD123/CD66c+++ CD38 hétérogène CD81 hétérogène CD44+	Phénotype d'hématogones stade1 Avec 03 LAIP informatifs	sur expression CD58 Infidélité de lignée Sous expression CD38 CD81
07 B.W LALBII	CD45-CD10+CD34-CD20- CD38 faible CD123/CD66c + CD81 faible.	Phénotype d'hématogones stade 2 avec 02 LAIP informatifs	Infidélité de lignée Sous expression CD38 CD81
08 F.I LALBII	CD45-CD10+CD34+homogène CD20- CD38 hétérogène CD58++ CD123/CD66c++ CD81 faible/CD49F+ CD34+/CD44++	Phénotype d'hématogones stade1 03 LAIP informatifs	sur expression CD58 Infidélité de lignée Sous expression CD38 CD81

RESULTATS

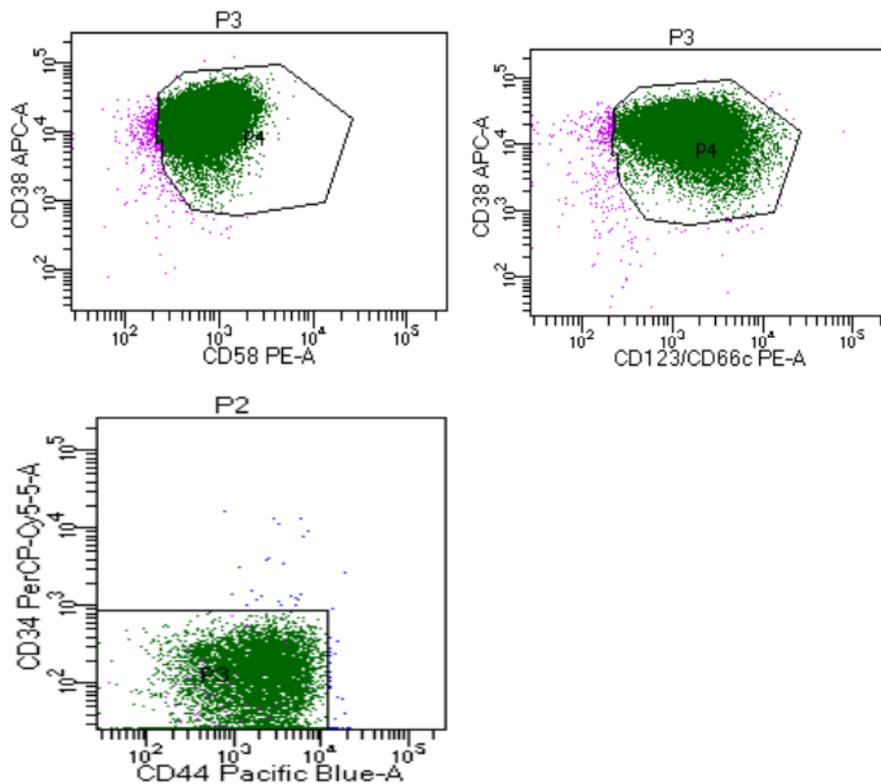
09	B. N LALBII	CD45- CD10+ CD34+CD20- CD38 faible CD58+ CD123/CD66c+++ CD81faible/CD49F++ CD44++/CD34+	Phénotype d'hématogones stade1 avec 03 LAIP informatifs	Surexpression CD58 Sous expression CD38 CD81 Infidélité de lignée Asynchronisme de maturation
10	R. M LALBII	CD45- CD10+ CD34- CD20+ CD38 hétérogène/CD58++	Phénotype stade 3 avec 01 LAIP informatif	Asynchronisme de maturation Sur expression CD58 Sous expression CD38
11	I.M LALBI	CD45+ CD10- CD34+ CD20- CD38 hétérogène CD58+ CD34+/ CD44++ CD81 hétéro. CD15++	02 LAIP informatifs	Asynchronisme de maturation Sur expression CD58 Sous expression CD81 CD38 Infidélité de lignée
12	N. S LALBIII	CD45+ CD10- CD34+ CD20- CD38 hétérogène CD123/CD66c + CD33+ CD34+/CD44+ CD81faible/CD49F+	02 LAIP informatifs	Asynchronisme de maturation Infidélité de lignée Sous expression CD38 CD81
13	M.R LALBIII	CD45++ CD10+CD34++ CD20+ CD38++ CD34++/CD44++ CD81faible/CD49f++	Phénotype d'hématogones stade 1 avec 01 LAIP informatif	Asynchronisme de maturation Infidélité de lignée Sous expression CD81

6.1.3 Exemples de LAIP dans les LALB :

Cas N°1 : LALB CD10 négatif avec 03 LAIP : CD38 hétérogène/CD123/CD66c, CD34+ /CD44+ et CD81hétérogène/CD49f+.



Phénotype d'hématogones stade 3 : CD45+CD10- CD34- CD20+/-



03 LAIP informatifs :

CD38hétérogène/CD123/CD66c positifs CD34-/CD44+ CD81hétérogène/CD49f+

Figure 30 :Phénotype d'hématogones stade 3 avec 03 LAIP.

Cas N°2 : LALB CD10 positif avec LAIP peu informatif : CD38 hétérogène /CD81 hétérogène/ CD34+/CD44+

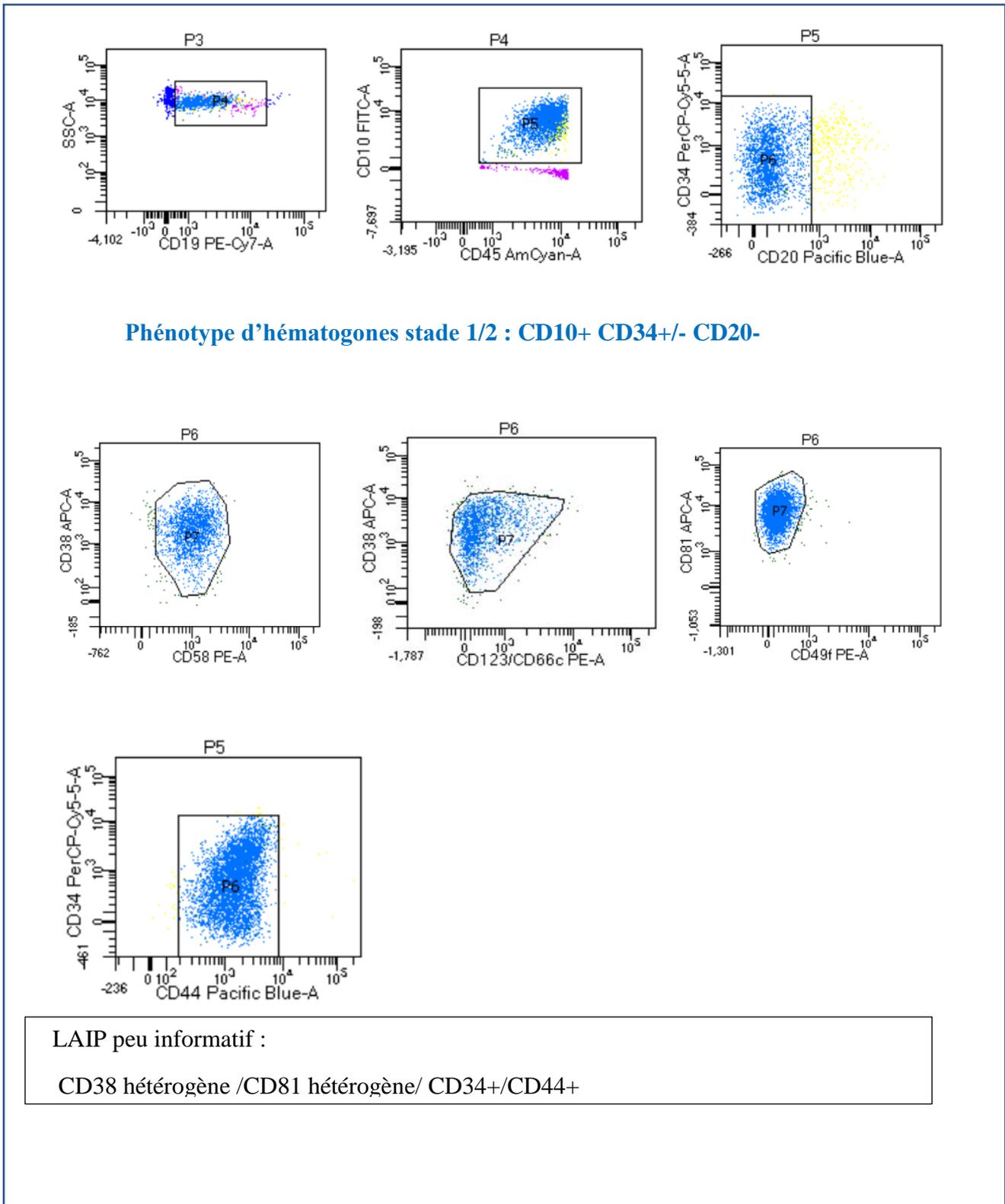


Figure 31 : Phénotype d'hématogones stade 1/2 avec un LAIP peu informatif

Cas N°3 : LALB CD10 positif avec deux LAIP : CD34+/CD20+ et CD81 modéré/ CD49f +

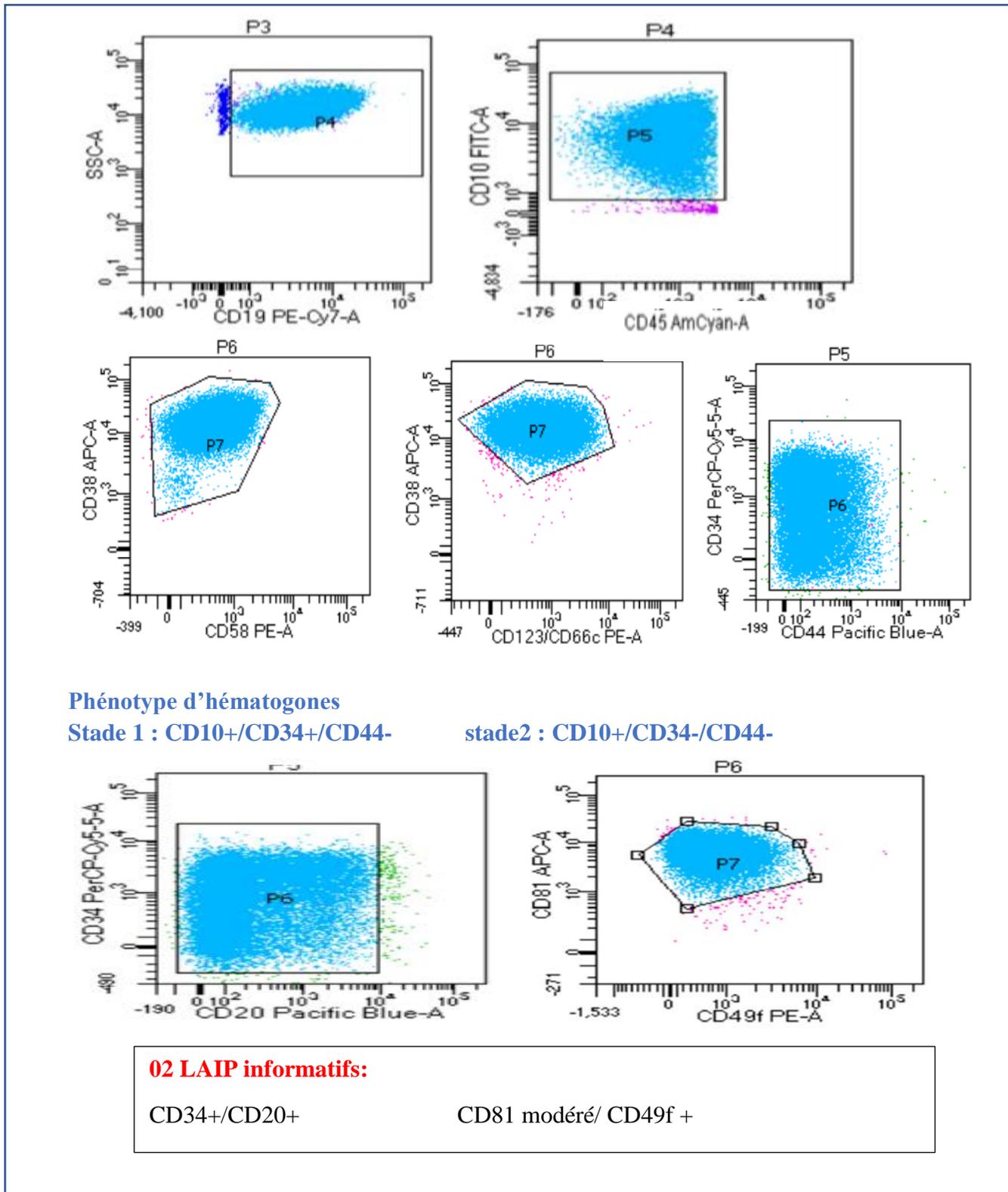


Figure 32 : Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 avec 02 LAIP

Cas N°4 : LALB CD10 positif avec un LAIP : CD81 modéré/CD49f

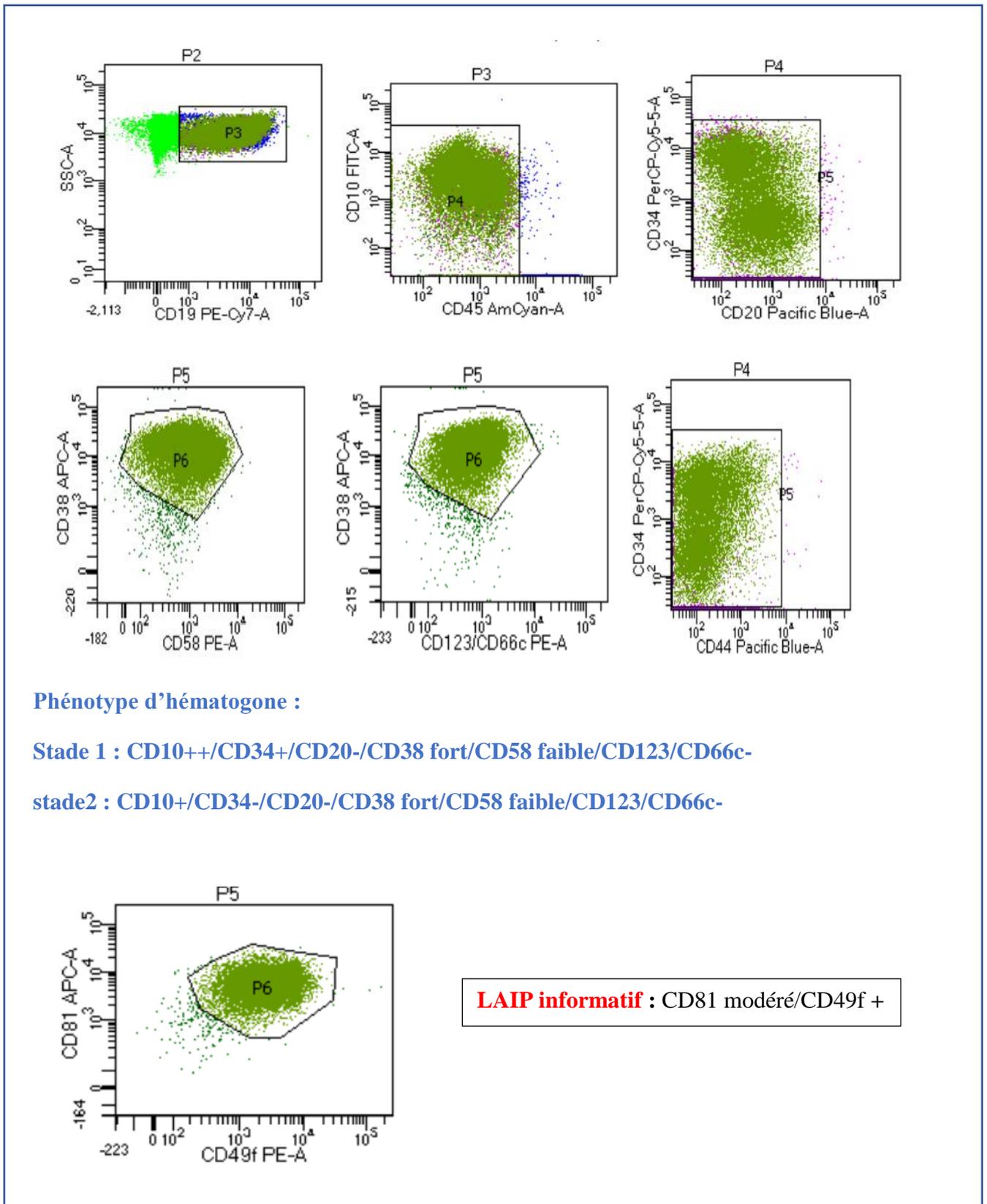
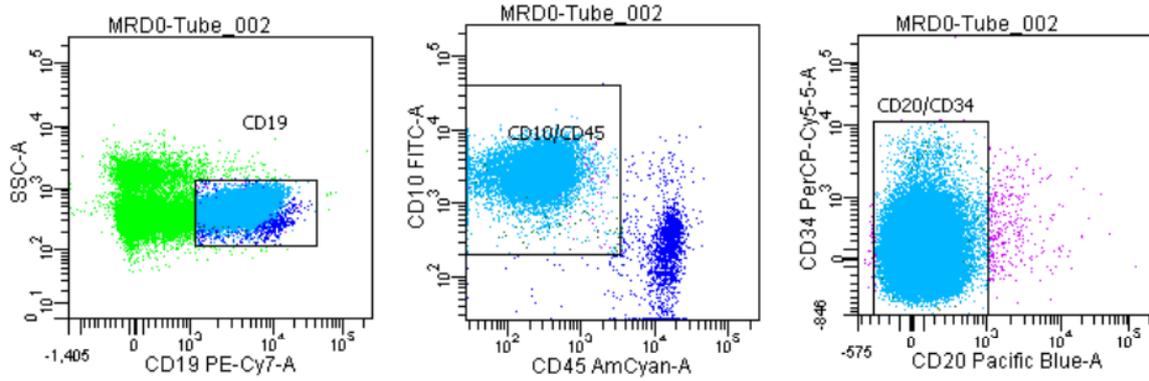
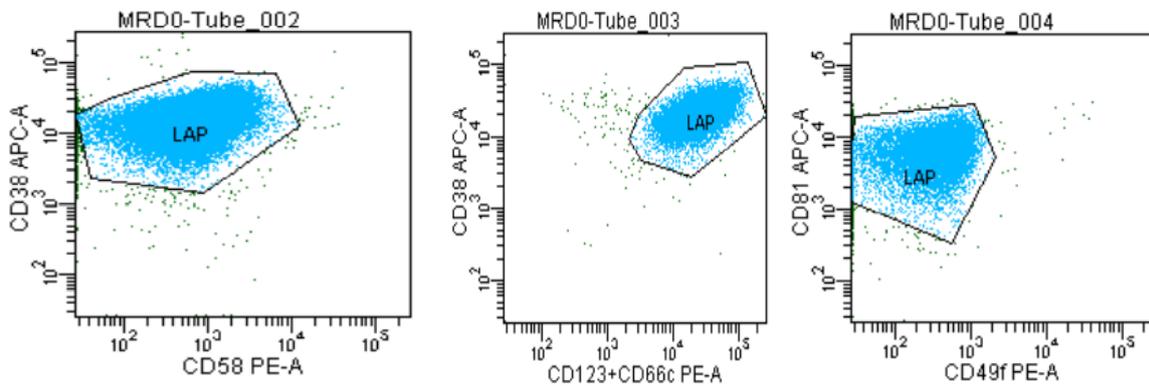


Figure 33 : Phénotype d'hématogones stade 1 et 2 avec 01 LAIP

Cas N°5 : LALB CD10 positif avec 03 LAIP informatifs : CD38 modéré/CD58+, CD123/CD66c+ et CD81 modéré.



Profil d'hématogone stade 2 : CD10+ CD34- CD20-



03 LAIP informatifs :

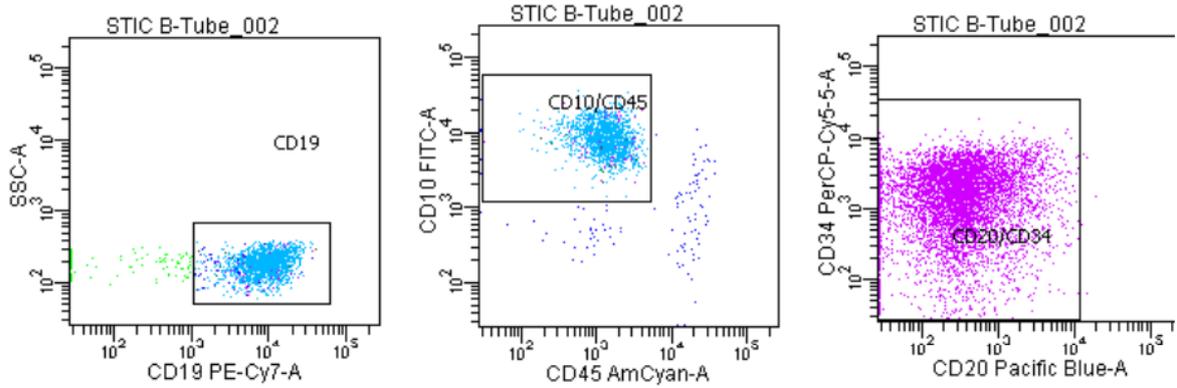
CD38 modéré/CD58+

CD123/CD66c+

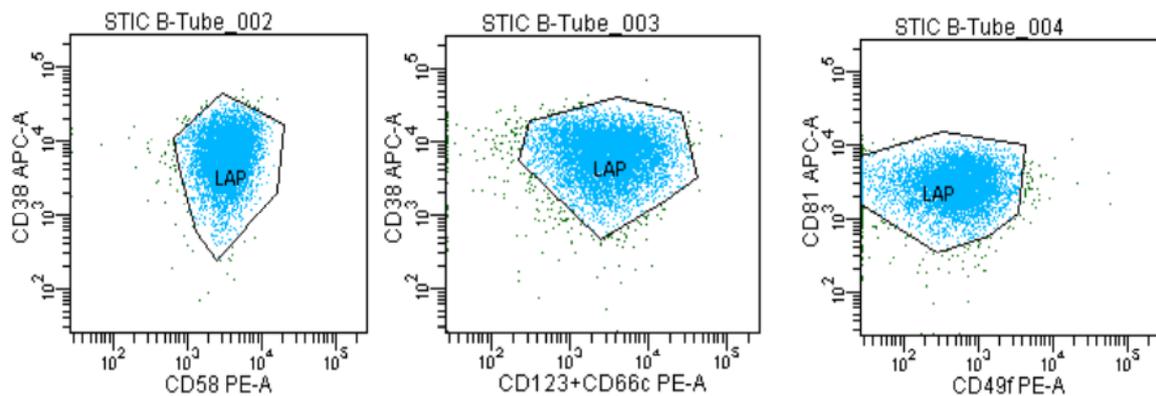
CD81 modéré

Figure 34 : Phénotype d'hématogones stade 2 avec 03 LAIP

Cas N° 6 : LALB CD10 positif avec 03 LAIP : CD38 hétérogène/CD58 fort, CD38 hétérogène/CD123/CD66c et CD81 modéré.



Phénotype d'hématogones stade 1 : CD10+/CD34+/CD20-



03 LAIP informatifs :

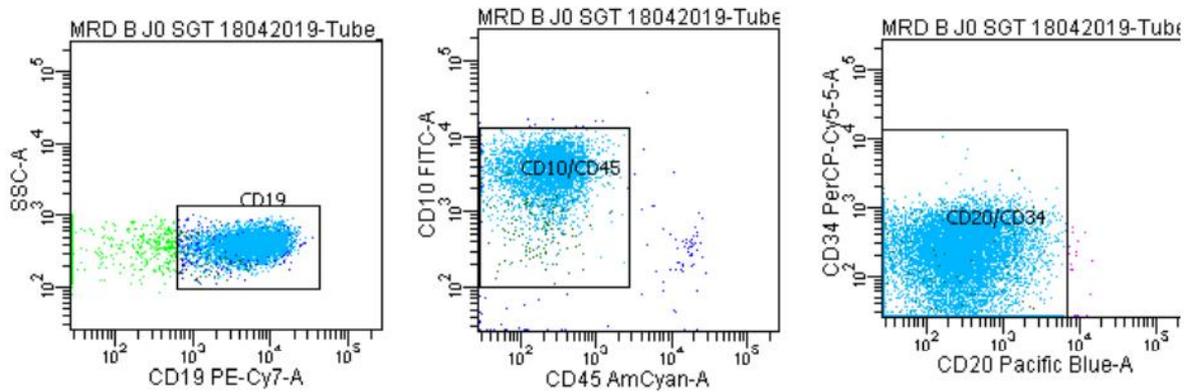
CD38 hétérogène/CD58 fort

CD38 hétérogène/CD123/CD66c

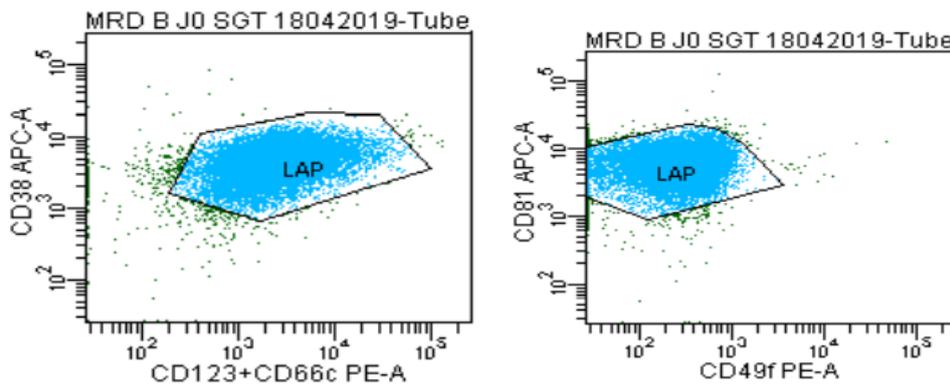
CD81 modéré

Figure 35 : Phénotype d'hématogones stade 1 avec 03 LAIP

Cas N°7 : LALB CD10 positif avec 02 LAIP : CD38 modéré/CD123+CD66c+, CD81modéré



Phénotype d'hématogones stade 2 : CD10+ CD34- CD20-



02 LAIP informatifs :

CD38 modéré/CD123+CD66c+

CD81modéré

Figure 36 : Phénotype d'hématogones stade 2 avec 02 LAIP

Cas N°8 : LALB CD10 positif avec 3 LAIP : CD38hétérogène/CD58 fort,
 CD38hétérogène/CD123+CD66c+ et CD81 modéré/CD49f+/ CD34+/CD44+

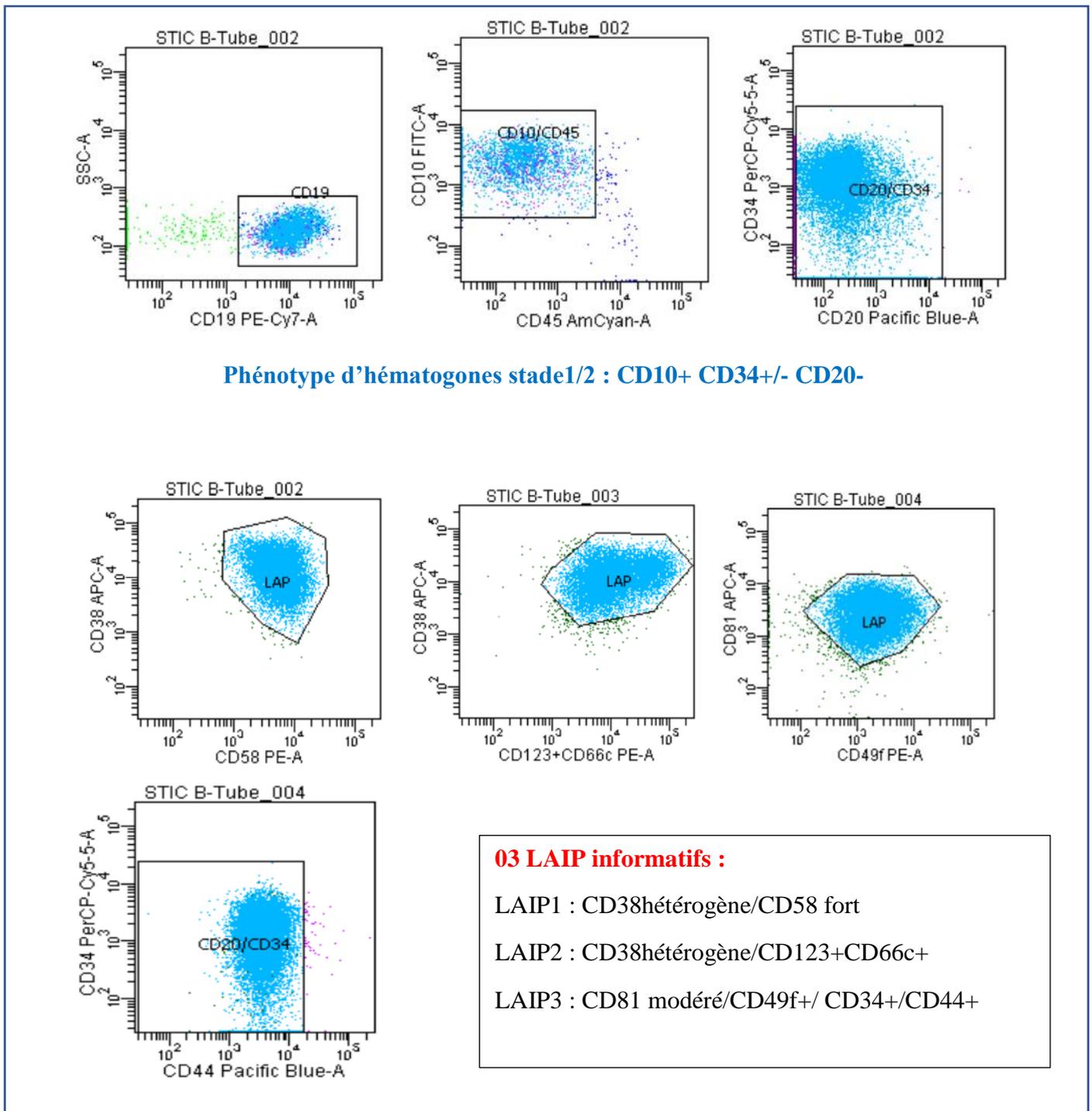
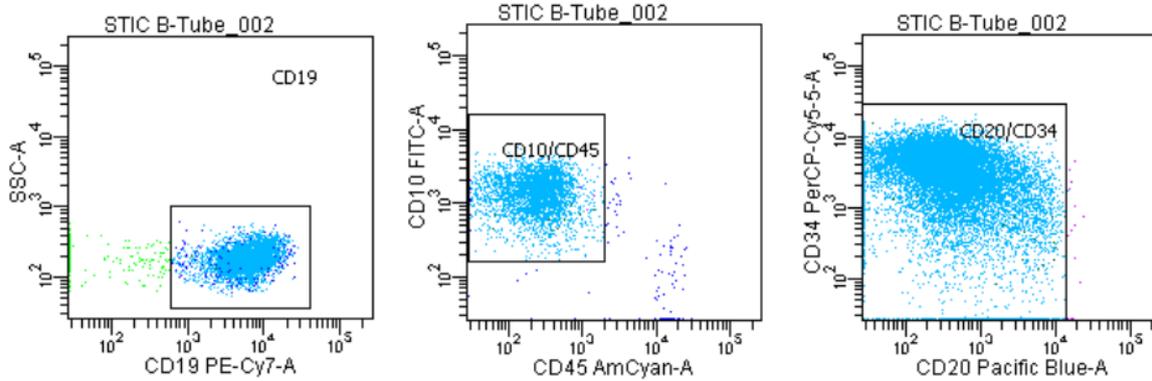
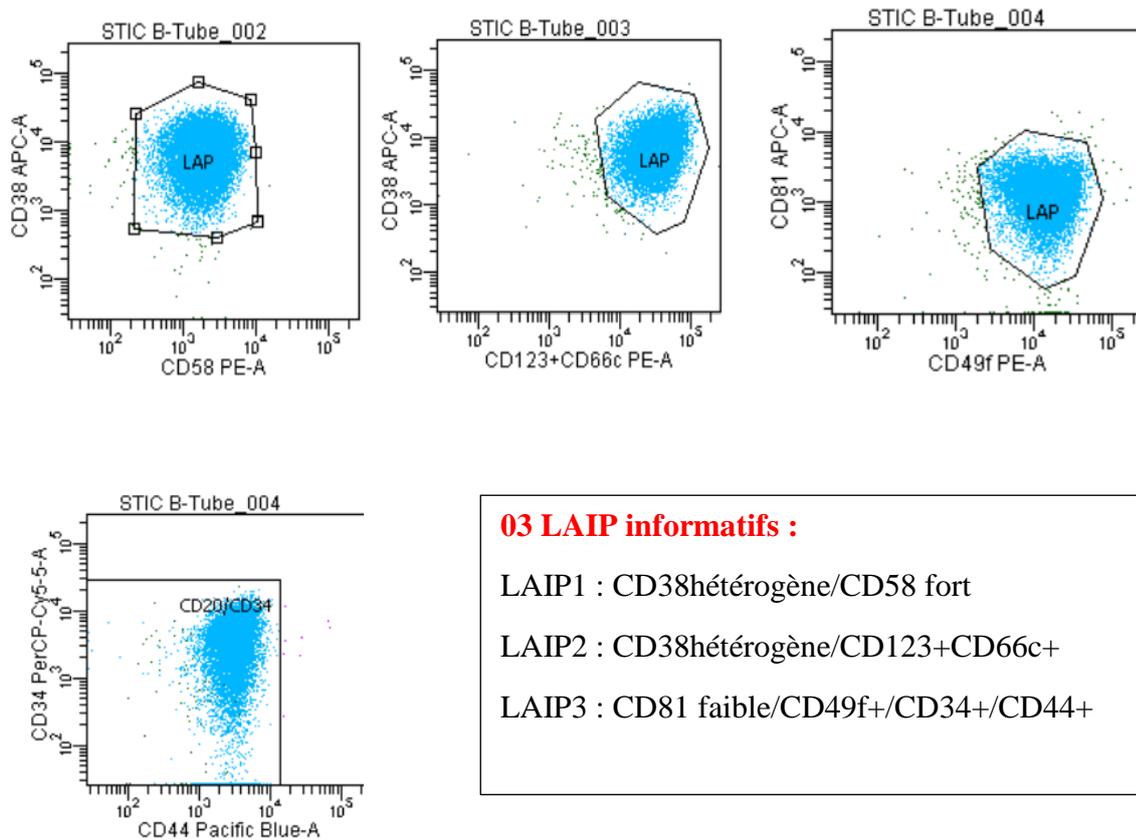


Figure 37 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 03 LAIP

Cas N°9 : LALB II CD10 positif avec 03 LAIP : CD38hétérogène/CD58 fort,
 CD38hétérogène/CD123/CD66c+ et CD81 faible/CD49f+/CD34+/CD44+.



Phénotype d'hématogones stade1 : CD10+ CD34+ CD20-



03 LAIP informatifs :

LAIP1 : CD38hétérogène/CD58 fort

LAIP2 : CD38hétérogène/CD123+CD66c+

LAIP3 : CD81 faible/CD49f+/CD34+/CD44+

Figure 38 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 03 LAIP

Cas N° 10 : LALB CD10 négatif avec 02 LAIP : CD10-CD34+ CD20-/CD38 hétérogène /CD58 fort et CD34+ / CD44+ /CD81 hétérogène.

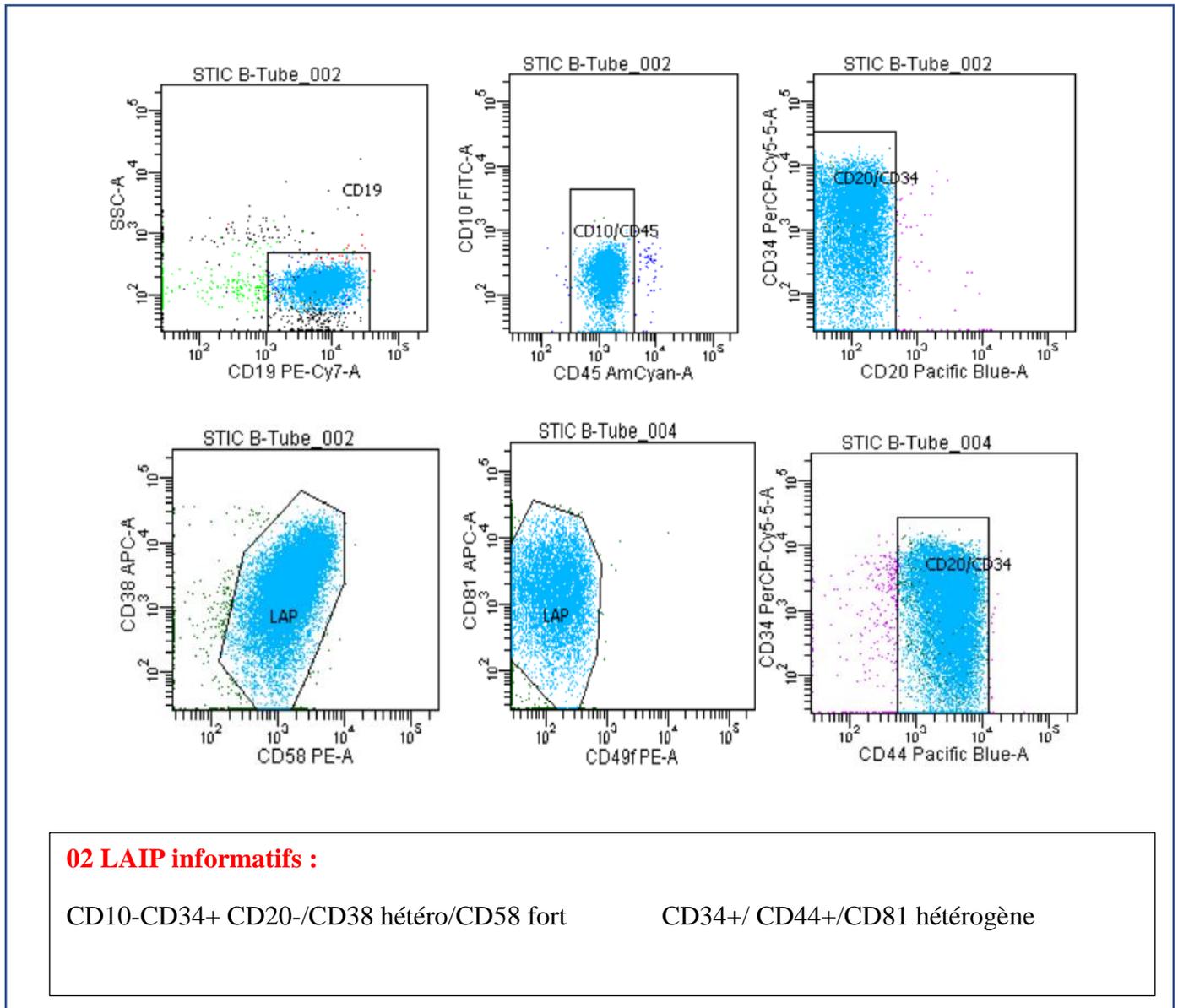


Figure 39 : Phénotype de LALB CD10 négatif avec 02 LAIP

Cas N° 11 : LALB CD10 positif avec un LAIP : CD34+/CD44+/CD81 modéré/CD49f+.

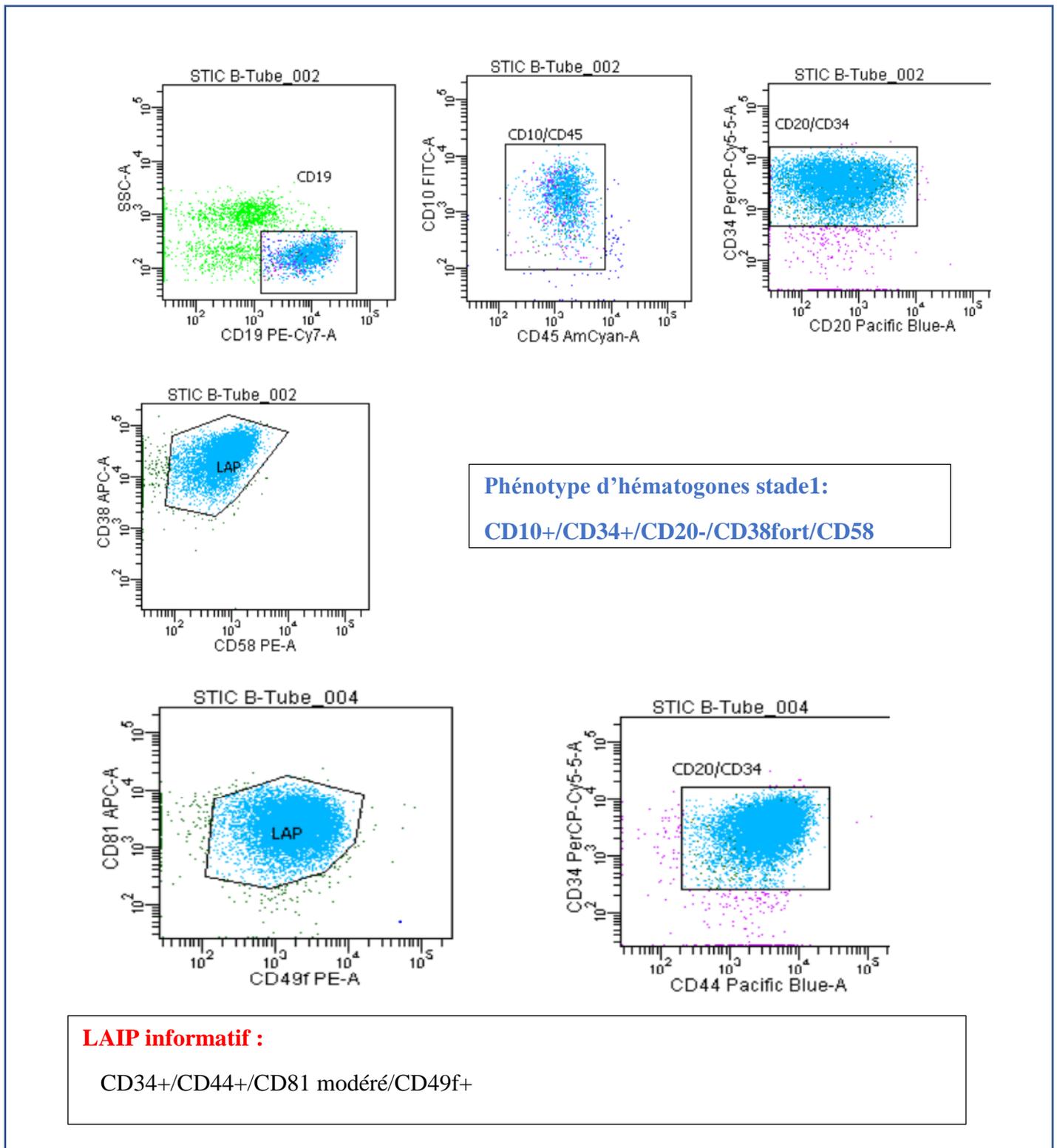


Figure 40 : Phénotype d'hématogones stade1 avec 01 LAIP

Cas N° 12 : LALB CD10 négatif avec deux LAIP: CD10- CD34+CD20- CD38 hétérogène CD123/CD66c + et CD34+/CD44+ /CD81faible/CD49f+.

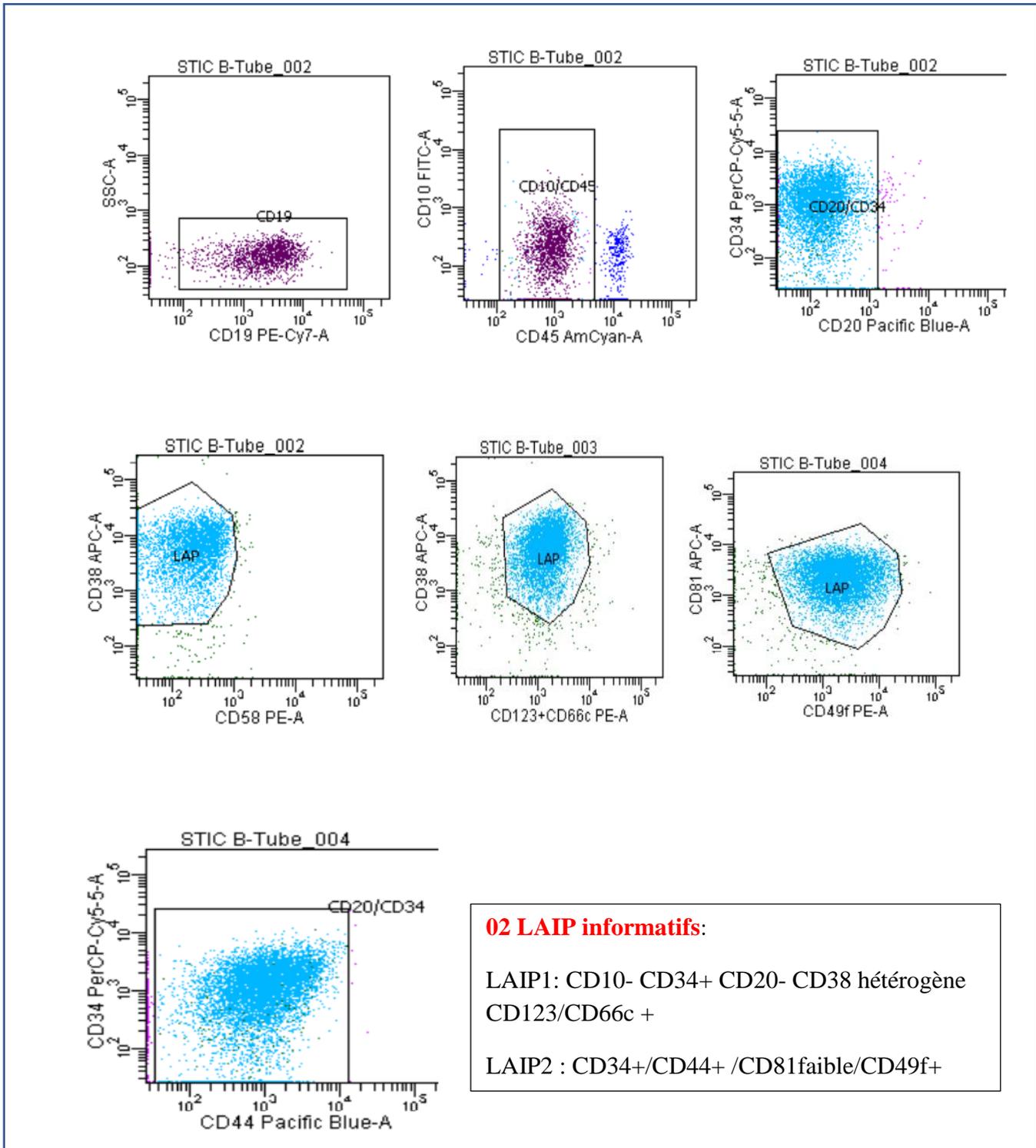
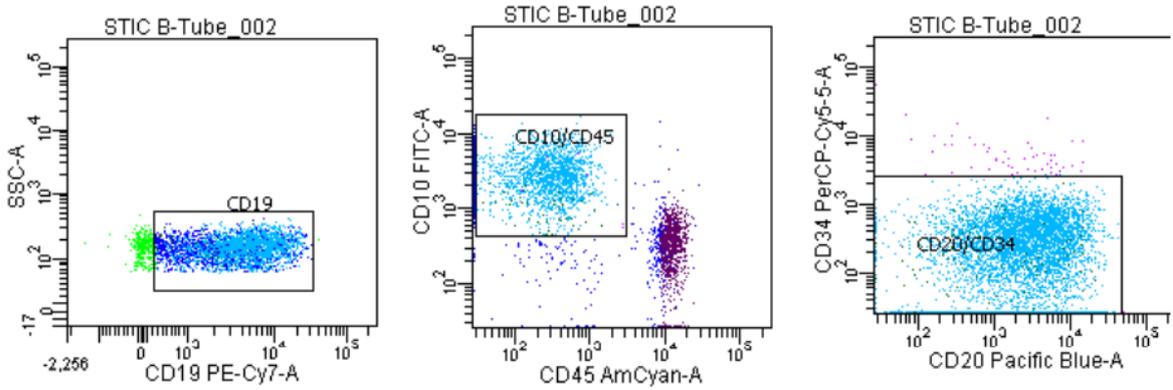
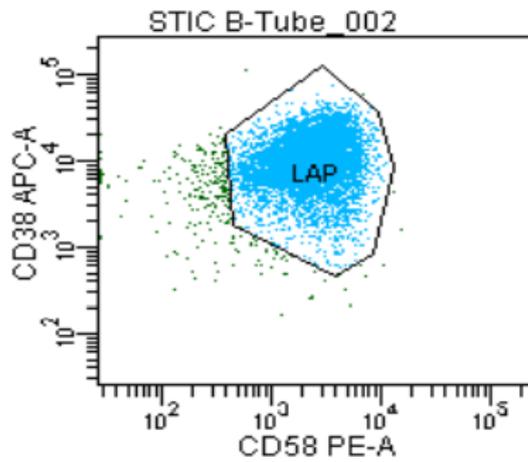


Figure 41 : LALB CD10 négatif avec 02 LAIP

Cas N°13 : LALB CD10 positif avec un LAIP : CD38 hétérogène/ CD58 fort



Phénotype d'hématogone stade 3 : CD10+ CD34- CD20+



LAIP informatif : CD38 hétérogène/ CD58 fort

Figure 42 : phénotype d'hématogones stade 3 avec 01 LAIP

6.2 Applicabilité de la MRD dans les LALT

6.2.1 Marqueurs associés aux LAIP des LALT

Tableau XI : Marqueurs associés aux LAIP des LALT

Marqueur informatif	LAIP	fréquence
TdT positive	Immature	04 (80%)
CD34 positif	Immature	03 (60%)
CD1a positif	Immature	03 (60%)
CD99 positif	Immature	04 (80%)
CD7 ++	Surexpression	03 (60%)
CD2 négatif	Sous expression	01(20%)
CD16/ CD56 positifs	Expression aberrante	02 (40%)

Les marqueurs associés au LAIP évalués pour la quantification de la MRD T, par ordre de fréquence étaient : TdT, CD99 (80%), CD1a et CD34 (60%), CD16/CD56 (40%).

Un trou phénotypique avec absence de CD2 était retrouvé chez un seul patient (20%).

6.2.2 Caractéristiques des LAIP identifiés dans les LALT:

Toutes nos LALT avaient au moins un LAIP informatif. Les caractéristiques des différents LAIP identifiés sont résumées dans le tableau XII.

Tableau XII : Différents LAIP identifiés dans les LALT

Patient	LAIP	Le nombre de LAIP	TYPE
01 M.M LALTIII	CD16/CD56++ CD34++	02 LAIP informatifs	Infidélité de lignée Phénotype ectopique
02 B.Y LALTIII	CD7++/CD5+ /CD2- TDT+/CD99++	02 LAIP informatifs	Surexpression CD7 Phénotype ectopique Trou phénotypique CD2
03 M. S LALTII	CD7++/CD5++/TDT++/CD99+	01 LAIP informatif	Surexpression CD7 Phénotype ectopique
04 B. B LALTIII	CD7++/CD5++ TDT/CD99+ CD1A+ CD34++ CD16/CD56++ CD2 hétéro	03 LAIP informatifs	Surexpression CD7 Infidélité de lignée Phénotype ectopique
05 B. A LALTIV	CD3c+/CD3s+ CD7+/CD5+ TDT+/CD99+ CD34++	02 LAIP informatifs	Phénotype ectopique

6.2.3 Exemples de LAIP de LALT

Cas 1 : LAT III avec 02 LAIP : CD34+ et CD16/CD56 +

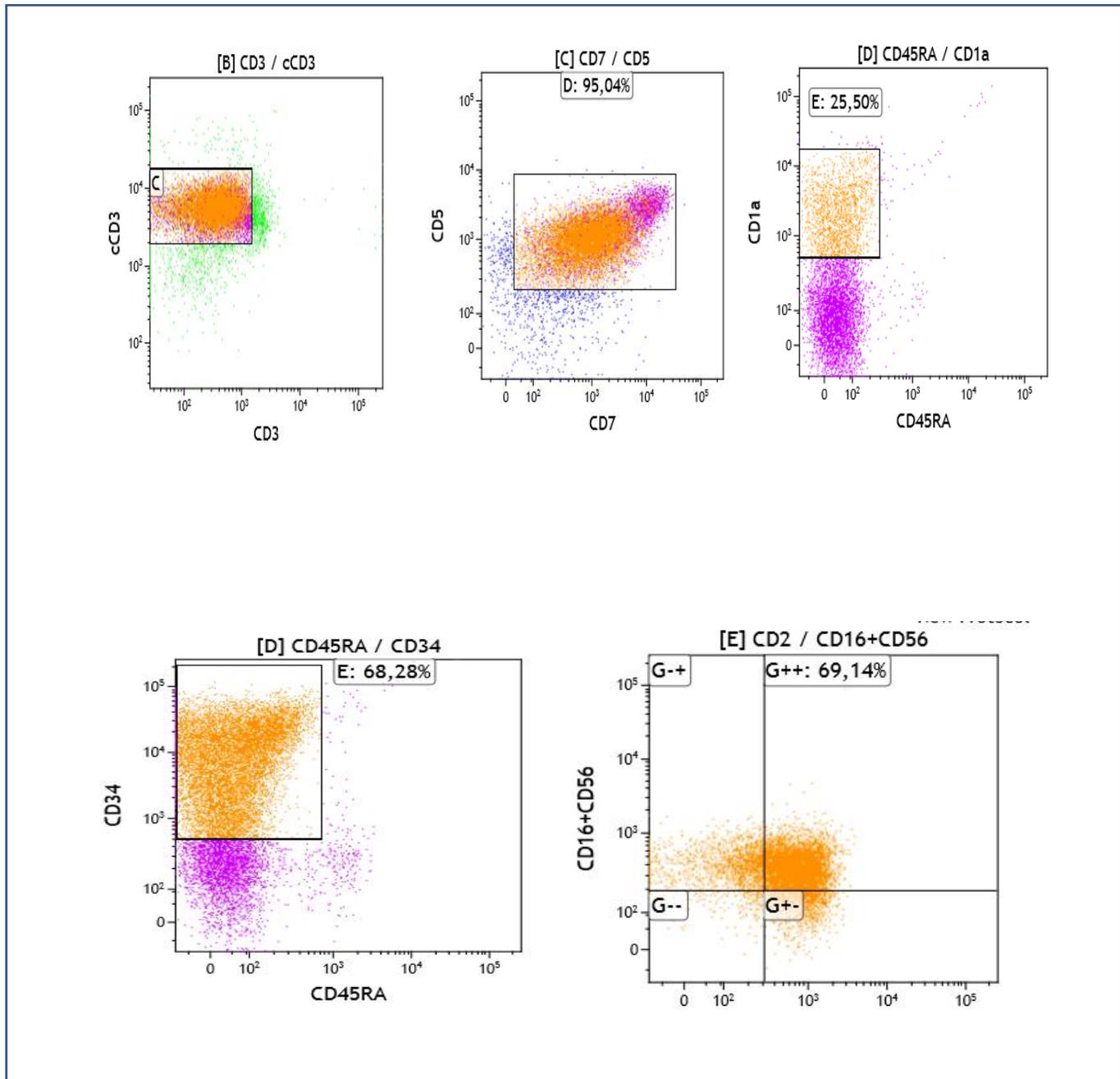


Figure 43 : LALT III avec 02 LAIP : CD34+ et CD16/CD56 +

Cas 2 : LALT III avec deux LAIP : CD99⁺⁺/ TdT + et CD2 négatif

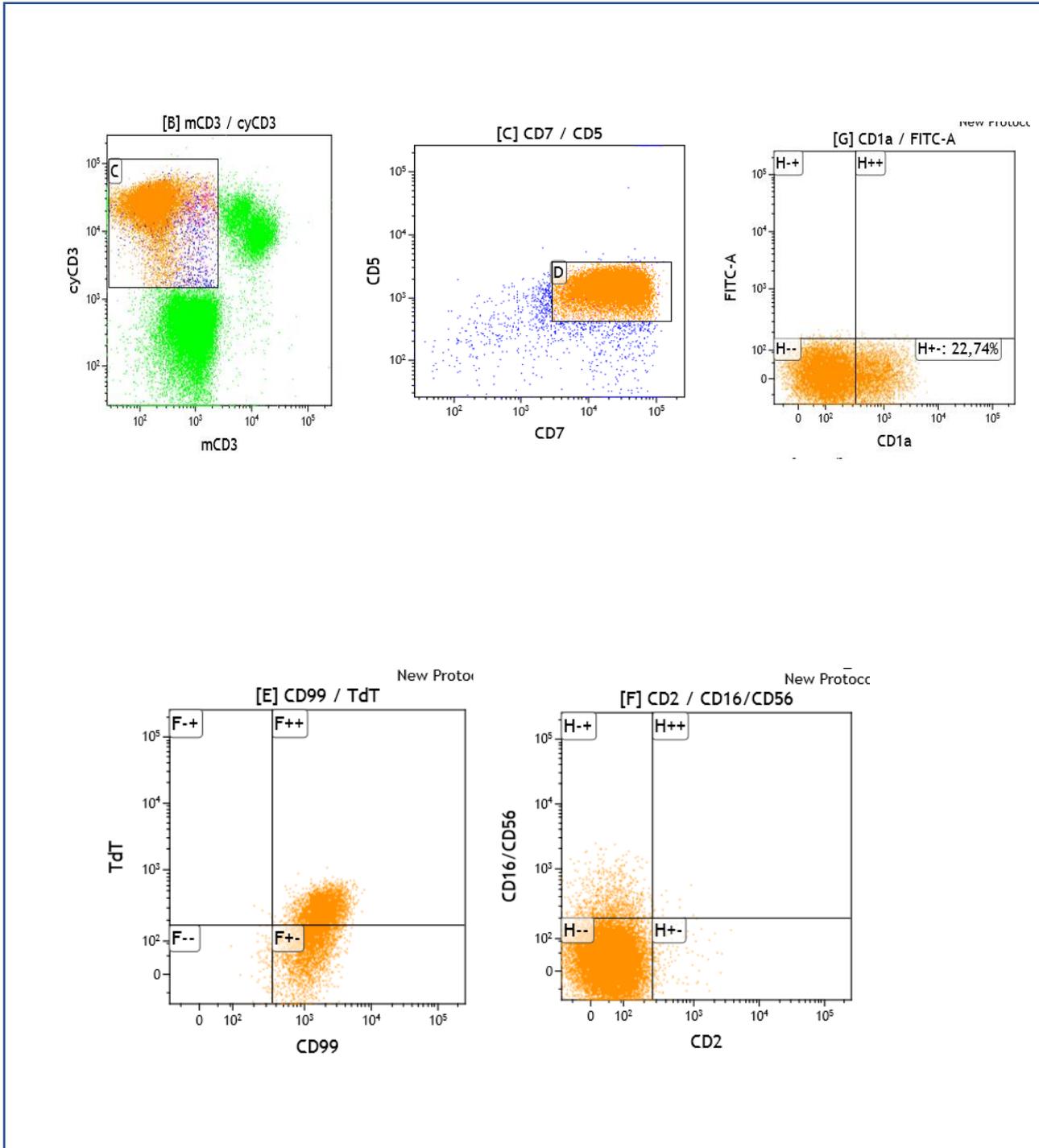


Figure 44 : LALT III avec deux LAIP : CD99⁺⁺/ TdT + et CD2 négatif

Cas 3 : LALT II avec un LAIP : TDT++/ CD99 ++

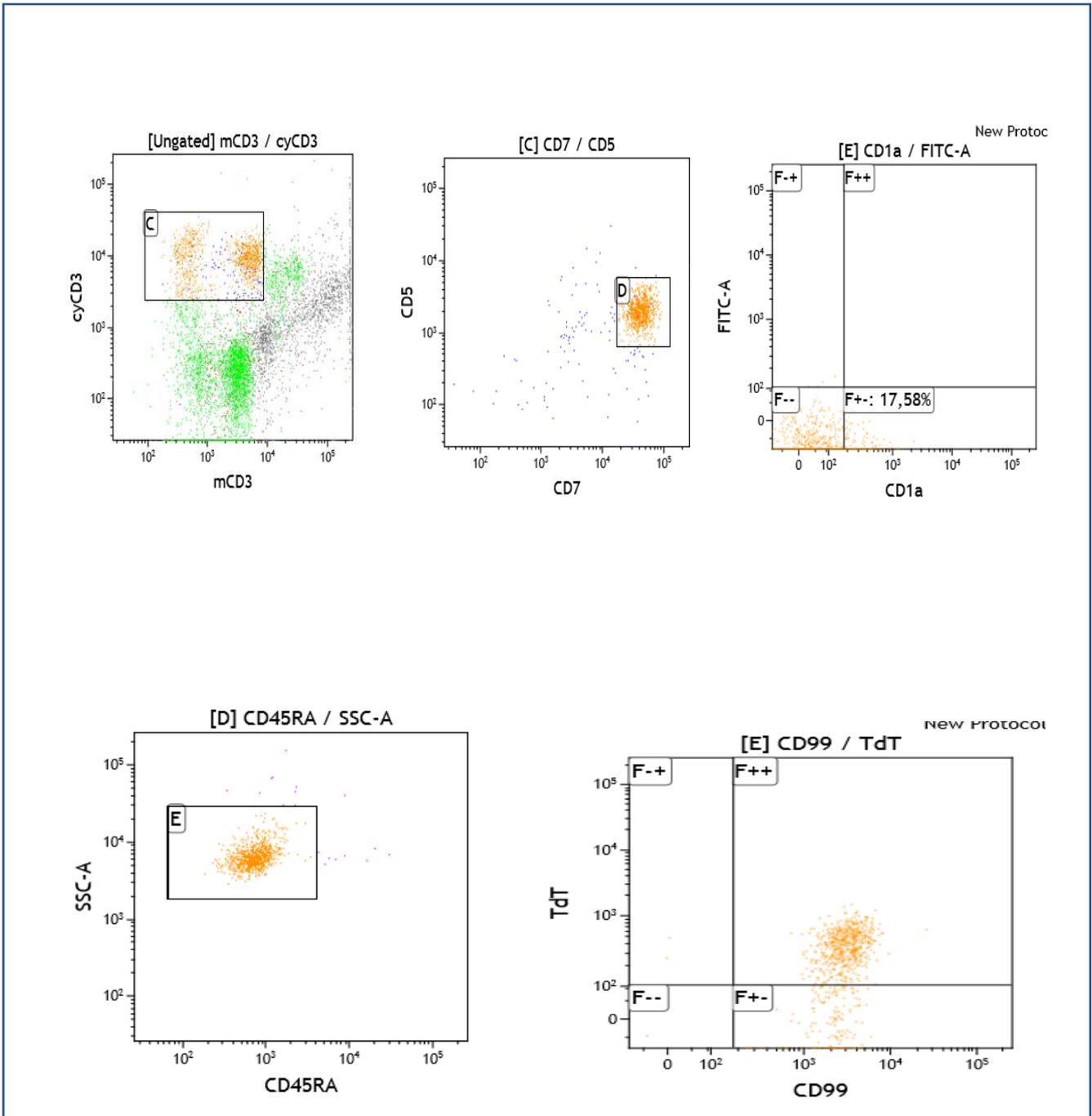


Figure 45 : LALT II avec un LAIP : TDT++/ CD99 ++

CAS 4 : LAL TIII avec 03 LAIP : TDT+/CD99+, CD1A + et CD34++CD16/CD56++

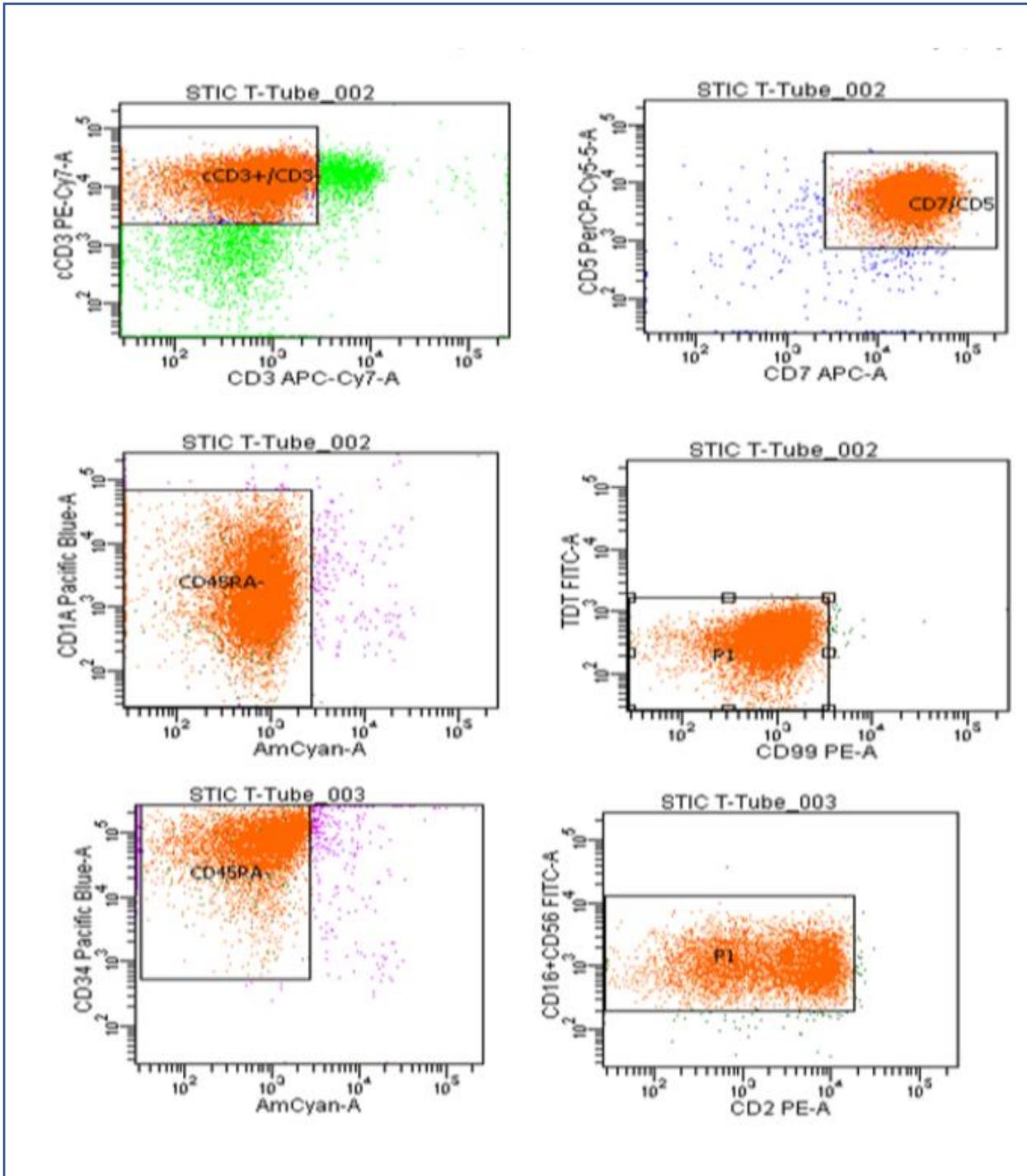


Figure 46 : LAL TIII avec 03 LAIP : TDT+/CD99+, CD1A + et CD34++CD16/CD56++

CAS 5 : LALT IV avec 02 LAIP : CD99++ et CD34+

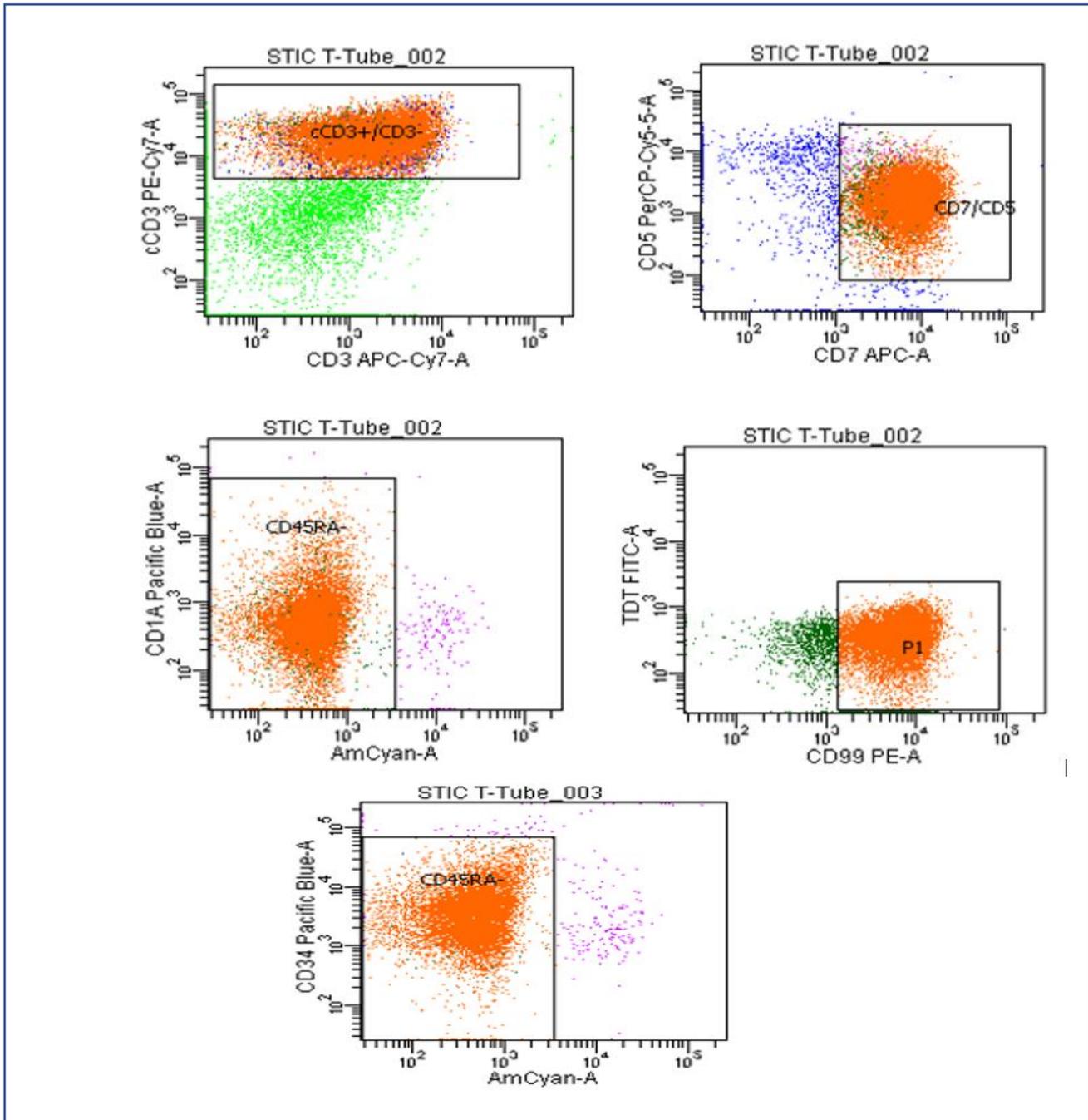


Figure 47 : LALT IV avec 02 LAIP : CD99++ et CD34++

6.3 Incidence des différents types de LAIP dans les LAL

Tableau XIII : Incidence des différents types de LAIP dans les LAL

	LAL B (n= 13)	LALT(n= 05)
Infidélité de lignée	11 (84.61%)	02 (40 %)
sur expression	07 (53.84%)	03 (60 %)
Sous expression	13 (100 %)	01 (20 %)
Asynchronisme de maturation	07 (53.84%)	**
Phénotype ectopique	**	05 (100 %)

**non applicable

Le types de LAIP les plus fréquemment retrouvés dans les LALB étaient respectivement : la sous expression des antigènes CD38 et CD81 et l'infidélité de lignée.

Pour les LALT, le type le plus fréquent était la présence d'un phénotype ectopique.

7. Résultats de l'évaluation de la MRD :

7.1 Fréquence de la MRD du total des échantillons testés

La quantification de la maladie résiduelle a été réalisée chez 13 patients, sur un ou deux points de suivi: MRD1(J35) et MRD2(J70). Au total 17 échantillons ont été analysés.

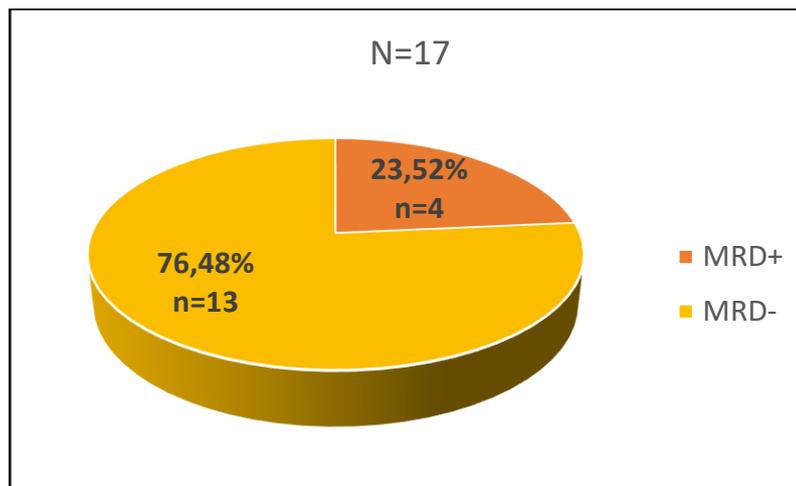


Figure 48 : Fréquence de la MRD positive

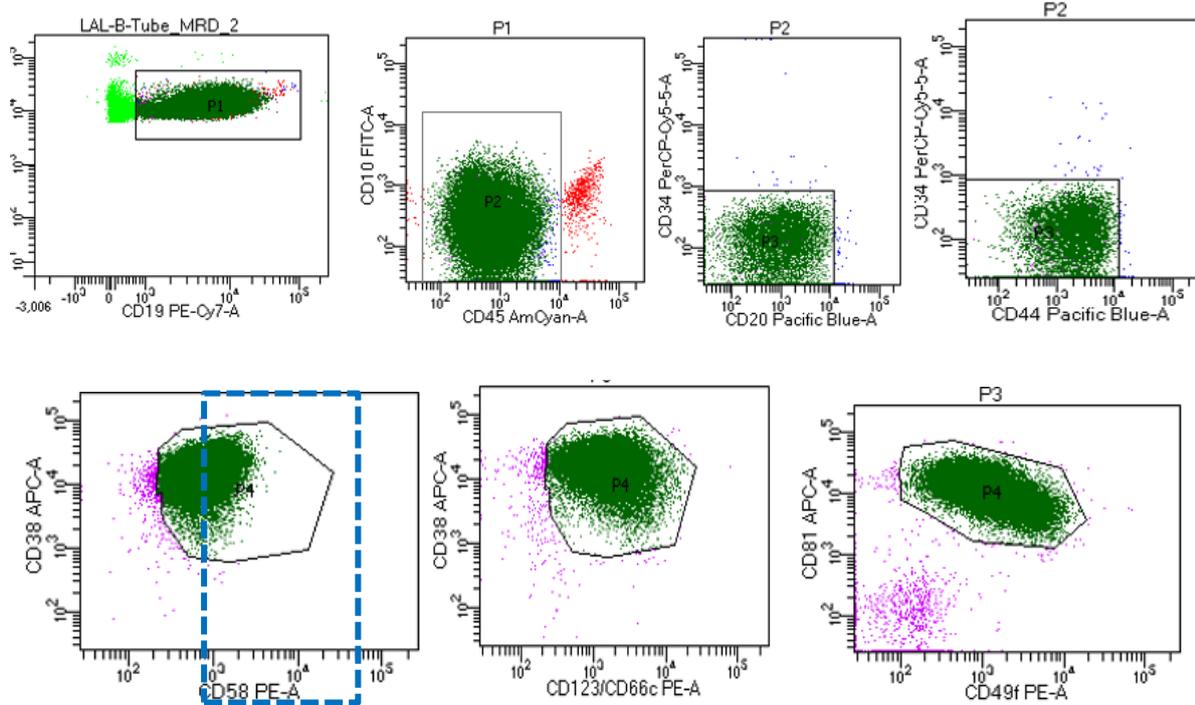
Sur un total de 17 échantillons analysés, 04 étaient positifs, dont deux pour le même patient, soit un taux de MRD positive de 23,52%.

7.2. Spécificité des évènements identifiés au point d'évaluation :

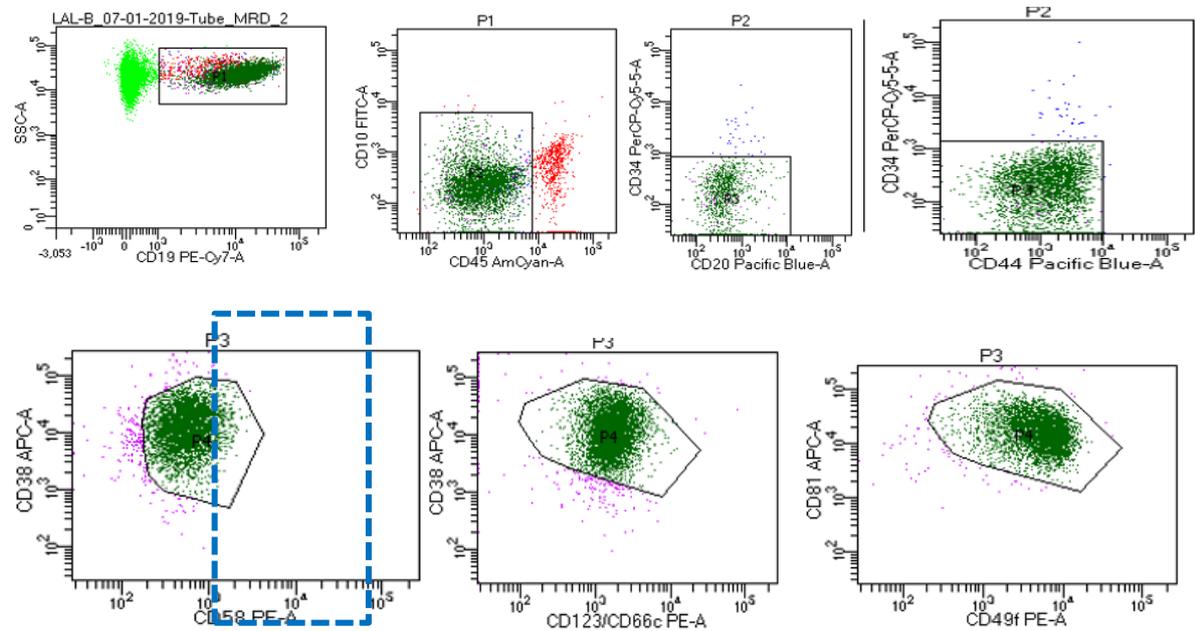
7.2.1 MRD positive sans hémotogones :

Cas 1 : LAIP : CD10- CD20- CD34- CD123/CD66c + CD49f+ CD44+.

Diagnostic : J0



MRD1 : J35



Modulation antigénique du CD58

MRD : 4×10^{-2}

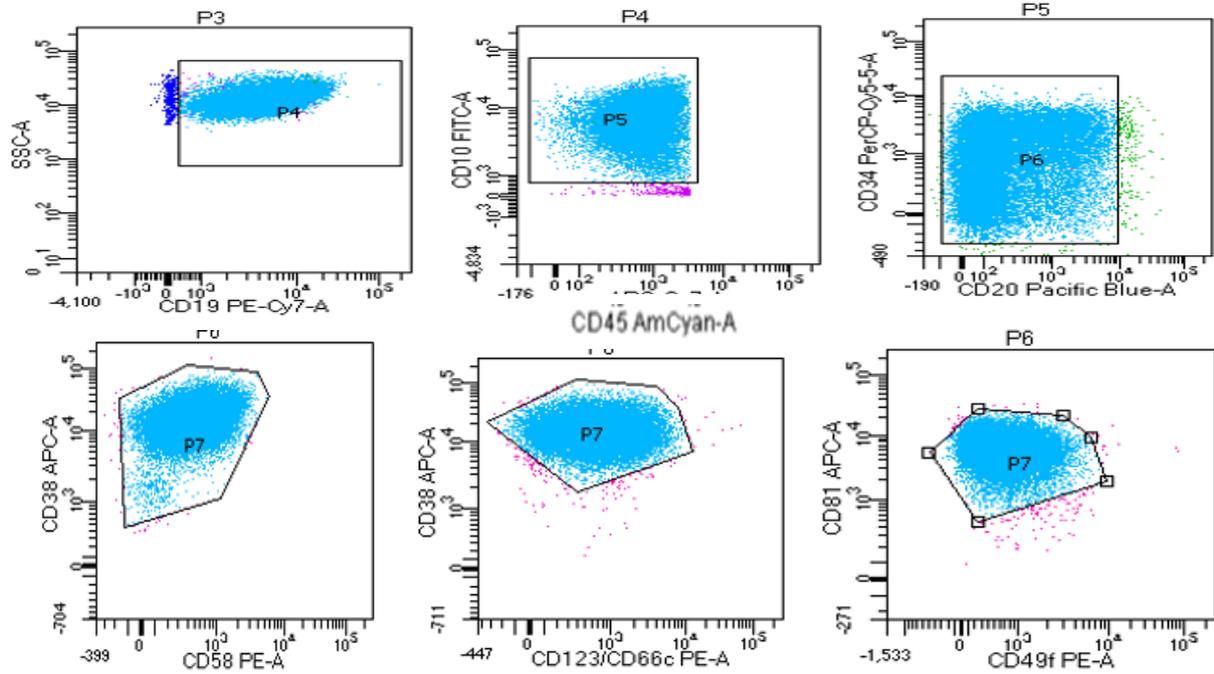
Figure 49 : MRD positive sans hémotogones

7.2.2 MRD négative avec présence d'hématogones

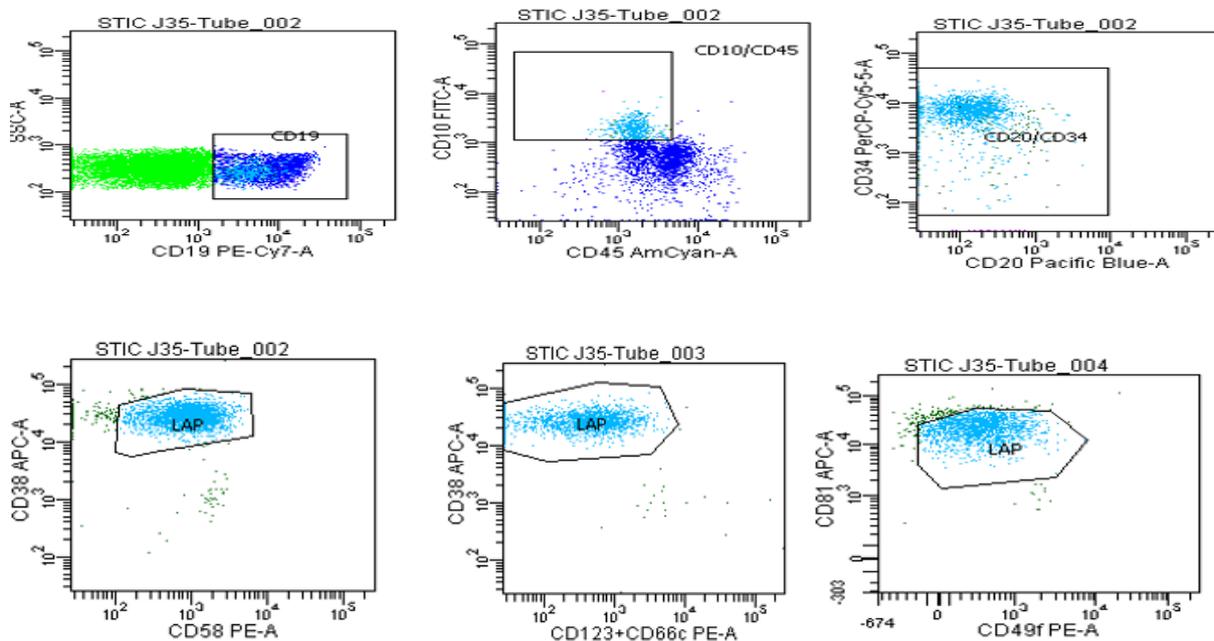
7.2.2.1 MRD négative :

Cas 2 : LAIP : CD10+ CD20/CD34+hétérogène CD123/CD66c + CD49f + CD81faible.

- Diagnostic : J0



- MRD2 : J70



Hématogones immature stade 1 : CD10+ CD34+ CD20- CD38fort CD58- CD123/CD66c -

Figure 50 : MRD négative avec présence d'hématogones.

7.2.2.2 Maturation des hémotogones (cas N°2).

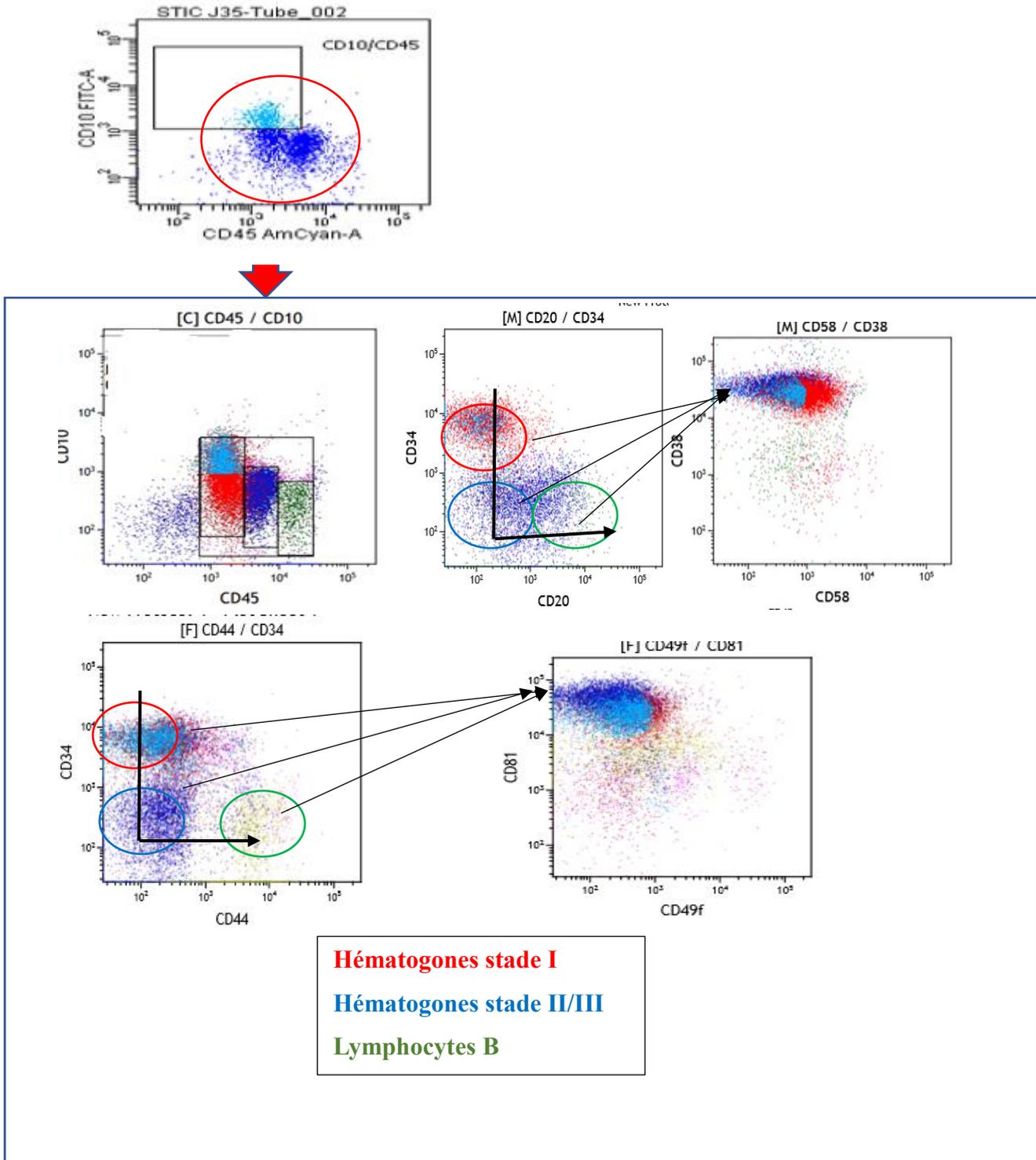
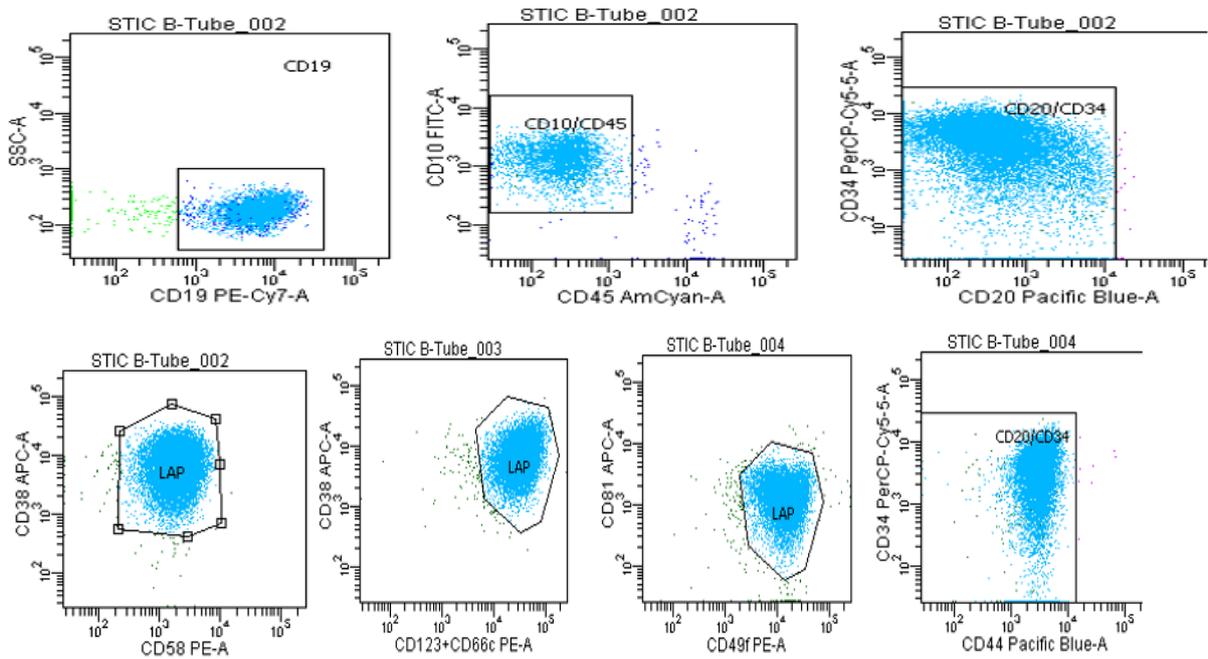


Figure 51 : Exemple de maturation des hémotogones (cas N°2).

7.2.3 MRD négative sans hématogones.

Cas 3 : CD10+ CD34 homogène CD20 - avec LAIP CD58 fort CD123/CD66 fort CD49f fort

Diagnostic : J0



MRD1 : J35

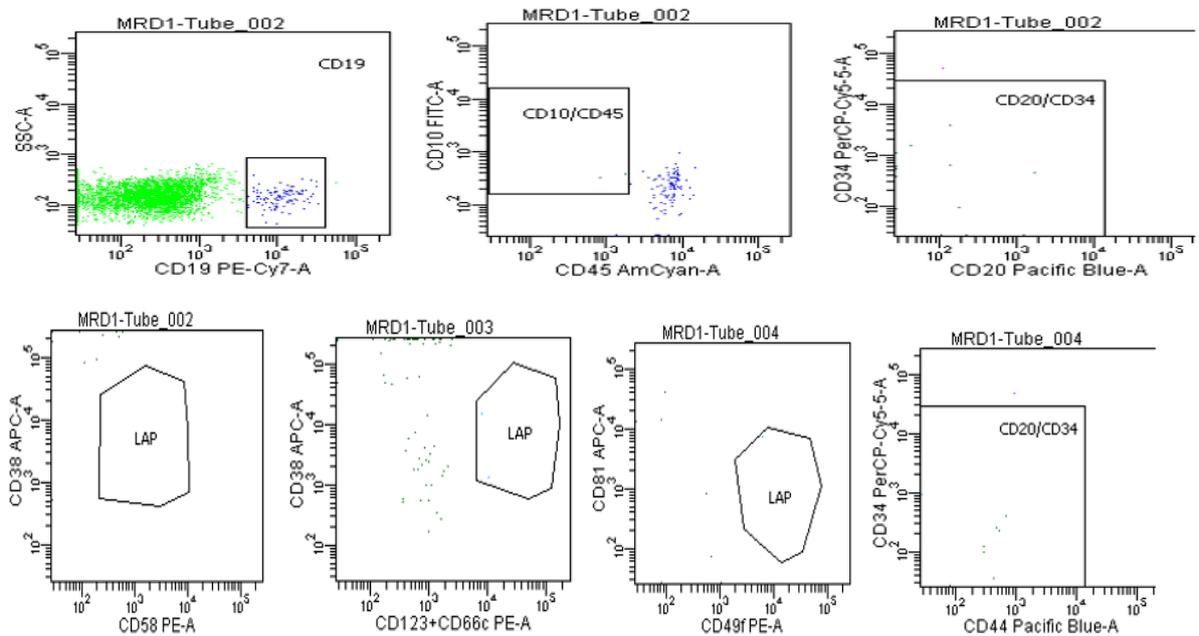
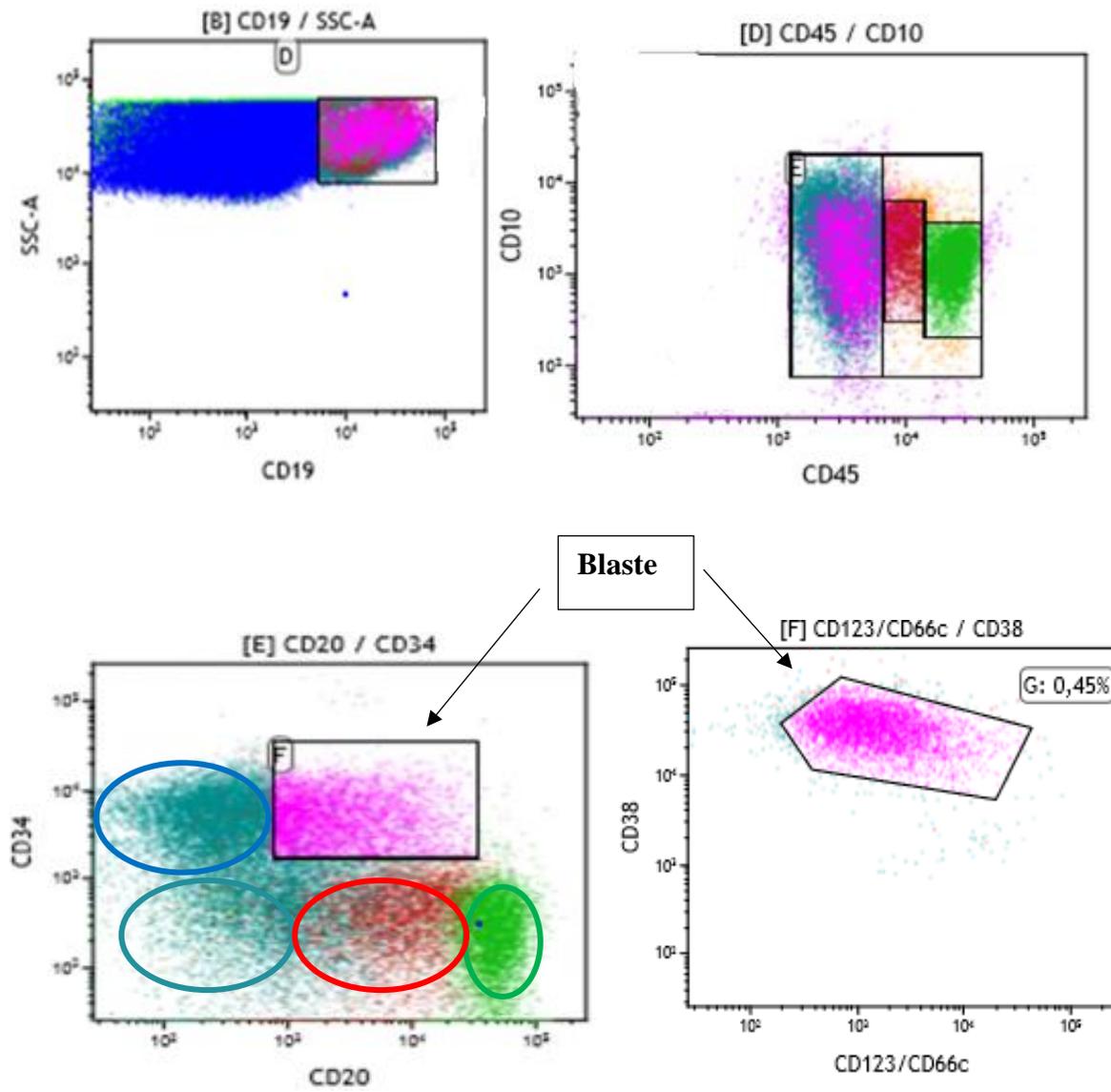


Figure 52 : MRD négative sans hématogones.

7.2.4 MRD positive avec hématozones.

Cas 04 : LAIP : CD34+ CD20+ CD123/CD66c +

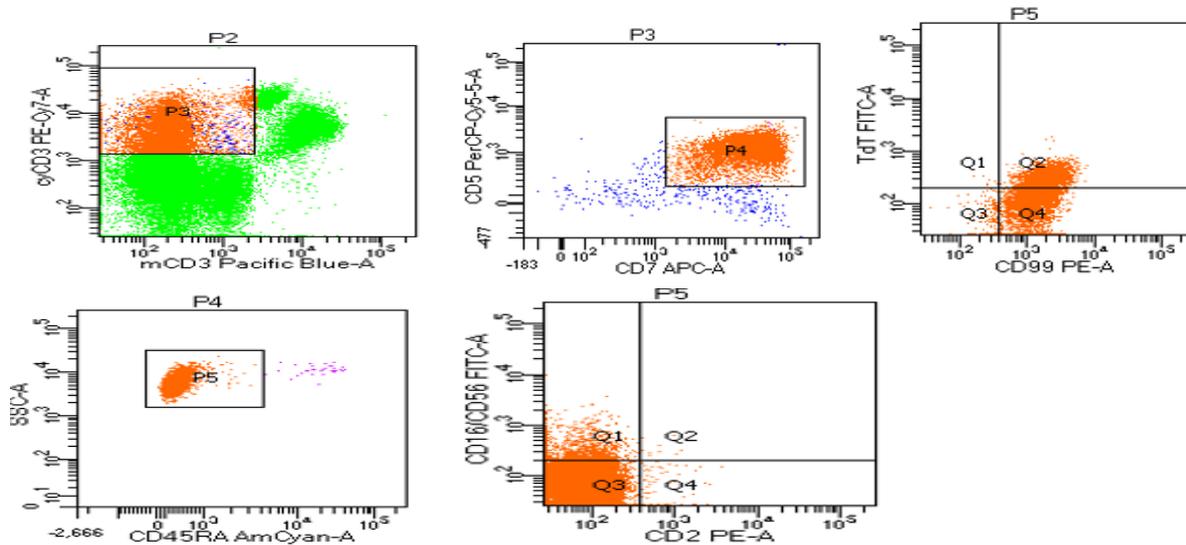


- Hématogones stade 1
- Hématogones stade 2
- Hématogones stade 3
- Lymphocytes B

Figure 53 : MRD positive avec hématozones.

7.2.5 MRD T négative avec des cellules T périphériques.

Cas 05 : LAIP : TDT/ CD99+ CD1a + CD2 négatif.
Diagnostic : J0



MRD2 : J70

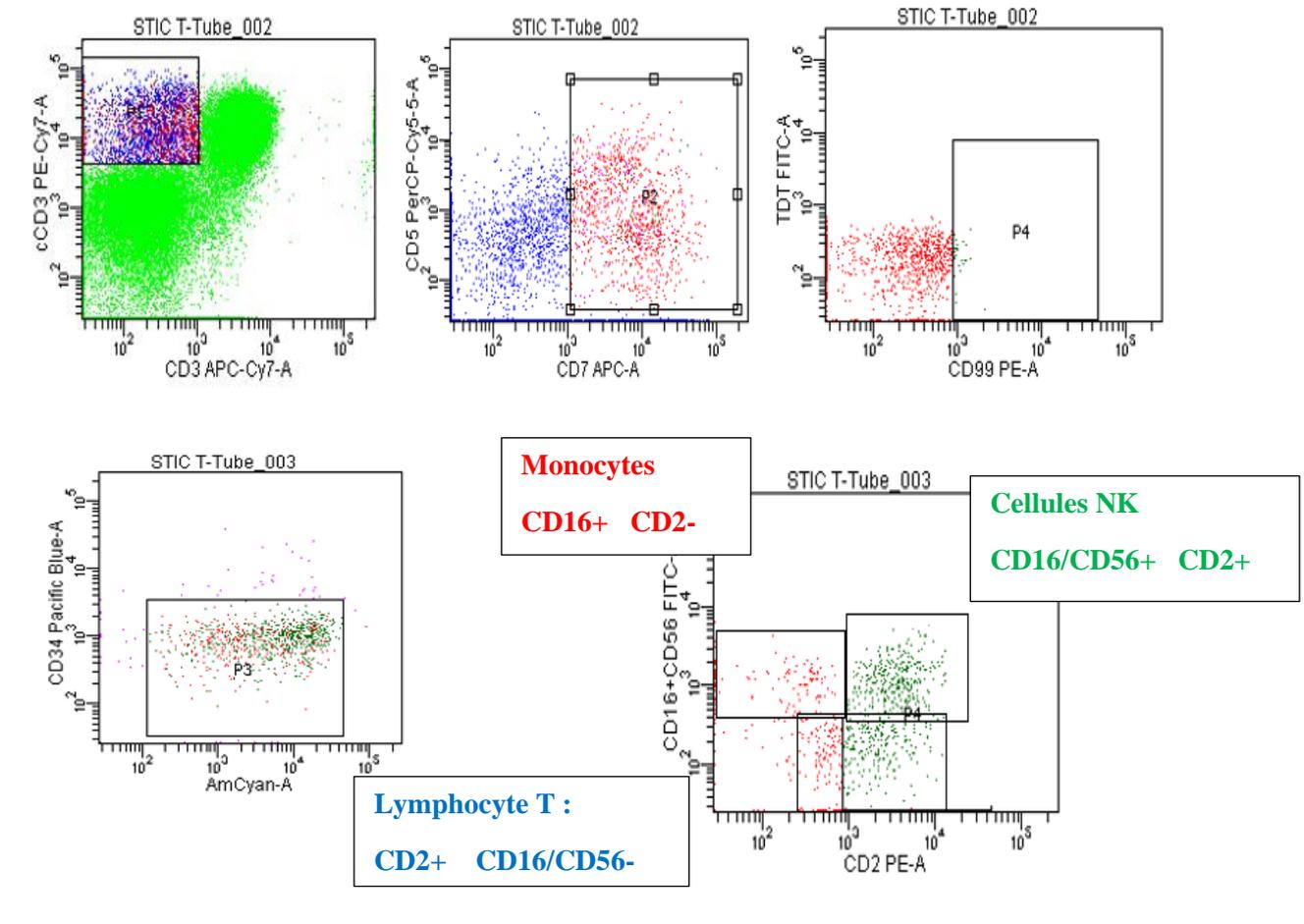


Figure 54 : MRD T négative avec des cellules T périphériques.

7. 3 Sensibilité des tests MRD :

7.3.1 Fréquence des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-4}

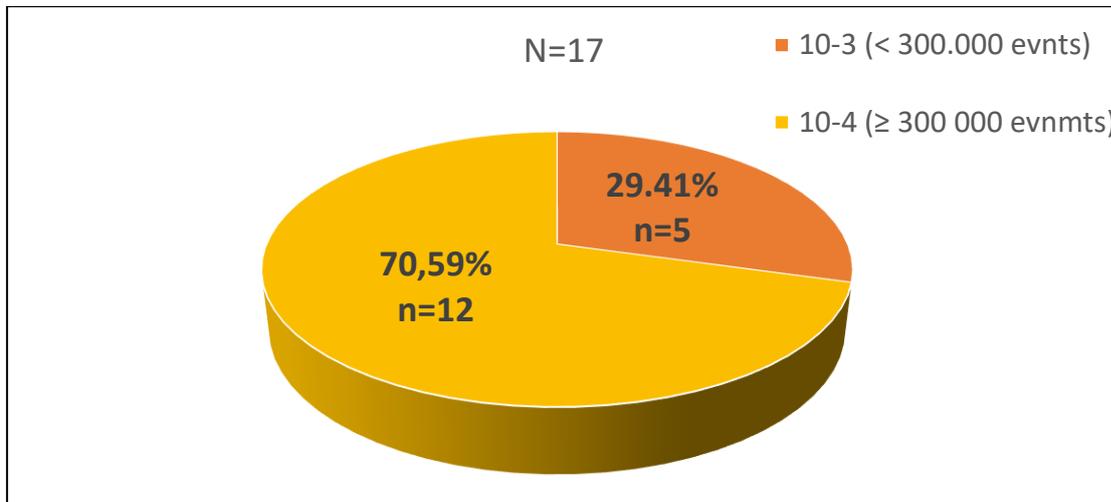


Figure 55 : Fréquence des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-4} .

70.59% de nos tests MRD ont atteint une sensibilité de 10^{-4} .

7.3.2 Médiane des évènements acquis des tests MRD:

- La médiane des évènements acquis des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-3} était de 161591 évènements, avec des valeurs extrêmes allant de 140691 à 254850 évènements.
- La médiane des évènements acquis des tests MRD avec une sensibilité de 10^{-4} était de 445450 évènements, avec des valeurs extrêmes allant de 352300 à 1000000 évènements.

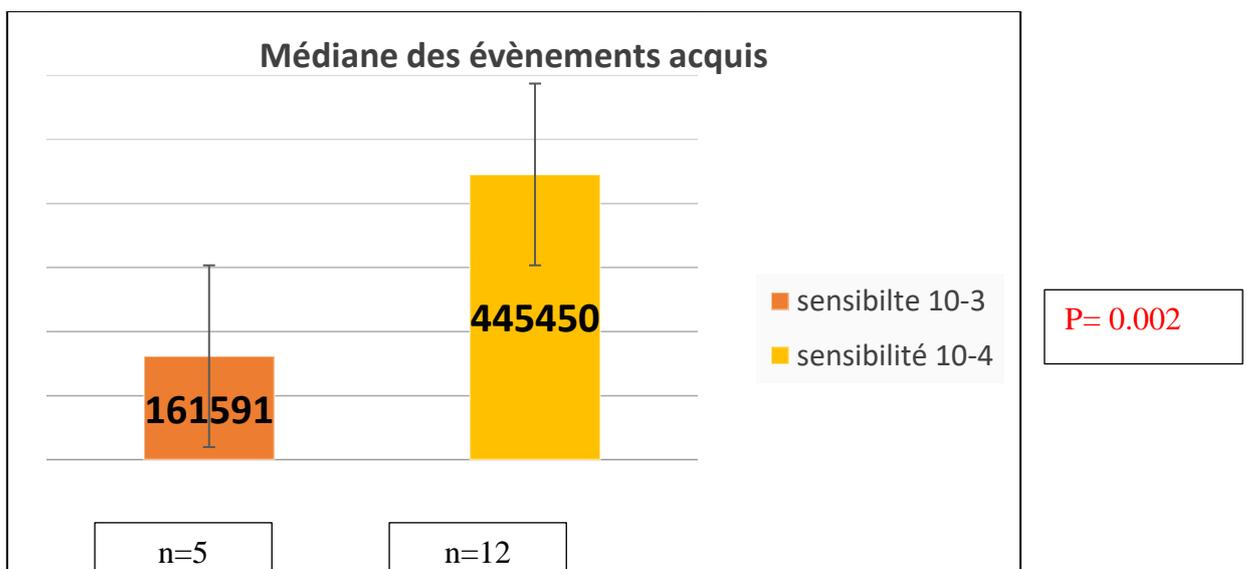


Figure 56 : Médiane des évènements acquis en fonction du niveau de sensibilité.

8. Facteurs influençant les résultats de la MRD:

8.1. Facteurs influençant la sensibilité des résultats:

8.1.1. Richesse des prélèvements en GB :

- La médiane des GB des prélèvements du J35 est de 11870 éléments/mm³ avec des valeurs extrêmes de 15000 à 55750 éléments /mm³.
- La médiane des GB des prélèvements du J70 est de 19950 éléments/mm³ avec des valeurs extrêmes de 3200 à 116900 éléments /mm³.

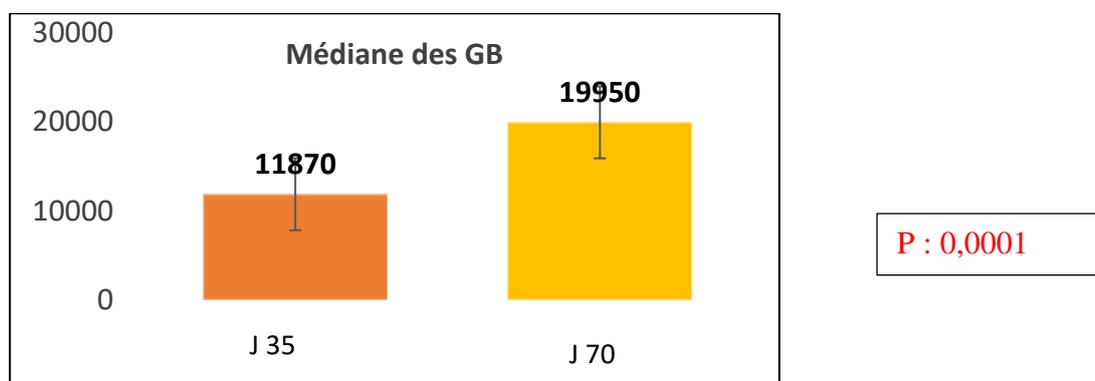


Figure 57 : Comparaison de la richesse des prélèvements en GB au deux points d'évaluation de la MRD

La cellularité des prélèvements de MO du J35 (fin d'induction) était significativement plus faible par rapport aux prélèvements du J70 (fin de consolidation).

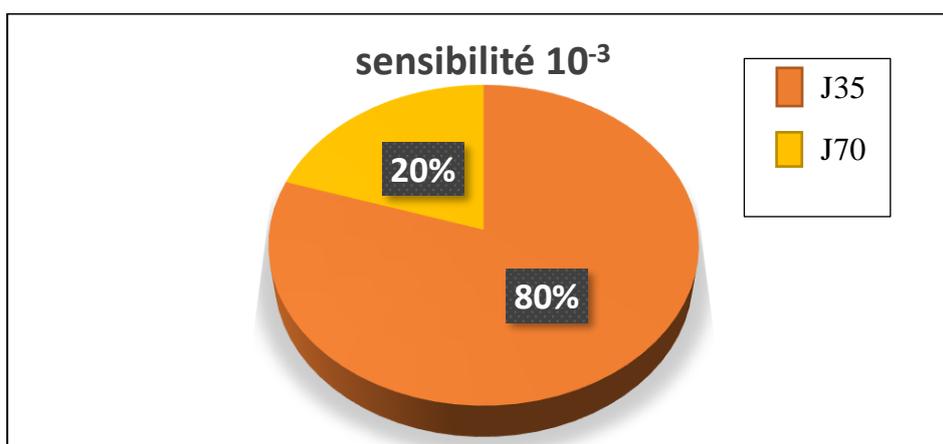


Figure 58: Répartition des résultats MRD avec une sensibilité de 10⁻³ en fonction du point d'évaluation

La sensibilité de la technique est liée au point de suivi. 80% (4/5) des tests MRD qui n'ont pas atteint une sensibilité de 10⁻⁴ étaient des échantillons prélevés à J35 (fin de l'induction).

8.1.2. Hémodilution des prélèvements :

Dans notre étude, le degré d'hémodilution des prélèvements de la MRD a été évalué principalement par l'examen cytologique de la MO (coloration MGG) et par l'évaluation du pourcentage des cellules CD34+. La méthode de Holdrinet a été appliquée uniquement chez deux patients, pour lesquels nous avons reçu un prélèvement sanguin en parallèle avec le prélèvement de MO. Il s'agit de la patiente Z.M et de la patiente B.W (tableau XIV).

Sur un total de 17 échantillons analysés, 5 étaient hémodilués, soit un taux d'hémodilution de 29.41%.

Tableau XIV: Résultat de l'évaluation du degré de l'hémodilution des prélèvements de la MRD.

	Patient	Prélèvement	Méthode de Holdrinet	Méthode cytologique	Pourcentage CD34 (%)
1	Z. M	MRD1	97.9%	MO pauvre	1.88
2	C.F	MRD1		Richesse normale	4.24
3	C.F	MRD2		Richesse normale	0.67
4	B.Y	MRD1		MO pauvre	/
5	B.Y	MRD2		MO diluée : 35% de lymphocytes	1.58
6	M.N	MRD1		MO pauvre	1.14
7	M.M	MRD1		MO pauvre : 67% d'érythroblastes	0.41
8	A.Y	MRD1		Richesse normale	5
9	A.Y	MRD2		MO diluée : 30% de lymphocytes	1.83
10	B.R	MRD1		MO pauvre:54% d' érythroblaste	1.89
11	B.R	MRD2		Richesse normale	2.62
12	Y.B	MRD1		MO diluée : 51% de lymphocyte	0.66
13	G.S	MRD1		MO pauvre : 64% d'érythroblastes	1.5
14	B.W	MRD1	47%	MO pauvre : 67% d'érythroblastes	0.70
15	F.I	MRD1		Richesse normale	2.37
16	B.N	MRD1		MO diluée : 60% de lymphocyte	1.04
17	B.A	MRD1		Richesse normale	4.16%

Nous avons comparé les résultats de l'évaluation cytologique avec le pourcentage des cellules CD34+. (Figure 59).

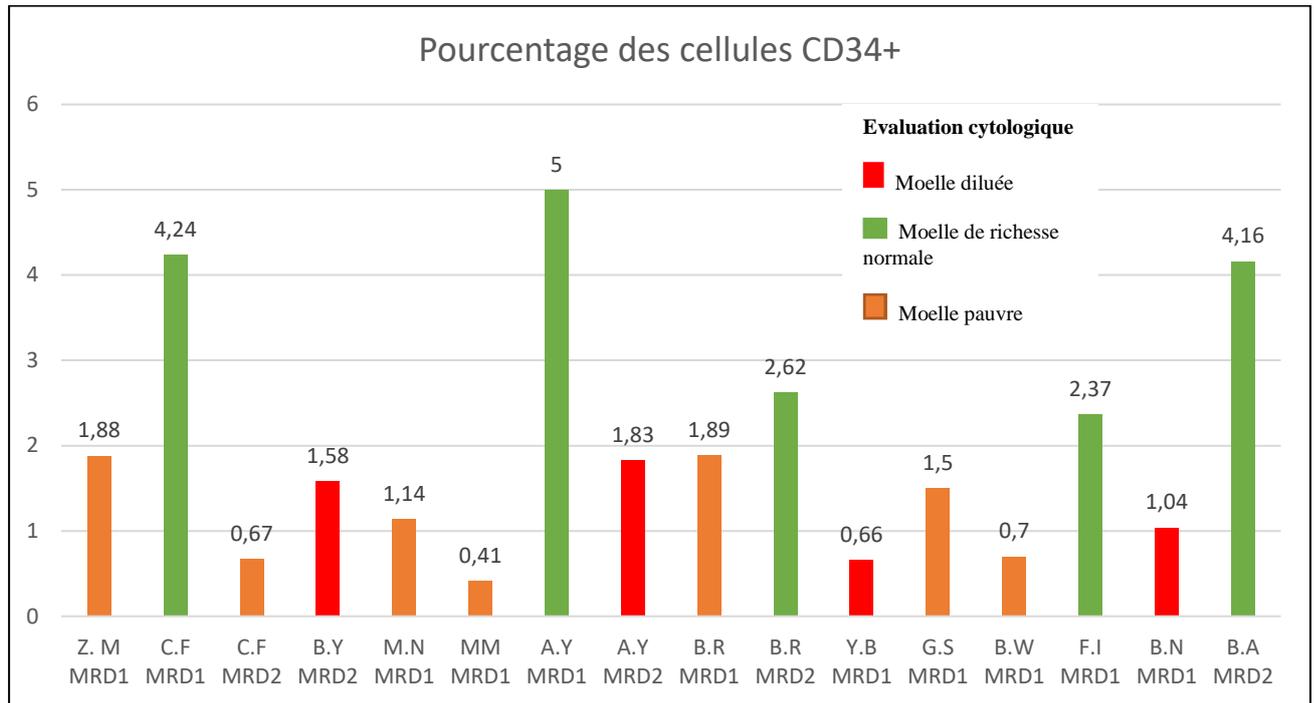


Figure 59 : Résultat de l'évaluation du degré de l'hémodilution des prélèvements de la MRD avec la méthode cytologique et sa corrélation avec le pourcentage des cellules CD34+.

Les résultats montrent que 11 prélèvements contenaient moins de 2% de cellules CD34+, dont 54.54% (6/11) étaient pauvres, 36.36% (4/11) étaient hémodilués et dans 09.09% (1/11) des cas la richesse du prélèvement était normale.

Au total, la diminution du taux des cellules CD34+ n'est pas toujours corrélée au degré d'hémodilution dans les moelles aplasiques. Cette observation est illustrée par le prélèvement de la patiente Z.M avec un taux de CD34 < 2%, alors que le degré de pureté était supérieur à 90% avec la méthode de Holdrinet. (Tableau XIV).

La comparaison du résultat de la méthode de Holdrinet de la patiente B.W avec le résultat de l'examen cytologique montre que ce dernier n'a pas mis en évidence des signes d'hémodilution, alors que le degré de pureté était inférieur à 70%. (Tableau XIV).

8. 2 Facteurs influençant la spécificité des résultats:

8.2.1. Les hémotogones :

L'évaluation de la détection des hémotogones a été réalisée chez les patients atteints de LALB aux deux points de suivi J35 et J70. Au total, 13 prélèvements de suivi de MRDB ont été analysés. (Figure29)

Tableau XV : Comparaison du pourcentage d'hémotogones du total des GB aux deux points de suivi.

% Hématogones	J35 (N=09)	J70 (N=04)	P
Médiane	0 (0 -4.37)	2.48 (0- 7.74)	0.2
Moyenne	0.5 +/- 0.48	3.17 +/- 1.8	

La proportion relative des hémotogones parmi les GB a augmenté du jour 35 au J70. Mais vu la taille réduite de notre échantillon, cette différence entre les deux points est statistiquement non significative (P= 0.2).

Tableau XVI : Comparaison de la composition des cellules B CD19+ en hémotogones aux deux points de suivi.

Type de cellules B CD19+ (%)	J35 (N=09)	J70 (N= 04)	P
Hématogones immatures	9.92 (0-18.61)	80.9 (0- 96.06)	0.04
Hématogones matures (lymphocytes B)	95.8 (6.92- 100)	9.92 (0- 96.06)	

Les échantillons du J35 contenaient beaucoup plus des cellules B matures, alors que les échantillons du J70 étaient dominés par des hémotogones immatures.

8.2.2. Modulation antigénique après chimiothérapie d'induction :

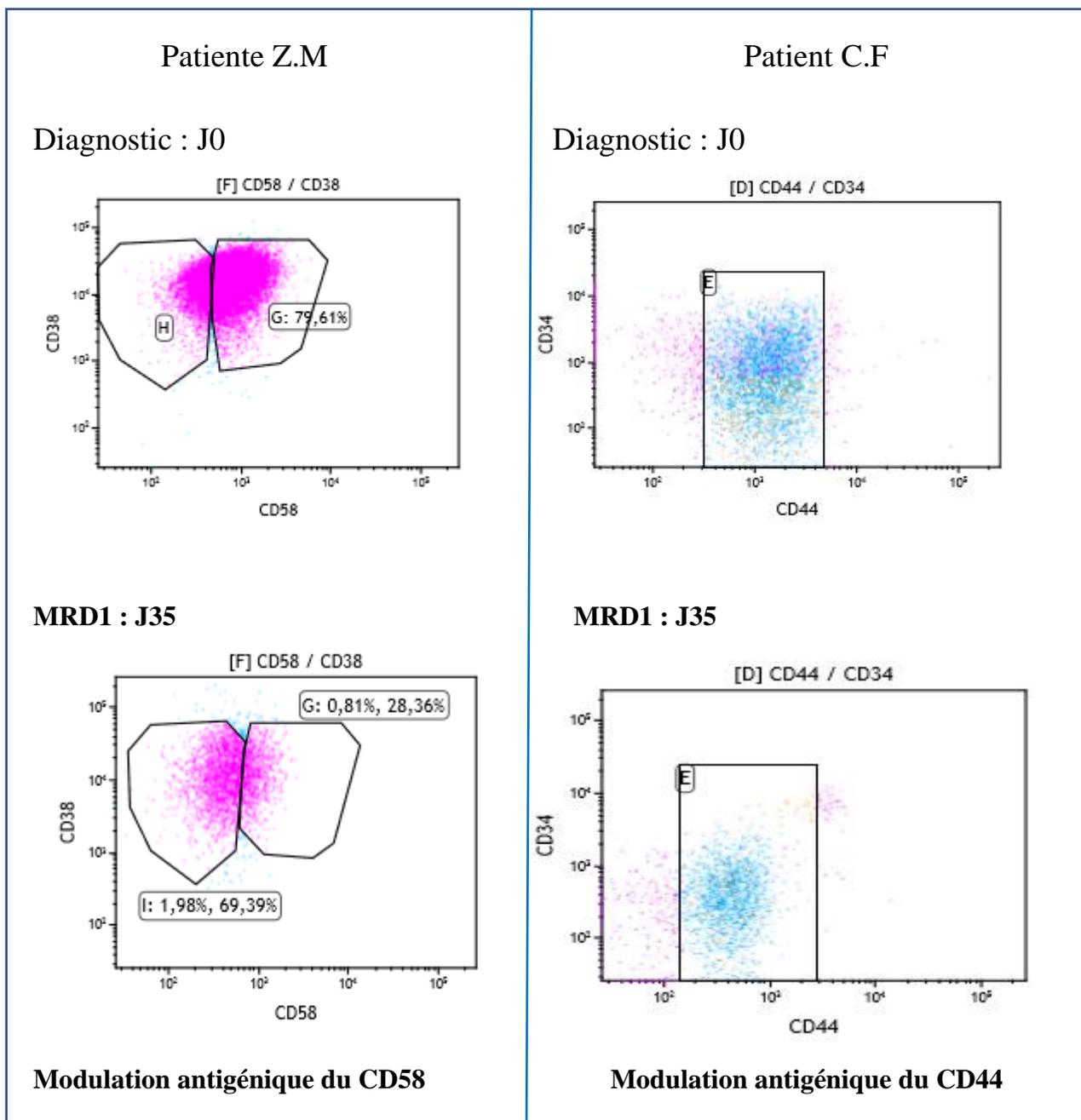


Figure 60 : Exemple de modulation antigénique après chimiothérapie d'induction

Une modulation antigénique a été observée à la fin d'induction chez deux patients : diminution de l'expression du CD58 chez la patiente Z.M et une diminution de l'expression du CD44 chez le patient C.F.

8.2.3. Hétérogénéité clonale de la population blastique au diagnostic:

Dans notre cohorte de LALB, parmi les 13 patients qui ont bénéficié d'une recherche de LAIP au moment du diagnostic, une patiente (7,7%) avait deux sous populations du clone blastique. Pour les 5 patients de la cohorte de LALT, deux patients (40%) avaient deux sous populations du clone blastique au diagnostic.

Un exemple de cette hétérogénéité clonale au diagnostic est illustré dans la figure 61.

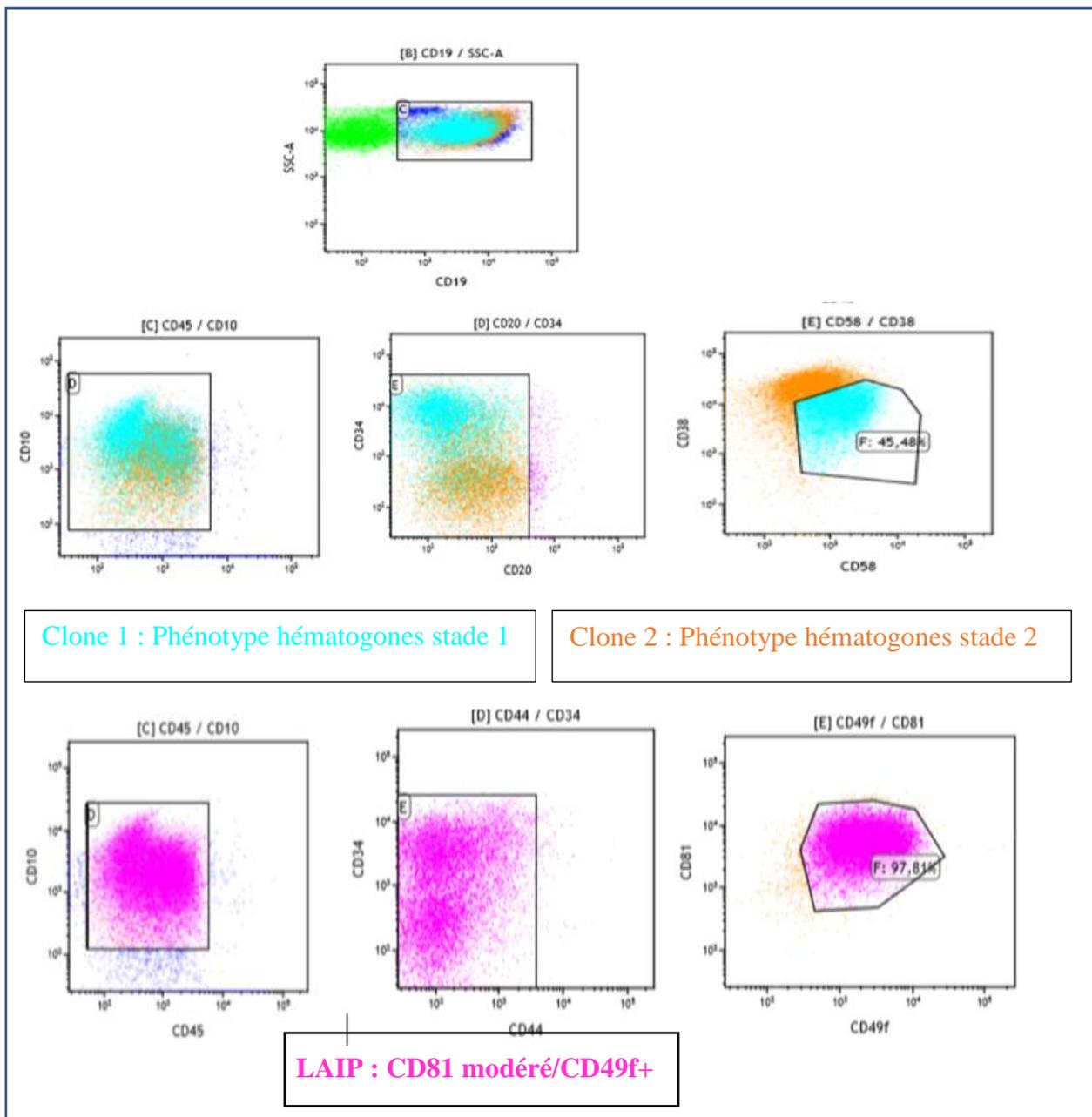


Figure 61 : Exemple de plusieurs sous clones blastiques au diagnostic

L'expression des marqueurs aberrants CD81/ CD49f par les cellules B immatures a permis de poser le diagnostic de l'origine blastique des deux sous clones.

8.3. Interprétation biologique des résultats de la MRD

L'interprétation du résultat de la MRD en CMF doit tenir compte de la sensibilité du test, dépendant de la richesse du prélèvement et du nombre d'évènements acquis, et de la représentativité de l'échantillon analysé (degré d'hémodilution). (Tableau XVII)

Tableau XVII : Résultats de la MRD des patients évalués et leurs seuils de sensibilité.

N	Patient	Phénotype	Prélèvement	Examen cytologique	CD34 %	hématogones	Conclusion de la MRD	seuil de sensibilité
01	Z.M	LALBIII	MRD1	MO pauvre	1.88	0	4×10^{-2}	10^{-3}
02	C.F	LALBII	MRD1	Richesse normale	4.24	0	11×10^{-2}	10^{-4}
			MRD2	Richesse normale	0.67	0	1×10^{-2}	10^{-4}
03	B.Y	LALTIII	MRD1	MO pauvre	/	/	Indéetectable	10^{-3}
			MRD2	MO diluée :35% de lymphocyte	1.58	/	Indéetectable	10^{-3}
04	M.N	LALTII	MRD1	MO pauvre	1.14	/	Indéetectable	10^{-3}
05	M.M	LALTIII	MRD1	MO pauvre : 67% d'érythroblaste	0.41	/	Indéetectable	10^{-3}
06	A.Y	LALBII	MRD1	Richesse normale	5	4.37%	Indéetectable	10^{-4}
			MRD2	MO diluée : 30% de lymphocytes	1.83	0.58%	Indéetectable	10^{-4}
07	B.R	LALBII	MRD1	MO pauvre : 54% d'érythroblaste	1.89	0	Indéetectable	10^{-4}
			MRD2	Richesse normale	2.62	4.38%	Indéetectable	10^{-4}
08	B.B	LALBII	MRD1	MO diluée: 51% de lymphocyte	0.66	0	Indéetectable	10^{-4}
09	G.S	LALBII	MRD1	MO pauvre: 64% d'érythroblaste	1.5	0	Indéetectable	10^{-4}
10	B.W	LALBII	MRD1	MO pauvre: 67% d'érythroblaste	0.70	0.16%	Indéetectable	10^{-4}
11	F.I	LALBII	MRD1	Richesse normale	2.37	0	Indéetectable	10^{-4}
12	B.N	LALBII	MRD1	MO diluée : 60% de lymphocyte	1.04	0	Indéetectable	10^{-4}
13	B.A	LALBI	MRD2	Richesse normale	4.16	7.74%	4.5×10^{-3}	10^{-4}

9. Analyse des résultats de la MRD et des rechutes :

A la clôture de notre étude (31/10/2020), nous avons étudié l'évolution clinique des 13 patients ayant bénéficié d'une évaluation de la MRD sur un ou deux points de suivi.

La durée moyenne de suivi est de 21 mois avec des extrêmes de 15 à 27 mois. Annexe 7.

9.1 Patients avec MRD positive :

Parmi les 03 patients dont la MRD était positive, deux ont rechuté. Le délai de rechute était de 1 mois et 20 mois.

Patiente Z.M âgée de 14 ans, qui présente une LALB avec des facteurs de mauvais pronostic: phénotype CD10 négatif, une hyperleucocytose et une corticorésistance. Elle est traitée par le protocole EORTC2002 dans le groupe VHR.

Le résultat de la MRD à J35 est revenu positif à un taux élevé de 4×10^{-2} avec un seuil de détection de 10^{-3} .

L'évaluation de la rémission cytologique sur le même prélèvement qui a servi à la détection de la MRD n'était pas concluant à cause la faible cellularité du prélèvement.

Une 2^{ème} évaluation de la rémission cytologique a été réalisée sur un autre prélèvement 11 jours après. Elle est revenue toujours non concluante.

Le diagnostic de la rechute a été établi sur un 3^{ème} prélèvement 25 jours après, avec un taux de blaste de 25%. La patiente est décédée au début de la phase de consolidation par un choc septique.

Chez cette patiente le taux de la MRD était élevé malgré la faible cellularité du prélèvement (GB :1500 éléments/mm³) et la faible sensibilité du test MRD (10^{-3}). Ce qui signifie qu'avec une sensibilité de 10^{-4} le taux de MRD serait encore plus élevé d'un log.

Dans cette observation, la MRD par CMF peut être considérée comme une approche objective et sensible de l'évaluation de la phase d'induction dans les moelles désertiques.

Patiente B.A âgée de 11 mois, qui présente une LALBI, forme hyperleucocytaire et corticosensible. Elle est traitée par le protocole « Interfant 06 » dans le groupe risque standard. A la fin de la consolidation, la patiente était en rémission cytologique complète. L'évaluation de la MRD à ce point de suivi était positive à un taux de 4.5×10^{-3} avec une sensibilité de détection de 10^{-4} .

Chez cette patiente, l'identification de LAIP n'a pas été réalisée au moment du diagnostic par manque de prélèvement. Cependant, la population blastique identifiée au moment de l'évaluation de la MRD a été caractérisée grâce à un LAIP très informatif : expression aberrante

des marqueurs myéloïdes CD66c/CD123, ce qui témoigne de la stabilité de ces marqueurs au cours du suivi.

Au cours de la phase d'entretien, 20 mois après le point d'évaluation, on notait l'apparition de blastes sur le frottis sanguin, définissant une rechute.

9.2. Patients avec MRD négative :

Parmi les 10 patients dont la MRD était négative dès le premier point de suivi, un patient a rechuté (Figure 62).

Patient B.Y âgé de 3 ans, qui présente une LAL-TIII, avec 2 facteurs de mauvais pronostic : une hyperleucocytose et une cortico-résistance. Il est traité par le protocole EORTC 2002 dans le groupe VHR.

A J35, il était en rémission cytologique complète, la quantification de la MRD était négative. La MRD2 à la fin de la consolidation (J70) était toujours négative.

Au cours de la phase d'entretien, nous avons noté l'apparition de blastes sur le frottis sanguin, définissant une rechute. Cette rechute est survenue 10 mois après le dernier point de suivi. Le patient est décédé 5 mois après.

Dans cette observation, la rechute ne s'est pas accompagnée d'une MRD détectable. Cependant, la sensibilité des tests MRD était faible pour deux raisons :

- Le seuil de détection des deux tests MRD était de 10^{-3} .
- Hémodilution du prélèvement MRD2.

Ces deux éléments réduisaient le nombre de cellules médullaires disponibles pour la quantification de la MRD.

9.3 Détermination séquentielle de la MRD:

Dans notre cohorte, quatre patients ont pu bénéficier d'une évaluation de la MRD aux deux points de suivi. Parmi lesquels, un patient avait une MRD positive (Figure 62) et dont le taux a régressé au cours du suivi.

Patient C.F âgé de 09 ans, qui présente une LAL-B II, forme hyperleucoytaire et corticosensible. Il est traité par le protocole EORTC 2002 dans le groupe risque standard.

A J35, il était en rémission cytologique complète, la quantification de la MRD était positive avec un taux \geq à 10^{-2} (11×10^{-2}), ce taux a régressé d'un log au cours de la phase de consolidation (MRD2 = 1×10^{-2}). La rechute n'a pas été observée chez ce patient. (Annexe 7)

Cette observation souligne l'importance de la surveillance séquentielle des patients avec une MRD positive. Une décroissance de la cinétique de la MRD est en faveur d'un bon pronostic.

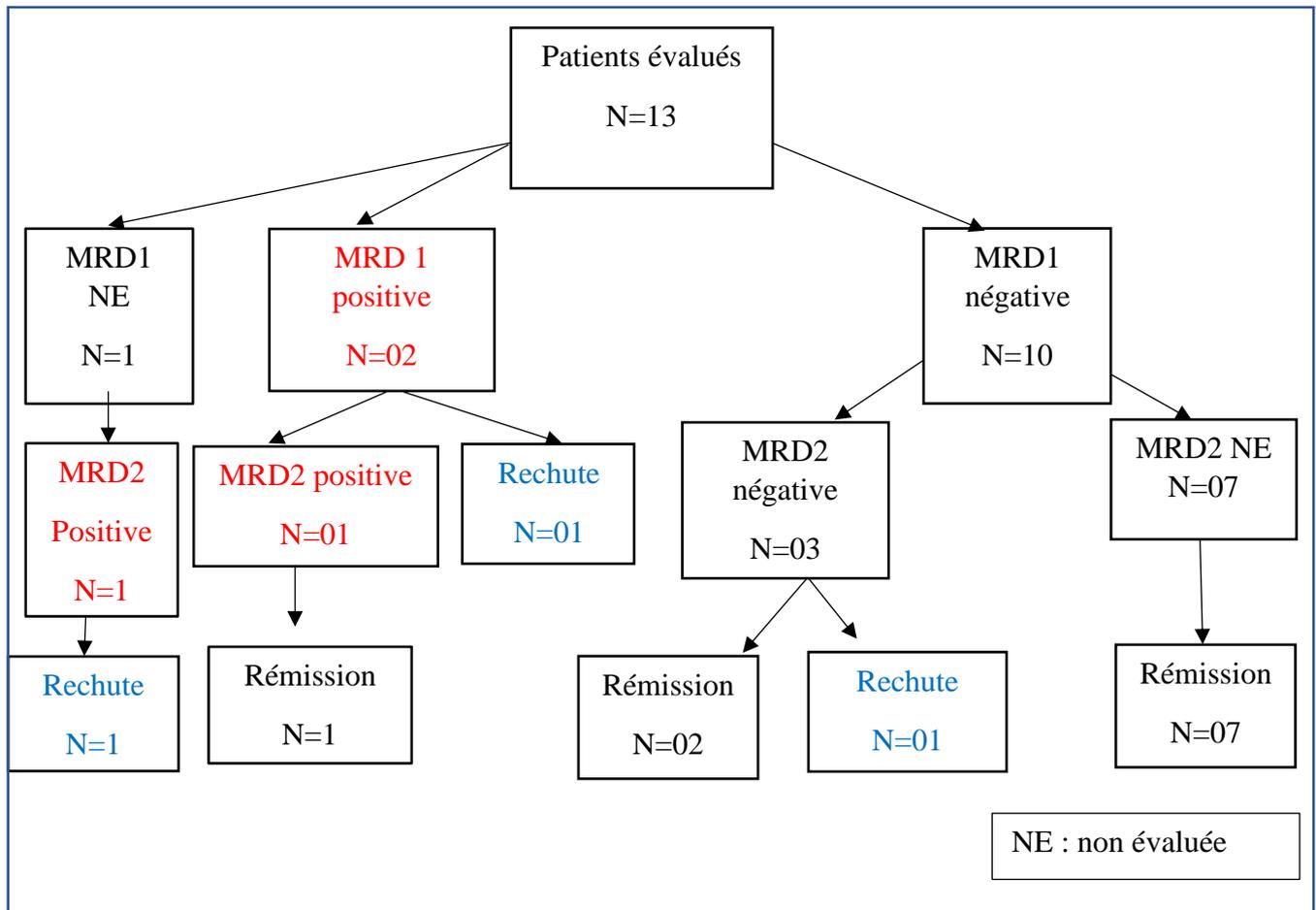


Figure 62 : Diagramme de flux de la cohorte des patients suivis par la MRD.

10. Analyse du coût d'un test MRD :

Cette analyse se limite uniquement au coût des réactifs d'anticorps et n'inclue pas les dépenses supplémentaires telles que le coût du consommable (du PBS, de la lyse et du liquide de gaine). Le coût des anticorps a été calculé en fonction du volume titré pour chaque anticorps.

Tableau XVIII : Coût d'un test MRD pour les LALB et T

Panel	MRD B	MRD T
Coût (DA)	10 000	22000

Le coût d'un test MRD avec nos panels MRD B et T est relativement abordable.

IV. DISCUSSION

Notre travail a porté sur 20 patients atteints de LAL recrutés sur une durée de 12 mois. Ce faible recrutement s'explique par la moindre incidence des LAL de l'enfant en Algérie : 19 cas/ million /an. **(18)**.

Sur le plan phénotypique, notre cohorte de LAL se répartie en 15 LALB (75%), et 05 LALT (25%). Cette répartition se rapproche de celle émanant des données de l'étude nationale (86% et 14%) effectuée par Chérif et al **(18)**, de celle de l'étude Marocaine (84,3% et 15,7%) réalisée par Tlamçani et al **(79)** ainsi que de l'étude Française (74% et 26%) de Fossat et al **(80)**.

Une sous-classification phénotypique classique de LALB telle que la classification EGIL a été obtenue : BI 2 cas (13.33%), BII 9 cas (60%), BIII 3 cas (20 %) et BIV 1 cas (6.66%). Le phénotype BII étant le plus fréquent, ce qui concorde avec les données du groupe Euroflow (BII : 73%) publiées par Van Dongen JJM et al **(45)** ainsi que les données de l'étude Française (BII : 76%) publiées par Bassot L **(70)**.

Pour les LALT, la taille de notre échantillon est réduite (05 cas), ceci est expliqué par la faible incidence des LALT par rapport aux LALB. Dans la littérature, les LALB ont un taux d'incidence 3,5 fois plus élevé que les LAL T (11,7 vs 2,6/100 000 h/an) **(28)**.

De ce fait, malgré la taille réduite de notre échantillon, les caractéristiques phénotypiques de notre population d'étude sont similaires aux données nationales et internationales, ce qui témoigne de l'absence d'un biais de sélection au recrutement des patients.

Une des limites d'application de la CMF comme méthode de quantification de la MRD dans les LAL serait l'absence de signature phénotypique (LAIP) au diagnostic.

L'identification des LAIP au diagnostic est une étape cruciale de toute étude MRD et c'est principalement ici que réside toute l'expertise pour l'évaluation de la MRD par CMF.

Dans notre étude monocentrique, l'applicabilité de l'évaluation de la MRD par CMF multiparamétrique dans les LAL, en utilisant la définition d'au moins un LAIP informatif a été confirmée dans 12 sur 13 cas de LALB (92,31%) (Tableau X) et dans la totalité des 5 cas de LALT (100%) (Tableau XII). De plus, une proportion élevée de cas présentait plus d'un critère aberrant.

Dans les premières études réalisées avec des panels 3 et 4 couleurs, 85% des LALB et 100% des LALT présentent des phénotypes aberrants au moment du diagnostic d'après les résultats de San Miguel et al. **(51)**. Cette incidence est encore plus élevée lors de l'élargissement

du panel d'antigènes explorés ; avec les panels 8 couleurs d'Euroflow, elle est $\geq 95\%$ dans les LAL B et $\geq 90\%$ dans les LALT d'après les données publiées par Van Dongen JJ et al. (11).

De ce fait nos résultats se rapprochent de ceux d'Euroflow.

Par conséquent, selon ces résultats, la détection immunophénotypique de la MRD est applicable chez la majorité des patients atteints de LAL.

Les marqueurs LAIP analysés dans notre étude sont déjà largement utilisés par les autres études de MRD par CMF (46, 51, 69, 80).

La performance de ces marqueurs est conditionnée par la fréquence de leur expression et leur stabilité au cours du suivi.

Dans notre série de LALB, les combinaisons d'anticorps les plus pertinentes sont celles contenant le CD38, CD81 et CD123/CD66c. (Tableau IX)

En 2016, Theunissen P et al. (69) du groupe Euroflow ont démontré que la combinaison de ces marqueurs permet une bonne séparation entre les hématogones et les blastes des LALB dans 89% des cas.

Concernant les LALT, les meilleures combinaisons pour mesurer la MRD étaient celles contenant la TdT et CD99 (Tableau XI). Ce résultat rejoint les données de Fossat et al (80).

Dans notre série, le type de LAIP le plus couramment retrouvé dans les LALB est la sous expression des antigènes de lignée CD38 et CD81(100%), et la présence d'une expression d'antigènes de lignées croisées (84.61%).

Globalement, nos résultats concordent avec les résultats de la littérature (Tableau XIX). Cependant nous avons noté que la sous expression d'antigène était plus fréquente dans notre étude par rapport à l'étude de Patkar et al (46), alors que dans l'étude de San Miguel (51) ce type d'aberration phénotypique n'a pas été exploré.

Cette variation d'incidence des aberrations phénotypiques entre les différentes études est due à l'hétérogénéité des panels d'anticorps et des critères utilisés pour la définition de ces aberrations.

Tableau XIX: Comparaison de l'incidence des différents types de LAIP des LALB avec les données de la littérature

LAIP LALB	Notre étude	San Miguel 1999 USA	Patkar 2012 Inde
Lignée croisée	84.61%	75%	75%
Asynchronisme de maturation	53.84%	39%	33.33%
Surexpression d'antigène	53.84%	35%	33.33%
Sous expression d'antigène	100%	/	66.7%

Dans notre cohorte de LAL, le phénotype ectopique est l'aberration phénotypique la plus fréquemment retrouvée. Ce résultat concorde avec les données de San Miguel et al (51) et de Fossat et al. (80).

La cytométrie en flux présente également un intérêt particulier pour certains sous-ensembles de LAL immatures, notamment la LAL BI (Figure 39), dans laquelle les réarrangements Ig/TCR ne présentent pas de marqueurs fiables pour le suivi de la MRD (11, 43).

Une quantification de la maladie résiduelle sur des échantillons de MO a été réalisée chez 13 patients sur un ou deux points de suivi: MRD1(J35) et MRD2(J70). Ces patients étaient en rémission cytologique complète. Au total, 17 échantillons ont été analysés dont 04 étaient positifs, soit une fréquence de MRD positive de 23.52% (Figure 48).

Ce résultat souligne la plus grande sensibilité de notre technique par rapport à l'évaluation cytologique de la moelle. Ceci est principalement dû à :

- L'analyse d'un plus grand nombre de cellules médullaires.
- L'utilisation d'une combinaison optimisée de marqueurs et de fluorochromes, pour une identification précise des taux très faibles de cellules leucémiques résiduelles.
- L'optimisation du réglage de l'instrument pour la détection de faibles intensités de fluorescence.

A l'heure actuelle, une MRD avec une sensibilité d'au moins 10^{-4} est requise pour ajuster l'intensité du traitement (43). Pour atteindre ce seuil de sensibilité, il va falloir analyser un million de cellules, ce qui n'est pas toujours réalisable. Il est important qu'au moins 300 000 cellules soient analysées pour atteindre ce seuil technique. Plus le nombre de cellules analysées est important, plus la sensibilité augmente.

Dans notre étude, 70.59% des tests MRD ont atteints une sensibilité de 10^{-4} (Figure 55), avec une médiane de 445450 évènements acquis (valeurs extrêmes allant de 352300 à 1000000 évènements).

Pour les 29.41% (5/17) des tests MRD où cette sensibilité n'a pas été obtenue, en analysant la raison pour laquelle un nombre insuffisant de cellules a été acquis, nous avons constaté que 80% (4/5) de ces tests MRD ont été réalisés sur des prélèvements du J35 (Fin d'induction) (Figure 58). Ce point d'évaluation est caractérisé par une faible cellularité par rapport au J70 (fin de consolidation) (Figure 57). Cette observation rejoint celle de Dworzak MN et al (39) et de Von Dongen et al (11). (Tableau XX).

Tableau XX : Comparaison de la richesse cellulaire des prélèvements de MO entre les deux points de suivi (induction/ consolidation) des différentes études.

Caractéristiques des études			Richesse cellulaire	
Auteur	Point de suivi	Cellules analysées	Induction	Consolidation
Dworzak MN et al. 2002 (Protocole BFM 95)	J33 et semaine 12	Globules blancs totaux (G/L)	7, 3 (9- 32)	15, 7 (2-120)
Von Dongen et al. 2015 (Protocole DCOG- ALL11)	J33 et J78	Cellules mononuclées (x 10 ⁶)	8 (5-8)	18 (18-40)
Notre étude	J35 et J70	Globules blancs totaux (G/L)	11.87 (1.5-55,75)	19.95 (3.2 -116,9)

Le manque de cellules à la fin de l'induction est un problème majeur, car à ce moment-là, il est important d'identifier avec précision les patients avec des niveaux de MRD indétectables au seuil de 10^{-4} . Par conséquent, un échantillonnage de MO approprié est un élément essentiel des études cliniques basées sur la MRD.

Dans l'étude de Fossat et al. (80), l'enrichissement des prélèvements de MO par une technique de leuco-concentration a permis d'obtenir une sensibilité de 10^{-4} dans une proportion exceptionnellement élevée de 97.9% des cas avec une médiane d'évènements acquis de 415 000 (valeurs extrêmes allant de 104 000 à 1000000 d'évènements).

Un autre élément qui peut influencer le nombre d'évènements analysés, est le délai pré-analytique qui conditionne la viabilité des cellules.

Afin de pouvoir analyser un maximum de cellules, le prélèvement doit être traité à l'état frais, dans les 24 heures suivant l'aspiration médullaire (43,78).

Dans notre étude, tout prélèvement arrivant au laboratoire avant 14h était traité le jour même.

La représentativité de l'échantillon est aussi un facteur critique qui conditionne la sensibilité de la technique. Un prélèvement hémodilué est moins représentatif de la composition médullaire, donc la proportion de cellules médullaires et de potentiels blastes leucémiques résiduels est sous-estimée. Ce qui entrainera un risque de résultat faussement négatif. Il est donc important de déterminer le degré d'hémodilution des échantillons de MO. (43, 80).

Ceci peut être estimé de plusieurs façons : La coloration MGG des frottis médullaires, l'analyse différentielle par CMF des sous-ensembles de leucocytes avec des marqueurs supplémentaires pour les cellules matures ou par la numération des cellules CD34, et par l'estimation de la pureté de la moelle osseuse selon la méthode de Holdrinet et al. (80).

Dans notre étude, le degré d'hémodilution des prélèvements de MO a été évalué principalement par l'examen cytologique (coloration MGG) et par l'évaluation du pourcentage des cellules CD34. La méthode de Holdrinet a été appliquée uniquement chez deux patients, pour lesquels nous avons reçu un prélèvement sanguin en parallèle avec le prélèvement de MO. Au total 29.41% (5/17) des prélèvements étaient hémodilués (Tableau XIV).

La comparaison des résultats de ces trois méthodes a montré que la diminution du pourcentage des cellules CD34+ n'est pas toujours corrélée au degré d'hémodilution dans les MO aplasiques.

Cette discordance avec les données de Brooimans et al (73) et Dericquebourg A (78) est expliquée par le fait que les études de ces derniers étaient réalisées sur des prélèvements de MO de sujets sains.

En raison de la simplicité et de la reproductibilité de la méthode décrite par Holdrinet, cette dernière est la plus adéquate pour l'évaluation du degré de l'hémodilution des échantillons de MO (73).

Brooimans et al (73), ont évalué s'il y avait ou non une corrélation entre le volume aspiré et le degré d'hémodilution. Les résultats montrent de manière significative que plus le volume aspiré est grand, plus le degré d'hémodilution est élevé.

De ce fait, pour obtenir un échantillon de moelle osseuse représentatif, il est important d'aspirer de petits volumes (maximum 2 ml à partir d'une seule ponction).

La spécificité des résultats de la MRD phénotypique est conditionnée par la capacité de discrimination des cellules leucémiques des progéniteurs hématopoïétiques physiologiques.

Cette spécificité tend à s'améliorer avec l'augmentation du nombre de fluorochromes disponibles pour détecter les LAIP et l'apport de nouveaux marqueurs. (83).

L'enjeu de la spécificité de la MRD des LALB est la distinction précise de la régénération lymphoïde B physiologique riche en hématogones des lymphoblastes B leucémiques.

Ces populations cellulaires sont particulièrement problématiques lorsqu'elles sont identifiées dans les échantillons de moelle osseuse d'enfants après un traitement de LAL, car les hématogones peuvent ressembler à des lymphoblastes malins par leurs caractéristiques morphologiques et par l'expression d'un phénotype de lymphocytes B immatures. (84)

Dans notre étude, sur les 17 échantillons d'évaluation de la MRD, les hémotogones ont été identifiés dans 5 cas (Tableau XVII).

L'analyse de ces échantillons de moelle osseuse riches en hémotogones a montré un spectre complet de maturation des cellules B, de cellules très immatures à des cellules B matures (Figure 51). En revanche, les échantillons de MO avec une MRD B positive, exprimaient systématiquement un immunophénotype plus immature et homogène (Figure 49). Ce résultat est similaire aux données des études de Rimsza LM (74), de Theunissen P (83) et de McKenna RW (84), évaluant les caractéristiques phénotypiques des hémotogones par rapport aux blastes leucémiques de la lignée B.

Dans notre cohorte de LALB, le nombre d'hémotogones est nettement réduit à absent à J35 (après le traitement d'induction), alors qu'à J70 (après le traitement de consolidation), ce nombre a considérablement augmenté dans le cadre de la régénération de la moelle (Tableau XV). Notre observation concorde avec celle de Wood (52) et de Theunissen P et al. (83).

L'analyse de la composition des échantillons de MO aux deux points de suivi concernant les sous-ensembles des cellules B, a montré que les échantillons du J70 (fin de consolidation) étaient dominés par des hémotogones immatures, alors que les échantillons du J35 (fin d'induction), contenaient majoritairement des cellules B matures (Tableau XVI). Notre résultat concorde avec les données de Dworzak MN et al (39) et de Van Dongen VJJ et al. (11).

Au cours des premières études de MRD par CMF avec un panel 3 couleurs, Dworzak et al (39) ont évalué l'influence de la présence des hémotogones immatures aux différents points de suivi sur la spécificité de la technique. Les résultats de ces études ont montré que le point de régénération (J70) était caractérisé par une spécificité limitée dans l'évaluation de la MRD dans une proportion élevée des cas de LALB, en raison de la prédominance d'hémotogones très immatures, alors que la haute fiabilité des tests à des moments antérieurs (J35) était basée sur la présence de cellules B matures (en dehors des cellules leucémiques résiduelles).

Dans notre étude, en utilisant un panel 8 couleurs avec des marqueurs aberrants pertinents, et une analyse multiparamétrique, cette variabilité des hémotogones immatures entre les deux points de suivi ne nous a pas posé un problème de discrimination avec les blastes leucémiques. (Figure 50 et figure 51).

De ce fait, la CMF multiparamétrique 8 couleurs améliore considérablement la spécificité de la technique à J70. Ceci est illustré dans le tableau XXI :

Dans notre étude la proportion des hémotogones immatures à J70 était plus élevée par rapport à celle retrouvée dans l'étude de Dowrosak où ces derniers ont été pris pour des cellules leucémiques résiduelles dans un nombre élevé de cas de LALB.

Tableau XXI : Proportion des hémotogones immatures aux deux points de suivi dans les différentes études.

Etude	J35		J70	
	Hématogones immatures (%)	Lymphocyte (%)	Hématogones immatures (%)	Lymphocytes (%)
Dowrosak et al 2002 CMF 3 couleurs	0 (0- 0)	98.2 (97.6- 100)	51 (0_ 99)	8.7 (0- 82)
Notre étude CMF 8 couleurs	9.92 (0-18.61)	95.8 (6.92- 100)	80.9 (0- 96.06)	9.92 (0- 96.06)

Pour le cas des LALT, la détection de la MRD au niveau médullaire est relativement facilitée du fait que le développement des lymphocytes T se produit principalement dans le thymus et l'identification des lymphocytes T immatures dans le sang périphérique, la moelle osseuse ou les tissus autres que le thymus est en soi anormale. Il n'y a donc pas lieu de distinguer lymphoblastes T pathologiques et physiologiques, puisqu'ils sont nécessairement pathologiques. **(43,45,78)**.

Pour autant, la MRD des LAL-T présente d'autres défis, qui sont de discriminer les lymphoblastes T des cellules T périphériques. Le CD45 est le plus souvent exprimé à une intensité élevée sur les blastes de LAL T, ce qui les fait chevaucher avec des cellules lymphoïdes T matures **(45)**.

Dans notre étude, en plus de la performance des marqueurs LAIP utilisés, le CD45RA nous a facilité l'identification des cellules NKT (cyCD3 + sCD3 -) et des lymphocytes T matures (Figure 54).

Le plus gros écueil de la spécificité de la MRD phénotypique est représenté par la modulation antigénique après chimiothérapie d'induction. Ces changements phénotypiques posent un défi particulier car ils peuvent entraîner des interprétations erronées et des résultats faussement négatifs. **(43,51,76,85,86)**.

Dans notre cohorte de LALB, une diminution de l'intensité d'expression antigénique a été observée avec le CD58 et CD44 sur le prélèvement de la MRD en post induction chez deux

patients avec MRD positive (Figure 60). Cependant, le fait d'avoir une stratégie d'analyse multiparamétrique on a pu analyser la maladie résiduelle même en présence d'un glissement antigénique (Figure 49). Pour le cas des LALT, nous n'avons pas pu analyser la modulation antigénique des marqueurs utilisés dans notre panel, vu que toutes nos MRD T étaient indétectables.

En 2010, au cours d'une vaste étude multicentrique sur la MRD dans la LALB infantile, Dworzak MN et al (**86**) ont observé des changements d'expression antigénique qui se produisaient fréquemment au cours des premières semaines de traitement dans les blastes des LALB : l'expression des marqueurs d'immatrité CD10 et CD34 a diminué de manière significative jusqu'au jour 33 et s'est rétablie par la suite au jour 78 à des valeurs comparables à celles au moment du diagnostic, alors que l'expression du marqueur de maturité CD20 a augmenté entre le diagnostic et le suivi.

Les mêmes observations ont été constatées par Roshal M et al (**76**), dans une étude sur une cohorte de LAL T infantiles, où l'expression des antigènes d'immatrité TdT et CD99 a commencé à diminuer au jour 8 et a continué à diminuer jusqu'au jour 29, alors que les antigènes associés à la lignée T (CD3, CD7 et CD5) n'ont pas montré de changements phénotypiques majeurs.

Ce schéma de diminution et de réexpression des antigènes d'immatrité correspond au calendrier de la chimiothérapie contenant des corticoïdes. Il est donc considéré comme un phénomène transitoire induit par l'effet différenciant des corticoïdes. (**43,52,86**).

En conséquence, une application prudente de la CMF multiparamétrique est nécessaire pour garantir des résultats de MRD corrects et fiables dans le suivi de la leucémie. Cela doit inclure l'utilisation de plusieurs marqueurs à la fois pour permettre une analyse multiparamétrique de plus haut niveau (≥ 8 couleurs), ce qui diminue la dépendance vis-à-vis des antigènes individuels, en particulier les marqueurs d'immatrité, et conduit à une plus grande confiance et précision dans l'identification des populations anormales dans les LAL.

L'autre limite de la spécificité de la technique, concerne l'hétérogénéité phénotypique/clonale de la population blastique.

Dans les années 90, la détection immunophénotypique de la MRD était basée sur les caractéristiques antigéniques de la population prédominante de cellules blastiques au moment du diagnostic. Cependant, il est bien connu que plusieurs sous-populations leucémiques avec

différentes caractéristiques phénotypiques peuvent être présentes au diagnostic, et une population mineure pourrait être le clone résistant responsable de la rechute. Ces sous-populations blastiques correspondent fréquemment à différents stades de maturation du clone leucémique telles qu'évaluées par leurs profils phénotypiques. **(51, 82)**.

Dans notre cohorte de LALB, parmi les 13 patients qui ont bénéficié d'une recherche de LAIP au moment du diagnostic, une patiente (7,7%) avait deux sous populations du clone blastique, avec des caractéristiques phénotypiques évoquant les deux premiers stades de maturation des hématogones, cependant l'expression du marqueur aberrant CD49f par les deux sous populations a permis de poser le diagnostic différentiel en faveur d'une seule population blastique leucémique. (Figure 61).

Parmi les 5 patients de la cohorte de LALT, deux patients (40%) avaient deux sous populations du clone blastique au diagnostic: l'un avait une expression différentielle du CD7 et du CD5 sur les deux populations, cependant la présence d'une expression aberrante des marqueurs CD16/CD56 et du marqueur d'immaturité CD34 sur ces deux populations nous a permis de confirmer l'origine leucémique des blastes T (Figure 43). L'autre patient avait une expression différentielle du CD3 de surface sur les deux populations blastiques (Figure 47).

Ces observations concordent avec les données de San Miguel et al. **(51)**, la présence de plus d'une sous population blastique au moment du diagnostic est plus fréquente dans les LALT (40%) que dans les LALB (24%).

Selon Dworzak MN et al, dans une étude récente sur les caractéristiques phénotypiques des LAL pédiatriques publiée en 2018 :

- Dans les LALT cette hétérogénéité phénotypique de la population blastique implique fréquemment le CD3 de surface.
- Dans les LALB, cela implique fréquemment le CD10 et l'IgM intra cytoplasmique.

Ceci conduirait à une sous classification différente de la leucémie si l'on respecte l'une ou l'autre des sous-populations blastiques. De ce fait, la recherche de la MRD devrait être basée sur les caractéristiques phénotypiques de chaque sous-population, avec une attention particulière portée aux plus immatures.

Indépendamment de sa sensibilité et de sa spécificité, la MRD par CMF 8 couleurs a d'autres avantages. C'est une technique rapide, simple et reproductible.

Le temps nécessaire pour la préparation des échantillons et l'analyse des résultats ne dépasse pas 02 heures.

De plus, cette technique est simple, le réglage du cytomètre (voltage et compensation) ainsi que le masque d'analyse sont standards pour tous les patients.

La rapidité du rendu des résultats est particulièrement intéressante d'un point de vue clinique, la découverte d'une MRD positive peut faire changer le groupe de risque et ainsi modifier la stratégie thérapeutique du patient (allogreffe, intensification de la chimiothérapie...). Il est donc important d'obtenir un résultat rapidement, afin de permettre une prise en charge rapide et optimale, particulièrement dans les points de suivi précoces de la réponse au traitement.

Dans notre étude, la reproductibilité d'interprétation est aidée par le fait que la stratégie de gating est standardisée avec un seul masque d'analyse utilisé pour la lecture de tous les échantillons du diagnostic et de la MRD.

Du point de vue économique, la cytométrie en flux multiparamétrique (≥ 8 couleurs) est actuellement considérée comme une approche coûteuse par rapport à la cytométrie en flux classique (4 couleurs), en raison des coûts des réactifs liés aux nouveaux fluorochromes (PECY7, APC H7, V450 et V500).

Cependant, le fait d'avoir un panel avec un nombre limité de tubes (2 tubes pour le panel MRDT et 3 tubes pour le panel MRDB), le coût d'un test MRD avec nos panels est relativement abordable (Tableau XVIII).

Du point de vue pronostique, notre cohorte est faible (13 patients ont été évalués), il est donc difficile d'en tirer des conclusions robustes et générales. Cependant, nous avons étudié l'évolution clinique de nos patients. A la clôture de notre étude, les patients évalués ont bénéficié d'un suivi entre 15 et 27 mois, le temps moyen de suivi est de 21 mois.

Dans notre série, 2/3 (66.66%) des patients avec une MRD positive ont rechuté, alors que dans le groupe MRD négative la rechute a été observée chez 1/10 (10%) des patients uniquement.

Les études initiales évaluant la valeur pronostique de la détection phénotypique de la MRD dans les LAL pédiatriques étaient basées sur de petites cohortes de patients. Notre résultat rejoint les données de ces études qui montrent clairement que la détection de la MRD est généralement associée à un risque plus élevé de rechute. (Tableau XXII).

TableauXXII: comparaison de la valeur pronostique de la MRD dans les LAL de l'enfant avec les données de la littérature.

L'étude	Nombre de cas	MRD	Rechute/total	(%)
Campana et al. (87)	37	+	15/15	(100%)
		-	7/22	(32%)
Van Dongen et al. (88)	28	+	11/12	(92%)
		-	1/16	(6%)
Drach et al. (89)	8	+	1/2	(50%)
		-	0/6	(0)
Notre étude	13	+	2/3	(66,66%)
		-	1/10	(10%)

Dans notre cohorte, le délai entre la rechute clinique et la détection de la MRD était de 1 et 20 mois. Ce résultat concorde avec l'étude de San Miguel et al (**50**) et celle de Cavé et al (**38**), où ce délai était de 1 à 19 mois et 1 à 15 mois respectivement.

En analysant la cinétique de la MRD au cours du suivi, nous avons noté que la MRD détectée lors d'une rémission clinique précoce peut régresser à des moments ultérieurs et que cette conversion est associée à un bon pronostic.

Dans la littérature, les résultats des études précédentes évaluant la valeur pronostique de la MRD dans les LAL de l'enfant (**8, 39, 89**), indiquent l'intérêt de la surveillance séquentielle des échantillons avec un résultat de MRD positif.

Une décroissance de la cinétique de la MRD au cours des différentes phases de la chimiothérapie est en faveur d'un bon pronostic même avec un résultat initial positif. Ce qui souligne l'importance de la chimiothérapie de consolidation comme moyen d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles.

Il est important de noter que non seulement la sensibilité et le calendrier des points de suivi sont essentiels pour la valeur prédictive des mesures de la MRD, mais également le protocole thérapeutique utilisé (le type et le nombre de médicaments ainsi que leurs dosage). C'est pourquoi, les résultats de la MRD des différents essais cliniques ne peuvent pas être comparés de manière directe. (**11**). En conséquence, des seuils de positivité de la MRD pour définir les catégories de risque doivent être établis, dans chaque protocole thérapeutique.

Il faut souligner aussi que les seuils pronostiques de la MRD peuvent dépendre de l'approche méthodologique, Coustan-Smith E et al (**8**), ont utilisé les cellules mononuclées pour la

quantification de cellules leucémiques résiduelles, alors que Dworzak et al. (39), ont quantifié ces cellules résiduelles à partir des globules blanc totaux.

La formulation des résultats doit être simple et informative. (Annexe 8)

- Technique utilisée
- Statut de la MRD
- Qualité du résultat
- Interprétation

L'expression des résultats serait la suivante :

- En cas d'absence d'évènements semblables aux blastes du diagnostic, nous pourrions rendre "MRD indétectable au seuil de sensibilité de X%",
- En cas d'évènements détectés : "MRD détectable à X%",
- En cas de LAIP au diagnostic peu spécifique: "MRD non évaluable". Les points de suivi de ces patients peuvent être tout de même analysés en CMF à la recherche d'une rechute sous un autre phénotype que celui du diagnostic.

L'interprétation "positive" ou "négative" sera laissée à l'appréciation du clinicien, en fonction des seuils de stratification thérapeutique.

Au cours de notre étude, nous avons soulevé plusieurs problèmes techniques qui peuvent entraver l'application de la MRD par CMF dans la stratification thérapeutique des patients atteints de LAL.

Le principal problème rencontré, sont les pannes répétées du cytomètre dues à un défaut de maintenance.

Ce problème de panne a engendré un arrêt prolongé du recrutement des patients.

Les lasers restent fragiles et les systèmes fluidiques les plus sophistiqués sont très exposés à l'obstruction et à l'instabilité du flux. La maintenance de ces appareils est donc cruciale, en particulier s'il y a exposition à des excès de chaleur, de poussière ou d'humidité.

La réalisation d'une telle étude en routine hospitalière est conditionnée par un approvisionnement régulier en réactifs et par un cytomètre toujours fonctionnel.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION

L'un des défis les plus importants dans le traitement de la leucémie aigue est de distinguer avec précision les patients qui peuvent être traités avec succès avec des schémas thérapeutiques de faible intensité ainsi que ceux qui nécessitent un traitement intensifié pour réduire le risque de rechute.

La mesure de la MRD à la fin du traitement d'induction et à la fin de la consolidation est avérée être le facteur pronostique le plus important dans de nombreuses études pédiatriques et chez l'adulte.

Par conséquent, l'étude morphologique de la réponse au traitement est désormais complétée par la surveillance de maladie résiduelle minimale (MRD) dans les protocoles thérapeutiques contemporains, modifiant ainsi les critères qui définissent la rémission complète et la rechute.

Les patients avec une MRD négative à la fin de l'induction auront un excellent pronostic, alors que des traitements intensifs devraient être envisagés pour les patients présentant des niveaux élevés de MRD à la fin de la phase d'induction ou une maladie résiduelle persistante au cours des phases initiales du traitement.

Ainsi, des seuils décisionnels de MRD sont établis dans les protocoles thérapeutiques et reposent actuellement sur les résultats obtenus en biologie moléculaire. Celle-ci est la technique de référence, mais cette technique est couteuse et nécessite une grande expertise.

En comparaison avec les techniques moléculaires, la détection de la MRD par cytométrie de flux (CMF) a l'avantage d'être rapide et à moindre coût.

De ce fait, la cytométrie en flux est une technique alternative pour intégrer la détection de la MRD dans nos protocoles thérapeutiques.

Dans notre étude, la mise au point méthodologique de la MRD par CMF multiparamétrique (8 couleurs) a permis de mettre en place une analyse applicable à la majorité des patients atteints de LAL ($\geq 90\%$), et de définir des critères de sensibilité et de spécificité nécessaires au bon rendu des résultats.

L'analyse des résultats obtenus a fait apparaître que la pertinence du résultat de la MRD en CMF est conditionnée par les paramètres suivant:

- Un seuil technique de sensibilité (dépendant du nombre d'évènements acquis).

- Un seuil de représentativité de l'échantillon analysé (degré d'hémodilution).
- La spécificité des LAIP identifiés.

En conclusion, ce travail a permis de montrer la faisabilité en pratique hospitalière de routine du suivi de la MRD dans les LAL par cytométrie en flux.

Le seuil clinique de la MRD pour la stratification thérapeutique des patients dépend de l'intensité et du calendrier des schémas thérapeutiques, ainsi que des aspects méthodologiques de la technique utilisée. Il est donc nécessaire d'établir des seuils de MRD pour chaque régime thérapeutique dans un essai clinique multicentrique.

PERSPECTIVES :

- Amélioration de la spécificité de la technique

Theunissen et al (69), ont évalué plusieurs autres marqueurs d'intérêt potentiel pour l'analyse de la MRD B (Par exemple: CD304-PE, CD27-PE, CD164-FITC, CD73-PE, CD200-PE, CD86-FITC).

Le CD73 et CD304 se sont avérés les plus prometteurs en fonction du niveau et de la fréquence des surexpressions et leur stabilité au cours du suivi.

Finalement un nouveau panel a été conçu avec deux tubes d'anticorps 8 couleurs très efficaces pour la détection de la MRDB. Ces deux tubes ne différaient que pour les marqueurs présents dans le canal PE (CD66c / CD123 versus CD73 / CD304). Les marqueurs de gating sont comparables aux marqueurs utilisés dans d'autres études (52, 80,81), et comprennent le CD19, CD10, CD20, CD34, CD45, CD38 et le CD81.

Il a été démontré, qu'en utilisant ces deux tubes les blastes de LALB peuvent être distingués du phénotype d'hématogones le plus proche, dans 99% des cas.

- Optimisation de la sensibilité de la technique par le protocole de lyse en vrac

Les données de la littérature montrent clairement que l'acquisition d'un grand nombre de cellules ($\geq 4 \times 10^6$) est une condition préalable pour obtenir des sensibilités et des résultats hautement comparables aux données de MRD par PCR. (69)

Les tubes MRD LALB conçus et optimisés par Theunissan et al, ont été testés en combinaison avec le protocole de macro lyse (lyse en vrac) développé par Euroflow, sur des échantillons de suivi de patients atteints de LALB.

Les résultats MRD de ce nouveau protocole, ont été comparés avec les données MRD par PCR. La concordance entre les deux méthodes était extrêmement élevée (93%) (69).

Cette grande concordance est due à la sensibilité plus élevée de la technique, résultant du plus grand nombre de cellules analysées.

- Nouvelle stratégie d'analyse avec le logiciel Infinicyt.

Les nouveaux outils logiciels développés au sein du consortium EuroFlow, notamment le gating automatisé et l'analyse des voies de maturation physiologique des cellules B, ont facilité les mesures de la MRD par CMF, avec une approche standardisée et plus objective.

Les données de la MRD par CMF basée sur la nouvelle stratégie d'analyse automatisée d'Euroflow ont montré une concordance de 98% avec les données de la MRD par PCR.

Au total, en appliquant ces nouvelles recommandations EuroFlow pour la quantification de la MRDB par CMF, on pourra certainement améliorer les performances de notre technique.

- Conception d'un panel MRDB pour les patients sous blinatumomab.

La plupart des stratégies de gating pour la détection de la MRD dans LALB, reposent sur le CD19. Cependant, l'utilisation de l'immunothérapie anti-CD19 (blinatumomab et CART-19), entraîne souvent la disparition du CD19 à la surface des précurseurs lymphoïdes B.

Dans ce cas, l'utilisation du CD19 comme marqueur de gating de base pour la détection des blastes B résiduels, va entraîner des résultats faussement négatifs.

De ce fait, il est nécessaire de développer une nouvelle stratégie de détection de la MRD B pour les patients sous immunothérapie anti CD19.

Cherian et al (90), ont démontré qu'une nouvelle stratégie de gating basée sur le CD22 et/ou CD24 en combinaison avec le CD66b, est très efficace pour la détection de la MRDB chez les patients sous blinatumomab. L'ajout de CD24 et CD22 aura également l'avantage que les précurseurs B les plus précoces, exprimant CD24 et / ou CD22 mais pas encore CD19, peuvent être identifiés; cela peut être pertinent pour l'identification de toutes les cellules B dans les échantillons de MO de régénération.

- Réalisation d'une étude multicentrique pour la détermination des seuils pronostiques dans le cadre d'une collaboration clinico-biologique.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie :

1. Michel G. Leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant et de l'adolescent : clinique et traitement. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Pédiatrie. **2008**. 4-080-D-10.
2. Mohseni M, Uludag H, Brandwein JM. Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications. Am J Blood Res. **2018**;8(4):29-56.
3. Simonin M, Gueguen G, Strullu M. Les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. **2019**;22(2):96-107.
4. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol **2011** ;29(5) :532-543.
5. Preudhomme C, Llopis L, Boissel N. Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës. EMC Hématologie **2012**;7(1):1-17 [Article 13-018-G-05].
6. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica **2020** ;105(11):2524-2539.
7. Cavé H, Van der werff ten bosch J, Suciú S et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer–Childhood Leukemia Cooperative group. N Engl J Med. **1998** ;339(9) :591-598.
8. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood **2000** ; 96 :2691-2696.
9. Eckert C, Stackelberg AV, Seeger K et al. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia. European Journal of Cancer .**2013** ;49, 1346– 1355.

10. Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, Campana D. Clinical Utility of Sequential Minimal Residual Disease Measurements in the Context of Risk-based Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: a Prospective Study. *Lancet Oncol.* **2015** April ; 16(4): 465–474.
11. Van Dongen JJ, Van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood.* **2015**;125(26):3996–4009.
12. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front. Oncol.*2019 ; (9)726.
13. Kim IS. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical aspects and implications for clinical interpretation. *Blood Res* **2020**;55: S19-S26.
14. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2003** ;16 (4):599–612.
15. WOOD B. Minimal residual disease detection by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. 35 Ulusal Hematoloji Kongresi, 7-10 Ekim **2009**, Antalya. p. 213-214.
16. Orfao A, Flores- Montero J, Lopez A et al. Flow cytometry for MRD détection: state of the art. 1st ESLHO symposium: minimal residual disease in hematological malignancies ; 8-9 November **2012** ; Rotterdam, The Netherlands. Abstract book 2nd édition. p.21-23.
17. Garand R, Beldjord K, Cavé H et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia.* **2013** ; 27 :370–376.
18. Chérif N, Kedji L. Khelafi N, Baghdali N, Messasset M, Bouk'hil KS, Boukendakdji F. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. 35eme congrès national de la société algérienne de pédiatrie. 10-11-12 Décembre 2014. Alger, Algérie.

19. Béné MC, Lacombe F. Place-de-la-cytometrie-en-flux-dans-le-diagnostic-et-le-suivi-des-leucemies-aigues. Revue francophone des laboratoires - avril **2015** ; 471: 35-41.
20. F. Delhommeau AN. Hématopoïèse normale et sa régulation. EMC Hématologie. 2015. S1155-1984(15)32570-X.
21. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 1 nov **2001**;414(6859):105-111.
22. Lelièvre JD, Thibault G, Toubert A, Gorochov G. Origine, différenciation et répertoire lymphocytaire T. In : Chevailler A et al. Immunologie fondamentale et immunopathologie. Elsevier Masson SAS **2018**. p. 57- 67.
23. Bruton DR, Delves PJ, Martin SJ, Roitt IM. Ontogénie et phylogénie. In: Les fondements de l'immunologie.1^{er} éd. Juin **2008**. p. 233- 237.
24. Kindt TJ, Golds RA, Osborne BA. Maturation, activation et différenciation des cellules T. In : Immunologie ; le cours de Janis Kuby. 6^{eme} éd. **2008**. p. 245-271.
25. Vallat L, Gubler B, Batteux F, Garraud O, Renaudineau Y. Les lymphocytes B : diversité et ontogénèse. In : Chevailler A et al. Immunologie fondamentale et immunopathologie. Elsevier Masson SAS ; **2018**. p. 69-78.
26. Chatenaud L. Cellules de l'immunité adaptative : Lymphocyte B. In : Chatenaud L, Bach JF. Immunologie ; 5^e éd. **2008**. p. 125-135.
27. Wäsch R, Digel W, Lübbert M. Leucémie aigue lymphoblastique In : Mertelsmann R, Engelhardt M. Précis d'hématologie et d'oncologie. Paris: Springer Paris; **2011**.p. 413-427.
28. Maynadié M, Troussard X. Épidémiologie des leucémies aiguës. Revue Francophone des Laboratoires. Avril **2015** ; 471:29-33.
29. Baruchel A. Impact de la biologie dans la caractérisation, la compréhension et le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. Archives de pédiatrie.**2002** ;10 Suppl 1.

30. Lainey É. Diagnostic biologique des leucémies : exemple des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). In : Cancérologie de l'enfant. **2017** ; 30.
31. Valensia F. Classification des leucémies aiguës. Nouvelles propositions de l'OMS. Revue française des laboratoires. Juin **2002** ; 344.
32. Imbert M, Wagner- Ballon O. Place du biologiste dans la prise en charge des leucémies aiguës : de l'hémogramme à la classification OMS. Revue Francophone des Laboratoires. Avril **2015** ; 471 : 83-90.
33. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 mai **2016**;127(20):2391-405.
34. Parikh SK, Uparkar UP. Assessment of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Appl Hematol **2016**;7:47-53.
35. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. Leuk Res. **1981**; 5 :301-309.
36. Van Dongen JJ, Hooijkaas H, Comans-Bitter M et al. Human bone marrow cells positive for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), HLA-DR, and a T cell marker may represent prothymocytes., J Immunol, **1985**;135 (5) :3144-3150.
37. Greaves M, Delia D, Janossy G et al. Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen. IV. Expression on non-leukaemic 'lymphoid' cells. Leuk Res. **1980** ; 4 (1):15-32.
38. Van Wering ER, van der Linden-Schrever BE, Szczepański T et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. Br J Haematol. **2000** ; 110 (1) :139-146.

39. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2002** Mar 15;99(6):1952-1958.
40. Conter V. MRD diagnostic- introduction on ALL. 1st ESLHO symposium : minimal residual disease in hematological malignancies ; 8-9 November **2012** ; Rotterdam, The Netherlands. Abstract book 2nd éd. p. 65-66.
41. Pieters R. MRD based recognition of low risk groups for treatment reduction in childhood ALL 1st ESLHO symposium: minimal residual disease in hematological malignancies ; 8-9 November **2012** ; Rotterdam, The Netherlands. Abstract book 2nd éd. p.85-86.
42. Gokbuget N. Application of MRD diagnostic in the design of adult ALL protocols: 1st ESLHO symposium: minimal residual disease in hematological malignancies ; 8-9 November **2012** ; Rotterdam, The Netherlands. Abstract book 2nd éd. Page 73-76.
43. Clappier E, Lhermitte L. La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës lymphoblastiques : aspects biologiques. *Hématologie* **2020** ; 26(supplément 1) : 25-38.
44. Kalina J, Flores-Montero J, Van der Velden VHJ. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. **2012** ; 26, 1986–2010.
45. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes *Leukemia*. **2012** : 1908–1975.
46. Patkar N, Alex AA, Bargavi B et al. Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry Part B* **2012**; 82B: 252–258.
47. Gane P. La cytométrie en flux en immunohématologie, *Transfusion clinique et biologique*. **2002** ; (9) :271–279.

48. Autissier P. Phenotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux multiparamétrique : un outil indispensable dans l'immunopathologie du Sida. Thèse de Doctorat, Sciences du Vivant. Conservatoire national des arts et métiers – CNAM ;**2010**.
49. Jouault H, Imbert M. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. *Revue Française des Laboratoires*. **1995** ; 275:29–35.
50. El Hentatia FZ, Cristina Iobagiu, Claude Lamberta. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Francophone des Laboratoires*, Elsevier, **2009** ;**410** : 23-2.
51. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales MB et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Oncology/Hematology*.**1999** ;32 :175–185.
52. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* **2016**; 90: 47–53.
53. Bruggemann M, Schrauder A, Raff T et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia*. **2010**;24:521– 535.
54. Lacombe F, Maynadié M, Chatelain B, Béné MB. Evolution des outils informatiques d'analyse des données en cytométrie en flux. *Revue francophone des laboratoires - Vol.* **2017** ; 495 :57-61.
55. Glier H, Heijnen I, Hauwel M et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland, *Journal of Immunological Methods*, 29 **Jul 2017**, 475: 112348.
56. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, Van Dongen JJM, Orfao A. Overview of clinical flow cytometry data analysis: Recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol.* **2013** ; (31), 415–425.
57. Heel K. et al. Developments in the immunophenotypic analysis of haematological malignancies. *Blood*. **2017** ; (27) :193–207.

58. Van Dongen JJM, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **2002** ;26 : 1899–1907.
59. Johansson U et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. *Br. J. Haematol.* **2014**;65:455–488.
60. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* **2007**; 27: 469–485.
61. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* **2004**; 62: 169–173.
62. Hughes OR, Stewart R, Dimmick I, Jones EA. A critical appraisal of factors affecting the accuracy of results obtained when using flow cytometry in stem cell investigations: where do you put your gates? *Cytometry A* **2009**; 75: 803–810.
63. Costa ES, Pedreira CE, Barrena S et al. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. *Leukemia*. **2010** Nov;24(11):1927-33.
64. Orfao A, Pedreira CE, Sobral Da, Costa E. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions derived from the fusion of a group of separate flow cytometry datafiles and their multidimensional reconstruction with both actually measured and estimated flow cytometry data, European patent EP1770387B1. **2011**.
65. Kalina, T, Flores-Montero J, Lecomte Q et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: Summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytom. Part A*. **2015**; 87: 145–156.

66. Lhermitte L, Mejstrikova E, Van Der Sluijs-Gelling AJ et al. Automated database-guided expert-supervised orientation for immunophenotypic diagnosis and classification of acute leukemia. *Leukemia* **2018** ;32: 874–881.
67. Flores-Montero, J, Grigore, G, Fluxá R et al. EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods*. **2019** Dec;475:112662.
68. Flores-Montero J et al. Next generation flow (NGF) for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. **2017** Oct; 31(10): 2094–2103.
69. Theunissen P et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2016** ; 129, 347–358.
70. Bassot L. Évaluation de la cytométrie en flux pour le suivi de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant au CHU de Rouen. Thèse de Doctorat, Sciences pharmaceutiques. **2018**. dumas01932674.
71. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. nov **2003**;88(11):1245-52.
72. Mekkaoui L, Rassart C, Rozen L et al. Use of CD 123 Expression on Blasts from AML, ALL and RAEB As Minimal Residual Disease Marker. *Blood*. 3 déc **2015**;126(23):5402-5402.
73. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Loewenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytometry Part B* **2009**; 76B: 18–26.
74. Rimsza LM, Larson RS, Winter SS. Hematogone-Rich Lymphoid Proliferations Can Be Distinguished From B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by Integration of

- Morphology, Immunophenotype, Adhesion Molecule Expression, and Architectural Features *Am J Clin Pathol* **2000**;114:66-75.
75. DiGiuseppe JA, Fuller SG, Borowitz MJ. Overexpression of CD49f in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: Potential usefulness in minimal residual disease detection. *Cytometry Part B* **2009**; 76B: 150–155.
76. Roshal M, Fromm JR, Winter S, Dunsmore K, Wood BL. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: Implications for minimal residual disease detection. *Cytometry Part B* **2010**; 78B: 139–146.
77. Dworzak MN, Froöschl G, Printz D et al, on behalf of the I-BFM-ALL-FCM-MRD-Study Group. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia*, **2004** ; (18) :703–708.
78. Dericquebourg A. Mise en place du suivi de la maladie résiduelle des LAL-T par cytométrie en flux multiparamétrique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine. Lille2 : Université Henri warembourg Faculté de médecine ; **2015**.
79. Tlamçani I, Oudrhiri Benaaddach S, Abddaoui M, Benmiloud S, Hida M, Amrani Hassani M. Profil immunophénotypique des leucémies aiguës lymphoblastiques chez l'enfant. *mt pédiatrie* **2018** ; 21(3) : 149-59.
80. Fossat C, Roussel M, Arnoux I et al. Methodological Aspects of Minimal Residual Disease Assessment by Flow Cytometry in Acute Lymphoblastic Leukemia: A French Multicenter Study. *Cytometry Part B* **2015**; 88B: 21–29.
81. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2011**; 117 (23):6267-6276.
82. Dworzak MN, Buldini B. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* **2018** Jan;94(1):82-93.

83. Theunissen P et al. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection. *Br J Haematol.* **2017** Jul;178(2):257-266.
84. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood.* **2001** ;98 (8): 2498–2507.
85. Gaipa G, Basso G, Maglia O et al, on behalf of the I-BFM-ALL-FCM-MRD-Study Group. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia,* **2005** ; (19) :49–56.
86. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: Evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry Part B* **2010**; 78B: 147–153.
87. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **1990**;76:163–71.
88. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* **1992**;6 (1 Suppl.):47–59.
89. Drach J, Drach D, Glassl H, Gatringer H, and Huber H. Flow Cytometric Determination of Atypical Antigen Expression in Acute Leukemia for the Study of Minimal Residual Disease' *Cytometry revue.* **1992**.13:893-901.
90. Cherian S, Miller V, McCullouch V, Dougherty K, Fromm JR and Wood BL. A Novel Flow Cytometric Assay for Detection of Residual Disease in Patients with B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Post Anti-CD19 Therapy. *Cytometry Part B* **2018**; 94B: 112–120.

ANNEXES

Annexe 01

Fiche technique N°1

Recueil des données à l'inclusion

Nom :

Date :

Prénom :

Date de naissance :

Signes clinique :

NFS :

Frottis sanguin :

Myélogramme :

Phénotype :

Anomalies cytogénétiques :

Annexe 02
Fiche technique N°2
Fiche de suivi

Nom : **Date :**

Prénom :

Date de naissance :

Protocole thérapeutique :

MRD1 :

Date : résultat :

MRD2 :

Date résultat :

Durée d'évolution/date des dernières nouvelles.

Annexe 03

Caractéristiques des 20 patients au diagnostic

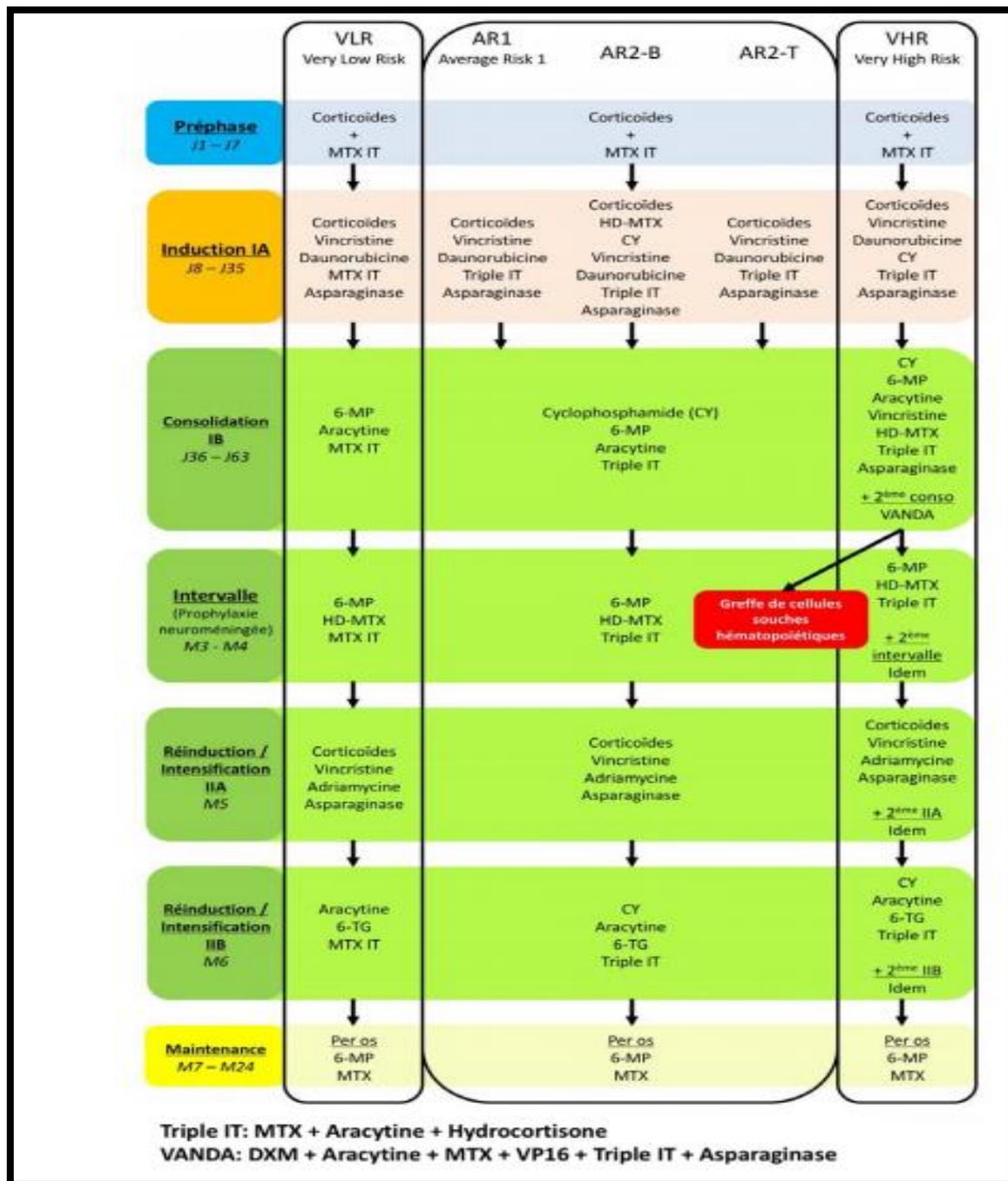
Nom Prénom	Date du diagnostic	L'âge (année)	sexe	GB G/L	Hb g/dl	Plaquettes (G/L)	Blastose sanguine (%)	Blastose médullaire (%)	Phénotype	Anomalie cytogénétique
B. Amira	20/07/18	0,91	F	91,5	6	36	96	90	BI	/
Z. MARIEM	05/11/18	14	F	41,3	8,3	48	58	72	BIII	T(9,22) négative
C. FAYCAL	02/01/19	9	M	32,5	11	108	80	84	BII	T(9,22) négative
B.YAAKOUB	03/01/19	2	M	72,2	10	77	61	86	TIII	/
A.YASMINE	26/01/19	3,5	F	78	10	33	57	98	BII	T(9,22) négative
M. NADJIA	27/02/19	5	F	68	11	80	40	90	TII	/
B.RITADJ	07/03/19	5	F	12,6	4,1	19	54	87	BII	T(9,22) négative
M.MARIEM	02/04/19	3	F	105	6,6	71	91	98	TIII	/
B. BRAHIM	17/04/19	2,5	M	7,3	8,1	45	30	80	BII	/
B.WIAM	17/04/19	13	F	1,2	6,1	49	10	98	BII	
F. ISHAK	24/04/19	2,75	M	7,44	6,6	29	5	98	BII	T (9,22) négative 04 copies du Chromosome 21
G. SELMA	29/04/19	4	F	8,64	6	21,3	80	98	BII	/
B. NIZAR	30/05/19	2	M	16,9	11	6	48	97	BII	/
B.ABDELHAKIM	18/06/19	12	M	277	11	18	83	97	TIV	/
B. BELKIS	25/06/19	5	F	12,4	13	70	35	82	TIII	/
D.A/HAKIM	30/06/19	3,5	M	19,1	6,5	26	12	90	BIV	T (8,22) positive
R. MOUNA	02/07/19	5	F	5	10	40	19	58	BII	/
M.RYADH	14/07/19	16	M	9,2	7,1	181	38	80	BIII	T(9,22) négative
N.SOFIANE	15/07/19	8	M	5,4	12	231	47	86	BIII	T(9,22) négative
I.MICIPSSA	21/07/19	0,5	M	232	7,3	112	97	98	BI	/

Annexe 04

Définition des facteurs de risque du protocole EORTC 2002

Groupe de risque	Facteurs pronostiques
VLR= Très bas risque	<p>LAL de type B et GB < 100. 000/mm³ et Index mitotique : *DNA INDEX(DI)> 1.16 et < 1.5 et nombre de chromosomes 51-66 *ou DI> 1.16 et < 1.5 et nombre de chromosomes inconnu *ou nombre de chromosomes 51 – 66 et DI non précisé. et bonne réponse à la pré phase et critères cytogénétiques et absence d'atteinte neuro méningée et testiculaire. Remarque : Tous ces critères sont requis. En l'absence de DI et des critères cytogénétiques, les patients seront obligatoirement traités comme AR.</p> <p>LMNH lymphoblastique T stade I et II</p>
AR= risque accru	<p>LAL avec bonne réponse à la préphase, qui ne sont classées ni très bas ni très haut risque Très bas risque avec atteinte neuro-méningée LMNH lymphoblastique B stade III et IV sans aucun autre facteur de haut risque LMNH lymphoblastique T.</p>
AR1	<p>LAL B avec GB< 100. 000/mm³ PL douteuse ou hémorragique, devenue négative à J4 de la pré phase. LMNH B stade III et IV LMNH T stade I et II</p>
AR2	<p>LALB avec GB≥100.000/ mm³ LALT quel que soit le taux de GB. Atteinte patente ou non équivoque du SNC à J0 ou n'importe quelle atteinte à J4. Atteinte des gonades. LMNH T stade III et IV</p>
VHR= risque très élevé	<p>Tous les patients LAL avec : Mauvaise réponse à la pré phase (≥1000 blastes/mm³ au FS) *ou t (9, 22) / bcr-abl *ou t (4 ; 11) / MLL-AF4 *ou 11q23/MLL réarrangement *ou pré- haploïdie (< 34 chromosomes ou DI ≥0.7 et < 0.8 *ou AUL ou pour LAL B : absence de RC après induction IA ou pour LALT : absence de RC ou bonne réponse partielle après induction IA ou MDR≥10⁻² à J35</p> <p>Tous les patients LMNH avec : Absence de RC ou bonne réponse partielle après induction IA</p> <p>Tous les patients à risque très élevé sont éligibles pour une greffe de moelle osseuse, excepté ceux qui ont une mauvaise réponse à la pré-phase et un des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Immunophénotype T -LALB pré-B (CD10 négatif) -GB> 100000/ mm³.

Schéma du protocole thérapeutique EORTC 2002 (suite annexe 04).

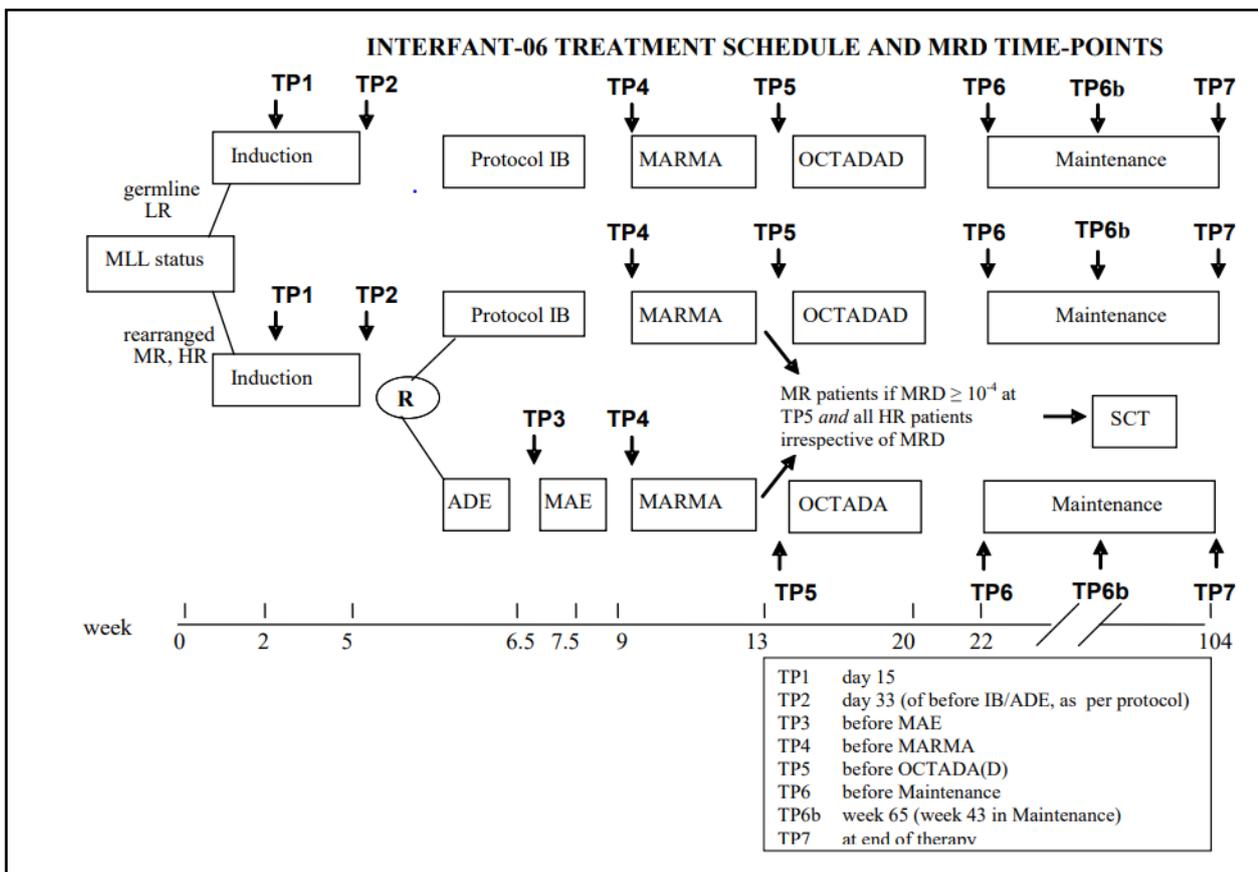


Annexe 05

Définition des facteurs de risque du protocole INTERFANT 06

Groupe de risque	Facteurs pronostiques
Risque faible	MLL germline et bonne réponse à la prednisone
Risque élevé	MLL réarrangé et âge < 6 mois et GB ≥ 300 G/L ou Mauvaise réponse à la prednisone
Risque intermédiaire	Tous les autres patients

Schéma du protocole thérapeutique INTERFANT 06

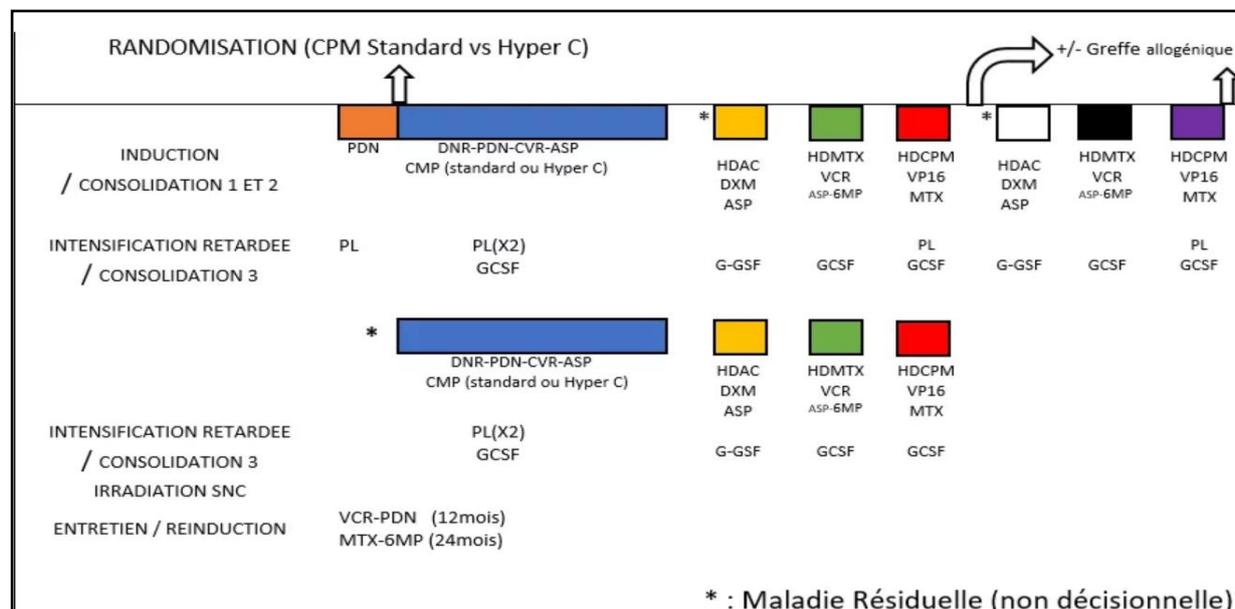


Annexe 06

Définition des facteurs de risque du protocole GRAALL 2005

Groupes de risques	<p>Deux sous-groupes de risques (risque élevé ou HR versus risque standard ou SR) sont définis en fonction des caractéristiques de base de LAL) ainsi que des critères dépendant du temps basé sur la thérapie de réponse précoce.</p> <p>Le groupe RH est défini par la présence d'au moins l'un des critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • GB > 30.000 mm² si B-lineage ALL • Atteinte du SNC (clinique et / ou morphologique) • LAL ProB (B1 pour EGIL) • t(4;11) et/ ou MLL-AF4+ LAL B • t(1 ;1) et/ ou E2A-PBXI+ LAL B • SIL-TAL ou HOX11L2 LALT • LAL haploïde ou quasi-triploïde (index ADN) • Corticorésistance après la préphase • Chimiorésistance après la première semaine de chimiothérapie • Besoin d'une deuxième cure d'induction (sauvetage) pour RC. • IgH-TCR ou transcription de fusion MRD $\geq 10^{-2}$ après d'induction (MRD-1) • IgH-TCR ou transcription de fusion MRD $\geq 10^{-2}$ après 3 blocs de consolidation (MRD-2) <p>Seuls les patients HR seront éligibles pour la GCS allogénique en première RC.</p>
--------------------	---

Schéma du protocole thérapeutique GRAALL 2005



Annexe 07 : Résultats du suivi de la MRD des patients et leur évolution clinique à la date de clôture de l'étude (31.10.2020)

Nom prénom	Date du diagnostic	l'âge	sexe	Traitement	Date MRD1	Résultat MRD1	Date MRD2	Résultat MRD2	Evolution	Etat final
B. Amira	20/07/18	0,91	F	Interant 06	/	NE	10/02/19	0.45%	Rechute (20 mois après MRD2.)	VRC sous TRT
Z.MARIEM	05/11/18	14	F	EORTC 02 VHR	14/01/19	4%	/	/	Rechute (1 mois après MRD1)	DCD
C.FAYCAL	02/01/19	9	M	EORTC 02 ARI	10/02/19	11%	18/04/19	1%	Rémission	VRC sous TRT
B.YAAKOUB	03/01/19	2	M	EORTC 02 VHR	19/02/19	N	12/05/19	N	Rechute (10 mois après MRD2)	DCD
A.YASMINE	26/01/19	3,5	F	EORTC 02 ARII	07/04/19	N	26/06/19	N	Rémission	VRC sous TRT
M.NADJIA	27/02/19	5	F	EORTC 02 ARII	14/04/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B.RITADJ	07/03/19	5	F	EORTC 02 ARI	24/04/19	N	02/07/19	N	Rémission	VRC sous TRT
M. MARIEM	02/04/19	3	F	EORTC 02 ARII	20/05/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B.BRAHIM	17/04/19	2,5	M	EORTC 02 ARI	30/05/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B.WIAM	17/04/19	13	F	EORTC 02 ARII	16/06/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
F.ISHAK	24/04/19	2,75	M	EORTC 02 ARI	23/06/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
G.SELMA	29/04/19	4	F	EORTC 02 ARI	12/06/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B.NIZAR	30/05/19	2	M	EORTC 02 ARI	11/07/19	N	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B.ABDELHAKIM	18/06/19	12	M	EORTC 02 ARII	/	NE	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
B. SABAA BELKIS	25/06/19	5	F	EORTC 02 ARII	DCD	DCD	DCD	DCD	DCD	DCD
D A. HAKIM	30/06/19	3,5	M	Protocole Burkitt	/	NE	/	NE	Rémission	VRC
R.MOUNA	02/07/19	5	F	EORTC 02 ARI	/	NE	/	NE	Perdu de vue	Perdu de vue
M.RYADH	14/07/19	16	M	GRAALL 05	/	NE	/	NE	Rémission	VRC sous TRT
N.SOFIANE	15/07/19	8	M	EORTC 02 ARII	/	NE	/	NE	Rémission	VRC (greffé)
I. MICIPSSA	21/0719	0,5	M	Interfant 06	/	NE	/	NE	Rémission	VRC sous TRT

N : négative, NE : non évaluée, DCD : décédé, VRC : vivant en rémission complète, ARI : risque faible, ARII : risque standard, VHR : haut risque, TRT : traitement.

Annexe 08

Exemple de compte rendu de MRD

**Etude de la Maladie résiduelle par cytométrie en flux multicolore Panel 8 couleurs sur
BD FACS CantoII 3 lasers**

Protocole : EORTC 2002

Point de suivi : fin d'induction (J35)

Echantillon : Moelle Osseuse

Conclusion:

Maladie Résiduelle indétectable avec une limite de détection de 10^{-4} .

Résultat exprimé par rapport aux leucocytes totaux.

Résultat validé par

Dr

Résumé

L'évaluation de la maladie résiduelle minimale est le meilleur indicateur de la réponse au traitement et du risque de rechute dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). La quantification des réarrangements clonaux des IG / TCR utilisant la PCR quantitative allélique est actuellement considérée comme le gold standard pour son évaluation dans la plupart des protocoles thérapeutiques Européens des LAL. Cependant, l'expertise technique et l'instrumentation nécessaire, limitent son application aux centres spécialisés. La mesure de la MRD par la technique de cytométrie en flux (CMF) est une approche alternative pour une application mondiale de la MRD dans les LAL.

L'objectif de notre étude est la mise en place de l'évaluation de la MRD dans les LAL de l'enfant, par la technique de cytométrie en flux multiparamétrique (8 couleurs) au laboratoire d'hématologie du CAC de Blida.

Matériel et méthodes : Il s'agit d'une étude descriptive prospective réalisée chez des enfants âgés de 16 ans ou moins, atteints de LAL. Ces patients ont été recrutés entre juillet 2018 et juillet 2019, à partir des services d'onco-hématologie pédiatriques du CHU BLIDA et du CHU Benmessous ainsi que du service d'hématologie du CAC de Blida.

Les immunphénotypes associés aux leucémies (LAIP) ont été identifiés sur un échantillon de sang ou de moelle osseuse (MO) prélevé au moment du diagnostic. L'évaluation de la MRD a été réalisée sur des échantillons de MO prélevés à la fin de l'induction (MRD1) et à la fin de la phase de consolidation (MRD2).

Résultats : 20 enfants atteints de LAL (15 LALB et 5 LAL T) ont été diagnostiqués, dont 18 ont bénéficié d'une identification de LAIP (13 LALB et 5 LALT). Dans notre étude monocentrique, l'applicabilité de l'évaluation de la MRD par CMF multiparamétrique dans les LAL a été confirmée dans 92,31% des cas de LALB et dans 100% des cas de LALT. Les combinaisons d'anticorps les plus pertinentes dans les LALB comprenaient CD38, CD123/CD66c et CD81. Les meilleures combinaisons pour mesurer la MRD dans les LAL T étaient celles contenant la TdT et CD99. Une quantification de la maladie résiduelle a été réalisée chez 13 patients sur un ou deux points de suivi: MRD1 et MRD2. Sur un total 17 échantillons analysés, 04 cas sont revenus positifs, soit un taux de MRD positive de 23,52%. Une sensibilité de 10^{-4} a été obtenue dans 70,59% des cas, avec une médiane de 445450 (352300-1000000) événement acquis. En utilisant un panel 8 couleurs, combinant les marqueurs de différenciation des cellules lymphoïdes B et des marqueurs aberrants pertinents associés aux LALB, avec une analyse multiparamétrique, des hémotogones immatures ont été identifiés dans 5 échantillons. L'analyse des résultats obtenus a fait apparaître que la pertinence du résultat de la MRD par CMF est conditionnée par les paramètres suivant: le seuil technique de sensibilité (dépendant du nombre d'évènements acquis), le seuil de représentativité de l'échantillon analysé (degré d'hémodilution), et par la spécificité des LAIP identifiés.

Conclusion : ce travail a permis de montrer que la détection de la MRD dans les LAL par la technique de CMF multiparamétrique est une méthode sensible, rapide et relativement peu coûteuse, qui est applicable à plus de 90% des patients.

Mots clés : Maladie résiduelle minimale – Leucémie aiguë lymphoblastique – Cytométrie en flux.

Summary

Assessment of minimal residual disease is the best indicator of response to treatment and risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Quantification of IG / TCR clonal rearrangements using quantitative allelic PCR is currently considered the gold standard for its evaluation in most European ALL treatment protocols. However, the technical expertise and the necessary instrumentation limit its application to specialized centers. Measurement of MRD by flow cytometry (FCM) is an alternative approach for worldwide application of MRD in ALL.

The aim of our study is to set up the assessment of MRD in children's ALL, by the multiparametric flow cytometry technique (8 colors) in the hematology laboratory of CAC in Blida.

Materials and Methods: This is a prospective descriptive study carried out on children aged 16 years or less with ALL. These patients were recruited between July 2018 and July 2019, from the pediatric oncohematology departments of CHU BLIDA and CHU Benmessous and from the hematology department of CAC Blida.

Leukemia-associated immunphenotypes (LAIP) have been identified in a sample of blood or bone marrow (BM) taken at the time of diagnosis. MRD evaluation was performed on BM samples taken at the end of induction (MRD1) and at the end of the consolidation phase (MRD2).

Results: 20 children with ALL (15 B-ALL and 5 T-ALL) were diagnosed, of which 18 were identified with LAIP (13 BCP ALL and 5 T-ALL). In our single-center study, the applicability of MRD assessment by multiparametric FCM in ALL was confirmed in 92.31% of B-ALL cases and 100% of T-ALL cases. The most relevant antibody combinations in B-ALL included CD38, CD123 / CD66c, CD81. The best combinations to measure MRD in T-ALL were those containing TdT and CD99.

Quantification of residual disease was performed in 13 patients at one or two follow-up points: MRD1 and MRD2. Out of a total of 17 samples analyzed, 04 cases were positive, i.e. a positive MRD rate of 23.52%. A sensitivity of 10^{-4} was obtained in 70.59% of cases, with a median of 445450 (352300-1000000) acquired events. Using an 8-color panel, combining B cell differentiation markers and aberrant B-ALL markers, with multiparametric analyzes, immature hematogones were identified in 5 samples. The analysis of the results obtained showed that the relevance of the result of the MRD by FCM is conditioned by the following parameters: the technical threshold of sensitivity (depending on the number of events acquired), the threshold of representativeness of the sample analyzed (degree of hemodilution), and by the specificity of the LAIP identified.

Conclusion: this study has shown that the detection of MRD in ALL by the multiparametric FCM technique is a sensitive, rapid and relatively inexpensive method, which is applicable to more than 90% of patients.

Keywords: Residual disease - Acute lymphoblastic leukemia - Flow cytometry.