

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

Spécialité :

Bio signalisation cellulaire, moléculaire et immunologie

**INTERET DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE
DANS LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES**

Présenté par

M^{elle} NEKKAL Dalia

Soutenue publiquement le 16 octobre 2014 devant le jury :

Mme Benazzouz F.	Maitre Assistante (A) à l'USDB	Présidente
Mr Djidjik R.	Pr au CHU Benni Messous	Promoteur
Mme Saadi L.	Maitre de Conférence (A) à l'USDB	Co-promotrice
Mme Eddaikra A.	Maitre Assistante (A) à l'USDB	Examinatrice
Mme Chelghoum H.	Maitre Assistante (A) à l'USDB	Examinatrice

Promotion 2013/2014

Remerciements.

*Mes sincères remerciements vont à Mr **DJIDJIK R.**, Professeur en Immunologie au laboratoire central du CHU de Benni Messous, à qui je dois la réalisation de ce travail. Après m'avoir aimablement accueillie dans son équipe et m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je le remercie de m'avoir guidé et orienté tout le long de mon mémoire, avec ses encouragements, sa rigueur scientifique, son enthousiasme positif, sa compétence et son esprit critique qui m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Je témoigne ma respectueuse gratitude à Mme **SAADI L.**, Maître de conférence (A) à la faculté des sciences biologiques de l'USDB, pour sa bienveillance à mon égard, ses précieux conseils, sa disponibilité ainsi que pour l'attention et l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux en tant que co-directrice.*

*Je tiens à remercier Mme **BENAZZOUEZ F.**, Maître Assistante (A) à l'USDB, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.*

*Je remercie Mme **EDAIKKRA A.**, et **CHELGUOUM H.**, Maître Assistante (A) à l'USDB, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe de recherche, ainsi que toute l'équipe du laboratoire central du CHU de Benni Messous, pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble, pour leurs encouragements et leur aide.

J'exprime toute ma reconnaissance et ma tendresse à mes chers parents. Je les remercie pour leurs conseils bienveillants, pour leur infatigable dévouement, pour leur disponibilité et leur soutien moral.

Je remercie plus que quiconque mes sœurs, toute ma famille et mes amis qui ont su me soutenir et m'encourager durant la réalisation de ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements pour toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dalia

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents, et plus particulièrement à mon père

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude

Pour leur soutien tout au long de

Mes études et grâce à qui

J'e suis là aujourd'hui

Que Dieu vous garde

A mes chères sœurs et à mes grands parents

Pour leur écoute et leurs encouragements très précieux

A tous mes amis sans exception

Pour leur présence et leur soutien

A tous ceux que j'aime

Résumé

Les travaux de recherche objet de ce mémoire, ont été réalisés au niveau du laboratoire central du CHU de Benni Messous. Le travail consistait à faire l'immunophénotypage par cytométrie en flux des patients, qui, par la cytochimie étaient suspectés d'avoir une leucémie aigue, et ce dans le but de poser le diagnostic.

Dans une première partie, nous rappelons à travers une étude bibliographique l'origine des leucémies aigues et leur classification, nous présentons les données nécessaires à la compréhension du travail, de son contexte et de ces enjeux.

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons étudié et décrit les éléments qui interviennent dans différentes étapes de l'immunophénotypage. Le diagnostic des leucémies aiguës repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Parmi ces derniers, l'examen morphologique et la définition immunophénotypique de la population blastique sont les deux éléments les plus précoces qui orientent le clinicien vers la bonne démarche thérapeutique. Depuis l'essor des anticorps monoclonaux permettant une identification précise des protéines exprimées, entre autres, par les leucocytes, l'identification d'associations moléculaires caractéristiques de l'engagement et de la progression des cellules dans une des lignées hématopoïétiques a connu une sophistication croissante et autorisé un positionnement précis des blastes dans ces voies de différenciation. En parallèle, sur la base de l'identification des antigènes de différenciation exprimés par ces blastes, la cytométrie en flux est devenue depuis une vingtaine d'années l'outil de choix pour la caractérisation fine des cellules leucémiques. Cette technologie encore en plein développement associe un éventail exponentiel d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes de plus en plus variés, une progression importante de la fiabilité des instruments et une puissance accrue des logiciels d'analyse des données obtenues. Au cours de notre recherche, nous avons confirmés l'intérêt de l'immunophénotypage dans le diagnostic des leucémies aigues, qui s'avère également être un excellent exemple de la pertinence de l'utilisation de la cytométrie en flux.

Dans ce memoire, après un rappel des types principaux de leucémies aiguës, nous détaillons les étapes physiologiques de l'hématopoïèse, identifiables par cytométrie en flux. Nous abordons ensuite l'application de cette technologie au diagnostic des leucémies aiguës, y compris pour les formes frontières et le suivi des patients.

Mots clés : Leucémies aigues, Hémopathies malignes, Anticorps monoclonaux, Cytométrie en flux, Immunophénotypage

Abstract

The research aim of this thesis were performed in the central laboratory of the University Hospital of Benni Messous. The job was to immunophenotyping by flow cytometry in patients who, for cytochemistry were suspected of having acute leukemia, and in order to make the diagnosis.

In the first part, we recall through a literature study the origin of acute leukemia and their classification, we present the necessary understanding of the work data, its context and the issues.

In the second part of this thesis, we studied and describes the elements involved in different stages of immunophenotyping. The diagnosis of acute leukemia based on clinical and laboratory of arguments. Of these, morphological examination and immunophenotypic definition of the population are the two blast earlier elements that guide the clinician to the correct therapeutic approach. Since the development of monoclonal antibodies for accurate identification of proteins expressed, among others, by leukocytes, the identification of molecular associations characteristics of the commitment and progression of cells in a hematopoietic lineages has been growing in sophistication and permitted accurate positioning in these blasts differentiation pathways. In parallel, based on the identification of differentiation antigens expressed by these blasts, flow cytometry has become the last twenty years the tool of choice for fine characterization of leukemic cells. Yet this developing technology combines an exponential range of conjugated fluorochromes increasingly diverse, a significant increase in the reliability of instruments and increased power analysis software data obtained monoclonal antibodies. During our research, we have confirmed the value of immunophenotyping in the diagnosis of acute leukemia, which also happens to be an excellent example of the relevance of the use of flow cytometry.

In this memory, after a review of the main types of acute leukemia, we show the identifiable by flow cytometry physiological stages of hematopoiesis. We then discuss the application of this technology in the diagnosis of acute leukemia, including the borders forms and patient monitoring.

Keywords: acute leukemia, Hematologic malignancies, Monoclonal Antibodies, Flow Cytometry, Immunophenotyping

ABBREVIATIONS

CD : Cluster de Différenciation

CMF : Cytométrie de flux

EDTA :Ethylène Diamine Tétra-Acétique .

EGIL : European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

FAB : French-American-British

GB : Globule blanc

GR : Globule Rouge.

HLDA : human leukocyte differentiation antigens

LA : Leucémie Aiguë

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

MPAL : Leucémie Aiguë de Phénotype Mixte

MPO : Myéloperoxydase

MRD : évaluation de la maladie résiduelle

Na : Fluorure de sodium

NASDA : Naphtol-ASD-Acétate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

LAIP : leukemia associated immunophenotypic patterns

TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase

Analyse cytogénétique: Processus d'analyse du nombre et de la taille des chromosomes.

Cellule souche: Cellule primitive, présente principalement dans la moelle.

Différenciation: Processus par lequel les cellules souches dépourvues de structure ou de caractéristiques fonctionnelles particulières engendrent des cellules fonctionnelles.

Érythrocytes: Synonyme de globules rouges.

Globules blancs: Synonyme de « leucocytes ». Le sang est composé de cinq principaux types de globules blancs : les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes et les lymphocytes.

Globules rouges: Cellules sanguines qui contiennent l'hémoglobine, laquelle se fixe à l'oxygène et en assure le transport aux tissus de l'organisme.

Granulocyte: Type de globule blanc caractérisé par un cytoplasme riche en granulations.

Immunophénotypage: Technique d'étude des cellules basées sur la reconnaissance des protéines par des anticorps, qu'il s'agisse de protéines qui se trouvent à la surface ou à l'intérieur des cellules.

□

Lymphoblaste: Cellule leucémique maligne, précurseur des lymphocytes qui se multiplie de manière incontrôlée dans la LAL.

Lymphocyte: Type de globule blanc essentiel au fonctionnement du système immunitaire de l'organisme.

□

Maladie résiduelle: Quantité de cellules malignes qui persistent après l'administration d'un traitement. Pour la mesurer, diverses techniques de laboratoire peuvent être utilisées.

Moelle osseuse: Tissu logé dans les cavités présentes à l'intérieur des os et où sont produites, notamment, les cellules du sang.

Mutation: Altération s'opérant dans un gène à la suite de la modification de l'ADN d'une cellule.

Pro géniteurs hématopoïétiques: ou « cellules souches ». Ils sont responsables de la production de toutes les cellules du sang et du système immunitaire.

Ponction de moelle osseuse: Ponction osseuse généralement réalisée dans le sternum (thorax) ou dans la crête iliaque postérieure (bassin) sous anesthésie locale et au cours de laquelle quelques millilitres de moelle sont prélevés pour analyse.

Sommaire

Résumé

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. Généralités sur les leucémies aiguës	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Classification des leucémies aiguës.....	4
I.1.2.1. Les leucémies aiguës myéloïdes.....	4
I.1.2.2. Les leucémies aiguës lymphoblastiques.....	5
I.1.2.3. Les leucémies aiguës de lignée ambiguë.....	7
I.2. Epidémiologie des leucémies aiguës	8
I.2.1. Incidences des leucémies aiguës myéloïdes.....	8
I.2.2. Incidences des leucémies aiguës lymphoblastiques.....	9
I.3. Origine des leucémies aiguës	10
I.3.1. HEMATOPOÏÈSE	10
I.3.2. Cancérogenèse.....	10
I.3.2.1. Les anomalies génétiques qui causent les leucémies aiguës.....	12
I.4. Facteurs de risques	13
I.4.1. Facteurs constitutionnels.....	14
I.4.2. Facteurs acquis.....	15
I.4.3. Facteurs environnementaux et professionnels.....	15

I.5. Etapes du diagnostic des leucémies aiguës.....	16
I.5.1. Numération formule sanguine.....	16
I.5.2. Myélogramme.....	17
I.5.3. Cytochimie.....	17
I.5.4. Immunophénotypage par cytométrie en flux.....	18
I.5.5. Etude cytogénétique.....	20
I.5.6. Etude en biologie moléculaire.....	20

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Patients étudiés.....	21
II.2. Matériels biologiques	22
II.2.1. Prélèvement	22
II.3. Matériels non biologiques.....	23
II.3.1. Matériels requis.....	23
II.3.1.1. Réactifs.....	23
II.3.1.2. Tampons.....	24
II.3.1.3. Matériels.....	24
II.3.2. Durée de l'expérimentation.....	24
II.4. Technique de la cytométrie en flux	25
II.4.1. Principe.....	25
II.4.2. Mode opératoire.....	29

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1.Répartition de la population étudiée selon différents

paramètre.....	31
III.1.1. l'âge.....	31
III.1.2. Le sexe.....	32

III.2.Résultats de l'analyse quantitative.....33

III.2.1. Interprétation des résultats en fonction du type de leucémie aigue diagnostiqué.....	35
III.2.2. Interprétation des résultats en fonction du profil immunophénotypique des leucémies aigues diagnostiquées.....	37

Conclusion et perspectives.....51

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1	Répartition des leucémies aiguës par région en Algérie.	9
Figure 2	Différenciation myéloïde normale et origine des différentes hémopathies myéloïdes.	11
Figure 3	Origine des différentes hémopathies lymphoïdes.	11
Figure 4	Leucémogénèse : processus multi étape.	12
Figure 5	Type de prélèvement utilisé dans cette étude.	22
Figure 6	Cytomètre en flux utilisé dans cette étude.	24
Figure 7	Informations « morphologiques » apportées par la CMF.	25
Figure 8	Principe de la cytométrie de flux.	26
Figure 9	Exemple de longueur d'onde de différents fluorochromes.	27
Figure 10	Schéma montrant le rôle du CD45.	27
Figure 11	Aspect du Le scattergram CD45/SSC chez les différents types de LAM.	28
Figure 12	Répartition des patients selon les classes d'âges.	31
Figure 13	Répartition des patients selon le sexe.	32
Figure 14	Leucémies aiguës diagnostiquées.	35
Figure 15	Type de leucémie aiguës diagnostiquée selon l'âge.	36
Figure 16	Profil immunophénotypique d'une LAM 5.	38
Figure 17	Profil immunophénotypique d'une LAM 4.	40
Figure 18	Profil immunophénotypique d'une LAM 7.	42
Figure 19	Profil immunophénotypique d'une LAL BII.	45
Figure 20	Profil immunophénotypique d'une LAL TIII corticale.	48
Figure 21	Profil immunophénotypique des deux LAM 1 diagnostiquées.	Annexe 1
Figure 22	Profil immunophénotypique d'une LAM 2 diagnostiquées.	Annexe 1

Figure 23	Profil immunophénotypique d'une LAM 3 diagnostiquées.	Annexe 1
Figure 24	Profil immunophénotypique d'une LAM 6 diagnostiquées.	Annexe 1
Figure 25	Profil immunophénotypique d'une LAL BII (LAL Pré-pré-B Commune) diagnostiquées.	Annexe 2
Figure 26	Profil immunophénotypique d'une LAL-B matures ou de type IV diagnostiquées.	Annexe 2
Figure 27	Profil immunophénotypique des deux LAL-T I diagnostiquées.	Annexe 3

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau I	Caractéristiques phénotypiques des leucémies aiguës myéloïdes.	4
Tableau II	Classification immunophénotypique des leucémies aiguës lymphoïdes B selon l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).	6
Tableau III	Classification immunophénotypiques des leucémies aiguës lymphoïdes T selon l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).	6
Tableau IV	Système de score de l'EGIL pour les leucémies aiguës biphénotypiques.	7
Tableau V	Répartition des LAM selon la classification FAB.	8
Tableau VI	Principaux facteurs de risque des leucémies aigues.	14
Tableau VII	Agents cytotoxiques impliqués dans les leucémies aigues thérapie-induites.	16
Tableau VIII	Caractéristiques générales des patients.	21
Tableau IX	Les différents marqueurs utilisés.	23
Tableau X	Caractéristiques des fluorochromes les plus utilisés.	27
Tableau XI	Protocole de marquage commun au LAM et LAL.	29
Tableau XII	Protocole de marquage qui s'ajoute au précédent dans le cas d'une LAL B (a) et LAL T (b).	29
Tableau XIII	Représentation des résultats des profils masculins leucémiques diagnostiqués.	33
Tableau XIV	Représentation des résultats des profils féminins leucémiques diagnostiqués.	34
Tableau XV	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAM5.	39
Tableau XVI	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAM7.	43
Tableau XVII	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LALB.	46
Tableau XVIII	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAL T.	49
Tableau XIX	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAL B-II (LAL pré-pré-B commune).	Annexe 2
Tableau XX	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAL B-IV (LAL B mature).	Annexe 2
Tableau XXI	Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAL T-I (LAL pro – T).	Annexe 3

Le diagnostic des leucémies aiguës repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Parmi ces derniers, l'examen morphologique et la définition immunophénotypique de la population blastique, sont les deux éléments les plus précoces qui orientent le clinicien vers la bonne démarche thérapeutique (Bene *et al.*, 2013).

Depuis l'essor des anticorps monoclonaux permettant une identification précise des protéines exprimées, l'identification d'associations moléculaires caractéristiques de l'engagement et de la progression des cellules dans une des lignées hématopoïétiques a connu une sophistication croissante et autorisé un positionnement précis des blastes dans ces voies de différenciation (Merle-Béral *et al.*, 2014).

En parallèle, sur la base de l'identification des antigènes de différenciation exprimés par ces blastes, l'immunophénotypage par cytométrie en flux est devenue depuis une vingtaine d'années l'outil de choix pour la caractérisation fine des cellules leucémiques. Une des applications principales de la cytométrie en flux au sein d'un laboratoire d'hématologie ou d'immunologie est d'aider le biologiste à caractériser au mieux les cellules qui se multiplient de manière anarchique dans les leucémies aiguës ou dans les processus lymphomateux (Kwong *et al.*, 2010).

L'immunophénotypage n'a pas pour objet de remplacer les techniques traditionnelles utilisées pour le diagnostic de ces pathologies. La cytologie et l'histologie restent les techniques de référence pour la classification de ces entités. Toutefois, la cytométrie en flux ainsi que la cytogénétique et la biologie moléculaire permettent d'obtenir des informations complémentaires permettant de mieux définir ces entités et de fournir des éléments importants pour définir l'agressivité d'un processus néoplasique, de prédire la réponse à une thérapie particulière ou encore pour suivre l'évolution de la maladie au cours du traitement (Vardiman *et al.*, 2008).

Cette technologie encore en plein développement associe un éventail exponentiel d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes de plus en plus variés, une progression importante de la fiabilité des instruments et une puissance accrue des logiciels d'analyse des données obtenues (Kwong *et al.*, 2010).

Ainsi, l'objectif de ce travail est de montrer l'apport de l'immunophénotypage dans le diagnostic des leucémies aiguës à travers la synthèse d'un recueil de six mois de diagnostics de leucémies aiguës au laboratoire central du C.H.U de Benni Messous, Alger.

Après un rappel des connaissances sur l'immunophénotypage ainsi que la classification des leucémies aiguës et les facteurs de risque pouvant être incriminés dans la leucémogénèse, nous aborderons ensuite l'application de cette technologie au diagnostic des leucémies aiguës, en évoquant la préparation des échantillons, le choix du panel de marqueurs ainsi que l'acquisition des résultats. La présentation et l'interprétation des résultats sont suivies d'une conclusion et des perspectives.

I. 1. Généralités sur les leucémies aiguës

I.1.1. Définition

Les leucémies aiguës sont des cancers des cellules hématopoïétiques caractérisés par l'accumulation de cellules paraissant « figées » à une étape de maturation, généralement précoce, et qualifiées de « blastes ». Ces cellules sont essentiellement présentes dans la moelle osseuse, mais on peut observer une blastose sanguine et des localisations tumorales dans le foie, la rate et/ou les ganglions. Certaines formes sont par ailleurs associées à une localisation méningée (Belson *et al.*, 2007).

Toutes les lignées hématopoïétiques peuvent être touchées par le processus leucémogène (Le Garff-Tavernier *et al.*, 2014). On distingue ainsi:

- Des leucémies lymphoblastiques (LAL), qui peuvent concerner la lignée B ou la lignée T ;
- Des leucémies myéloblastiques (LAM), caractérisées par une prolifération des formes les plus immatures de cellules myéloïdes ou présentant une orientation plus franche vers la lignée granuleuse ou la lignée monocyttaire ;
- Des leucémies érythroblastiques ;
- Des leucémies mégacaryocytaires.

A la fin des années 1970, la classification franco-américano-britannique (FAB) a utilisé les caractéristiques morphologiques des cellules blastiques examinées au microscope pour distinguer trois formes de LAL et huit formes de LAM, parmi lesquelles les entités M6 et M7 représentant respectivement les leucémies érythroblastiques et mégacaryocytaires.

En 2008, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a abandonné cette nomenclature, mais mentionne de façon systématique les caractéristiques cytogénétiques et immunophénotypiques des hémopathies malignes (Vardiman *et al.*, 2009).

I.1.2. Classification des leucémies aiguës

I.1.2.1. Les leucémies aiguës myéloïdes

La LAM est une expansion clonale de blastes myéloïdes. C’est une pathologie, tous âges confondus, plus fréquente que la LAL. La classification des leucémies aiguës a été proposée en 1976 par le groupe FAB (Bennett *et al.*, 1976). Elle est fondée sur l’aspect morphologique des blastes sur les frottis médullaires colorés au May Grünwald Giemsa, sur les résultats des colorations cytochimiques des myéloperoxydases et des estérases sur frottis et sur les données immunophénotypiques. Dans le cas d’un diagnostic de leucémie aiguë myéloïde, cette classification FAB est toujours utilisée par les cytologistes. Les réactions cytochimiques utilisées dans le diagnostic des LA ont pour but d'aider à préciser la lignée d'appartenance des blastes en montrant la présence ou l'absence d'activité d'enzymes caractéristiques. La définition de leucémie aiguë selon le groupe FAB repose sur un taux de blastes supérieur ou égal à 30 %. On distingue 8 catégories de LAM en fonction de la différenciation cellulaire de la moelle osseuse vers une ou plusieurs lignées cellulaires et du degré de maturation des cellules, le phénotypage immunologique des cellules blastiques est un des paramètres de la nouvelles classification de l’OMS des 2002 (Bennett *et al.*, 2001).

Tableau I : Caractéristiques phénotypiques des leucémies aiguës myéloïdes.

CD	M0	M1	M2	M3	M4		M5	M6	M7
CD34	+++	+++	++	+/-	+	-	-/+	-/+	+/-
CD117	+++	+++	++	+/-	+	-/+	-/+	-/+	+/-
HLADR	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+/-	+/-
CD13	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+/-	+/-
CD33	+++	+++	+++	++	++	++	++	+/-	+/-
MPO cy	-	+	++	+++	++	+/-	+/-	-	-
CD15, CD16	-	-	+/-	+	-	+	+	-	-
CD14	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CD64	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CD11a, b et c	-	-	-	-	-	++	++	-	-
CD235a AGA	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CD41aCD42b	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+
CD61	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+
CD36	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CD71	-	-	-	-	-	-	-	++	-

(Vardiman *et al.*, 2002)

LAM-0 : leucémie aiguë myéloïde peu différenciée ; LAM-1 : leucémie aiguë myéloïde sans maturation ; LAM-2 : leucémie aiguë myéloïde avec maturation ; LAM-3 : leucémie aiguë promyélocytaire ; LAM-4 : leucémie aiguë myélomonocytaire ; LAM-5 : leucémie aiguë monoblastique/monocytaire ; LAM-6 : érythroleucémie ; LAM-7 : leucémie aiguë mégacaryoblastique ; CD : classe ou « *cluster* » de différenciation ; MPO cy : myéloperoxydases intracytoplasmiques ; AGA : glycophorine A.

I.1.2.2. Les leucémies aiguës lymphoblastiques

Les LAL sont des proliférations malignes clonales aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de cellules immatures de la lignée lymphoïde, bloquées au stade lymphoblastique. Le diagnostic de LAL a été longtemps fondé sur la simple morphologie des blastes et la négativité de la cytochimie de la myéloperoxydase. La classification FAB distinguait 3 groupes : L1, L2 et L3 ; la LAL-L3 étant la LAL à cellules de Burkitt. La classification L1/L2 reposait sur un système de score fondé sur quatre critères : le rapport nucléocytoplasmique, le contour du noyau, la présence de nucléoles et la taille cellulaire (Bennett *et al.*, 2001).

La mise en évidence par cytométrie en flux de marqueurs cellulaires membranaires et intracytoplasmiques a permis d'affirmer la nature lymphoïde des blastes, de distinguer les LAL à précurseurs B (LAL-B) et les LAL à précurseurs T (LAL-T) puis d'individualiser différents sous-groupes. Les phénotypes immunologiques des LAL sont définis à partir des stades physiologiques de la maturation des cellules lymphoïdes dans la moelle osseuse et le thymus (classification EGIL) (Castoldi *et al.*, 1995).

Tableau II : Classification immunophénotypique des leucémies aiguës lymphoïdes B selon l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).

EGIL	Autres classifications	Marqueurs	Autres marqueurs
B-I	pro B	CD19+, cCD79a+,	TdT+ CD10- cIgM- sIg-(κ ou λ)
B-II	commune	CD22+ (s ou c) (au	TdT+ CD10+ cIgM- sIg-(κ ou λ)
B-II I	pré B	moins 2 des 3	TdT+ CD10+ cIgM+ sIg-(κ ou λ)
B-IV	B mature	marqueurs), DR+	TdT- CD10+/- cIgM+ sIg+(κ ou λ)

(Valensi *et al.*, 2003)

Tableau III : Classification immunophénotypiques des leucémies aiguës lymphoïdes T selon l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).

EGIL	Equivalent « physiologique »	Marqueurs communs	Autres marqueurs
T-I	Pro T	cCD3+, CD7+, TdT+, DR+	Aucun
T-II	Pré T		CD2+ CD5+/- sCD3- CD1a-
T-III	Cortical		CD2+ CD5+ CD4+ CD8+ CD1a+ sCD3-
T-IV	T mature		T-IVa : CD2+ CD5+ sCD3+ TCRα/β+ CD4+ ou CD8+ T-IVb : CD5+ sCD3+ TCRγ/δ+ CD2- CD4- CD8-

(Valensi *et al.*, 2003)

TdT : terminal desoxyribonucleotidyl transferase, c: intracytoplasmique ; s: surface, TCR: T-cell receptor

I.1.2.3. Les leucémies aiguës de lignée ambiguë

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

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

Les LA biphénotypiques Seul l'examen par cytométrie de flux est susceptible d'identifier la leucémie aiguë biphénotypique. Les blastes coexpriment des marqueurs myéloïdes et lymphoïdes B et/ou T. En 1995, l'EGIL présentait les critères de classification de LA avec expression de marqueurs biphénotypiques. Le système de score de l'EGIL est fondé sur la présence d'un certain nombre d'antigènes ayant différents niveaux de pondération (tableau IV).

L'assignation à une lignée nécessite un score strictement supérieur à 2 (bene *et al.*, 1995).

Tableau IV : Système de score de l'EGIL pour les leucémies aiguës biphénotypiques.

Score	Marqueurs B	Marqueurs T	Marqueurs myéloïdes
2	CD79a cIgM cCD22	CD3 TCR	Anti-MPO (lysozyme)
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CD65 CD117
0,5	TdT CD24	TdT CD1a CD7	CD14 CD15 CD64

(bene *et al.*, 1995)

I.2. Epidémiologie des leucémies aiguës

Les leucémies aiguës myéloïdes représentent environ 0,9 cas / 100 000 habitants contre 3/100 000 habitants/an dans les pays développés, et un peu moins de 10 % de l'ensemble des hémopathies malignes. Sur les dix dernières années, l'incidence des LA en Algérie augmente de façon modérée et régulière, avec un taux annuel moyen d'évolution de 0,9 % sur l'ensemble de la période, aussi bien chez l'homme que chez la femme (Troussard *et al.*, 2009).

En 2010, les taux d'incidence estimés (standardisés sur la population mondiale) sont de 4,7 pour 100 000 habitants chez l'homme et de 3,7 pour 100 000 habitants chez la femme. Le taux de mortalité par leucémie aiguë a tendance à progresser également entre 2000 et 2010 d'après le rapport de projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010. La hausse concerne essentiellement les décès survenus à plus de 65 ans et elle est du même ordre pour les hommes et les femmes (Belot *et al.*, 2005).

I.2.1. Incidences des leucémies aiguës myéloïdes

Les leucémies aiguës d'origine myéloïde prédominent chez l'adulte : elles représentent 75-80 % des cas de LA contre 20 à 25 % d'origine lymphoïde. L'incidence des LAM augmente avec l'âge, surtout après 50 ans pour les deux sexes, avec cependant une prédominance masculine. Les leucémies aiguës myéloïdes se répartissent de la façon suivante selon la classification FAB et la classification OMS.

Tableau V : Répartition des LAM selon la classification FAB.

M0	Myéloblastique, indifférenciée	2-3 % des LAM
M1	Myéloblastique, sans différenciation	20 %
M2	Myéloblastique, avec différenciation	30 %
M3	Promyélocytaire	10 %
M4	Myélomonocytaire	15-20 %
M5	Monocytaire	10-15 %
M6	Érythroleucémie	5 %
M7	Mégacaryocytaire	2 %

(Brionne *et al.*, 2009)

I.2.2. Incidences des leucémies aigues lymphoblastiques

Les LAL représentent environ 80 % des cas de LA chez l'enfant, et 85 % d'entre elles sont des LAL-B alors que la fréquence des LAL augmente avec l'âge avec un pic d'incidence à 50 ans chez l'adulte (Brionne *et al.*, 2009).

Les données épidémiologiques concernant les leucémies aiguës de lignée ambiguë sont rares. Ces LA biphénotypiques sont estimées entre 3 à 4 % des LA. Elles sont observées aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Troussard *et al.*, 2006 ; Weinberg *et al.*, 2010).

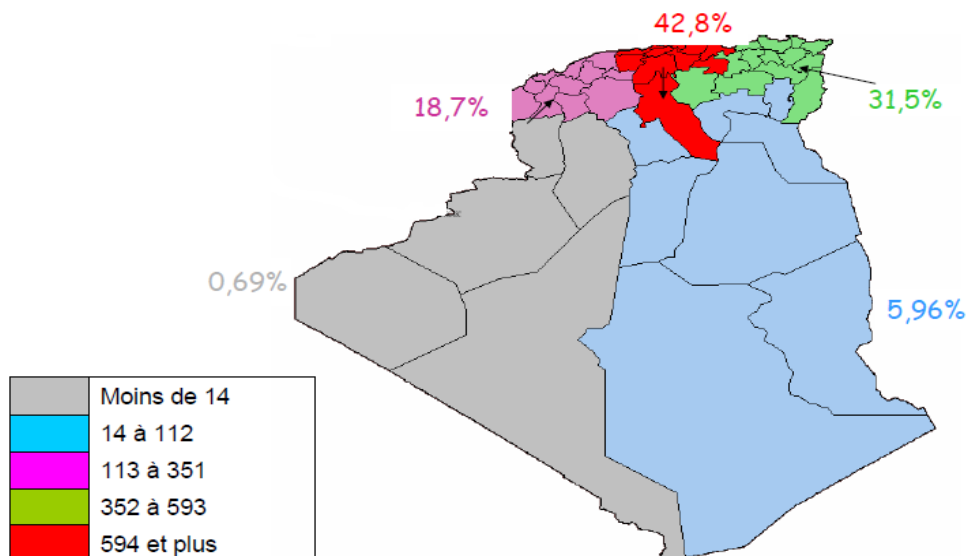


Figure 1 : Répartition des leucémies aigues par région en Algérie (Benakli *et al.*, 2009).

La répartition des patients montre une origine géographique prédominante au centre ou existe un nombre de services d'hématologie et de pédiatrie plus élevé. L'inégalité de répartition entre les régions Est (31,5) et Ouest (18,7) s'explique probablement par une plus grande densité de la population à l'Est du pays. Le taux faible en provenance du sud du pays doit alerter les pouvoirs publics de la nécessité d'ouvrir des services spécialisés de proximité vu l'éloignement et le coût élevé des déplacements vers les services du nord (Benakli *et al.*, 2009).

I.3. Origine des leucémies aiguës

I.3.1. HEMATOPOÏÈSE

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au renouvellement continu et régulé des cellules sanguines. Cette activité de production a pour origine une cellule souche commune totipotente qui va se différencier vers la voie myéloïde ou vers la voie lymphoïde. Dans le premier cas, elle va donner des progéniteurs qui se différencieront vers les cellules myéloïdes que sont les globules rouges, plaquettes, granulocytes et monocytes. Dans le deuxième cas, la différenciation aboutira aux lymphocytes (Dick *et al.*, 2008).

L'hématopoïèse doit être contrôlée afin de maintenir à peu près constant le nombre de cellules sanguines malgré des variations de consommation importantes liées à des circonstances physiologiques (infections, hémorragies...). Cette régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux (facteurs de croissance, interleukines) qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse.

I.3.2. Leucémogénèse

La leucémogénèse est l'ensemble des mécanismes responsables d'une prolifération cellulaire avec blocage de la maturation. Le processus leucémique est donc l'apparition d'un clone cellulaire provenant d'une cellule immature à un moment quelconque de sa différenciation. Le type de leucémie aiguë est ainsi déterminé par l'origine de la lignée cellulaire dont provient le clone et par le degré de différenciation atteint au moment de la transformation maligne comme le montre la figure 2. Ces cellules malignes envahissent la moelle osseuse et peuvent passer dans le sang. Elles sont bloquées dans leur différenciation, et ne peuvent aboutir à une hématopoïèse normale et efficace (Muller-Hermelink *et al.*, 2008).

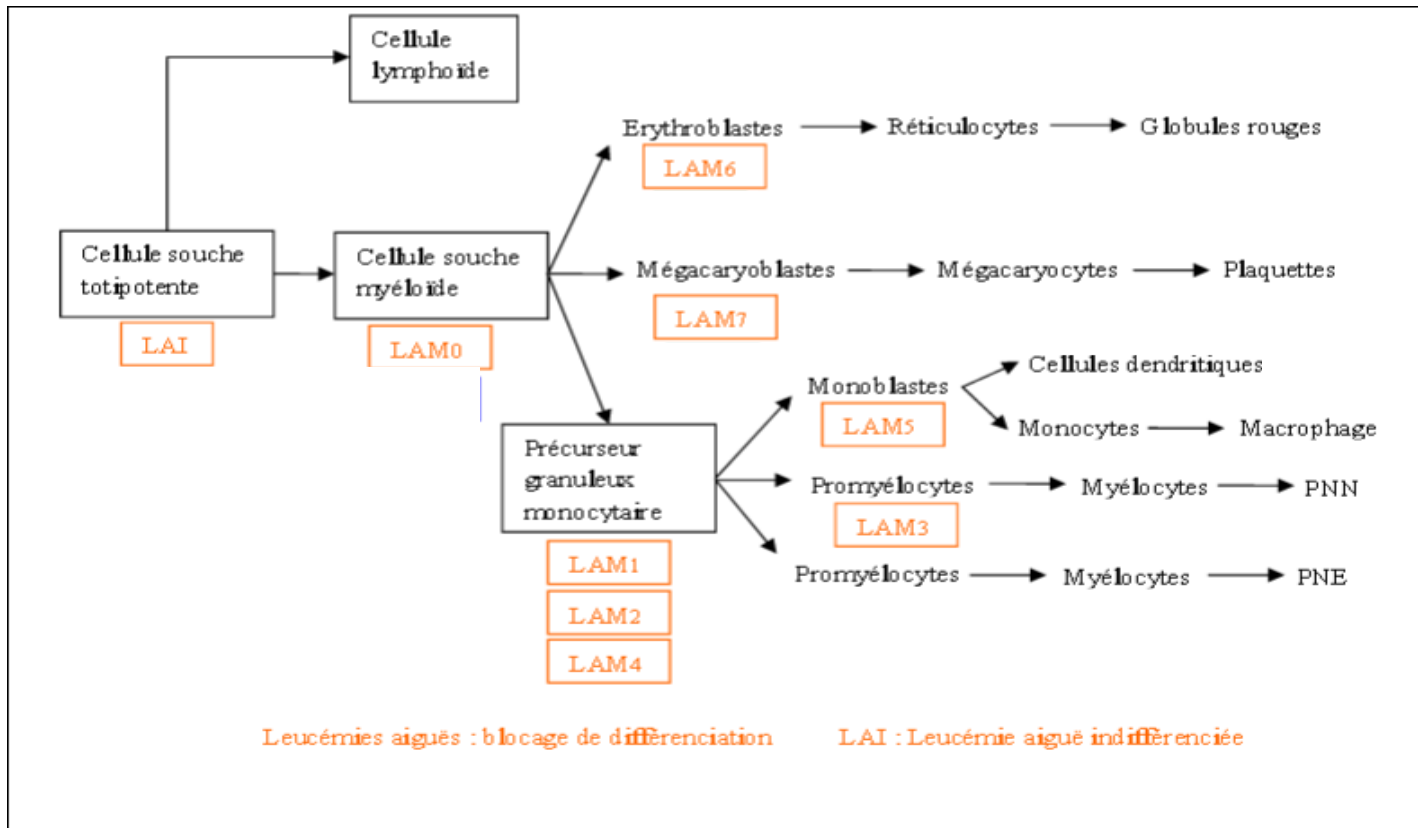


Figure 2 : Différenciation myéloïde normale et origine des différentes leucémies myéloïdes (Muller-Hermelink *et al.*, 2008).

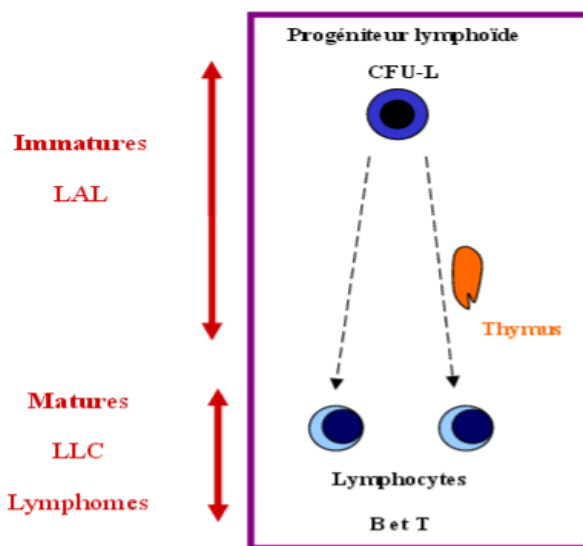


Figure 3 : Origine des différentes hémopathies lymphoïdes (Dick *et al.*, 2008).

Actuellement, les processus de leucémogénèse mis en jeu restent incertains mais l'implication d'une cellule souche leucémique présentant une capacité d'autorenouvellement ou d'un progéniteur ayant acquis cette capacité par l'accumulation de mutations génétiques, restent des modèles de référence (Dick *et al.*, 2008 ; Llopis *et al.*, 2009).

I.3.2.1. Les anomalies génétiques qui causent les leucémies aiguës

Selon le « two-hit model » de Gilliland, les évènements oncogéniques clés qui vont conduire à la leucémie sont divisés en deux classes d'anomalies génétiques (Gilliland *et al.*, 2002 ; Llopis *et al.*, 2009) :

- Evènements de type I conférant un avantage prolifératif et/ou une résistance à l'apoptose du clone malin. Les gènes mutés dans cette catégorie, sont des acteurs clés des voies de signalisation intracellulaire (récepteurs de tyrosine kinase FLT3, RAS, c-KIT). Ces anomalies ont conduit à la mise en évidence d'anomalies de la transduction du signal intracellulaire des cellules leucémiques.
- Evènements de type II induisant un blocage de différenciation cellulaire impliquant principalement des facteurs de transcription, mutés ou le plus souvent impliqués dans des translocations chromosomiques récurrentes (AML1-ETO, PML-RAR α ...).

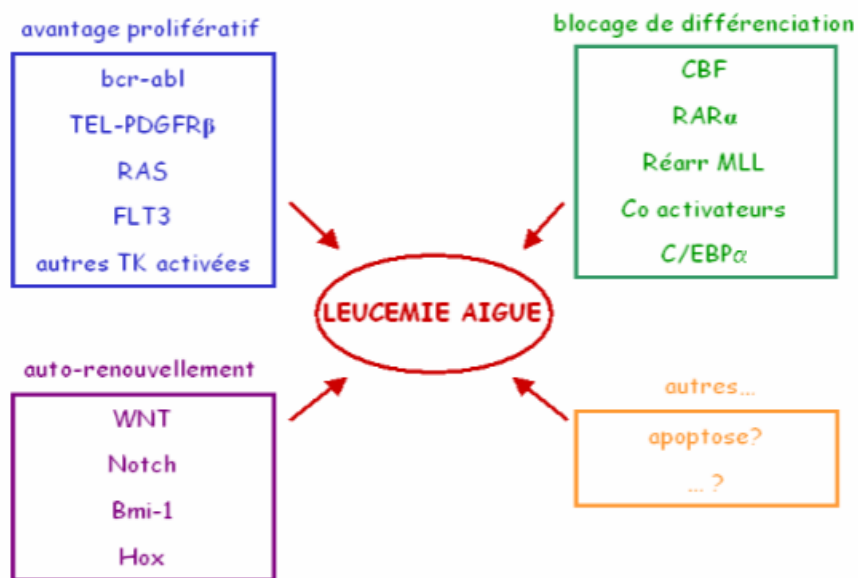


Figure 4 : Leucémogénèse : processus multi étape (Dick *et al.*, 2008).

Schématiquement la physiopathologie des LA peut se faire comme suit :

- Fréquence des translocations récurrentes intéressant des facteurs de transcription :

Production de protéines chimériques (LAM) ou activation de gènes par des promoteurs spécifiques de lignées (LAL)

Blocage de la différenciation.

Avantage de prolifération/ défaut d'apoptose.

Prolifération monoclonale de cellules hémato-poïétiques jeunes, s'accompagnant d'une insuffisance médullaire. Ces mutations génétiques sont souvent insuffisantes à elles seules pour induire une leucémie aiguë. Dans la plupart des cas, de nombreux facteurs variés peuvent être mis en cause dans la survenue d'une leucémie aiguë (Dick *et al.*, 2008).

I.4. Facteurs de risques

L'étiologie des leucémies aiguës demeure inconnue. Cependant un certain nombre de facteurs de risque ont pu être clairement identifiés comme augmentant le risque de leucémie aiguë alors que d'autres facteurs ne sont que suspectés. De nombreux facteurs environnementaux sont maintenant bien établis dans l'étiologie des leucémies aiguës. L'effet leucémogène du benzène et de certains solvants organiques, des radiations ionisantes à forte dose, est particulièrement bien décrit dans les leucémies aiguës myéloïdes. De nombreuses études soulignent l'importance possible d'autres facteurs comme les radiations électromagnétiques, les pesticides, le radon et le tabac. Les déficits immunitaires congénitaux ou acquis (trisomie 21, traitements immunosuppresseurs) favorisent le risque de LAM mais aussi de LAL (Dick *et al.*, 2008).

Tableau VI : Principaux facteurs de risque des leucémies aiguës.

Facteurs constitutionnels	Facteurs acquis	Facteurs environnementaux
<p>Déficits congénitaux Trisomie 21 Neurofibromatose</p> <p>Instabilité chromosomique Syndrome de Bloom Maladie de Fanconi Syndrome de Klinefelter Syndrome de Turner</p> <p>Déficit immunitaire Syndrome de Wiskott-Aldrich Ataxie télangiectasie</p> <p>Antécédents familiaux Présence d'un jumeau leucémique</p>	<p>Syndromes myéloprolifératifs</p> <p>Syndromes myélodysplasiques</p> <p>Hémoglobinurie paroxystique nocturne</p> <p>Autres néoplasies Myélome multiple Maladie de Hodgkin Lymphome malin non Hodgkinien Cancer du sein Cancer de l'ovaire</p> <p>Virus HTLV1</p>	<p>Médicaments cytotoxiques Alkylants Inhibiteurs de la topo-isomérase II</p> <p>Radiothérapie</p> <p>Solvants organiques Benzène</p> <p>Agents physiques Radiations ionisantes Radon Radiations non ionisantes : champs électro-magnétiques</p> <p>Pesticides</p>

(Deschler *et al.*, 2006)

I.4.1. Facteurs constitutionnels

– **Déficits congénitaux**

La trisomie 21 constitue un facteur de risque majeur de leucémie chez l'enfant, en particulier de leucémie aiguë myéloblastique. Certains syndromes dus à des mutations ou des délétions génétiques identifiées, comme les syndromes d'instabilité chromosomique favorisent la survenue d'hémopathies malignes dès l'enfance. Certains traitements immunosuppresseurs pourraient également être en cause dans le développement de LAM mais aussi de LAL (Kwong *et al.*, 2010).

– **Antécédents familiaux**

Le risque est augmenté d'un facteur 2 à 4 en cas de LA dans la fratrie. Il devient très élevé pour le jumeau vrai d'un enfant atteint de LA: 20 % si la LA est apparue avant l'âge de 6 ans et 100 % si elle est apparue avant 1 an. Le risque est majeur pendant l'année qui suit le diagnostic (Guyot-Goubin *et al.*, 2010).

I.4.2. Facteurs acquis

– Antécédents d'hémopathies malignes

Les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs ont en commun la possibilité d'évolution vers une leucémie aiguë. D'autres maladies hématologiques se compliquent avec une fréquence significative de leucémies secondaires, comme la leucémie lymphoïde chronique, le myélome, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, les lymphomes non hodgkiniens. Cependant la part respective de la maladie et des traitements reçus (chimiothérapie, radiothérapie) reste à préciser dans le processus de leucémogénèse (Matesanz-Isabel *et al.*, 2011).

– Agents infectieux

Le virus d'Epstein-Barr a été identifié dans une grande proportion de lymphomes de Burkitt et de lymphomes de Hodgkin, mais aucun virus spécifique n'a jamais été mis en cause dans les LAL de l'enfant. Même si une association entre l'exposition à certains virus et le développement des LAM a été suggérée, aucun virus n'a été mis en évidence dans leur étiologie. Le parvovirus B19 pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse des LAM (Kerr *et al.*, 2003).

I.4.3. Facteurs environnementaux et professionnels

– Chimiothérapie cytotoxique et radiothérapie

Actuellement 4 % des patients survivant à un premier cancer auront un second cancer dans les 20 ans qui suivent le diagnostic (Bhatia *et al.*, 2002). La plupart des leucémies aiguës induites sont myéloblastiques. On estime qu'environ 5 à 10 % des leucémies aiguës et 10 à 20 % des LAM sont induites par une chimiothérapie ou radiothérapie préalable (De Botton *et al.*, 2010 ; Vardiman *et al.*, 2008).

Les LAM post-chimiothérapie sont plus fréquemment observées après traitement pour une tumeur solide (86 % des cas). Cette complication étant fréquente, elle a été isolée dans la classification OMS 2008. Le risque leucémogène dépend de la dose et du schéma d'administration (Swerdlow *et al.*, 2008).

L'exposition aux alkylants et aux inhibiteurs de la topo-isomérase II est retrouvée dans 50 à 75 % des cas, avec pour 45 % des cas, une radiothérapie associée. Le risque de LAM après exposition aux épipodophylotoxines est de 2 à 12%. La combinaison de la chimiothérapie à la radiothérapie augmente le risque de leucémie induite (Bhatia *et al.*, 2002 ; De Botton *et al.*, 2010).

Tableau VII : Agents cytotoxiques impliqués dans les leucémies aigues thérapie-induites.

<p>Agents alkylants Melphalan, cyclophosphamide, moutarde azotée, chlorambucil, busulfan, carboplatine, cisplatine, dacarbazine, procarbazine, carmustine, mitomycine C, thiotepa, lomustine, etc</p>
<p>Radiothérapie</p>
<p>Inhibiteurs de la topo-isomérase II Etoposide, teniposide, doxorubicine, daunorubicine, mitoxantrone, actinomycine, amsacrine</p>
<p>Autres: -antimétabolites : thiopurine, mycophénolate, fludarabine -antimitotiques (combiné à d'autres agents): vincristine, vinblastine, vindesine, paclitaxel, docetaxel</p>

(Vardiman *et al.*, 2008)

Un grand nombre d'autres facteurs de risque sont suspectés d'augmenter la fréquence de survenue de leucémies aiguës sans qu'un lien formel ne puisse être établi (Brunnering *et al.*, 2009).

I.5. Etapes du diagnostic des leucémies aiguës

I.5.1. Numération formule sanguine (NFS)

Une leucémie peut être suspectée suite à une simple prise de sang, lorsque la numération formule sanguine (NFS) est anormale : l'analyse sanguine montre alors une baisse du nombre de globules rouges, de plaquettes et de polynucléaires. Elle peut aussi mettre en évidence la présence de cellules leucémiques au travers d'une quantité de globules blancs anormalement élevée.

Cependant, le **diagnostic de leucémie aiguë** ne peut se fonder uniquement sur cette analyse sanguine. Si les résultats de la numération formule sanguine laissent suspecter une leucémie aiguë, le patient doit être adressé à un centre d'hématologie spécialisé pour **confirmer le diagnostic grâce à un myélogramme**.

I.5.2. Myélogramme

Il consiste à analyser les cellules de la moelle osseuse au microscope. Le prélèvement de moelle osseuse est effectué sous anesthésie locale, par ponction dans le sternum ou dans l'os du bassin (épine iliaque). Ce geste ne dure que quelques secondes mais peut être douloureux. Des antalgiques sont donc souvent prescrits en plus de l'anesthésie. Le diagnostic est confirmé si l'analyse montre que la moelle contient plus de 20 % de cellules immatures. L'analyse morphologique des cellules permet alors de définir la sous-catégorie de leucémie aiguë. D'autres examens biologiques permettent d'obtenir des données complémentaires afin de mieux caractériser la maladie. C'est le cas notamment de l'étude des chromosomes des cellules anormales qui permet d'affiner le diagnostic et le pronostic, afin de choisir le meilleur traitement pour le patient. Après le **myélogramme** une étude **cytochimique** est entamée. Etude cytochimique qui contribue à la classification des LA. La réaction des peroxydases est importante car sa positivité permet d'exclure une appartenance à la lignée lymphoïde. La positivité de la réaction des estérases permet le rattachement à la lignée monocyttaire.

I.5.3. Cytochimie

Les colorations cytochimiques permettent de préciser la classification en LAL ou LAM quand l'étude cytologique simple est insuffisante. Les techniques de coloration panoptiques dont le seul objectif est de permettre une analyse morphologique ne répondent pas toujours aux attentes des cytologistes. Dans certains cas, il faut nécessairement recourir à des techniques de colorations spécialisées telle que la cytochimie. La cytochimie consiste à colorer, grâce à leurs propriétés chimiques particulières des structures de la cellule spécifique d'une lignée.

Reposant sur des réactions colorées visualisables au microscope optique, la cytochimie est destinée à l'identification des substrats et d'activités enzymatiques dans les cellules (Sebahoun *et al.*, 1996).

L'utilisation de la cytochimie ultra structurale contribue à l'identification d'une population blastique. Elle est très utile en pathologie où les cellules deviennent nombreuses et monstrueuses, rendant la seule description morphologique difficile, sinon impossible. Il existe plusieurs techniques cytochimiques. En routine, deux techniques sont très utiles pour étudier les LA :

- La réaction des myéloperoxydases (ou du noir soudan B) qui est positive dans les LAM et certaines LA monocytaires. Elle est indispensable pour faire la distinction entre LAM 1 et LAL 2. Elle met en évidence l'activité peroxydasique des cellules de la lignée granulocytaire et en est spécifique. La production d'eau oxygénée permet la transformation d'un sel de benzidine en un composé brun aux endroits où se trouve la peroxydase ;

- La réaction des estérases avec le naphthol AS ou ASD acétate (NASDA) : elle est le plus souvent utilisée pour individualiser les cellules granuleuses et monocytaires au sein d'une population blastique.

I.5.4. Immunophénotypage par cytométrie en flux

➤ Définition

Si le diagnostic des leucémies aiguës repose avant tout sur l'examen cytologique et cytochimique des étalements réalisés à partir d'un produit de ponction de moelle, l'immunophénotypage par cytométrie en flux peut offrir une aide considérable au biologiste dans le cadre des leucémies aiguës peu différenciées pour définir l'appartenance des cellules blastiques à la lignée lymphoïde ou myéloïde, pour définir la lignée (B ou T) dont sont issues les cellules leucémiques dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques possible sans l'apport de la CMF ainsi que la mise en évidence de variant myéloïdes dans le cadre des leucémies myéloblastiques aiguës . Pour le clinicien, il est important de connaître rapidement le type de leucose aiguë dont est atteint un patient pour opter pour la thérapie la mieux adaptée. La rapidité avec laquelle une leucémie peut être caractérisée à l'aide de la CMF va permettre au clinicien de débiter au plus tôt sa thérapie. En associant les informations obtenues de l'examen cytologique, de la cytochimie et de l'immunophénotypage, il pourra définir le type de leucémie dont est atteint son patient dans la quasi-totalité des situations et opter pour la thérapie la plus adéquate. Aujourd'hui, l'immunophénotypage est devenu l'élément primordial pour le diagnostic et le choix du traitement dans le cas des LAL (Sebahoun *et al.*, 1996).

Il existe plusieurs techniques :

- La cytofluorométrie : l'analyse en cytofluorométrie des cellules marquées par immunofluorescence est considérée comme la méthode de référence pour la caractérisation immunophénotypique des LA.

- L'utilisation des anticorps monoclonaux : il existe sur le marché près de deux milles anticorps monoclonaux (AcMo) qui servent à détecter une centaine de molécules différentes présentes sur les cellules hématopoïétiques normales ou pathologiques. Les anticorps monoclonaux sont regroupés, selon la molécule ou l'antigène qu'ils reconnaissent, dans une classe de différenciation (CD). Seule une minorité d'entre eux est utile au diagnostic des hémopathies malignes.

L'immunocytochimie : c'est la technique de marquage sur lames de cellules étalées par cyto centrifugation et lisible au microscope optique. Elle a l'avantage de corréler la morphologie avec l'expression antigénique.

➤ **Principe :**

L'immunophénotypage des cellules leucémiques consiste à définir au mieux leurs caractéristiques en recherchant à leur surface, dans leur cytoplasme ou dans leur noyau, l'expression d'antigènes de différenciation. Ces derniers ont été identifiés progressivement, depuis le début des années 1980, grâce à la technologie des anticorps monoclonaux. Les efforts de nomenclature réalisés pour les classer ont conduit par analogie à la définition des antigènes reconnus par ces outils (Zola *et al.*, 2007).

L'abréviation des termes « cluster de différenciation », CD, utilisée initialement pour regrouper des clones d'anticorps de même spécificité, est également employée pour désigner les molécules identifiées sur ou dans les cellules. Actuellement, à l'issue du neuvième atelier de définition de ces antigènes leucocytaires, plus de 360 CD ont été décrits (Matesanz-Isabel *et al.*, 2011).

Un choix judicieux des marqueurs pertinents et de leur combinaison doit donc être effectué parmi cette foule de spécificités pour définir au mieux la prolifération leucémique d'un patient. Les recommandations et classifications actuelles sont toutefois susceptibles d'évoluer encore (Bene *et al.*, 2011 ; Davis *et al.*, 2007).

I.5.5. Etude cytogénétique

Comme l'immunophénotypage, le caryotype se fait sur un échantillon de moelle sur seringue héparinée prélevé avant traitement. Un certain nombre d'anomalies récurrentes de nombre et de structure du caryotype ont été décrites dans les LA. Il s'agit d'anomalies somatiques acquises qui sont rencontrées dans environ 40% des cas (Sebahoun *et al.*, 1996).

Leur intérêt est essentiellement pronostique. Toutefois, certaines de ces anomalies ont permis d'isoler de véritables entités clinico-biologiques avec une présentation, une évolution voire un traitement particulier. Dans ces cas, l'examen cytogénétique peut être considéré comme un examen du diagnostic positif (Craig *et al.*, 2008).

I.5.6. Etude en biologie moléculaire

Celle-ci est complémentaire de l'étude cytogénétique. Elle permet de détecter par RT-PCR, l'existence de transcrits de fusions correspondantes à certaines translocation. Au niveau du matériel génétique issu des clones malins, deux types d'anomalies sont décrites. L'une concerne des transcrits de fusion correspondant à une fusion de 2 gènes situés sur 2 chromosomes différents, aboutissant parfois à une protéine dotée de fonction, le plus souvent intéressant la régulation du cycle cellulaire. On décrit ainsi les transcrits BCR-ABL, MLL, TEL-AML 1, l'autre concerne un réarrangement des différents gènes codant pour les immunoglobulines – lignée B ou le récepteur T – lignée T, au sein de clones de cellules lymphoïdes (Fliedner *et al.*, 1981 ; Jeannet *et al.*, 1986).

Il convient d'utiliser les techniques de biologie moléculaire pour un double but. L'un permet de mieux apprécier la diminution du nombre de cellules lors du traitement, l'autre est essentiellement une aide au diagnostic. On notera dans le premier cas que l'intérêt de ces techniques est l'augmentation de la sensibilité de la détection des cellules clonales résiduelles à des seuils proches de 1/10 000 cellules. Cependant en routine, ces techniques ne sont informatives que pour environ 70 % des patients (Oikawa *et al.*, 2003 ; Ifrah *et al.*, 1987).

Afin d'accéder à une analyse fine des échantillons sur le plan immunophénotypique nécessaire pour mettre en évidence les éléments susceptibles d'intervenir dans le diagnostic des leucémies aiguës, plusieurs manipulations s'imposent.

En effet pour notre travail, nous avons d'abord procédé à la numération de la formule sanguine par la suite nous avons préparé nos différents tubes en utilisant des protocoles propres à l'unité immunologique de cytométrie du laboratoire ou un certain nombre de paramètres sont analysés dans le but de réaliser l'étude immunophénotypique de nos échantillons par cytométrie en flux.

II.1. Patients étudiés :

Il s'agit d'une étude portant sur 59 patients atteints de leucémie aiguë diagnostiqués durant une période de 6 mois (du 12 mars au 26 août 2014), dont 21 présentant des leucémies aiguës myéloïdes (10 de sexe masculin-11 de sexe féminin) et 26 présentant des leucémies aiguës lymphoblastiques (14 de sexe masculin-12 de sexe féminin), rapportés majoritairement des Services Pédiatrique (A et B) et hématologique du CHU de Beni Messous, ainsi que le service d'Hématologie EHS et EPH Zabanade de Blida.

Tableau VIII : caractéristiques générales des patients.

Caractéristiques	Nombres de patients
Sexe	
Masculin	46 %
Féminin	54 %
Age	
Moyenne	22
Extrêmes	1-63
Services	
Pédiatrie CHU Bab el Oued	2 %
Pédiatrie A	15 %
Pédiatrie B	22 %
Hématologie	41 %
BLIDA	20 %
Prélèvements	
MO	66 %
sang	34 %

II.2. Matériels biologiques:

II.2.1. Prélèvement :

Des prélèvements de sang sont effectués par ponction veineuse sur des tubes en présence d'anticoagulant (EDTA) alors que les prélèvements de moelle osseuse sont effectués sous anesthésie locale, par ponction dans le sternum ou dans l'os du bassin (épine iliaque).

La plupart des échantillons primaires doivent être recueillis sur anticoagulant, en particulier le sang et la moelle osseuse (seuls les liquides d'épanchements et le LCS peuvent être prélevés sur tube sec). Deux types d'anticoagulants sont couramment utilisés pour les immunophénotypages, l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) potassique (K_2 ou K_3 EDTA) et l'héparine (Ait-Cheikh *et al.*, 1996).

L'anticoagulant est susceptible d'altérer la morphologie, la viabilité et l'expression antigénique des cellules. Ces effets dépendent du type d'anticoagulant, du temps et de la température de conservation de l'échantillon, et de la nature des cellules (les lymphocytes B sont ainsi plus « fragiles » que les lymphocytes T dans le sang normal (Rothe *et al.*, 1996)).

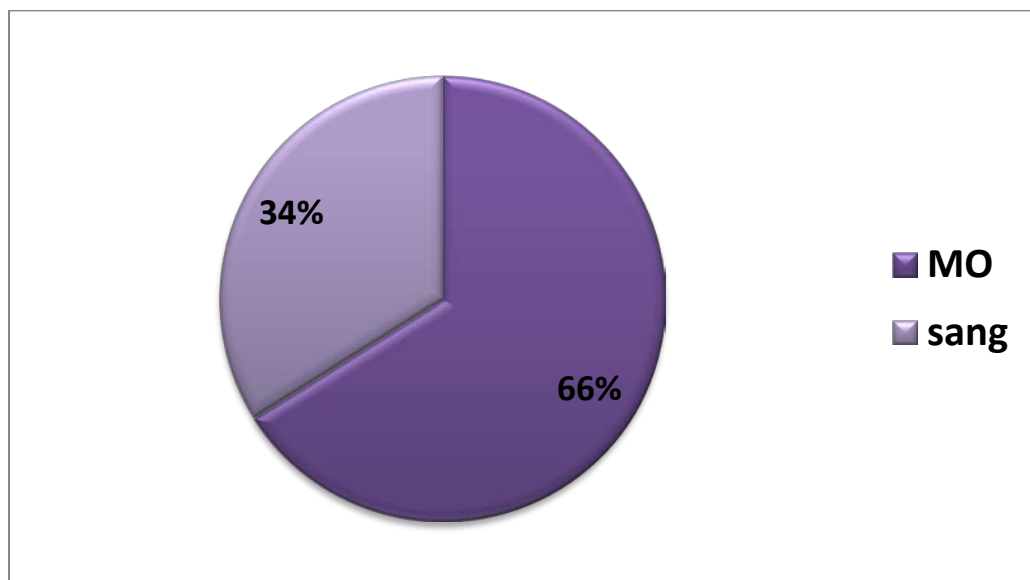


Figure 5 : Type de prélèvement utilisé dans cette étude.

II.3. Matériels non biologiques

II.3.1. Matériels requis

II.3.1.1. Réactifs

-Marqueurs spécifiques (anticorps monoclonaux), couplés a des fluorochromes qui ont la capacité d'absorber l'énergie du laser puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure (fluorescence), ce qui permet de quantifier les antigènes à la surface ou dans le cytoplasme d'une cellule.

Tableau IX : les différents marqueurs utilisés.

LAM	LAL B	LAL T
Marqueurs d'immaturité CD34 CD117 HLA DR	Marqueurs d'immaturité CD34	
Marqueurs myéloïdes CD13 CD33 MPO cy	Marqueurs pan-B CD19 CD22 cCD79a	Marqueurs d'immaturité CD34
Marqueurs de granuleux matures CD15 et CD16	Marqueurs de stade de différenciation CD10 C μ /sIgM CD20 CD79b FMC7	Marqueurs pan-T CD7 CD2 CD5 CD3 TCR β
Marqueurs monocytaires CD14 CD64 CD11a, b, c		Marqueurs de stade de différenciation CD1a CD4 CD8
Marqueurs érythroïdes CD235a (AGA)		Marqueurs non spécifiques CD38 HLA DR
Marqueurs plaquettaires CD41a et CD42b CD61	Marqueurs non spécifiques HLADR	
Marqueurs non spécifiques CD36 CD71		

Légende : MPO cy : myéloperoxydases intracytoplasmiques ; AGA : glycophorine A.
cCD79a : intracytoplasmique ; c μ : chaîne μ intracytoplasmique ; sIgM : immunoglobuline M exprimée en surface. TCR : récepteur T pour l'antigène.

II.3.1.2. Tampons

- Un tampon de marquage en cytométrie de flux ou « Staining Buffer »
- Bleu trypan pour le comptage des cellules ou « Trypan blue »
- Liquide de gaines pour le cytomètre en flux

II.3.1.3. Matériels

- pipettes et micro-pipettes
- centrifugeuse
- Vortex
- Cytomètre en flux à six couleurs et deux lasers (BD FACS Canto)

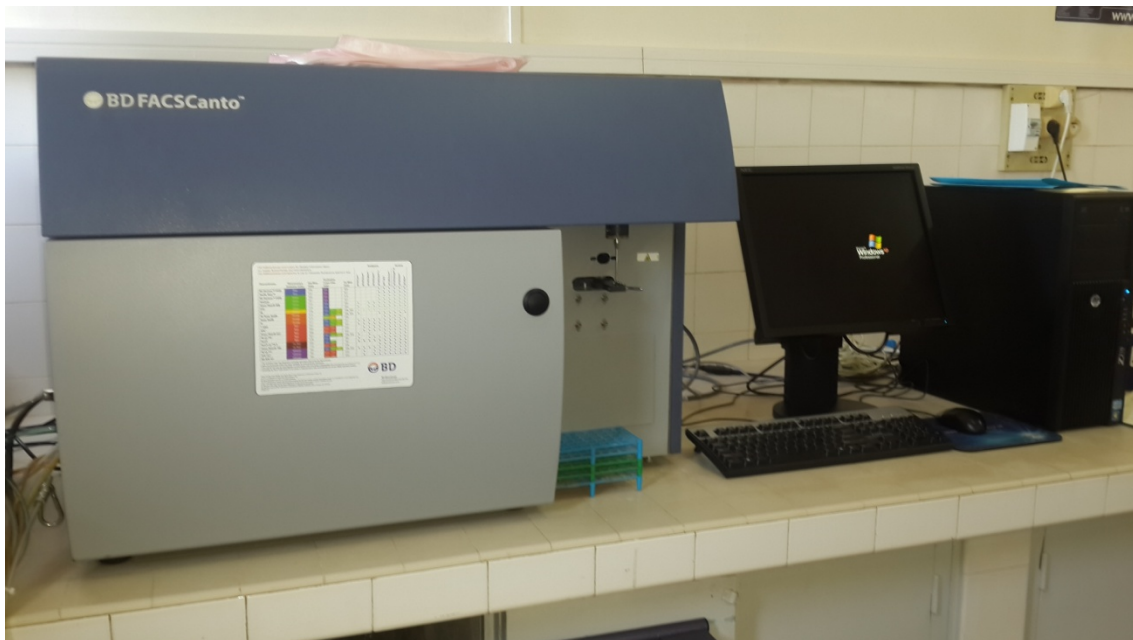


Figure 6 : Cytomètre en flux utilisé dans cette étude.

II.3.2. Durée de l'expérience :

- 30 mn de préparation des échantillons et des anticorps
- 30 mn à 1 h d'incubation des anticorps
- 30 mn à 1 h de lecture des cellules par le cytomètre de flux (selon le nombre d'échantillons, la concentration des cellules et les réglages du cytomètre) **TOTAL : 2 à 3 heures**

II.4. Technique de la cytométrie en flux :

II.4.1. Principe:

La CMF permet d'évaluer simultanément différentes caractéristiques d'une cellule ou d'une particule. Les cellules sont préalablement marquées par des anticorps monoclonaux (Acm) couplés à des fluorochromes. Les mesures sont effectuées pendant que ces cellules défilent une à une, dans un flux liquidien, devant une ou plusieurs sources lumineuses d'excitation (laser). Les cytomètres actuellement disponibles permettent d'analyser deux paramètres indépendants des Acm, apportant des informations « morphologiques » : le *forward angle scatter* (FAS, FW ou FSC), paramètre de taille et le *right angle scatter* (RAS ou SSC), paramètre de granularité cellulaire (**Figure 7**). Ceci permet de réaliser un fenêtrage sur la population cellulaire d'intérêt puis d'analyser les paramètres de fluorescence spécifiques de chacun des fluorochromes (« couleurs ») couplés aux Acm utilisés (Merle-Béral *et al.*, 2014). Les fluorochromes sont en effet capables d'absorber l'énergie lumineuse provenant du laser puis de libérer cette énergie, appelée fluorescence, par émission de photons de longueur d'onde supérieure (**Figure 8**). Les fluorochromes les plus utilisés sont décrits dans le **tableau X**.

Pour le diagnostic des hémopathies malignes, la plupart des laboratoires d'hématologie utilisent actuellement des appareils à 4 ou 6 couleurs. À côté de ces analyseurs utilisés en routine, il existe des cytomètres trieurs permettant de séparer des populations cellulaires et des cytomètres pouvant analyser jusqu'à 17 paramètres de fluorescence (Perfetto *et al.*, 2004), dont l'intérêt est actuellement réservé à la recherche.

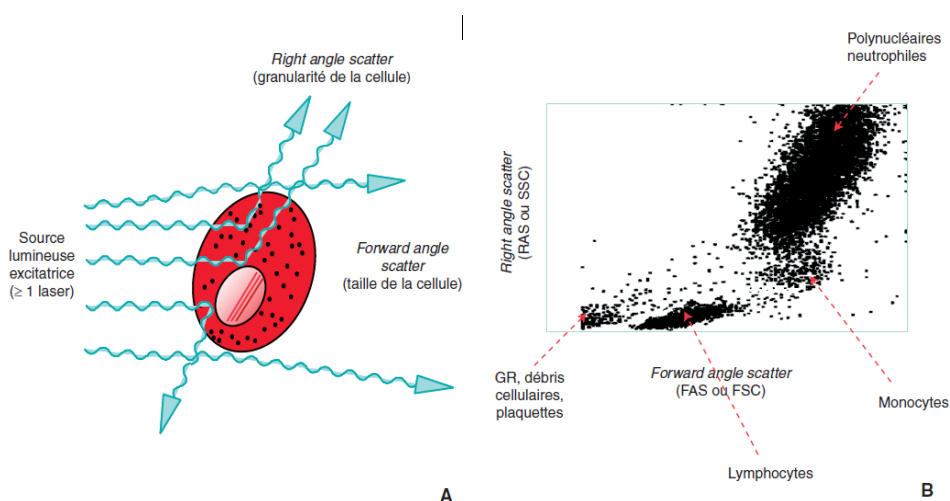


Figure 7 : Informations « morphologiques » apportées par la CMF.

La CMF permet d'analyser deux paramètres indépendants des anticorps monoclonaux : le *forward angle scatter* (FAS) proportionnel à la taille de la cellule, qui correspond à la lumière mesurée dans l'axe de la cellule et le *right angle scatter* (RAS) proportionnel à la granularité de la cellule, qui correspond à la lumière mesurée à 90° de l'axe de la cellule (A). Ils permettent de réaliser un fenêtrage sur la population leucocytaire à étudier : les lymphocytes, monocytes ou polynucléaires neutrophiles (B).

La CMF permet ainsi de caractériser les cellules pathologiques sur des prélèvements sanguins, médullaires ou dans des liquides de ponction avec la possibilité de marquer directement les cellules sans nécessité de réaliser au préalable une séparation cellulaire. Ceci est particulièrement intéressant pour le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes, la rapidité de cette technique permettant d'avoir un résultat fiable en moins d'une demi-journée (Merle-Béral *et al.*, 2014).

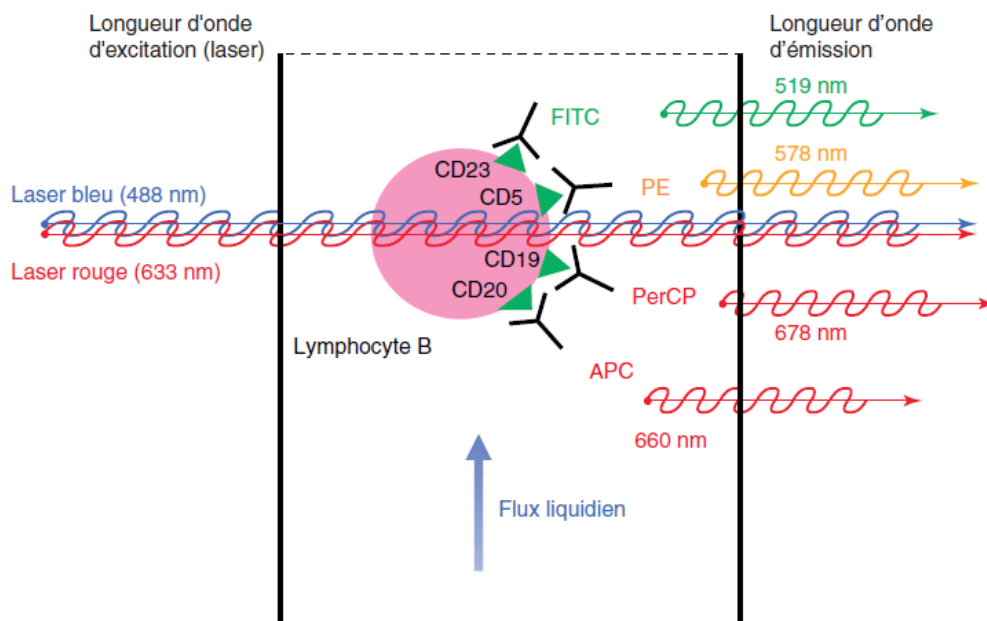


Figure 8 : Principe de la cytométrie de flux.

Les fluorochromes, fixés sur les anticorps monoclonaux, sont capables d'absorber l'énergie du laser puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure (fluorescence), ce qui permet de quantifier les antigènes à la surface ou dans le cytoplasme d'une cellule. Dans cet exemple est représenté un lymphocyte B exprimant les molécules CD19, CD20, CD5 et CD23. FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; PE : R-phycoérythrine ; APC : allophycocyanine ; PerCP : peridinine chlorophylle-protéine.

Tableau X : Caractéristiques des fluorochromes les plus utilisés

Fluorochrome	Laser (nm)	Émission maximale (nm)
AlexaFluor® 405	360, 405, 407	421
PacificBlue®	360, 405, 407	455
AmCyan	405, 407	491
FITC	488	519
PE	488, 532	578
PerCP	488, 532	678

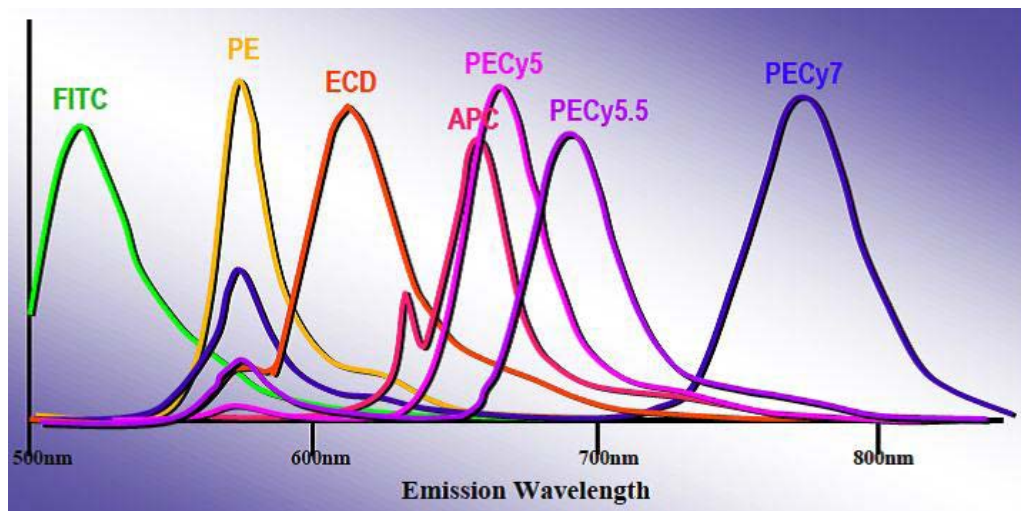


Figure 9: Exemple de longueur d'onde de différents fluorochromes.

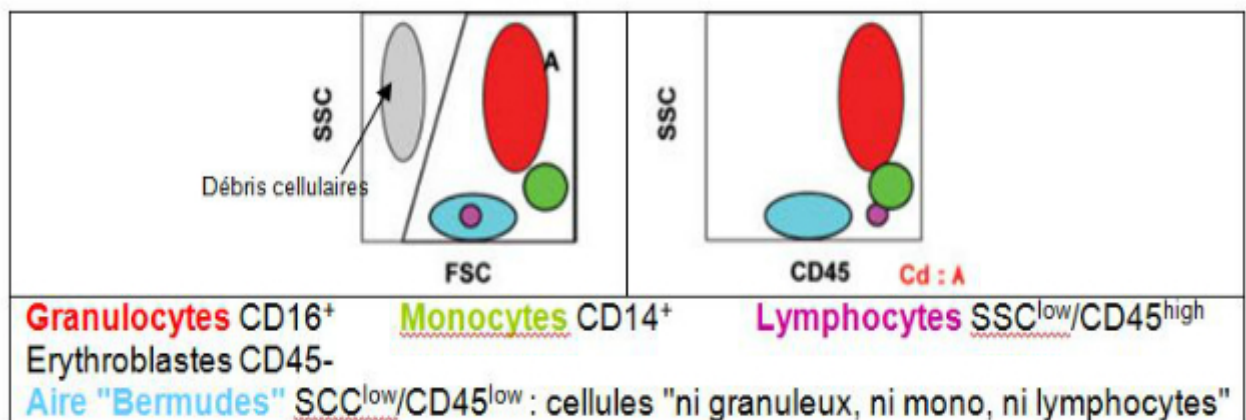


Figure 10 : Schéma montrant le rôle du CD45.

Le scattergram FSC/SSC permet d'éliminer les débris cellulaires. Le scattergram CD45/SSC constitue le masque de référence définissant les régions (fenêtres ou gates) d'analyse. On peut y superposer l'expression de marqueur de maturité spécifique de lignée afin de recadrer les fenêtres sur les populations d'intérêt. L'aire "Bermudes" comprend les cellules hématopoïétiques immatures et la population blastique de la majorité des LA.

Une fois la population d'intérêt identifiée, on détermine le profil d'expression de divers antigènes à la surface ou dans le cytoplasme des blastes : on superpose au scattergram CD45/SSC les cellules exprimant une combinaison d'antigènes (= backgating)

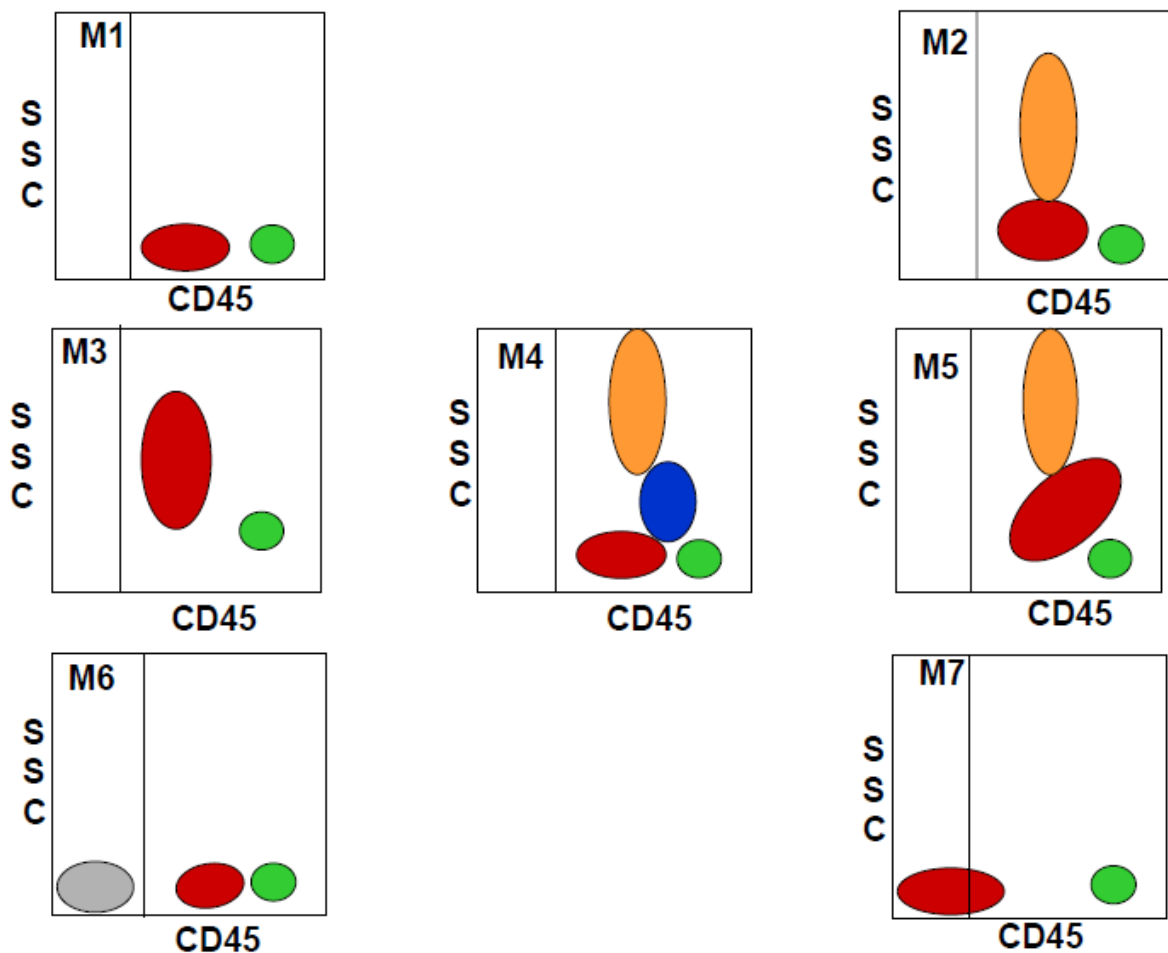


Figure 11 : Aspect du Le scattergram CD45/SSC chez les différents types de LAM.

II.4.2.Mode opératoire :

- Préparer les tubes, numérotation
- Déposer dans chaque tube 10 µl de chaque anticorps (membranaire) conjugués aux fluorochromes selon la méthodologie suivante.

Tableau XI: Protocol de marquage commun au LAM et LAL.

Tube 1	CD3 _{FITC}	MPO _{PE}	CD45 _{PerCp}
Tube 2	CD19 _{FITC}	CD7 _{PE}	CD45 _{PerCp}
Tube 3	CD14 _{PE}	CD13 _{FITC}	CD45 _{PerCp}
Tube 4	CD33 _{PE}	CD15 _{FITC}	CD45 _{PerCp}
Tube 5	HLA DR _{FITC}	CD34 _{PE}	CD45 _{PerCp}
Tube 6	CD117 _{PE}	CD71 _{FITC}	CD45 _{PerCp}
Tube 7	CD11c _{PE}	CD2 _{FITC}	CD45 _{PerCp}

Les fluorochromes utilisés dans notre Protocol :

PE : R-phycoérythrine

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

PerCp : peridinine chlorophylle-protéine.

Tableau XII : Protocol de marquage qui s'ajoute au précédant dans le cas d'une LAL B (a) et LAL T (b).

Tube 8	CD19 CD10 CD45
Tube 9	Cµ CD79b CD45
Tube 10	SIgM CD22 CD45

(a)

Tube 8'	CD3 CD4 CD8 CD45
Tube 9'	CD3 _{intra} CD7 CD45

(b)

cµ : chaîne µ intracytoplasmique ; sIgM : immunoglobuline M exprimée en surface.

- Ajouter 100 μ l de la suspension cellulaire préparée (sang ou MO) dans chaque tube.
- Vortexer et incuber 15-30 minutes à l'abri de la lumière (récipient couvert).
- Pour éliminer l'excès d'anticorps après le marquage, ajouter 2 ml de la solution de lyse dans chaque tube.
- Vortexer.
- Incuber pendant 10 mn à l'abri de la lumière.
- Centrifugation à 300g pendant 5 mn.
- Eliminer le surnageant et fixer les cellules avec 500 μ l de PBS.
- Vortexer et les tubes seront prêts à être lu par le cytomètre **sauf le tube 1.**

Les étapes qui suivent ne concernent que le Tube 1 (marquage intra cytoplasmique)

- Déposer 250 μ l de perméabilisant dilué au 1/10 dans PBS.
- Incuber pendant 30 mn à l'abri de la lumière.
- Déposer 3 ml de PBS.
- Centrifugation à 500 g pendant 5 mn.
- Eliminer le surnageant par l'aspiration avec la pipette de 200 μ l.
- Déposer 5 μ l d'Ac intra cytoplasmique (MPO).
- Incuber pendant 20 mn à l'abri de la lumière.
- Fixe les cellules avec 500 μ l de PBS et vortexer, le tube 1 est prêt à être lu.

Afin de mettre en évidence l'intérêt de l'immunophénotypage dans le diagnostic des leucémies aiguës nous avons analysé 59 échantillons de sang et/ou de moelle qui ont été marqué d'après des protocoles précis et très spécifique selon la suspicion de l'étude cytochimique.

Les résultats analytiques qui seront présentés sous forme de tableau, de graphiques et d'images du cytomètre, seront successivement analysés puis commentés.

III.1. Répartition de la population étudiée selon différents paramètres

III.1.1. l'âge

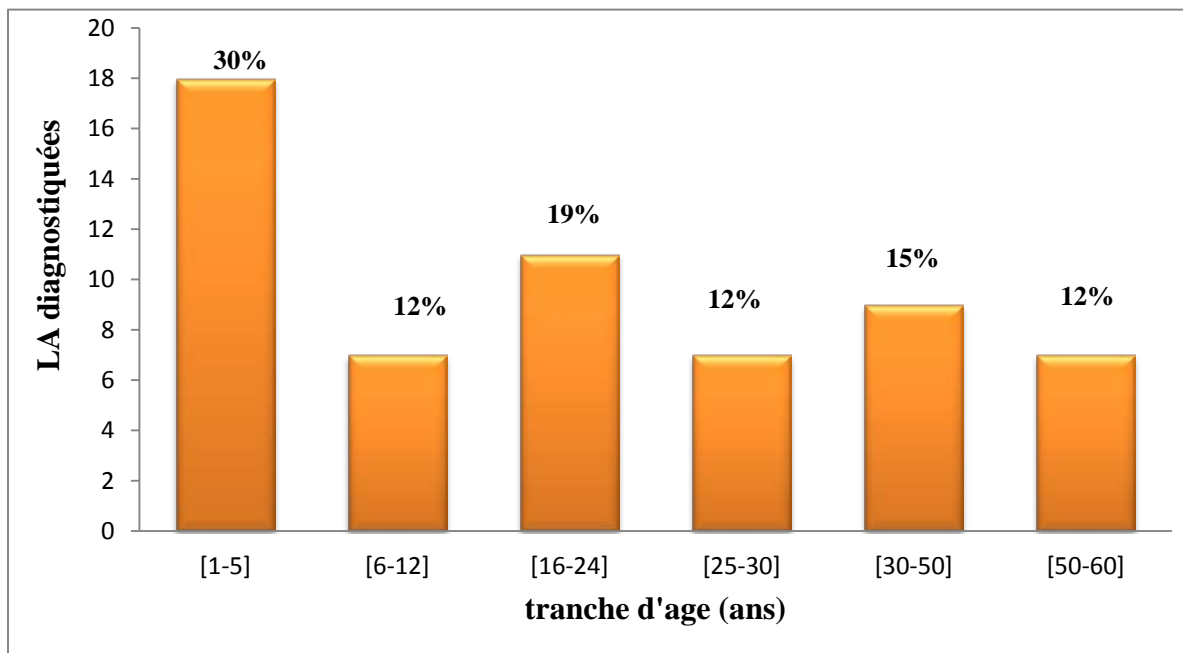


Figure 12 : répartition des patients selon les classes d'âges.

A travers la figure 12, nous avons répartie nos patients selon 6 tranches d'âges allant de 1 à 60 ans. L'âge moyen du diagnostic était de 22 ans avec des extrêmes de 1 à 60 ans.

La répartition par tranche d'âge montre une prédominance du sujet jeune en accord avec la pyramide des âges en Algérie : 36 (61 %) ont moins de 24 ans, 16 (27%) entre 25 et 50 ans, 7 (12%) ont plus de 50 ans. Il s'agit donc d'une pathologie qui touche plus le sujet jeune ce qui est renforcé par les résultats de l'étude de (Benakli *et al.*, 2009).

III.1.2. Le sexe

D'après notre série nous constatons une prédominance masculine chez les sujets leucémiques diagnostiqués avec 53% d'hommes contre 47% de femmes. Les taux d'incidence standardisés de la population mondiale (pour 100 000 personnes-années) sont de 4,5 chez l'homme et de 3,5 chez la femme (Bélot *et al.*, 2008). On observe que les leucémies aiguës touchent davantage les hommes que les femmes et cela a été confirmé par une étude préalable (Blaise *et al.*, 2013).

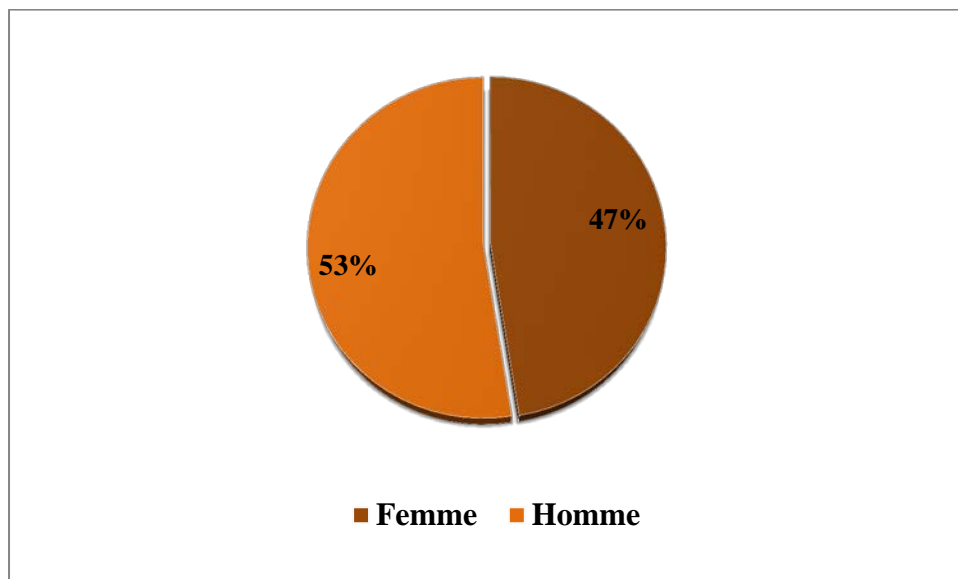


Figure 13 : Répartition des patients selon le sexe.

III.2. Résultats de l'analyse quantitative

Les résultats de l'analyse quantitative et qualitative sont représentés dans les **tableaux XIII et XIV**

Tableau XIII : Représentation des résultats des profils masculins leucémiques diagnostiqués.

Patients:	Sexe:	Age:	prélèvements:	Blastes%:	Résultats:
1	H	23	sang	96	LAM 3
2	H	23	Sang	12	LAM 4
3	H	18	MO	57	LAL -BII
4	H	20	MO	57	LAL -BII
5	H	5	sang	90	LAL -BI
6	H	30	MO	70	LAL -BII
7	H	53	MO	76	LAM 3
8	H	4	sang	46	LAL -BII
9	H	52	MO	82	LAM 5
10	H	57	MO	72	LAL -BI
11	H	1	sang	85	LAM 5
12	H	2	sang	38	LAL -BII
13	H	7	MO	19	/
14	H	41	sang	85	LAM 5
15	H	16	MO	/	/
16	H	62	sang	78	LAL -BII
17	H	6	MO	85	LAL -BIII
18	H	3	MO	80	LAL -BI
19	H	5	MO	52	LAL -TIII
20	H	8	MO	77	LAM 2
21	H	12	MO	70	LAL T-I
22	H	29	MO	20	LAL T-I
23	H	46	sang	97	LAM 1
24	H	50	MO	86	LAM 6
25	H	20	MO	43	/
26	H	30	MO	91	LAM 3
27	H	42	MO	20	/
28	H	17	MO	42	LAL -BII
29	H	20	MO	14	/
30	H	1	MO	16	/
31	H	3	MO	17	/

Tableau XIV : Représentation des résultats des profils féminins leucémiques diagnostiqués.

Patientes:	Sexe:	Age:	prelevement:	Blastes%:	Resultat:
1	F	33	MO	61	LAM 5
2	F	2	MO	90	LAL -BII
3	F	38	sang	84	LAM 1
4	F	2	MO	86	LAM 5
5	F	25	MO	34	LAM 5
6	F	23	MO	85	LAM 3
7	F	24	sang	86	LAM 3
8	F	54	MO	21	LAM 2
9	F	6	sang	/	/
10	F	6	MO	96	LAL -BII
11	F	18	MO	/	/
12	F	3	sang	79	LAM 5
13	F	47	sang	52	/
14	F	42	MO	80	LAM 2
15	F	30	MO	14	LAL -BII
16	F	5	MO	32	LAL -BII
17	F	3	sang	42	LAM 7
18	F	4	sang	54	LAL -BIII
19	F	1	sang	90	LAL -BIV
20	F	27	MO	90	LAL -BII
21	F	2	MO	90	LAL -BII
22	F	4	MO	97	LAL -BII
23	F	31	MO	82	LAM 3
24	F	8	sang	85	LAL -BIII
25	F	58	MO	85	LAL -TIII
26	F	39	sang	0	/
27	F	30	sang	/	/
28	F	63	MO	50	LAL T-I

III.2.1. Interprétation des résultats en fonction du type de leucémie aigue diagnostiqué :

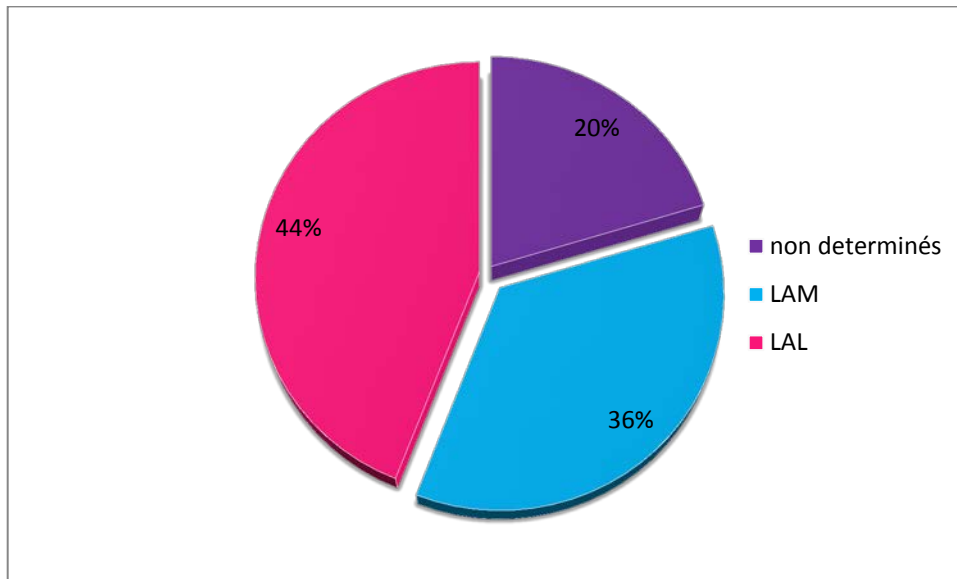


Figure 14 : Leucémies aiguës diagnostiquées.

Sur les 59 leucémies aiguës diagnostiquées, **44%** font partie de la différenciation lymphoblastique (LAL) avec 26 cas, le résultat est d'autant plus logique parce que précédemment nous avons décrit la répartition par tranche d'âge (**figure 12**), et nous avons déduit d'après l'analyse de l'histogramme ; que plus de 60% des cas diagnostiqués avaient moins de 24 ans et nous savons aussi d'après l'incidences des leucémies aiguës lymphoblastiques, que les LAL représentent environ 80 % des cas de LA chez l'enfant (Brionne *et al.*, 2009).

Il s'agit donc d'une pathologie qui touche plus le sujet jeune ce qui est renforcé par les résultats de l'étude de (Benakli *et al.*, 2009).

Pour les **36%** de LAM diagnostiquées le raisonnement est le même, la répartition par tranche d'âge nous a indiquée que 39 % des cas diagnostiqués avaient plus de 25ans et nous savons aussi d'après l'incidence des leucémies aiguës myéloïdes que leucémies aiguës d'origine myéloïde prédominent chez l'adulte : elles représentent 75-80 % des cas de LA (Brionne *et al.*, 2009).

Il s'agit donc d'une pathologie qui touche particulièrement les adultes donc le risque de développer une LAM s'accroît avec l'âge.

Pour les 20% des cas non déterminés, l'immunophénotypage n'a pas été concluant pour faire un diagnostic en faveur d'une leucémie aigue, d'autres causes peuvent être à l'origine de plusieurs difficultés techniques tels que le mauvais état des échantillons ou le nombre de cellules à analyser qui est insuffisant.

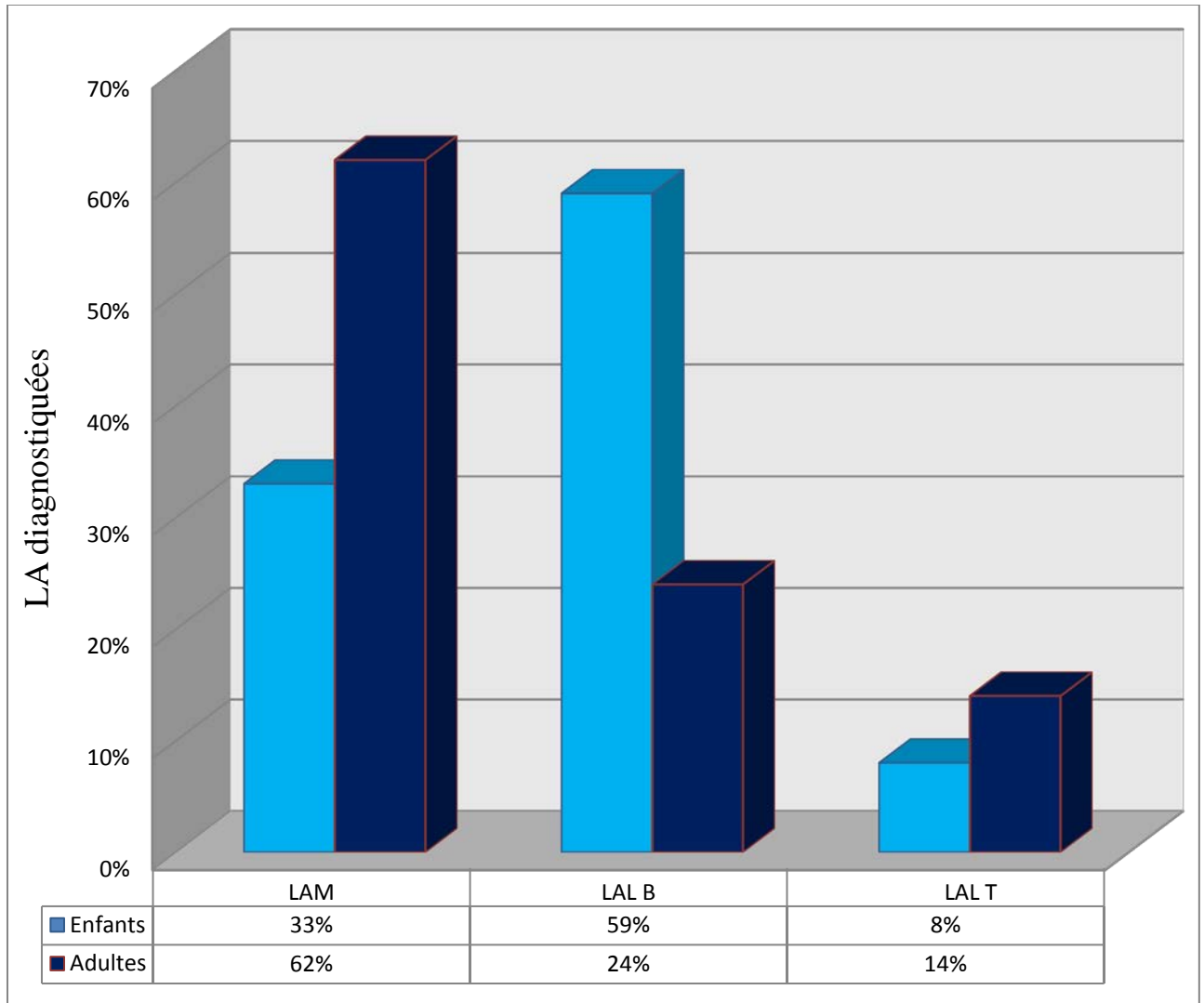


Figure 15 : Type de leucémie aigues diagnostiquée selon l'âge.

La leucémie aiguë est principalement une maladie du sujet âgé, la survenue des leucémies aiguës myéloïdes augmente régulièrement avec l'âge à partir de 60 ans comme le montre la **figure 15**, la LAM touche particulièrement les adultes. Chez les enfants (jusqu'à 16 ans), la leucémie est en général de type lymphoïde. La (LAL), qui est la forme la plus courante chez les enfants, représentent 30% des LA.

Ce sont surtout des pathologies de l'enfant. Environ 60% des cas surviennent chez les moins de 20 ans avec un pic de fréquence entre 2 et 5ans. Le deuxième pic de fréquence se situe chez l'adulte, autour de 70ans. Elles proviennent de la transformation néoplasique d'une cellule lymphoïde primitive soit au niveau d'un progéniteur très primitif commun aux lignées T et B ou à un niveau plus avancé dans la différenciation lymphoïde LAL T ou LAL B. Les LAL B représentent 80% des LAL de l'enfant, chez l'adulte, la fréquence des LAL T se situe aux alentours de 14% ce qui a été confirmé par une étude préalable (Valensi *et al.*, 2002). La LAM est plus fréquente que la LAL (70% des cas de LA sont myéloïdes), elle affecte surtout les adultes (62% des LA chez l'adulte et 33% chez l'enfant).

III.2.2. Interprétation des résultats en fonction du profil immunophénotypique des LA diagnostiqués

Exemple 1 : LAM

Le panel de marqueurs utilisé pour le diagnostic de chaque type de LA est très divers, les plus significatifs et les plus spécifiques de notre étude seront illustrés ci-dessous ainsi que leurs profils immunophénotypiques sous forme d'images obtenues lors de l'analyse cytométrique. Pour le diagnostic des **21 LAM** de cette étude la présence ou l'absence de certains marqueurs a confirmé en premier lieu la lignée incriminée et a déterminé le type de **LAM**, l'immunophénotypage des LAM a longtemps été considéré inutile en raison de la dichotomie très fine que permet l'étude morphologique dans ces leucémies. Toutefois, des informations complémentaires utiles sont apportées par l'immunophénotypage, confortant souvent les conclusions de l'observation microscopique, mais apportant des éléments différents (Béné *et al.*, 2001).

Pour les profils immunophénotypiques des trois LAM illustrés dans les figures 16, 17 et 18:

L'immunophénotypage **par cytométrie en flux** a été réalisé sur l'échantillon de sang total grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immatunité (**CD34**, **HLADR**, **CD117**, **TdT**) et des différentes lignées myéloïdes, lymphoïdes, érythrocytaire et plaquettaire [**MPO_{intra}**, **CD13**, **CD33**, **CD14**, **CD15**, **CD11c**, **CD2**, **CD3_{intra}**, **CD79a_{intra}**, **CD7**, **CD1**, **CD41** et **CD71**] ont été analysés.

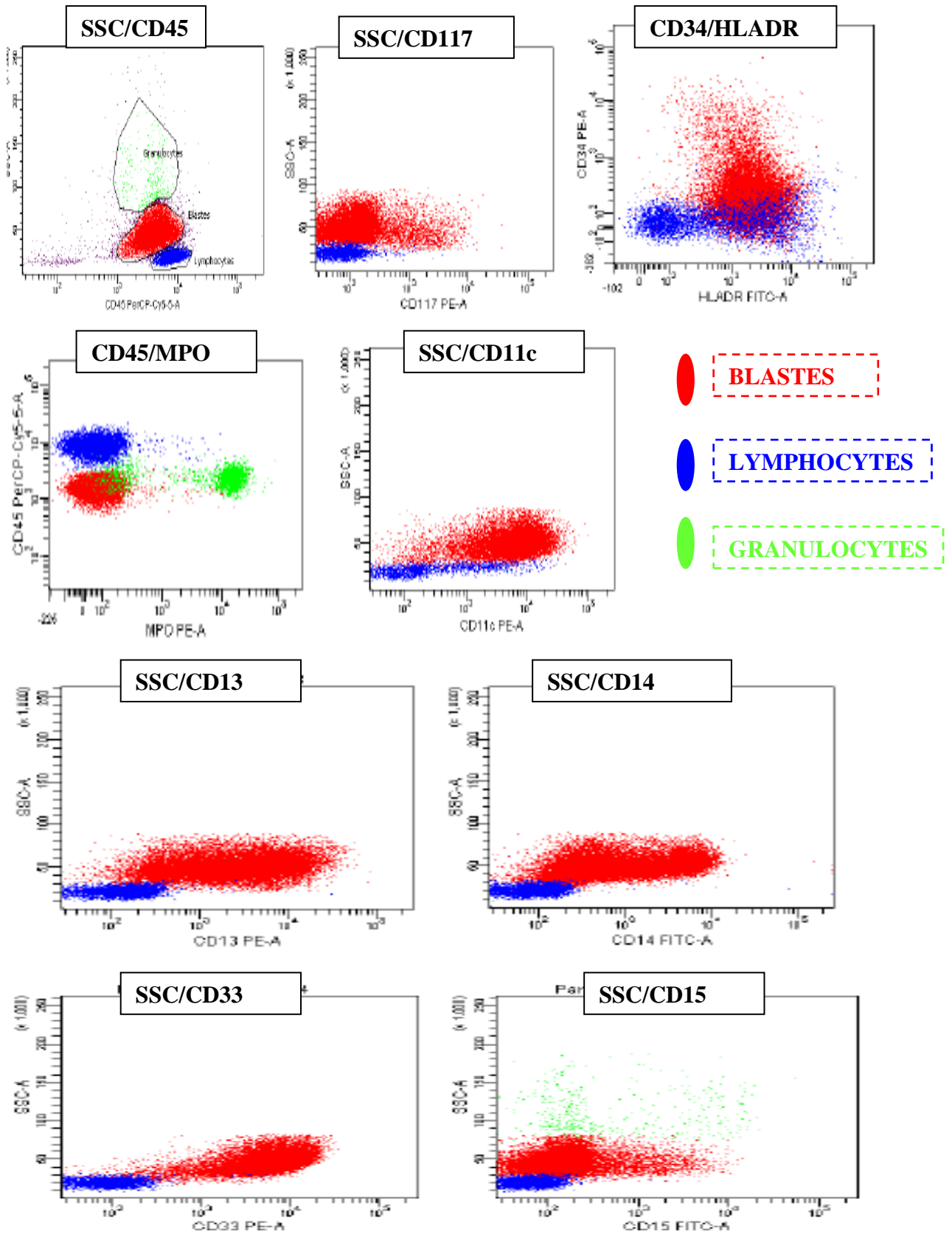


Figure 16: Profil immunophénotypique d'une LAM 5.

L'interprétation du profil immunophénotypique résultant de la cytométrie en flux illustrées dans la figure 16 est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XV : Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAM 5**.

MARQUEURS	RESULTATS		
MARQUEURS D'IMMATURITE	CD34 : Négatif	CD117 : Négatif	HLADR , Positif
MARQUEURS MYELOÏDES	MPO : Négative	CD13 : Positif	CD33 : Positif
	CD14 : Positif	CD15 : Négatif	CD11c : Positif
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	CD79a _{intra} : Négatif	CD19 : Négatif	CD22 : Négatif
	CD10 : Négatif	Cμ : Négative	
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	CD3 _{intra} : Négatif	CD7 : Négatif	CD2 : Négatif
	CD4 : Négatif		
AUTRES MARQUEURS	CD56 : Négatif	CD71 : Négatif	CD41 : Négatif

L'immunophénotypage révèle une population blastique de (61%) ayant le profil immunophénotypique suivant : **CD34-CD117-HLADR+MPO-CD13+CD33+CD14+CD11c+CD15-**. Le Phénotype est compatible avec une **LAM 5** selon la classification de l'EGIL.

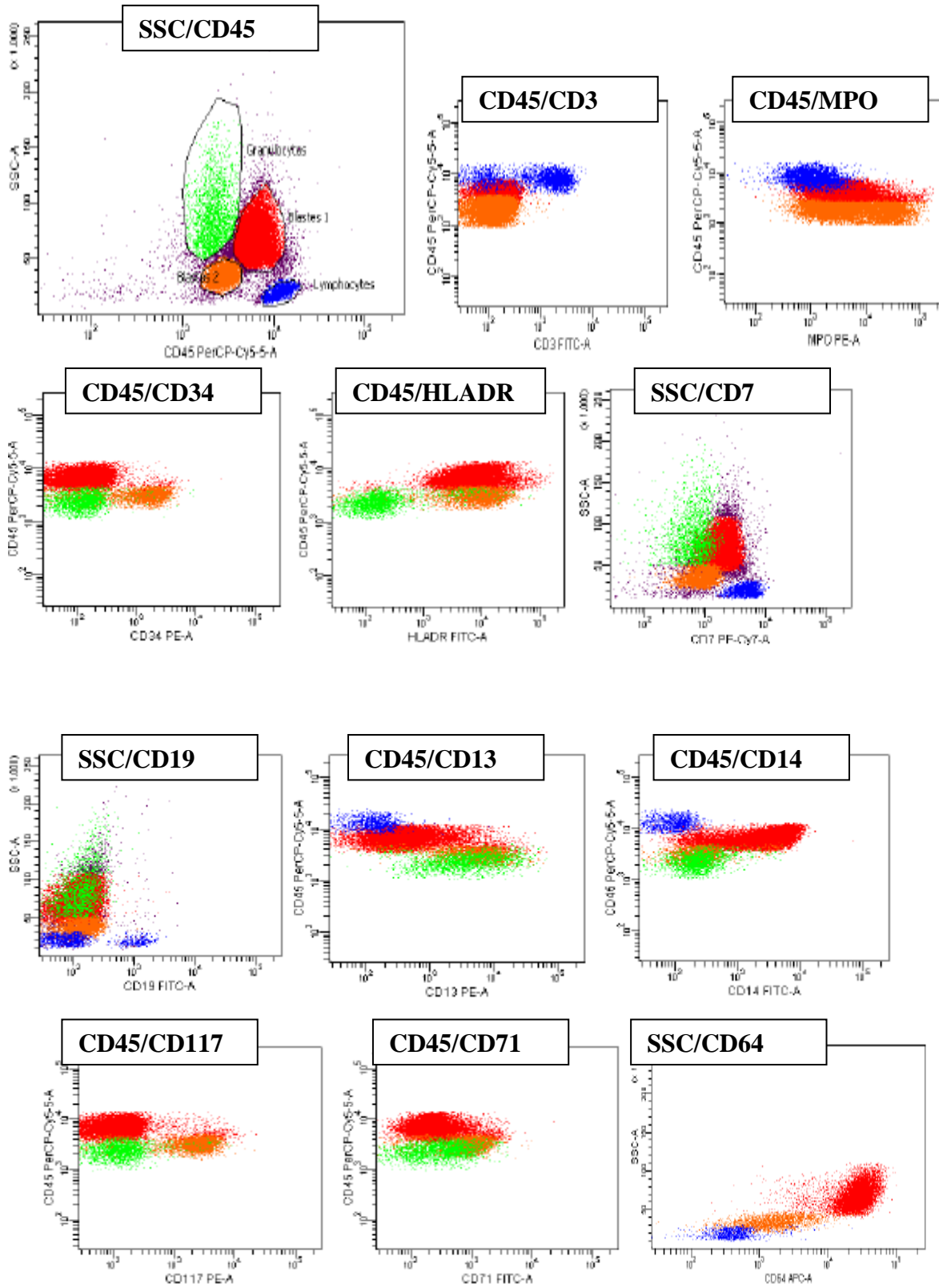


Figure 17: Profil immunophénotypique d'une LAM 4.



L'immunophénotypage révèle :

➤ **UNE POPULATION BLASTIQUE (12%):**

CD34+ CD117+ HLADR+

*MPO+ CD13+ CD33+CD11c- CD64- CD14- CD15- (CD2, CD7 et CD19 :
Négatifs)*

➤ **UNE COMPOSANTE MONOCYTAIRE (68%):**

HLADR+ MPO+ CD13- CD33+ CD64+ CD14+ CD11c+ CD15-

Résultats compatible avec une Leucémie aiguë myéloïde type **LAM4**

Le diagnostic est porté sur la présence de marqueurs monocytaires (CD14, CD64, CD11b) associés aux marqueurs myéloïdes (CD33, CD13). De plus, le CD36 non spécifique de la lignée monocyttaire, est aussi fréquemment exprimé. La différence entre les LAM-4 myélomonocyttaire et les LAM-5 monocyttaire est fondée, comme pour la cytologie, sur la proportion de blastes monocytaires par rapport aux blastes myéloïdes comme le montre l'étude de Merle-Béral *et al.*, 2008.

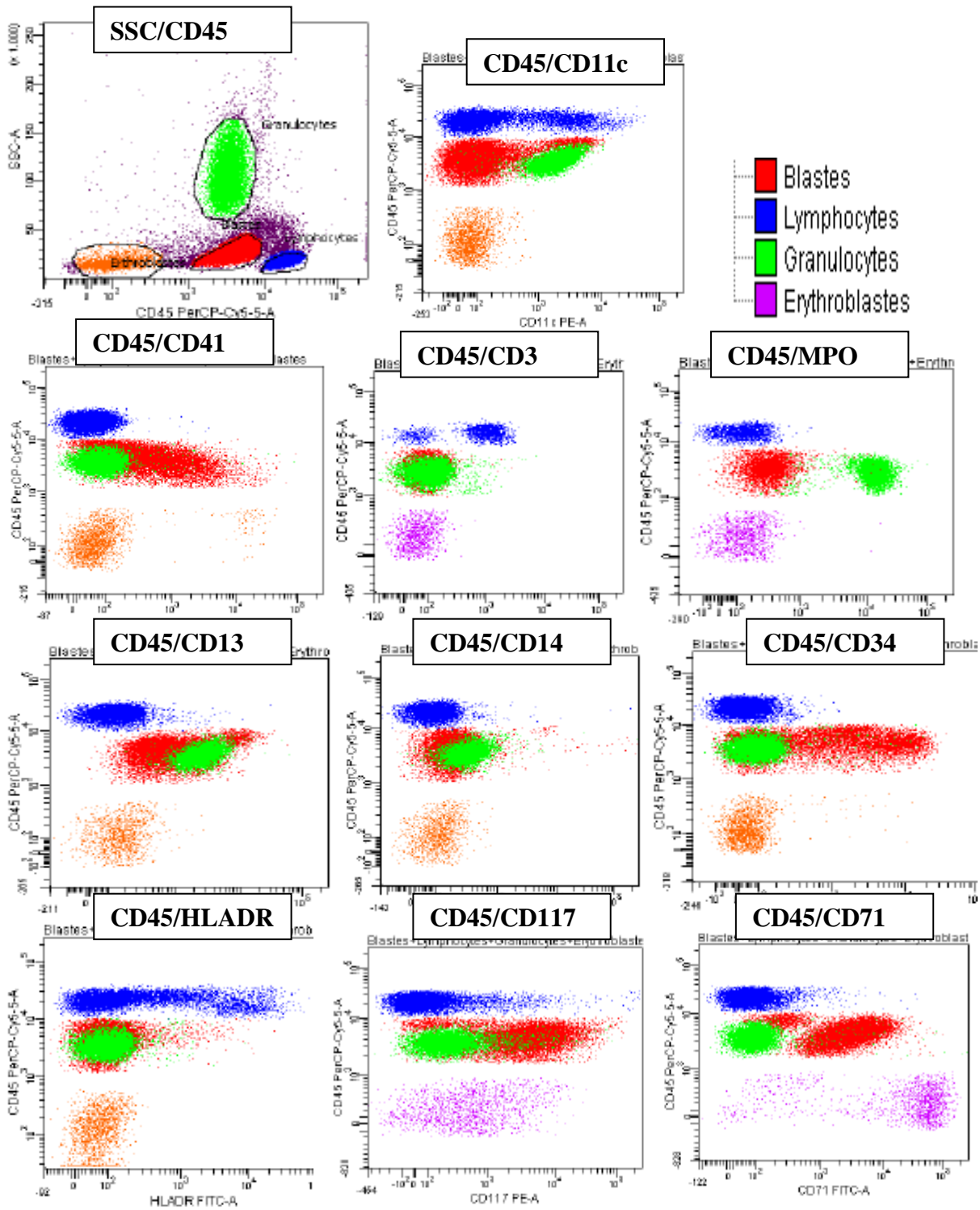


Figure 18: Profil immunophénotypique d'une LAM 7.

L'interprétation du profil immunophénotypique résultant de la cytométrie en flux illustrées dans la figure 18 est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XVI : Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAM 7** :

MARQUEURS	RESULTATS		
MARQUEURS D'IMMATURITE	<i>CD34 : Positif</i> <i>TdT : Négative</i>	<i>CD117 : Positif</i>	<i>HLADR : Négatif</i>
MARQUEURS MYELOÏDES	<i>MPO : Négative</i> <i>CD14 : Négatif</i>	<i>CD13 : Positif</i> <i>CD15 : Négatif</i>	<i>CD33 : Positif</i> <i>CD11c : Négatif</i>
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	<i>CD79_a_{intra} : Négatif</i> <i>CD20 : Négatif</i>	<i>CD19 : Négatif</i>	<i>CD22 : Négatif</i>
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	<i>CD3_{intra} : Négatif</i> <i>CD4 : Négatif</i>	<i>CD7 : Positif</i>	<i>CD2 : Négatif</i>
MARQUEURS ERYTHROCYTAIRES & MEGARYOCYTAIRES	<i>CD41a : Positif</i>	<i>CD71 : Positif</i>	
AUTRES MARQUEURS	<i>CD56 : Faible</i>	<i>CD10 : Négatif</i>	/

Présence d'une population blastique de **42%** exprimant les marqueurs : CD34 – CD117 – CD13 – CD33 – CD7– CD41a et CD71. **Profil immunophénotypique en faveur d'une LAM-7 selon la classification FAB.**

La LAM7 est une forme rare de leucémie (0,5 à 2 % des LA et 3 à 10 % des LAM de l'enfant) (Lacour *et al.*, 2004 ; Athale *et al.*, 2002 ; Paredes-Aguilera *et al.*, 2003). l'étude de ZANDECKI *et al.*, 2013, montre que les mégacaryocytes expriment **au moins une des glycoprotéines plaquettaires**: CD41 (IIb/IIIa) et/ou CD61 (IIIa), que les antigènes myéloïdes CD13 et CD33 sont positifs. HLA-DR sont négatifs et que l'expression cytoplasmique des CD41 est plus spécifique que le marquage de surface, du fait de l'adhésion possible de plaquettes à la surface des blastes MPO négatifs ce qui en accords à 100% avec nos résultats.

Les résultats des autres LAM diagnostiquées ont été illustrés en annexe mais un récapitulatif englobant ces résultats et proposé ci-dessous

Les marqueurs utiles pour l'immunophénotypage des LAM sont tout d'abord ceux des cellules myéloïdes immatures : *CD34*, *CD117*, *CD33* et *CD13*. L'engagement plus net vers la lignée granuleuse peut s'accompagner de l'expression de *CD15* et/ou *CD65*, plus rarement de *CD11b*, pratiquement jamais de *CD16*. Une orientation plutôt **promonocytaire** ou **monocytaire** conduit au maintien de la coexpression *CD13/CD33*, et à l'apparition de marqueurs comme *CD64* ou *CD4*, très rarement de *CD14*. Les **LAM 3 promyélocyaires** se caractérisent de plus par l'absence d'expression de HLA-DR et de *CD34* ainsi que des intégrines *CD11a* et *CD18*. Les **LAM 6 érythrocytaire** se définissent par l'expression *CD36+*, *CD71+*, *GlyA+* selon l'étude de **Dong et al., 2011** ce qui est conforme à nos résultats.

Exemple 2 : LAL

L'immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) permet d'attribuer à la maladie son appartenance à la lignée B ou T, selon les éléments de maturation rappelés plus haut. L'European Group for Immunophenotyping of Leukemias (EGIL) a proposé en 1995 une classification reposant sur ces critères. Son application impose d'avoir recherché sur les blastes l'ensemble des marqueurs entrant en jeu pour l'application de cette classification.

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux**, sur une des 26 LAL a été réalisé sur l'échantillon de moelle totale grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturité (*CD34*, *HLADR*, *CD117*, *TdT*) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [*MPO*, *CD13*, *CD33*, *CD14*, *CD15*, *CD11c*, *CD3_{intra}*, *CD2*, *CD7*, *CD79a_{intra}*, *CD19*, *CD71* et *CD41*] ont été analysés.

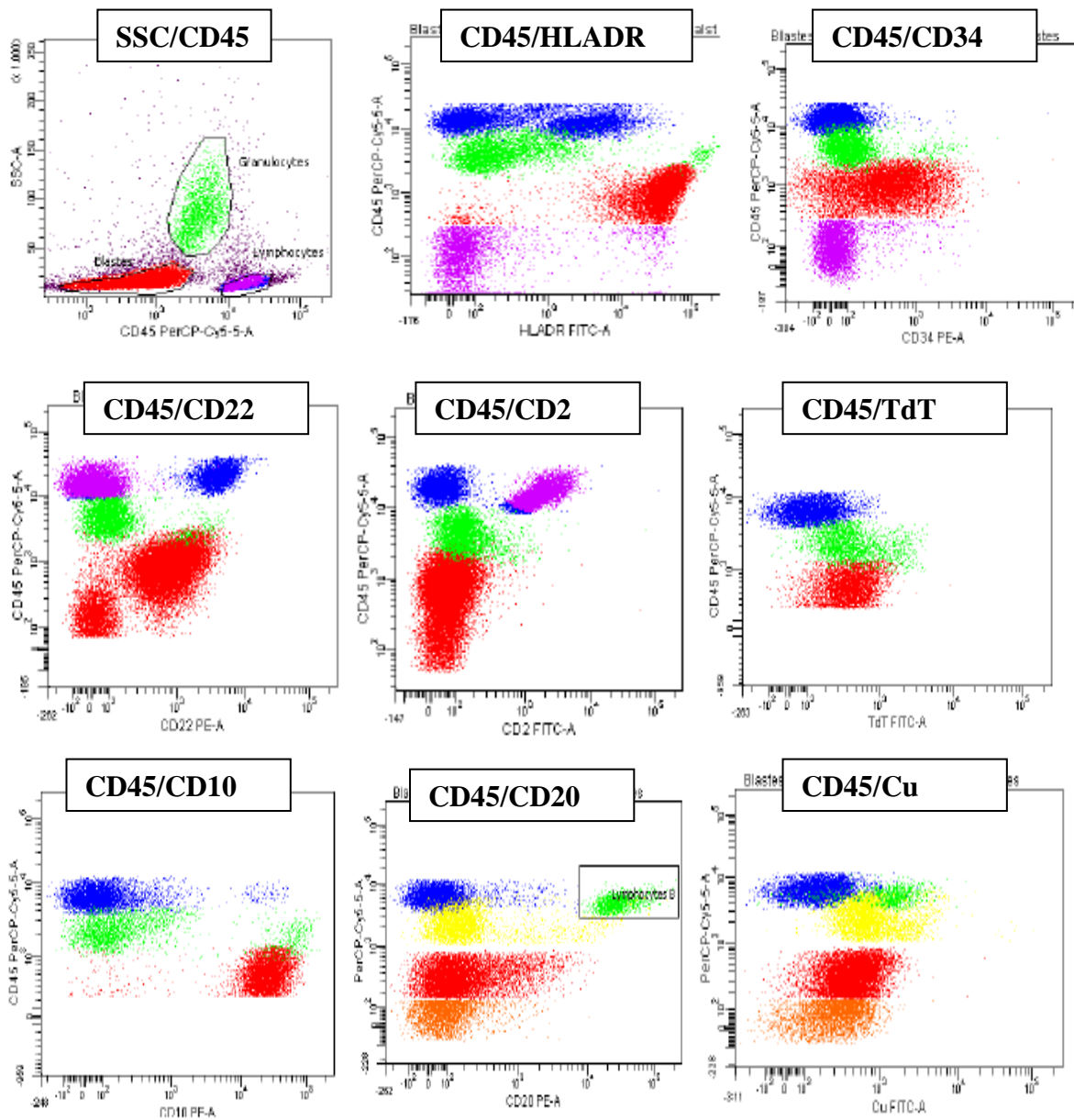


Figure 19: Profil immunophénotypique d'une LAL BII.



L'interprétation du profil immunophénotypique résultant de la cytométrie en flux illustrées dans la figure 20 est représentée dans le tableau suivant.

Tableau XVII : Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAL B**.

MARQUEURS	RESULTATS		
MARQUEURS D'IMMATURITE	CD34 : Positif TdT : Positive	CD117 : Négatif	HLADR : Positif
MARQUEURS MYELOÏDES	MPO : Négative CD14 : Négatif	CD13 : Négatif CD15 : Négatif	CD33 : Négatif CD11c : Négatif
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	CD79a_{intra} : Positif CD10 : Positif	CD19 : Positif C μ : Négative	CD22 : Positif
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	CD3 _{intra} : Négatif CD4 : Négatif	CD7 : Négatif	CD2 : Négatif
AUTRES MARQUEURS	CD56 : Négatif	CD71 : Négatif	CD41 : Négatif

On remarque la Présence d'une population lymphoblastique **B** exprimant les marqueurs : **CD79a_{intra} – CD19 – CD22 CD10 – CD34 –HLADR et TdT**. Le Phénotype est compatible avec une **LAL BII** (LAL Pré-pré-B Commune) selon la classification de l'EGIL.les **21 LAL B** qui ont été diagnostiqués, ont eut la même étude analytiques.

Le stade B-II définit les LAL dites communes, les plus fréquentes, qui coexpriment CD19 et CD10, en l'absence de chaînes d'immunoglobulines selon l'étude de **Maury et al., 2010** ce qui est conforme a nos résultats.

Les résultats des autres LAL B diagnostiquées ont été illustrés en annexe mais un récapitulatif englobant ces résultats et proposé ci-dessous

Pour la lignée B, les marqueurs pan-B sont CD19, cCD22, cCD79a. Les marqueurs de stade de la lignée B étant CD10, c μ (chaîne μ d'immunoglobuline [Ig] cytoplasmique) et sIgM (IgM de surface), le CD20. La molécule HLA-DR et l'Ag nucléaire TdT (désoxynucléotidyl transférase terminale), non spécifiques de la lignée B sont présents dans presque tous les cas de LAL-B (**Liu *et al.*, 2004**). Les précurseurs B très immatures sont caractérisés par l'absence d'Ig, que ce soit en surface (sIgM) ou en intracytoplasmique (c μ) et se divisent en deux catégories, les lymphoblastes pro-B (**LAL pro-B ou de type I**) n'exprimant pas l'Ag CD10 et les blastes pré-pré B (**LAL pré-pré B ou de type II**) qui l'expriment. Les lymphoblastes pré-B (**LAL pré B ou de type III**) restent CD10 positifs et acquièrent l'expression de la chaîne lourde μ intracytoplasmique. Enfin, les cellules B matures (**LAL-B matures ou de type IV**) sont définies par l'expression en surface d'une Ig complète, d'après l'étude de **Merle-Béral *et al.*, 2008** ce qui est conforme totalement avec nos résultats.

Exemple 3 : LAL T

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux**, a été réalisé sur l'échantillon de moelle totale grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturité (**CD34, HLADR, CD117, TdT**) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [**MPO, CD13, CD33, CD14, CD15, CD11c, CD3_{intra}, CD2, CD7, CD79a_{intra}, CD19, CD71 et CD41**] ont été analysés.

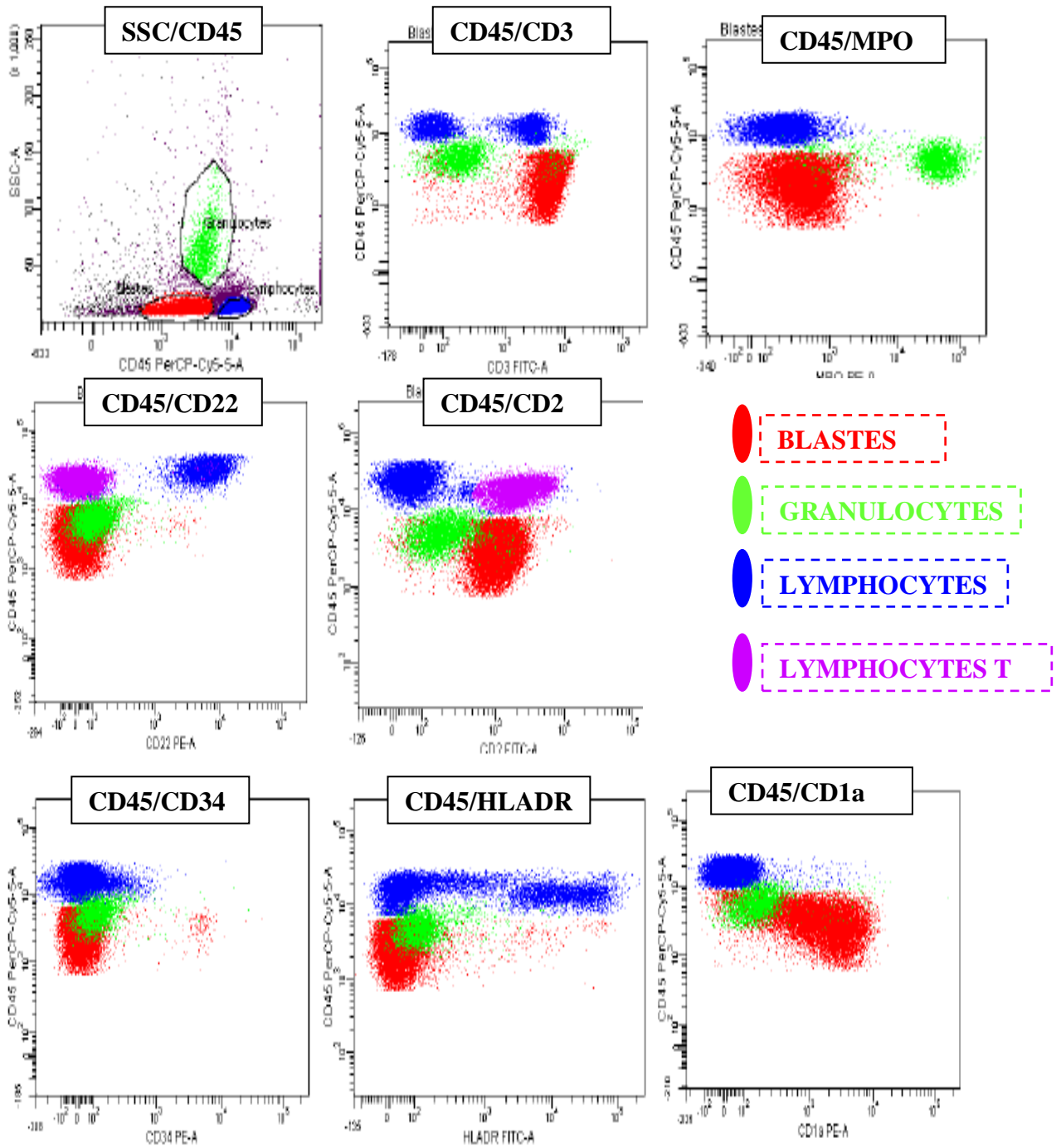


Figure 20: Profil immunophénotypique d'une LAL TH1 corticale.

L'interprétation du profil immunophénotypique résultant de la cytométrie en flux illustrées dans la figure 23 est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XVIII : Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAL T**.

MARQUEURS	RESULTATS		
MARQUEURS D'IMMATURITE	CD34 : Négatif	CD117 : Négatif	HLADR : Négatif
	TdT : Positif		
MARQUEURS MYELOÏDES	MPO : Négatif CD14 : Négatif	CD13 : Négatif CD15 : Négatif	CD33 : Négatif CD11c : Négatif
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	CD79a _{intra} : Négatif CD20 : Négatif C μ : Négative	CD19 : Négatif CD10 : IgMs : Négative	/
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	CD3_{intra} : Positif CD5 : Positif CD1a : Positif	CD7 : Positif CD4 : Positif	CD2 : Positif CD8 : Positif
MARQUEURS ERYTHROCYTAIRE ET MEGACARYOCYTAIRE	CD71 : Négatif	CD41a : Négatif	/

CD3_{intra} : CD3 intracytoplasmique, **CD79a_{intra}** : CD79a intracytoplasmique, **MPO_{intra}** : MPO intracytoplasmique. **C μ** : chaîne mu intracytoplasmique, **IgMs** : IgM de surface.

La population blastique exprime les marqueurs : **CD3_{intra}, CD2, CD5, CD7, CD1a, CD4, CD8 et la TdT**. Négativité des marqueurs B (**CD79a_{intra} – CD19 – CD20 – CD10**) et myéloïdes (**MPO, CD13, CD33, CD14, CD15, CD11c**). Phénotype compatible avec une **LAL T-III corticale** selon la classification de l'EGIL.

D'après l'étude de **Lacombe et al., 2013** la présence de CD1a en surface signe la nature thymocytaire de la prolifération et le stade T-III ce qui corrobore nos résultats . Les blastes sont classés dans cette catégorie tant que CD1a persiste, même si l'expression de CD3 en surface a débuté.

Les résultats des autres LAL T diagnostiquées ont été illustrés en annexe mais un récapitulatif englobant ces résultats et proposé ci-dessous

Les quatre stades de la classification des LAL-T sont caractérisés par l'expression intracytoplasmique de CD3 en l'absence de CD3 de surface pour les stades T-I et T-II. 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. 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. Ces informations ont été rapportés par l'étude de **Béné *et al.*, 2013** ce qui confirme nos résultats.

L'apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic des hémopathies malignes en général et dans les leucémies aiguës en particulier est indéniable, cet outil s'associe aux autres méthodes classiques, cytologie, histologie et colorations spécifiques afin d'asseoir de manière fiable et précise le diagnostic des leucémies aiguës.

Il nécessite néanmoins un matériel sophistiqué, des panels complets, un contrôle de qualité et un personnel averti.

Notre stage au laboratoire de béni Messous nous a permis de constater l'importance de cette méthode qui permet souvent d'établir un diagnostic précis dans la journée même et donc d'optimiser le pronostic des malades par la mise en route précoce de thérapeutiques adaptées.

Les résultats de ces six mois de stage ont montrés l'importance de cette pathologie chez l'adulte et l'enfant, avec plus de 59 cas recensés, les difficultés parfois à établir un diagnostic (20 cas) d'où la nécessité d'un travail multidisciplinaire associant cliniciens et biologistes.

Presque tous les types de leucémies aiguës sont retrouvées ce qui nous a permis d'analyser tous les spectres immunophénotypiques et d'en appréhender les difficultés.

Cet outil devrait et doit être disponible dans toutes les structures prenant en charge les hémopathies malignes, son utilisation tend à se généraliser même s'il demeure difficile d'accès actuellement dans tout le pays.

Annexe 1

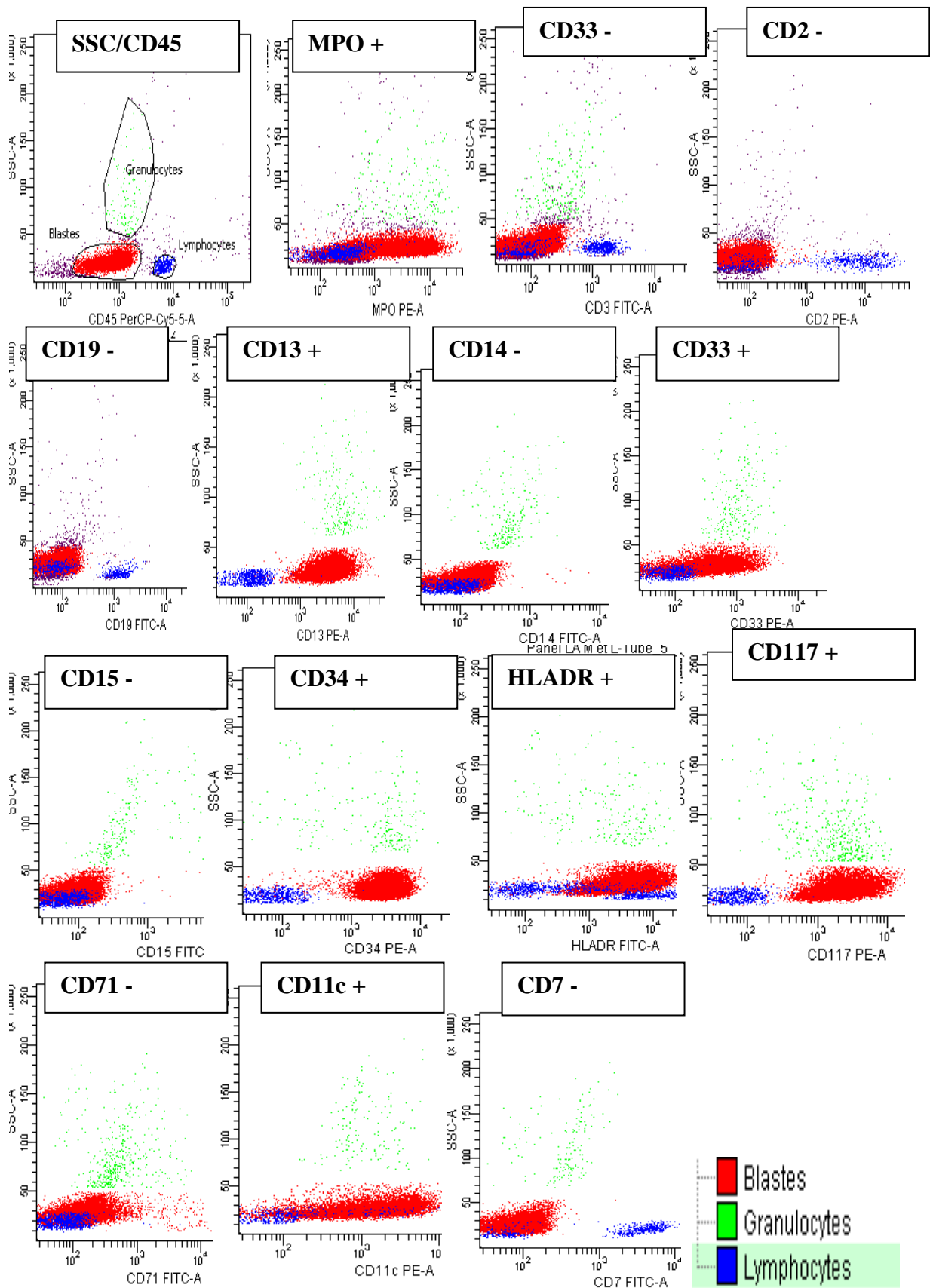


Figure 21 : Profil immunophénotypique d'une LAM 1 diagnostiquées.

L'immunophénotypage (par cytométrie en flux) a été réalisé sur l'échantillon de sang total à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturité (CD34, HLADR, CD117) et des différentes lignées myéloïdes, lymphoïdes et érythrocytaire [MPO_{intra}, CD13, CD33, CD14, CD15, CD11c, CD2, CD3_{intra}, CD79a_{intra}, CD7, CD19 et CD71] ont été analysés.

L'immunophénotypage d'une des deux **LAM 1** révèle :

UNE POPULATION BLASTIQUE (84%):

CD34+ CD117+ HLADR+

MPO+ CD13+ CD33+/-

CD11c+/- CD14- CD15- CD71-

CD2, CD7 et CD19 : Négatifs

On note aussi la présence des éléments suivants :

Lymphocytes : **7%**

Granulocytes : **1.7%**

Résultats compatible avec une Leucémie aiguë myéloïde type LAM1 (classification FAB)

*Abréviations : + : Positif | +/- : Faible | CD3_{intra} : CD3 intracytoplasmique,
CD79a_{intra} : CD79a intracytoplasmique, MPO_{intra} : MPO intracytoplasmique*

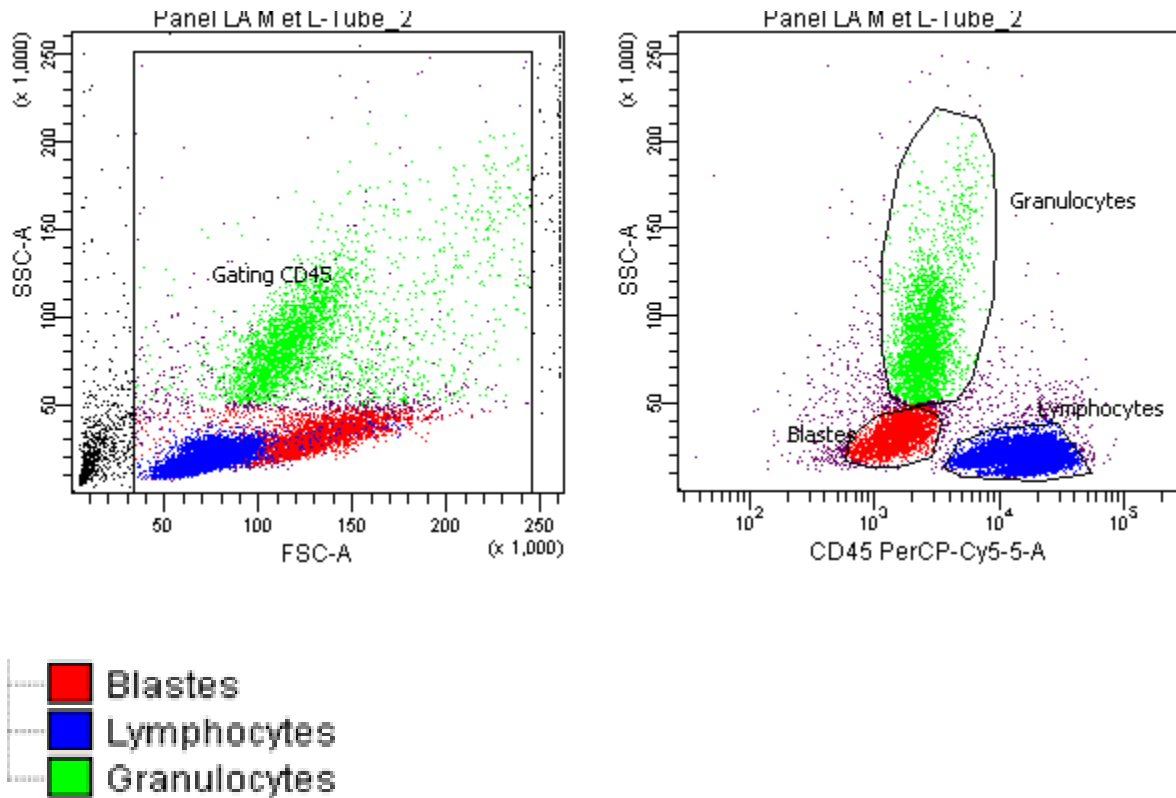


Figure 22 : Profil immunophénotypique d'une LAM 2.

L'immunophénotypage d'une des trois LAM 2 révèle :

CD34+/-, CD117+, HLADR+
MPO+, CD13+, CD33+
CD11c+/-, CD14-, CD15-, CD41, CD71-

CD3_{intra} CD2, CD7 et CD19 : Négatifs

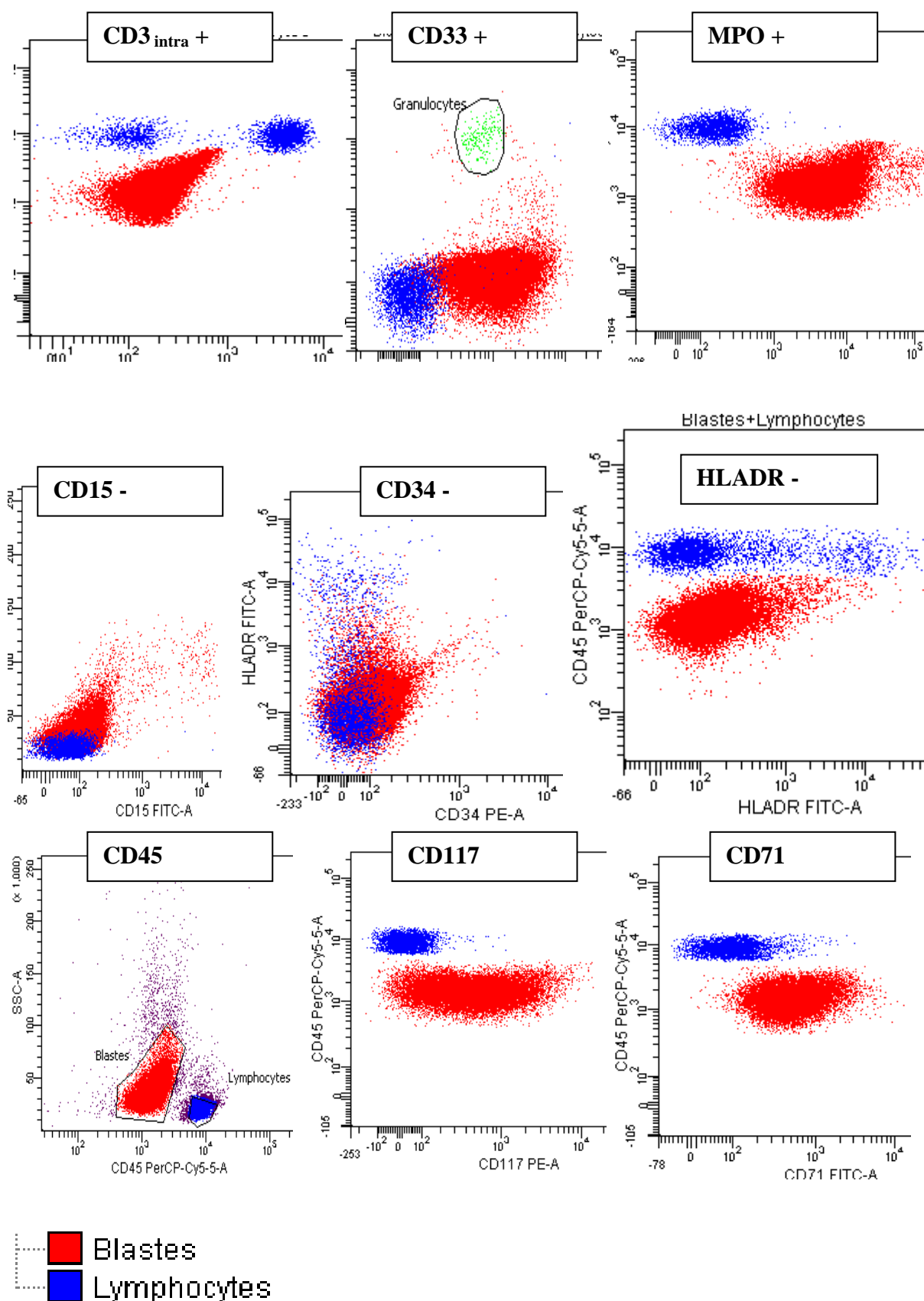


Figure 23 : Profil immunophénotypique d'une LAM 3 diagnostiquées.

L'immunophénotypage (par cytométrie en flux) a été réalisé sur l'échantillon du sang périphérique grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturation (CD34, HLADR, CD117) et des différentes lignées myéloïdes, lymphoïdes et érythrocytaire [MPO_{intra} , CD13, CD33, CD14, CD15, CD16, CD11c, CD2, $CD3_{intra}$, CD4, CD7, CD10, CD19, CD56, CD64 et CD71] ont été analysés.

L'immunophénotypage d'une des six **LAM 3** révèle une population blastique de **96%**.

Population blastique (96%):

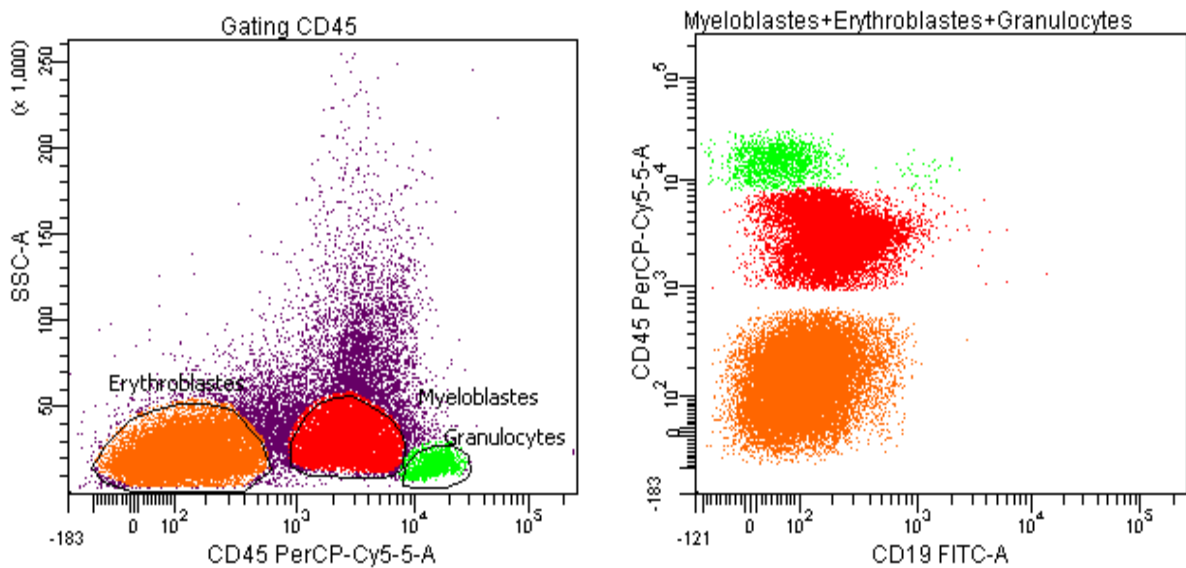
CD34- CD117+ HLADR+/-

MPO_{intra} + CD13+ CD33+ CD11c+/- CD14+/- CD15-

CD2+/-, CD7+/-

$CD3_{intra}$, CD4, CD10, CD16, CD19, CD56, CD64 et CD71 : Négatifs

Résultats en faveur d'une Leucémie aiguë myéloïde de type LAM 3.



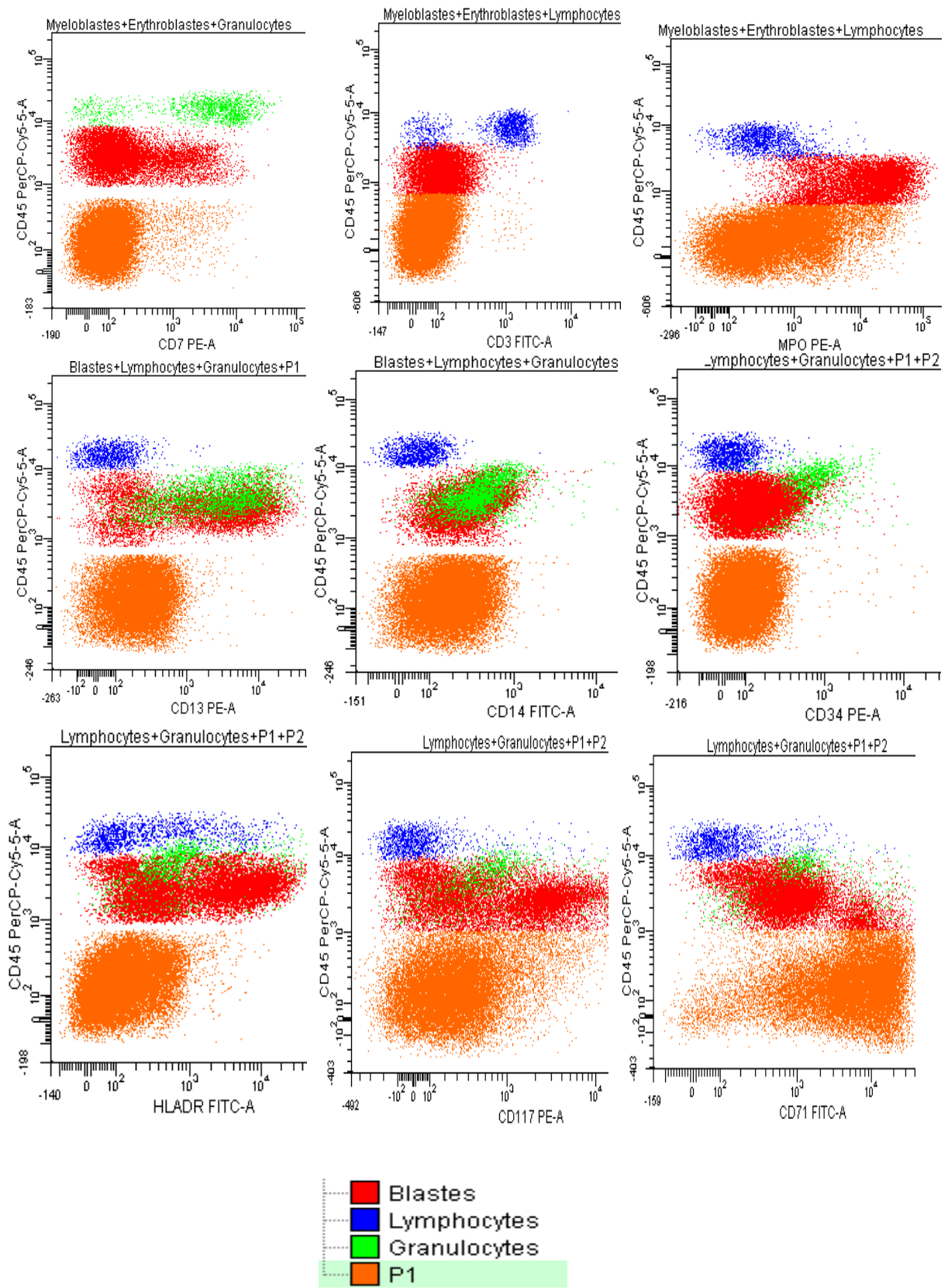


Figure 24 : Profil immunophénotypique d'une LAM 6 diagnostiquées.

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux (cytomètre à 6 couleurs)**, a été réalisé sur l'échantillon de moelle osseuse (du 05/08/2014) grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturité (*CD34*, *HLADR*, *CD117*, *TdT*) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [*MPO*, *CD13*, *CD33*, *CD14*, *CD15*, *CD11c*, *CD3_{intra}*, *CD2*, *CD7*, *CD79a_{intra}*, *CD19*, *CD71* et *CD41*] ont été analysés.

L'immunophénotypage révèle la présence de deux populations blastiques :

1- **Une composante myéloïde** (30%) ayant le phénotype suivant :

***MPO+*, *CD13+*, *CD33+*, *CD11c+*
CD117+, *HLADR+***

CD34-, *CD14-*, *CD15-*, *CD71-*, *CD36-*, *GlyA-*, *CD41a-*,
CD19-, *CD79a_{intra}-*, *CD10-*, *CD3_{intra}-*, *CD2-*, *CD7-*, *TdT-*.

2- **Une composante érythroïde** (56%) ayant le phénotype suivant :

CD36+*, *CD71+*, *GlyA+

CD34-, *HLADR-*, *CD117-*, *MPO-*, *CD13-*, *CD33-*, *CD14-*, *CD15-*, *CD11c-*, *CD41a-*,
CD19-, *CD79a_{intra}-*, *CD10-*, *CD3_{intra}-*, *CD2-*, *CD7-*, *TdT-*.

Profil immunophénotypique en faveur d'une **érythroleucémie LAM 6** selon la classification FAB.

Abréviations : *CD3_{intra}* : *CD3 intracytoplasmique* – *CD79a_{intra}* : *CD79a intracytoplasmique* –
TdT : *Terminal deoxynucleotidyl Transférase* – *GlyA* : *Glycophorine A*.

Annexe 2

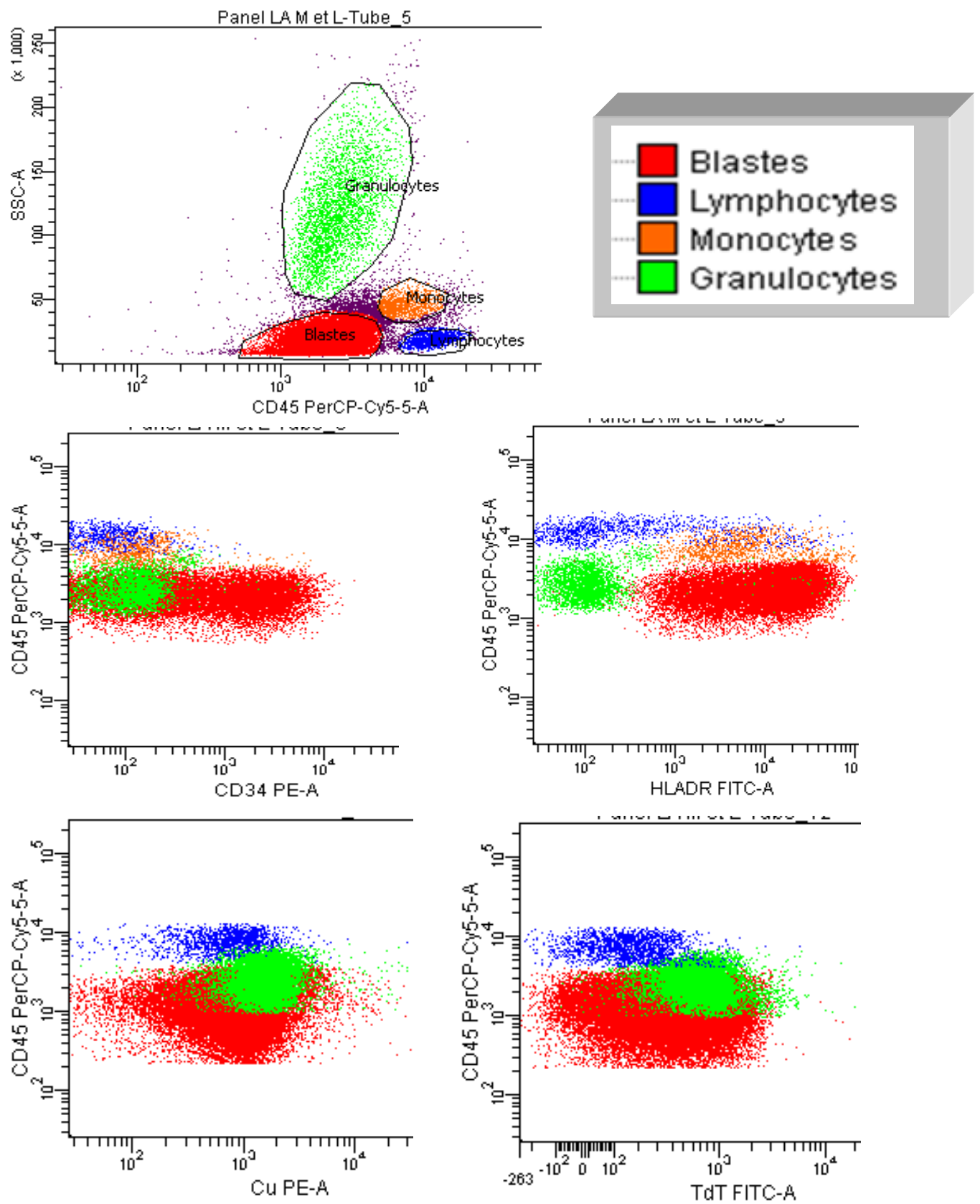


Figure 25 : Profil immunophénotypique d'une LAL BII (LAL Pré-pré-B Commune) diagnostiquées.

IMMUNOPHENOTYPAGE DE LA POPULATION BLASTIQUE

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux (cytomètre à 6 couleurs)**, a été réalisé sur l'échantillon de moelle totale grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immatunité (*CD34*, *HLADR*, *CD117*, *TdT*) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [*MPO*, *CD13*, *CD33*, *CD14*, *CD15*, *CD11c*, *CD3_{intra}*, *CD2*, *CD7*, *CD79a_{intra}*, *CD19*, *CD71* et *CD41*] ont été analysés.

Tableau XIX: Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAL B-II (LAL pré-pré-B commune)**.

<i>MARQUEURS</i>	<i>RESULTATS</i>		
<i>MARQUEURS D'IMMATURITE</i>	<i>CD34 : Positif</i>	<i>TdT : Positive</i>	<i>CD117 : Négatif</i>
<i>MARQUEURS MYELOÏDES</i>	<i>MPO : Négatif</i> <i>CD15 : Négatif</i> <i>CD11b : Négatif</i>	<i>CD13 : Négatif</i> <i>CD14 : Négatif</i> <i>CD11c : Négatif</i>	<i>CD33 : Négatif</i> <i>CD64 : Négatif</i>
<i>MARQUEURS LYMPHOÏDES B</i>	<i>CD79a_{intra} : Positif</i> <i>CD10 : Positif</i>	<i>CD19 : Positif</i> <i>Cμ : Négative</i>	<i>CD20 : Négatif</i> <i>IgMs : Négative</i>
<i>MARQUEURS LYMPHOÏDES T</i>	<i>CD3_{intra} : Négatif</i> <i>CD4 : Négatif</i>	<i>CD7 : Négatif</i>	<i>CD2 : Négatif</i>
<i>AUTRES MARQUEURS</i>	<i>CD71 : Négatif</i> <i>CD56 : Négatif</i>	<i>CD41 : Négatif</i> <i>CD36 : Négatif</i>	<i>HLADR : Positif</i>

Présence d'une population lymphoblastique **B** exprimant les marqueurs : *CD79a_{intra}* – *CD19* – *CD10* – *CD34* – *HLADR* et *TdT*.

POPULATION BLASTIQUE : **42%**, phénotype compatible avec une **LAL B-II (LAL pré-pré-B commune)** selon la classification de l'EGIL.

Abréviations : *CD3_{intra}* : *CD3 intracytoplasmique* – *CD79a_{intra}* : *CD79a intracytoplasmique* – *TdT* : *Terminal deoxynucleotidyl Transférase* – *Cμ* : *Chaîne mu intracytoplasmique* – *IgMs* : *IgM de surface*.

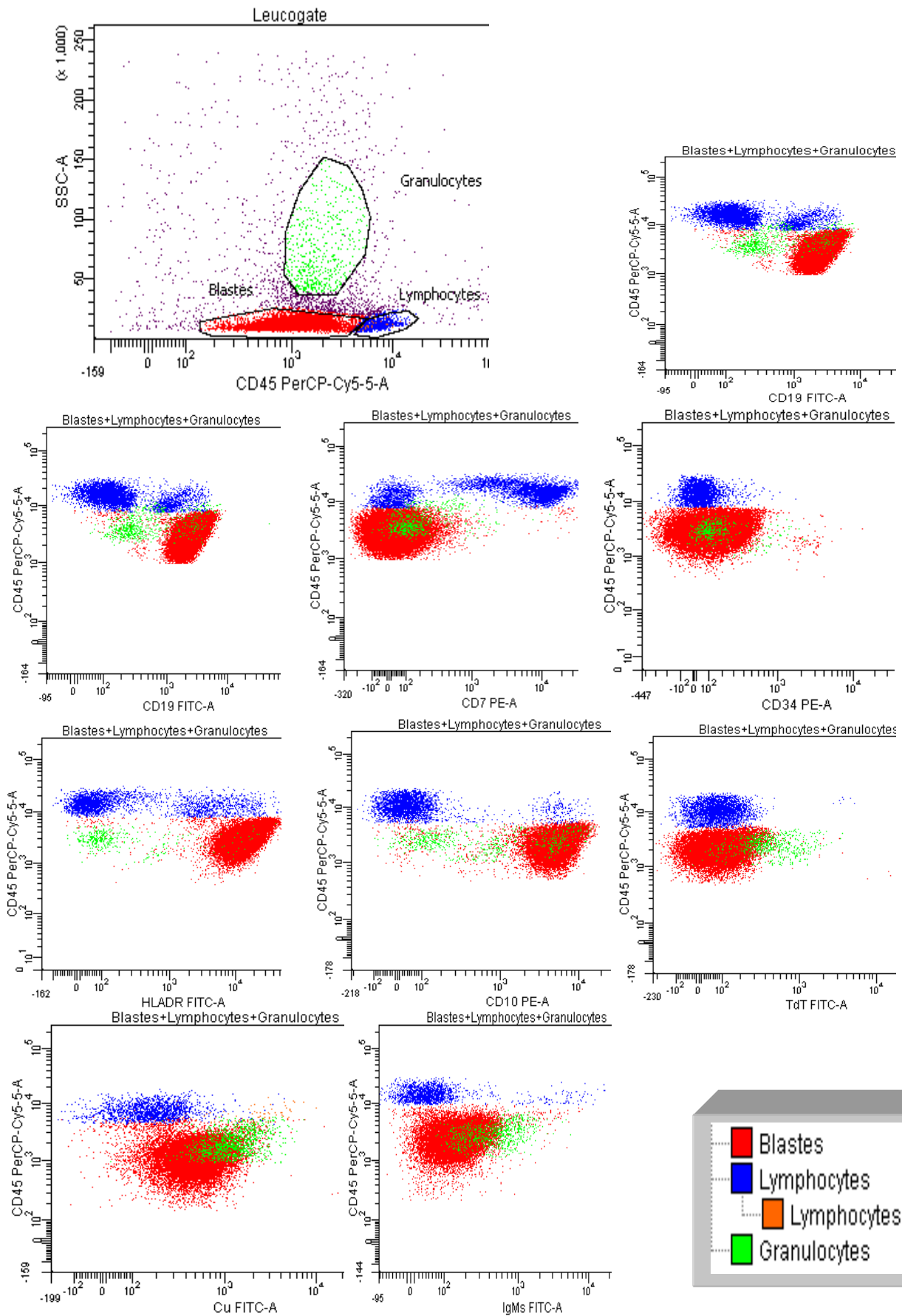


Figure 26: Profil immunophénotypique d'une LAL-B matures ou de type IV diagnostiquées.

IMMUNOPHENOTYPAGE DE LA POPULATION BLASTIQUE

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux (cytomètre à 6 couleurs)**, a été réalisé sur l'échantillon de sang total grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturation (*CD34*, *HLADR*, *CD117*, *TdT*) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [*MPO*, *CD13*, *CD33*, *CD14*, *CD15*, *CD11c*, *CD3_{intra}*, *CD2*, *CD7*, *CD79a_{intra}*, *CD19*, *CD71* et *CD41*] ont été analysés.

Tableau XX: Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une **LAL B-IV (LAL B mature)**.

MARQUEURS	RESULTATS
MARQUEURS D'IMMATURITE	<i>CD34</i> : Négatif <i>CD117</i> : Négatif <i>HLADR</i> : Positif <i>TdT</i> : Négative
MARQUEURS MYELOÏDES	<i>MP</i> : Négative <i>CD13</i> : Négatif <i>CD33</i> : Négatif <i>CD14</i> <i>CD15</i> : Négatif <i>CD11c</i> : Négatif : Négatif
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	<i>CD79a_{intra}</i> : <i>CD19</i> : Positif <i>CD22</i> : Positif Positif <i>CD20</i> : Positif <i>CD10</i> : Positif <i>IgMs</i> : Positive
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	<i>CD3_{intra}</i> : <i>CD7</i> : Négatif <i>CD2</i> : Négatif Négatif <i>CD4</i> : Négatif
AUTRES MARQUEURS	<i>CD56</i> : <i>CD71</i> : Négatif <i>CD41</i> : Négatif Négatif

Présence d'une population lymphoblastique **B** exprimant les marqueurs : *CD79a_{intra}* – *CD19* – *CD22* – *CD20* – *CD10* – *HLADR* et *IgMs*.

POPULATION BLASTIQUE : 90%, phénotype compatible avec une LAL B-IV (LAL B mature) selon la classification de l'EGIL.

Abréviations : *CD3_{intra}* : *CD3* intracytoplasmique – *CD79a_{intra}* : *CD79a* intracytoplasmique – *TdT* : Terminal deoxynucleotidyl Transférase – *IgMs* : *IgM* de surface.

Annexe 3

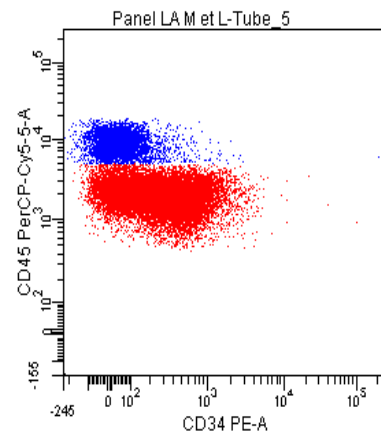
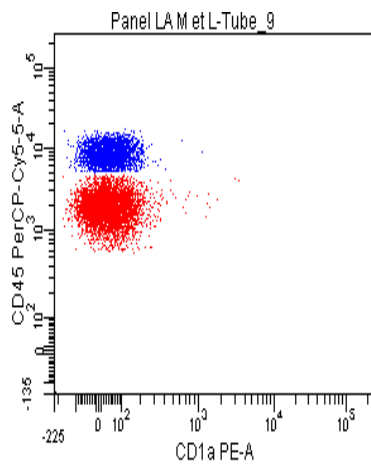
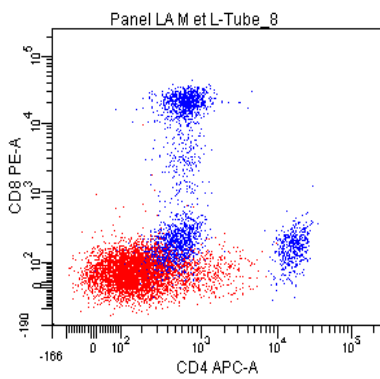
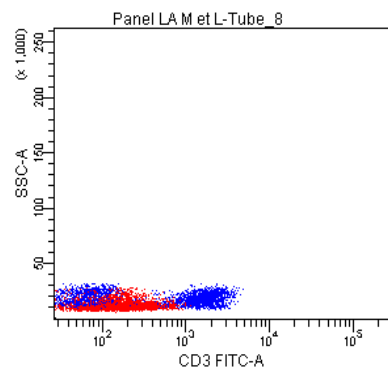
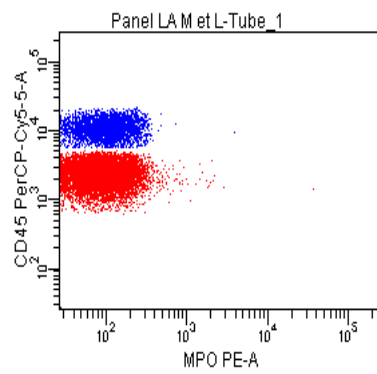
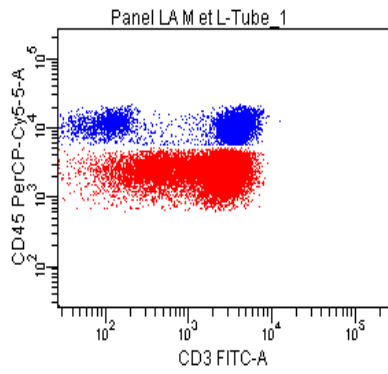
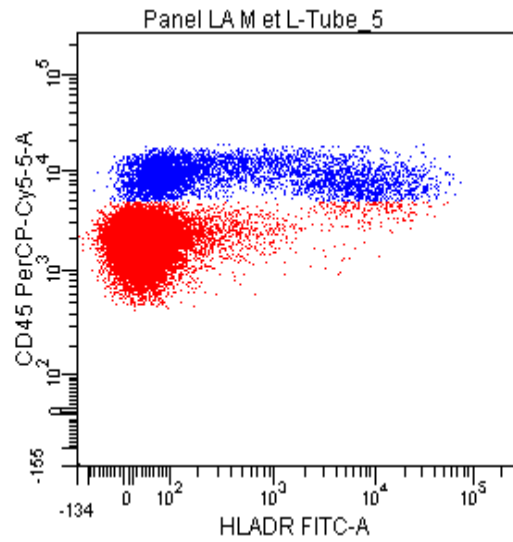
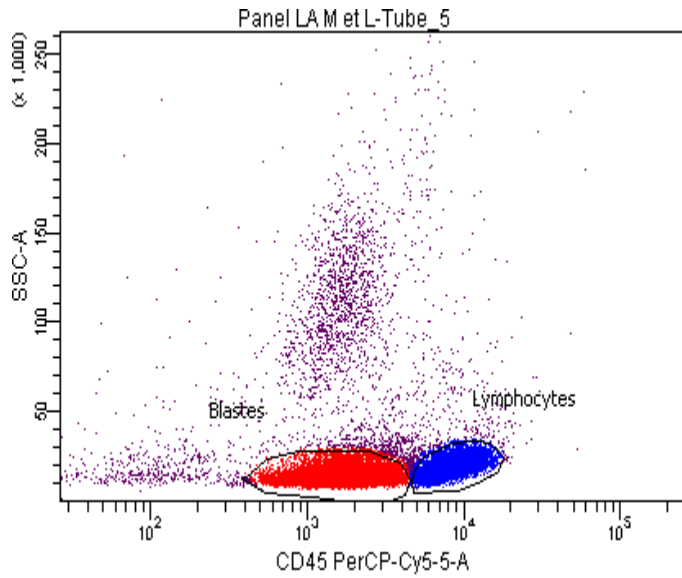


Figure 27: Profil immunophénotypique des deux LAL-T I diagnostiqués.

IMMUNOPHENOTYPAGE DE LA POPULATION BLASTIQUE

L'immunophénotypage, **par cytométrie en flux (cytomètre à 6 couleurs)**, a été réalisé sur l'échantillon de moelle osseuse grâce à un **gating SSC/CD45**. Des marqueurs d'immaturation (*CD34, HLADR, CD117, TdT*) et des différentes lignées myéloïde, lymphoïde, érythrocytaire et plaquettaire [*MPO, CD13, CD33, CD14, CD15, CD11c, CD3_{intra}, CD1a, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD79_{intra}, CD19, CD71 et CD41*] ont été analysés.

Tableau XXI: Résultat du marquage dans l'immunophénotypage d'une LAL T-I (LAL pro –T).

MARQUEURS	RESULTATS		
MARQUEURS D'IMMATURITE	CD34 : Positif TdT : Faible	CD117 : Négatif	HLADR : Positif
MARQUEURS MYELOÏDES	MPO : Négatif CD14 : Négatif	CD13 : Positif CD15 : Négatif	CD33 : Positif CD11c : Négatif
MARQUEURS LYMPHOÏDES B	CD79_{intra} : Négatif CD20 : Négatif Cμ : Négative	CD19 : Négatif CD10 : Négatif IgMs : Négative	CD22 : Négatif /
MARQUEURS LYMPHOÏDES T	CD3_{intra} : Positif CD5 : Négatif CD1a : Négatif	CD7 : Positif CD4 : Négatif	CD2 : Négatif CD8 : Négatif
MARQUEURS ERYTHROCYTAIRE ET MEGACARYOCYTAIRE	CD71 : Positif	CD41 : Négatif	/

Présence d'une population lymphoblastique **T** exprimant les marqueurs : *CD3_{intra} – CD7 – CD34 – HLADR* avec une expression faible de la *TdT*.

Expression aberrante du marqueur myéloïde *CD13 et CD33 et CD71*.

POPULATION BLASTIQUE : 70%, phénotype compatible avec une LAL T-I (LAL pro – T) selon la classification de l'EGIL.

***Abréviations : CD3_{intra} : CD3 intracytoplasmique – CD79a_{intra} : CD79a intracytoplasmique –
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transférase – C μ : Chaîne mu intracytoplasmique –
IgMs : IgM de surface.***