



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et physiologie cellulaire

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Thème

Expression de marqueur CD38 dans la leucémie lymphoïde
chronique par immunophénotypage par cytométrie en flux

Présenté par : AISSA Karima

AZEBI Chahinez

Devant le Jury :

<i>Mme. KANANE A</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Président (e)</i>
<i>Mme. ABDUL HUSSEIN A</i>	<i>MCA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examineur (ice)</i>
<i>Mme. MOKRANE A</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Promoteur (ice)</i>
<i>Mme. OUKID S</i>	<i>MD.MCA</i>	<i>CAC, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur (ice)</i>

Session 2019 / 2020

Remerciements

Nos sincères remerciements à Dr SAADI. L maître de conférences à l'université de Blida 1 pour son aide, sa générosité et son attention, ainsi que le partage de ses connaissances et son expérience scientifique durant le long de notre parcours.

Nos sincères remerciements vont à Notre promotrice Dr MOKRANE. A, pour son aide, son soutien, et ses conseils précieux, ainsi pour nous avoir encouragés durant toute la période de notre travail.

Ainsi pour notre Co-promotrice Pr OUKID. S, ou nous tenons à lui exprimer nos sincères remerciements pour son suivi, son aide et ses orientations durant toute la période du stage.

Nos sincères remerciements aussi à Dr KANANE. A et Dr ABDUL HUSSEIN. A, d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma mère, ma raison d'être, ma raison de vivre, la lanterne qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour.

A mon père, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont il a fait preuve à mon égard.

A mon frère Islem qui représente ma joie.

A ma famille, et à tous mes ami(e)s, en témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments passés ensemble.

A mes chers professeurs qui m'ont enseigné le long de mon parcours.

A tous les gens qui ont cru en moi et qui me donnent l'envie d'aller en avant.

Aïssa Karima

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de ma mère.

A mon père, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont il a fait preuve à mon égard.

A tous mes frère, mes sœur, mes belles sœurs, beau frères ainsi que leurs enfants du petits au grands.

A tous mes ami(e)s, en témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments passés ensemble.

A mes chers professeurs qui m'ont enseigné le long de mon parcours.

A tous les gens qui ont cru en moi et qui me donnent l'envie d'aller en avant.

AZEBI CHAHINEZ

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie la plus fréquente chez l'adulte, avec une prédominance masculine, Caractérisé par la prolifération monoclonale maligne de lymphocyte B mature et leur accumulation dans la moelle osseuse puis passage dans le sang et les organes lymphoïde secondaire.

Le but de notre étude est de confirmer le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique par immunophénotypage par cytométrie en flux qui consiste à détecter le marqueur CD38 à la surface des lymphocytes B qui caractérise cette leucémie. Nous avons également pour objectif principal l'étude de la relation entre l'expression du marqueur CD38 et la progression de la maladie.

Il s'agit d'une étude prospective sur une période allant du 01 Février 2020 au 12 Mars 2020 et du 16 Juillet 2020 au 30 Aout 2020 au niveau du laboratoire d'hématologie du service d'hématologie, l'EHS ELCC *Centre* Anti-Cancer (CAC) à l'hôpital de Frantz Fanon de Blida, portant sur 22 échantillons sélectionnés pour immunophénotypage par cytométrie en flux.

Nos résultats révèlent des taux d'expression du CD38 varient entre 0,20% et 97%. Cette expression est associée à un mauvais pronostic qui caractérise un stade avancé de la maladie. Le CD38 joue un rôle important dans la cellule leucémique en favorisant leur activité proliférative et leur survie.

Le CD38 est considéré comme un marqueur indépendant de LLC, et ce biomarqueur pourrait représenter de nouvelles cibles thérapeutiques en oncologie.

Mots clés : CD38, leucémie lymphoïde chronique, cytométrie en flux, lymphocytes B. immunophénotypage.

Abstract

Chronic lymphoid leukemia is the most common leukemia in adults, with a male predominance, characterized by malignant monoclonal proliferation of mature B lymphocytes and their accumulation in the bone marrow and then passage into the blood and secondary lymphoid organs.

The aim of our study is to confirm the diagnosis of chronic lymphoid leukemia by immunophenotyping by flow cytometry which consists in detecting the CD38 marker on the surface of B lymphocytes which characterizes this leukemia. Our main objective was also to study the relationship between the expression of the CD38 marker and the progression of the disease.

This is a prospective study over a period from February 01, 2020 to March 12, 2020 and from July 16, 2020 to August 30, 2020 at the level of the hematology laboratory of the hematology service, the EHS ELCC Center Anti-Cancer (CAC) at Frantz Fanon of Blida hospital, involving 22 samples selected for immunophenotyping by flow cytometry.

Our results show that the CD38 expression levels vary between 0.20% and 97%. This expression is associated with a poor prognosis which characterizes an advanced stage of the disease. CD38 plays an important role in the leukemia cell by promoting their proliferative activity and survival.

CD38 is considered to be an independent marker of CLL, and this biomarker could represent new therapeutic targets in oncology.

Keywords: CD38, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry, immunophenotyping, B lymphocytes.

ملخص

سرطان الدم الليمفاوي المزمن هو أكثر أنواع اللوكيميا شيوعًا عند البالغين ، وغالبًا ما يصيب الرجال ، ويتميز بانتشار خبيث لوحيدة النسيلة اللمفاوية البائية الناضجة وتراكمه في نخاع العظم ثم مروره إلى الدم والأعضاء اللمفاوية الثانوية.

الهدف من دراستنا هو تأكيد تشخيص سرطان الدم اللمفاوي المزمن عن طريق التتميط المناعي عن طريق قياس التدفق الخلوي و الذي يتكون من اكتشاف علامة CD38 على سطح الخلايا الليمفاوية البائية التي تميز سرطان الدم هذا. كان هدفنا الرئيسي أيضا دراسة العلاقة بين التعبير عن علامة CD38 و تطور المرض.

هذه دراسة مستقبلية على مدى الفترة من 1 فبراير 2020 إلى 12 مارس 2020 ومن 16 يوليو 2020 إلى 30 أغسطس 2020 على مستوى مختبر أمراض الدم التابع لخدمة أمراض الدم , مركز ELCC EHS لمكافحة السرطان (CAC) في مستشفى فرانتز فانون بالبلدية, بما في ذلك 22 عينة تم اختيارها للنمذجة المناعية عن طريق قياس التدفق الخلوي.

تظهر نتائجنا معدلات تعبير CD38 تتراوح بين 0.20% و 97% يرتبط هذا التعبير بسوء التشخيص الذي يميز مرحلة متقدمة من المرض. يلعب CD38 دورًا مهمًا في خلايا سرطان الدم من خلال تعزيز نشاطها التكاثري وبقائها على قيد الحياة.

يعتبر CD38 علامة مستقلة ل LLC, ويمكن أن يمثل هذا المرقم الحيوي أهدافًا علاجية جديدة في علم الأورام.

الكلمات المفتاحية:

اللمفاوية البائية - التتميط المناعي - سرطان الدم الليمفاوي المزمن- التدفق الخلوي- CD38.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Les organes lymphoïdes primaires et secondaires	07
Figure 2	L'équilibre des membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dicte la survie cellulaire	09
Figure 3	Initiation de la signalisation lors de l'engagement des BCR à IgG et IgM	10
Figure 4	La différenciation des lymphocytes B comprend deux phases: une phase indépendante des antigènes étrangers, de la cellule souche hématopoïétique jusqu'au lymphocyte B mature, dans la moelle osseuse, et une phase dépendante des antigènes étrangers, du lymphocyte B mature au plasmocyte et au lymphocyte B mémoire, dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques)	10
Figure 5	Formation du complexe antigène-anticorps	12
Figure 6	Le système fluide et le principe de focalisation hydrodynamique	12
Figure 7	Le système optique	13
Figure 8	Représentation graphique en histogramme et en nuage (Dot Plot) des cellules marquées	14
Figure 9	Forme typique et ombres de Gumprecht	16
Figure 10	Forme atypique de la LLC	16
Figure 11	LLC morphologiquement mixte	17
Figure 12	Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC (Score de Matutes)	18
Figure 13	Les cinq aires lymphoïdes palpables. Une aire = un étage, uni ou bilatérale	19
Figure 14	Délétion de la 17p dans la LLC	22
Figure 15	Représentation schématique de la structure et de l'activité enzymatique du CD38 CD38 convertit le substrat NAD ⁺ en ADP ribose cyclique et NAADP ⁺ ; il peut également agir sur son propre produit, le cADPR, pour former la molécule linéaire ADP-ribose. Indépendamment de son activité enzymatique, le CD38 peut déclencher des cascades de signalisation intracellulaire qui mobilisent les réserves de calcium intracellulaires	23
Figure 16	Augmentation survie des cellules de LLC	25

Figure 17	FACS Calibur BD du laboratoire d'hématologie du CAC Blida	31
Figure 18	Calibrite 3 : Les Billes de calibration 3. Laboratoire d'hématologie du CAC Blida	32
Figure 19	Exemple de 04 Anticorps monoclonaux du laboratoire d'hématologie du CAC Blida	33
Figure 20	Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux	36
Figure 21	Hémogramme. Rouge : taux de GB normal avec une hyperlymphocytose. Noir et bleu : hyperleucocytose majeur	37
Figure 22	L'ajout de 100 µl du sang	38
Figure 23	Homogénéisation par vortex	38
Figure 24	L'ajout de la lyse	39
Figure 25	Suspension contenant la solution de lyse	39
Figure 26	Tubes Falcon contenant la suspension cellulaire marquée (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)	39
Figure 27	Image de compensation	42
Figure 28	Dot Plot présentant les différentes populations du sang. Laboratoire hématologie du CAC Blida	43
Figure 29	Ajustement de la zone négative. Laboratoire hématologie du CAC Blida	44
Figure 30	Dot Plot bi-paramétrique. Laboratoire d'hématologie CAC Blida	45
Figure 31	Répartition des patients selon le sexe	47
Figure 32	Répartition des patients selon les tranches d'âge	48
Figure 33	Représentation graphique de taux d'expression des marqueurs du score de Matutes.	52
Figure 34	Population lymphoïde B CD19+. Laboratoire hématologie CAC Blida	52
Figure 35	Lymphocyte B CD19+ ; CD23+ et FMC7-. Laboratoire d'hématologie CAC Blida	53
Figure 36	Expression faible du CD79b (Bleu) et expression forte de CD79b (Vert). Laboratoire hématologie CAC Blida	53
Figure 37	Monoclonalité Kappa. Laboratoire hématologie CAC Blida	54
Figure 38	Représentation graphique des taux du différent marqueur des patients.	55
Figure 39	Lymphocytes B CD5+ et CD10-. Laboratoire hématologie CAC Blida	56

Figure 40	Expression faible du CD20 (Gauche) et expression forte de CD20 (Droite). Laboratoire hématologie CAC Blida	56
Figure 41	Répartition des patients selon le stade de Binet	57
Figure 42	Représentation graphique des taux d'expression du CD38	58
Figure 43	Expression du CD38 (Gauche) et absence d'expression du CD38 (Droite). Laboratoire hématologie CAC Blida	59
Figure 44	Forte expression du CD38. Laboratoire hématologie CAC Blida	59
Figure 45	Représentation graphique selon le taux de CD38 et le stade de Binet	60

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Pages
Tableau I	Score de MATUTES	17
Tableau II	Stade de Binet	20
Tableau III	Classification de RAI	20
Tableau IV	solutions du cytométrie en flux	32
Tableau V	Les marqueurs des cellules lymphoïdes (B, T, NK).	34
Tableau VI	Panel des SLPC B	35
Tableau VII	Principe de la compensation d'un cytomètre à 04 couleurs	42
Tableau VIII	Taux des globules blancs	49
Tableau IX	Taux des lymphocytes	49
Tableau X	Résultats de la cytologie	50
Tableau XI	Résultats de l'immunophénotypage par CMF	50
Tableau XII	Score Matutes	51
Tableau XIII	Taux d'expression des marqueurs du score de Matutes	51
Tableau XIV	Expression de monoclonalité	54
Tableau XV	Taux d'expression des autres marqueurs	55
Tableau XVI	Répartition des patients selon le stade de Binet	57
Tableau XVII	Taux d'expression de la molécule CD38	58
Tableau XVIII	Taux de CD38 et stade de Binet	60
Tableau XIX	Comparaison des résultats du score de Matutes	63
Tableau XX	Comparaison d'expression des marqueurs du score de Matutes	63
Tableau XXI	Comparaison de la monoclonalité	64

Glossaire

- **Activité NAD glycohydrolase** : catalyse de la réaction: $\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{nicotinamide} + \text{ADP-ribose}$ sans passer par un intermédiaire cyclique ADP-ribose.
- **ADP-ribose cyclique hydrolase** : une enzyme présente à la surface des cellules de nombreuses cellules immunitaires et il est un biomarqueur pronostique utilisé dans le diagnostic des leucémies.
- **ADP-ribosyl cyclase** : cette enzyme catalyse à la fois la formation et l'hydrolyse de l'ADP-ribose cyclique, un second messenger intervenant notamment dans le métabolisme du calcium, susceptible de mobiliser les réserves intracellulaires des cations Ca^{2+} et de favoriser l'entrée de ces ions dans la cellule pour réguler une grande variété de processus physiologiques.
- **Allogreffe** : une opération chirurgicale consistant à transférer un organe ou un tissu provenant d'une autre personne, le donneur, sur un receveur.
- **Anémie hémolytique** : celle provoquée par une destruction accélérée des globules rouges (GR).
- **Autogreffe** : une greffe où donneur et receveur sont la même personne.
- **Co-récepteur** : une notion qui désigne, en biologie cellulaire, des protéines membranaires qui participent à une interaction ligand-récepteur en facilitant le signal transmis entre les deux cellules impliquées.
- **Cytopénies** : diminution du nombre de cellules sanguines saines.
- **Ecto-enzyme**: une enzyme qui est sécrétée par une cellule et qui fonctionne en dehors de celle-ci, dans le milieu extracellulaire.
- **Hématopoïèse** : l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique.
- **Hémogramme** : aussi appelé numération de la formule sanguine (NFS), permet l'analyse quantitative (numération) et qualitative (formule) des éléments figurés du sang : hématies, leucocytes et thrombocytes .
- **Hémopathie** : désigne une catégorie générale de maladies du sang.
- **Hépatomégalie** : l'augmentation de la taille du foie. Elle peut être le signe révélateur de nombreuses maladies, allant de l'hépatite à la cirrhose et aussi de certains cancers.
- **Hyperlymphocytose** : également appelée simplement lymphocytose, est une anomalie de l'hémogramme, caractérisée par un nombre trop élevé de lymphocytes, supérieur à 4 500 par mm^3 chez le sujet adulte.
- **Immunocompétence** : la capacité du corps à produire une réponse immunitaire normale, après exposition à un antigène.
- **Lymphadénopathie** : atteinte des ganglions lymphatiques qui augmentent de volume, peuvent devenir douloureux, enflammés (lymphadénite).

- **Ombres de Gumprecht** : des anomalies correspondant à l'éclatement des lymphocytes lors de la réalisation des frottis sanguins.
- **Photomultiplicateur** : un système donnant la possibilité à détecté des photons. Il se présente sous la forme d'un tube électronique.
- **Pneumocystose** : une maladie retrouvée chez les malades immunodéprimés.
- **Prolymphocyte** : une cellule à un stade intermédiaire de développement entre un lymphoblaste et un lymphocyte.
- **Pronostic** : désigne les risques d'évolution d'une maladie.
- **Protéine transmembranaire de type II** : protéines intrinsèques est dite transmembranaire lorsqu'elle traverse au moins une fois entièrement la membrane cellulaire.
- **Super-Ag** : sont des toxines de nature protéique. Permet la stimulation d'un grand nombre de lymphocytes T.
- **Thrombopénie auto-immune** : thrombopénie immunitaire liée à l'apparition d'un Ac dirigé contre un Ag plaquettaire de structure (un auto-Ac).

Liste des abréviations

Ac: Anticorps

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP: Adénosine Diphosphate

Ag: Antigène

APC: Allophycocyanine

BCL-2: B-Cell Lymphoma protein 2

BCR: B Cell Receptor

CD: Cluster of Differentiation

CMF: Cytométrie en Flux

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CXCL: C-X-C motif chemokine Ligand

CXCR: C-X-C motif chemokine Receptor

Del (17p): Délétion 17p

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

FITC: Fluorescéine Isothiocyanate

FMC7: FITC-conjugated Mouse Monoclonal antibody

FSC: Forward light Scatter

GB: Globules Blancs

HAS: Haute Autorité de Santé

HCL: Hairy Cell Leukemia

HGB: Hemoglobin

HLA- DR: isotype H uman L eucocyte A ntigen – DR.

Ig: Immunoglobuline

IgE: Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobulines M

IgVH: Immunoglobulin Variable Heavy chain gene

LCM: Lymphome à Cellule du Manteau

LDT: Temps de Doublement Lymphocytaire

LF: Lymphome Folliculaire

LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique

LLC-B: Leucémie Lymphoïde Chronique cellules B

LZM: Lymphome de la Zone Marginale

MALT : Tissus Lymphoïdes Associés aux Muqueuses

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NK: Natural killer

NLC: Nurse-Like Cells

P53: Tumor Protein 53

PE CAM-1: Platelet/Endothélial Cell Adhésion Molécule-1

PE: Phycoérythrine

PerCP : Peridinin-Chlorophyll-Protein

PMT: PhotoMultiplicaTeurs

R-PE: R-Phycoérythrine

sCD23: Soluble CD23

SLPc : Syndrome Lymphoprolifératif chronique

SSC: Side Scatter

STF-1: Steroidogenic Factor-1

TCR: Récepteur des Cellules T

TK: Thymidine kinase

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ZAP-70: Zeta chain of t cell receptor Associated Protein kinase 70

β2m : β2-microglobuline

Sommaire

INTRODUCTION.....	01
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	03
I.1. Généralité sur la leucémie lymphoïde chronique	04
I.1.1. Définition de la leucémie lymphoïde chronique.....	04
I.2. Epidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique	04
I.3. Etiologie de la leucémie lymphoïde chronique	05
I.3.1. Facteurs exogènes.....	05
I.3.2. Facteurs endogènes.....	05
I.3.2.1. Les facteurs héréditaires	05
I.4. Physiologie et Physiopathologie.....	06
I.4.1. Physiologie.....	06
I.4.2. Physiopathologie.....	08
I.5. Cytométrie en flux.....	11
I.5.1. Historique	11
I.5.2. Définition de la cytométrie en flux	11
I.5.3. Principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux	11
I.5.4. Les composantes d'un cytomètre de flux	12
I.5.5. Avantages et inconvénients de la CMF	14
I.6. Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique.....	15
I.6.1. Diagnostic clinique	15
I.6.2. Diagnostic Biologique	15
I.7. Classification morphologique.....	19
I.7.1. Classification de Binet	19
I.7.2. Classification de RAI	20
I.8. Facteurs pronostiques.....	21

I.8.1. Facteurs biologiques.....	21
I.8.2. Facteurs immunophénotypiques.....	23
I.9. Evolution.....	25
I.10. Diagnostic différentiel.....	26
I.11. traitement.....	27
I.11.1. Agents alkylants	27
I.11.2. Les analogues de purines	27
I.11.3. Les anticorps monoclonaux	27
I.11.4. La greffe de cellules souches hématopoïétiques	28
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	29
II.1. Matériel.....	30
II.1.1. Matériel biologique.....	30
II.2.2. Matériel non biologique	31
II.2. Méthodes.....	35
II.2.1. Présentation du cytomètre en flux.....	35
II.2.2. Principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux.....	35
II.2.3. Principe du marquage.....	36
II.2.4. Technique.....	37
II.3. Etude statistique.....	45
CHAPITRE III : RESULTATS	46
III.1. Caractéristiques cliniques de la population étudiée.....	47
III.2. Caractéristiques biologiques.....	49
CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS	61
CONCLUSION	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente de l'adulte qui représente 12% de toutes les hémopathies. Il s'agit d'une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation de lymphocytes B monoclonaux matures dans la moelle osseuse. La LLC est une maladie hétérogène qui est liée aux caractéristiques de la cellule tumorale, en particulier moléculaires (Jacque et Leblond, 2019).

Certains patients n'ont aucun signe clinique pendant toute l'évolution de la maladie, et ont une survie semblable aux sujets sains du même âge et du même sexe. En revanche, d'autres patients auront une aggravation rapide. Les courbes de survie peuvent aller de quelques mois à plusieurs décades (Brochet, 2008).

Le tableau clinique, les données de l'hémogramme et l'analyse du frottis sanguin orientent le diagnostic de la LLC, par contre l'immunophénotypage par la cytométrie en flux confirme le diagnostic en appliquant le score de Matutes. Un score ≥ 4 correspond à une LLC typique, un score à 3 peut correspondre à une LLC atypique et par contre un score < 3 élimine le diagnostic de LLC et permet de caractériser les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (Merle-Béral, 2012). Cette maladie est reconnue par son hétérogénéité clinique mais également pronostique révélée récemment grâce aux avancées significatives dans le domaine de sa connaissance biologique (étude des séquences génomiques des parties variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVh) ; expression du CD38 et de ZAP70 et la présence ou non d'anomalies cytogénétiques) (Rizzo, 2014).

Le CD38 est une protéine transmembranaire de type II qui a plusieurs fonctions dans divers types de cellules. Elle joue un rôle d'un ecto-enzyme et présente également des propriétés moléculaires d'adhésion (Mokrane, 2018). La LLC-B se caractérise par une accumulation massive de cellules B leucémiques au repos dans le sang périphérique, l'examen des protéines d'activation, y compris CD38, pourrait éclairer le stade de développement et certaines capacités biologiques de ces cellules leucémiques, en particulier leur réponse aux facteurs environnementaux (Pittner et al., 2005). En effet, un rapport suggère que la signalisation via CD38 conduit à des vastes réseaux de signalisation des récepteurs de surface qui peuvent fonctionner pour promouvoir un pool de cellules B leucémiques proliférantes (Pittner et al., 2005).

Au cours des années, plusieurs auteurs ont démontré l'importance du CD38 en tant que facteur pronostique indépendant dans la LLC-B (Boonstra et al., 2006). Plusieurs rapports suggèrent que les patients avec un seuil de positivité de 7 à 30% de cellules leucémiques CD38+ présentent une évolution de la maladie plus agressive et ont une réponse inférieure au traitement. Cependant, une étude suggère que des pourcentages encore plus faibles de cellules B leucémiques exprimant CD38 sont

en corrélation avec de mauvais résultats, et d'autres études suggèrent que les niveaux d'expression de CD38 changeront au cours de l'évolution de la maladie (Pittner *et al.*, 2005).

Dans le cadre de l'analyse d'expression de CD38 chez des patients atteints de la LLC, plusieurs laboratoires dépendent d'un diagnostic par la cytométrie en flux de routine (He *et al.*, 2017).

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressées au diagnostic de la LLC par immunophénotypage par cytométrie en flux en suis des SLPC et à la recherche du taux d'expression du CD38 avec comme objectifs:

- Evaluer l'apport de la CMF dans le diagnostic des LLC ;
- Etablir une association entre l'analyse cytologique reçus et les résultats obtenus par immunophénotypage ;
- Etablir le taux d'expression du CD38.

Pour atteindre nous objectifs :

- Faire un panel de l'immunophénotypage par CMF en cas de SLPC ;
- Manipuler la cytométrie en flux ;
- Analyser les résultats de l'immunophénotypage par CMF en cas de SLPC pour déterminer le diagnostic des LLC et de déterminer le score de Matutes ;
- Analyser l'expression du CD38 dans les LLC.

Notre travail comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des rappels bibliographiques sur la leucémie lymphoïde chronique, Nous décrivons le matériel et les techniques utilisés dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième et quatrième chapitre.

A la fin, une conclusion est présentée.

CHAPITRE I

***RAPPEL
BIBLIOGRAPHIQUE***

I- Rappel Bibliographique**I.1- Généralité sur la leucémie lymphoïde chronique****I.1.1- Définition de la leucémie lymphoïde chronique**

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation de lymphocytes B monoclonaux matures dans la moelle osseuse puis passage dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (Boissard, 2015a).

Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), la LLC se définit comme « toute lymphocytose B monoclonale isolée de plus de 5000/mm³, persistant depuis plus de 3 mois chez un sujet adulte, doit faire évoquer le diagnostic de LLC » (Boissard, 2015a).

I.2- Epidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique

La LLC est une pathologie rare qui représente moins de 1% de l'ensemble des cancers. Cependant, elle est la plus fréquente des leucémies de l'adulte. Environ 2/3 des patients atteints sont des hommes. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et 72 ans chez les femmes. Le pronostic de cette maladie est hétérogène. Néanmoins, l'espérance de vie est réduite de 5 ans par rapport à celle de la population générale (Nudel, 2018).

Jemal et *al*, (2010) a estimé aux Etats-Unis que le nombre annuel de nouveaux cas de cancer à 152 956 en 2010, dont 137 260 (9 %) hémopathies malignes (HM) et 14 900 LLC (10,85 %). En Europe, Milena et *al*, (2010) pour le groupe Haemacare, rassemblant 48 registres européens de 20 pays différents et regroupés en cinq zones géographiques (Europe du Nord, Grande Bretagne, Europe centrale (Autriche, France, Allemagne), Europe du Sud (Italie, Espagne, Slovaquie, Malte) et Europe de l'Est (Pologne, Slovaquie) a étudié entre 2000 et 2002 88 167 patients avec une hémopathie. Les hémopathies lymphoïdes (HMLy) sont les plus fréquentes (75 % : 66 371 cas), la LLC représente 12,5 % des hémopathies (11 019 cas). En Europe, il n'existe pas de variation d'incidence significative de la LLC dans les cinq zones géographiques étudiées (Troussard, 2012).

Dans les pays occidentaux, la LLC est la plus fréquente des leucémies quelque soit le sexe et la race. L'incidence de la maladie est de 5/100000 après 50 ans, de 30/100000 après 80 ans; et très rare avant 40 ans, sa fréquence augmente avec l'âge (Moueden, 2018).

En Algérie, l'incidence moyenne annuelle de la maladie est faible comparée à celles des pays occidentaux. Elle est de 0.57/100000 habitant. L'âge jeune de la population algérienne pourrait expliquer

cette incidence, ainsi que la méconnaissance des stades A. L'âge moyen est de 64 ans et dans 67% sont des hommes (Ait Ali *et al.*, 2014).

I.3- Etiologie de la leucémie lymphoïde chronique

La cause de la LLC reste inconnue jusqu'à nos jours. Mais certains facteurs exogènes et endogènes sont reconnus comme ayant un rôle plus ou moins important dans la survenue de la maladie.

I.3.1- Les facteurs exogènes

I.3.1.1- Les facteurs environnementaux

Plusieurs auteurs ont souligné le rôle joué par certains facteurs environnementaux dans la survenue de la maladie notamment chez les producteurs de soja, les utilisateurs d'herbicides, les travailleurs dans l'industrie du caoutchouc ou de l'amiante, ainsi que chez les personnes soumises de façon chronique à des champs électromagnétiques (Sidzanboma, 2004).

I.3.1.2- Les infections

Il a été également identifié des anticorps spécifiques du virus de l'hépatite C chez des patients atteints de LLC, ce qui montre que ce virus joue un rôle important dans la leucémogénèse (Sidzanboma, 2004).

I.3.2- Les facteurs endogènes

I.3.2.1- Les facteurs héréditaires

Contrairement aux facteurs environnementaux. L'étude des fréquences de la maladie a montré que des facteurs génétiques contribuent probablement au développement de la maladie (Sidzanboma, 2004). L'existence d'une susceptibilité génétique à développer une LLC est corroborée par plusieurs données: les apparentés au premier degré des patients ayant une LLC ont un risque accru de développer eux-mêmes une LLC évalué à 8,5; de plus, les jumeaux monozygotes des patients porteurs d'une LLC se voient plus souvent diagnostiquer eux-mêmes des LLC que les jumeaux dizygotes (Gauthier, 2017).

I.4- Physiologie et Physiopathologie

I.4.1- Physiologie

I.4.1.1- Description générale du système immunitaire

✓ Organes lymphoïdes primaires

Les organes lymphoïdes primaires sont composés du thymus et de la moelle osseuse. Les lymphocytes immatures générés par l'hématopoïèse effectuent leur maturation dans ces organes lymphoïdes primaires où ils acquièrent une spécificité antigénique particulière.

Ce n'est qu'après cette maturation qu'un lymphocyte devient une cellule immunocompétente. Chez les mammifères, les cellules T effectuent leur maturation dans le thymus et les cellules B dans la moelle osseuse (**Figure 01**) (Bergereau et *al.*, 2010).

✓ Organes lymphoïdes secondaires

Les plus organisés de ces organes sont la rate et les ganglions. Alors que les ganglions lymphatiques sont spécialisés dans la capture antigénique venant des tissus environnants, la rate est spécialisée dans la filtration du sang et la capture des antigènes circulants. Ces deux organes lymphoïdes secondaires comprennent non seulement des follicules primaires constitués d'un réseau de cellules dendritiques folliculaires et de petites cellules B au repos, mais également des régions distinctes supplémentaires d'activité de cellules T et de cellules B, le tout entouré d'une capsule fibreuse (**Figure 01**) (Bergereau et *al.*, 2010).

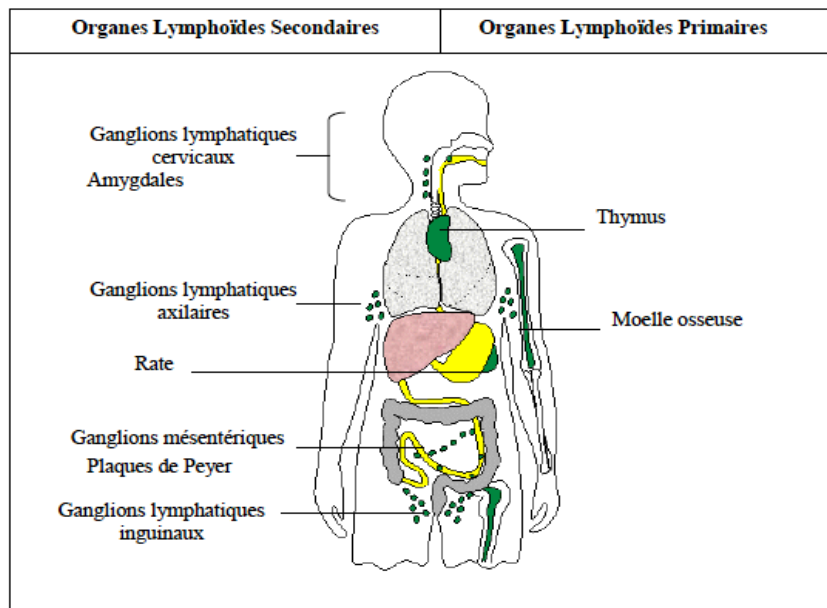


Figure 01 : Les organes lymphoïdes primaires et secondaires

- Les lymphocytes B

Les lymphocytes B naissent et se développent dans la moelle osseuse. Au cours de ce développement, ils acquièrent l'expression de leur récepteur spécifique: le BCR (B-cell receptor) et du complexe moléculaire CD21/CD19. Le BCR reconnaît l'antigène dans son état natif.

Ces lymphocytes B sécrètent les immunoglobulines et exercent à ce titre une fonction importante dans la réponse adaptative. Ils peuvent également internaliser un pathogène et le présenter sur le CMH II. Cette fonction de CPA est indispensable aux lymphocytes B pour recevoir l'aide des lymphocytes T. L'activation et la prolifération des lymphocytes B ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (Duffaut, 2009).

- Les lymphocytes T

Les lymphocytes $T\alpha\beta$ sont les principaux lymphocytes T circulants. Ils désignent un ensemble de cellules d'origine hématopoïétique dont la différenciation se déroule dans le thymus.

La reconnaissance spécifique des lymphocytes $T\alpha\beta$ se fait via son TCR. Parmi les lymphocytes T, on distingue deux sous-populations importantes. Les lymphocytes T auxiliaires exprimant le CD4 sont les cellules coordinatrices majeures du système immunitaire. Les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le CD8 participent uniquement à la réponse cellulaire (Duffaut, 2009).

- Les cellules NK (Natural-Killer)

Les cellules NK sont issues des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ et se développent dans la moelle osseuse (Caillat-Zucman et *al.*, 2018).

• Répartition des différentes sous-populations lymphocytaires

Le taux des lymphocytes normal dans le sang est compris entre 1500 et 4000/ mm³ (Caron-Servan et *al.*, 2012).

- ✓ Lymphocytes T CD3+ : 75 %, (900 à 1900/mm³).
 - Lymphocytes T CD3+ CD4+ : 40-50 %, (500 à 1200/mm³).
 - Lymphocytes T CD3+ CD8+ : 25-30 %, (200 à 800/mm³).
- ✓ Lymphocytes B : 10-15 %, (100 à 500/mm³).
- ✓ Lymphocytes NK : 8-15 %, (70 à 400/mm³).

I.4.2- Physiopathologie

Jusqu'à présent, la physiopathologie de cette maladie reste mal connue. Selon les progrès de recherche fondamentale de ces dernières années, le défaut d'apoptose est considéré comme le mécanisme principal responsable de l'accumulation du clone leucémique (Moueden, 2018).

Les cellules tumorales expriment fortement la protéine anti-apoptotique Bcl-2 en provoquant le blocage des cellules B de la LLC en phase G0, malgré l'expression de certains marqueurs d'activation comme le CD23. La stimulation par la voie du récepteur pour l'antigène permet de déceler dans un pourcentage important de cas, une anomalie de transduction du signal définie par une réponse proliférative défectueuse, ainsi qu'une phosphorylation des tyrosines et une mobilisation calcique anormales. La faible expression du récepteur pour l'antigène pourrait être à l'origine de ces différentes anomalies de l'activation.

Cependant, il a été récemment montré que la LLC-B n'est sans doute pas liée à l'accumulation de lymphocytes à vie longue, mais une maladie où il existe un processus dynamique avec des cellules qui prolifèrent et d'autres qui meurent à des degrés variables (Moueden, 2018).

I.4.2.1- Déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose

L'accumulation de cellules B matures qui ont d'une part échappée à la mort cellulaire programmée et d'autre part subi un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1; représente la marque distinctive de la LLC des cellules B (**Figure 02**) (Moueden, 2018).

Les cellules de la LLC présente un dysfonctionnement des mécanismes de l'apoptose, qui est due soit à l'inactivation de nombreuses voies d'apoptose, soit à la dérégulation des protéines impliquées dans l'apoptose (**Figure 02**).

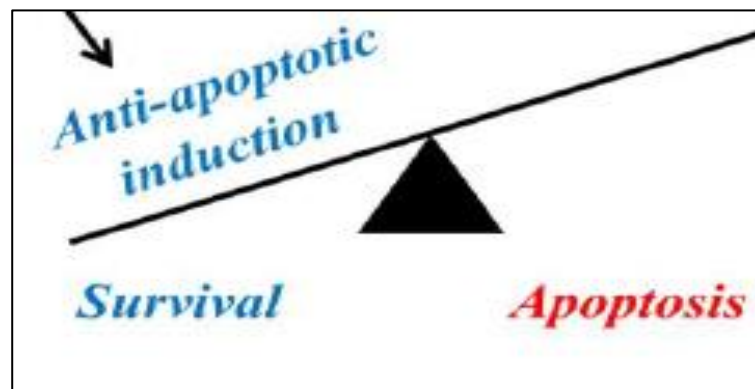


Figure 02: L'équilibre des membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dicte la survie cellulaire (Wongvaranon *et al.*, 2014)

La dérégulation des gènes de contrôle du cycle cellulaire pourrait également contribuer à l'accumulation des cellules malignes au début de la phase G0/G1 du cycle cellulaire. De ce fait, on peut conclure que la LLC est une maladie résultant beaucoup plus de l'accumulation des cellules lymphocytaires B (Moueden, 2018).

I.4.2.2- Rôle de la stimulation antigénique à partir des récepteurs des cellules B

Le devenir des cellules B normales est déterminé par leur exposition à l'antigène. Celle-ci met en jeu le récepteur de l'antigène des cellule B (BCR) qui est centré sur une immunoglobuline (Ig) faite d'une partie constante et d'une partie variable et formée aussi de différentes combinaisons de segments V,D,J pour la chaine lourde et V et J pour la chaine légère. Ces différentes combinaisons constituent le répertoire qui permet aux cellules B de répondre à un très grand nombre d'antigène (Ag) (Moueden, 2018).

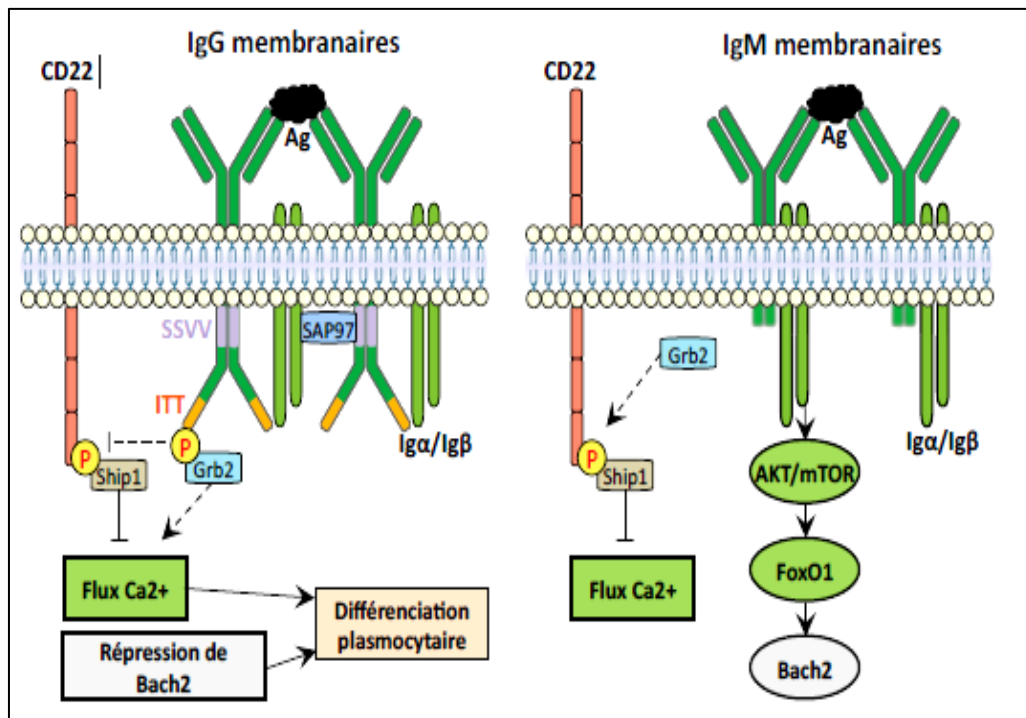


Figure 03: Initiation de la signalisation lors de l’engagement des BCR à IgG et IgM (Blanc, 2015)

L’acquisition des mutations somatiques dans les chaînes des Ig augmente leur diversité et leur affinité pour l’Ag reconnu (**Figure 03**). Les lymphocytes B deviennent après, soit des plasmocytes capables de sécréter des Ac, soit des cellules B mémoire (**Figure 04**) (Moueden, 2018).

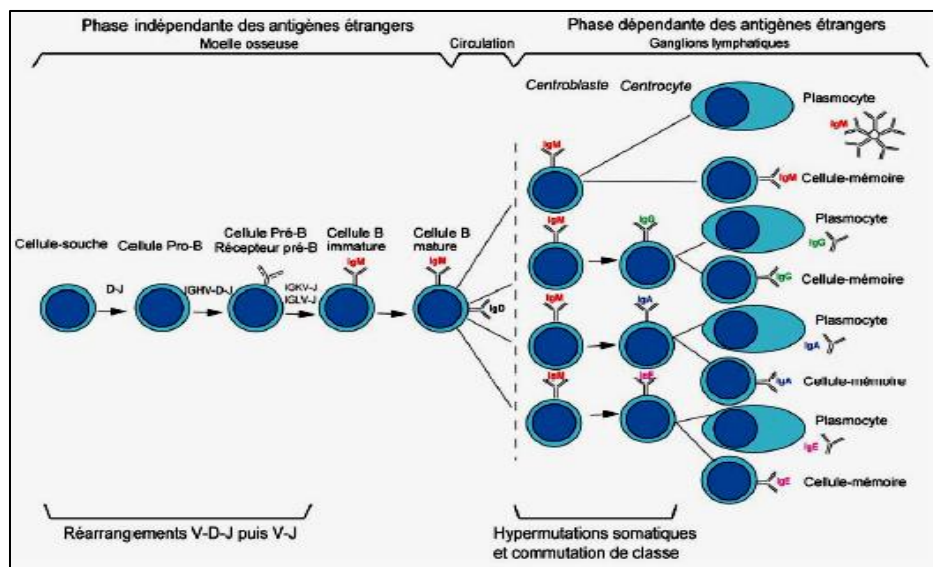


Figure 04: La différenciation des lymphocytes B comprend deux phases: une phase indépendante des antigènes étrangers, de la cellule souche hématopoïétique jusqu’au lymphocyte B mature, dans la moelle osseuse, et une phase dépendante des antigènes étrangers, du lymphocyte B mature au plasmocyte et au lymphocyte B mémoire, dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) (Lefranc et al., 2009)

I.4.2.3- Le microenvironnement ganglionnaire et leucémie lymphoïde chronique

De nombreuses études récentes confirment l'importance du microenvironnement ganglionnaire pour la prolifération du clone leucémique. L'interaction avec les cellules stromales ou les cellules Nurse-Like (NLC) (composant cellulaire majeur du microenvironnement des tissus de la LLC) ou les interactions entre CD38 et CD31 permettent aux cellules leucémiques d'échapper à l'apoptose. Les cellules T activées ou toute autre cellule exprimant le CD40 peut favoriser la croissance des cellules leucémiques en sécrétant des substances impliquées dans l'expansion des clones de LLC, notamment, les cytokines, le VEGF et les chimiokines (comme STF-1) (Moueden, 2018).

I.5- Cytométrie en flux

I.5.1- Historique

La cytométrie en flux est née d'un besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en 1934, que Moldavan conçut le premier appareil qui réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient visualisées par un capteur photo électronique (Ibba, 2012).

I.5.2- Définition de la cytométrie en flux

En 1948, Howard définit : « La cytométrie en flux comme un processus dans lequel chaque cellule ou autre particule passe en une seule file dans un courant liquide devant un ou plusieurs détecteur(s) qui va ou vont mesurer ses caractéristiques chimiques et/ou physiques » (Ibba, 2012).

I.5.3- Principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à analyser une suspension cellulaire concentrée en un flux unique qui passe à travers une source lumineuse. La lumière diffusée et émise est ensuite mesurée par plusieurs détecteurs. Les paramètres obtenus correspondent aux caractéristiques physiques des cellules : la dimension et la granularité des cellules sont déterminées en fonction de la dispersion lumineuse frontale et latérale (respectivement FSC et SSC). La caractérisation des cellules est rendue encore plus précise par l'utilisation d'anticorps marqués par un fluorochrome qui permet l'identification de composants cellulaires, tel que l'expression des glycoprotéines par les cellules. Ces fluorochromes sont stimulés par ces lasers (**Figure 05**) (Poleszczuk, 2015).

Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée. La lumière fluorescente émise est ensuite canalisée par des filtres adaptés et les signaux sont récoltés par un assortiment de détecteurs (Poleszczuk, 2015).

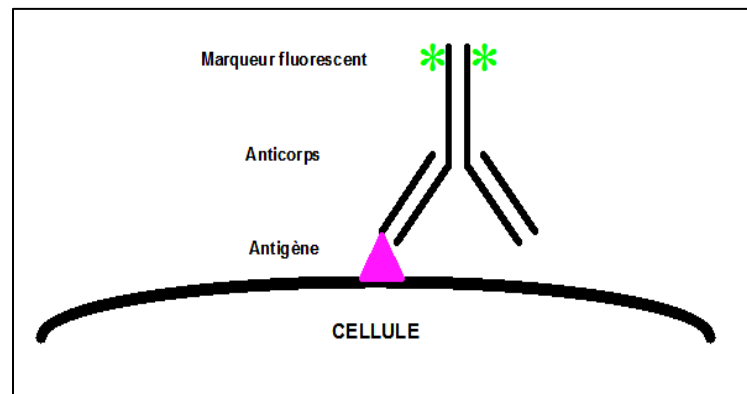


Figure 05 : Formation du complexe antigène-anticorps (Duperray, 2011)

I.5.4- Les composantes d'un cytomètre de flux

Le système fluïdique : est un système basé sur le principe de focalisation hydrodynamique. Il s'agit d'un flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser (**Figure 06a, 06b**). Le liquide de gain et celui de l'échantillon ne se mélangeront jamais grâce à la présence d'une pression sur les cellules (**Figure 06b, 06c**) (Terra, 2012).

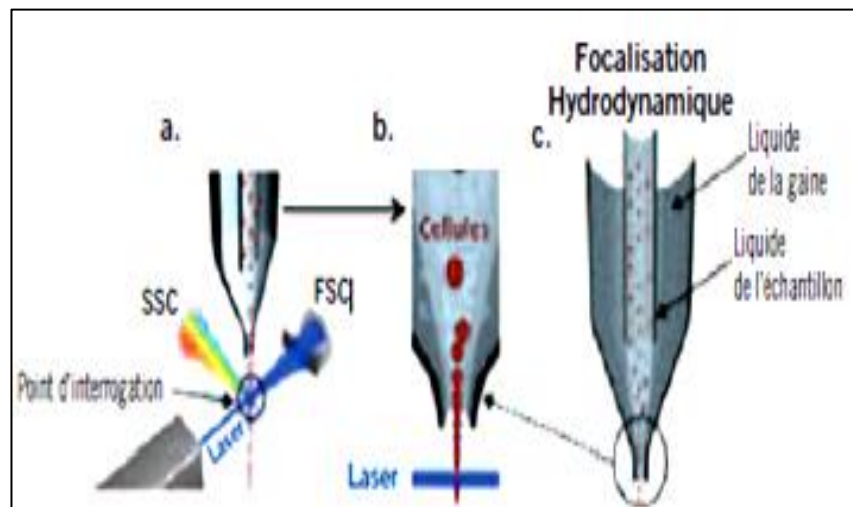


Figure 06: Le système fluïdique et le principe de focalisation hydrodynamique (Terra, 2012).

Le système optique : implique une source lumineuse qui est souvent composée d'un ou de plusieurs lasers. Le laser a l'avantage d'être une lumière monochromatique très fine, qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde déterminée. Le laser à ion d'argon est le plus utilisé car il émet un rayon lumineux puissant à 488 nm capable d'exciter plusieurs fluorochromes tels que la fluorescéine (FITC) et l'aphycoérythrine (PE) (Terra, 2012). L'utilisation de plusieurs lasers (xénon, krypton, hélium-néon, hélium-cadmium) permet de tirer profit d'un éventail beaucoup plus large de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes. Les fluorochromes sont des substances capables, quand elles reçoivent un rayonnement incident d'une certaine longueur d'onde (la longueur d'onde d'excitation),

de réémettre une radiation de longueur d'onde supérieure (longueur d'onde d'émission) lors du retour à l'état de repos (état fondamental) (**Figure 07a, 07b**) (Terra, 2012). Les signaux et rayons ainsi émis sont ensuite séparés par des filtres optiques (miroirs dichroïques et filtres) puis collectés par des photomultiplicateurs (PMT) afin d'être amplifiés, numérisés, analysés et stockés par un ordinateur (Terra, 2012).

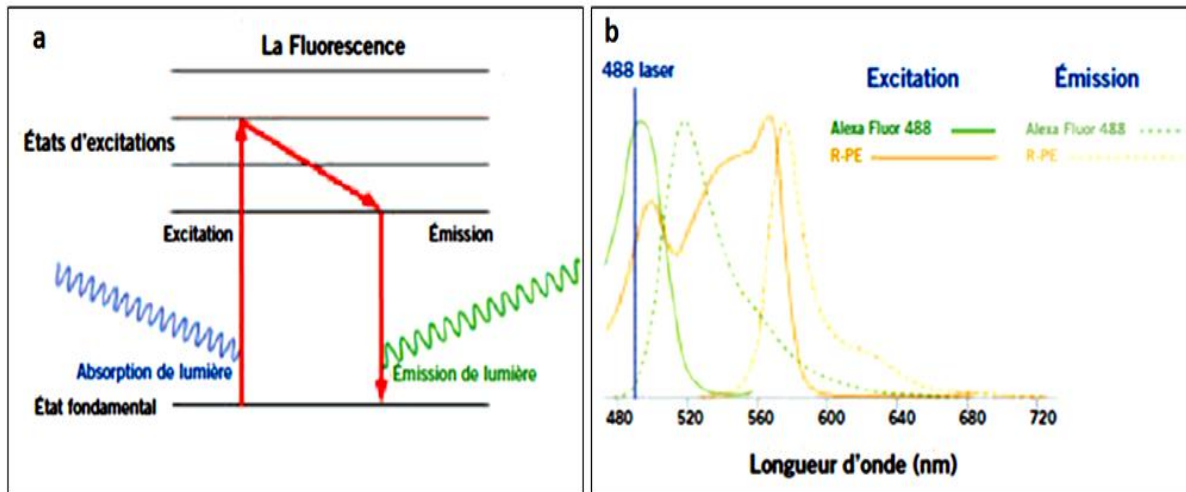


Figure 07 : Le système optique (Terra, 2012)

- a**: La fluorescence et la longueur d'onde d'excitation et d'émission ;
b: Spectres d'excitation et d'émission de deux fluorochromes Alexa Fluor 488 et phycoérythrine (R-PE).

Le système électronique et ordinateur: Les signaux lumineux recueillis sont alors amplifiés et transformés en signaux électriques, puis convertis en signaux digitaux. Un logiciel conçu pour la CMF va permettre l'analyse des données sous forme d'histogramme et graphique en nuage (Dot Plot) (**Figure 08**). La représentation biparamétrique du « Forward light scatter » (FSC) et du « Side Scatter » (SSC) ou de deux marqueurs ciblés en même temps est sous forme de points regroupés. Chaque point représente une cellule; il est donc possible de visualiser différentes populations cellulaires et de tracer des contours (Gate) sur celle que l'on veut analyser. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées (nombre de cellules positives par rapport au nombre de cellules analysées) et d'intensité de fluorescence qui reflète la quantité d'antigènes de surface ou intracellulaires (Terra, 2012).

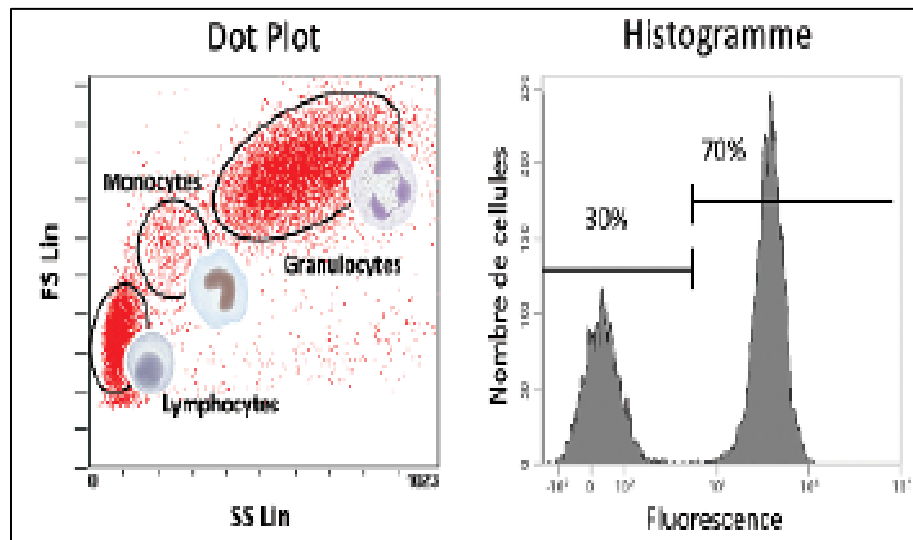


Figure 08 : Représentation graphique en histogramme et en nuage (Dot Plot) des cellules marquées (Terra, 2012).

I.5.5- Avantages et inconvénients de la CMF

I.5.5.1- Avantages de la CMF

- ✓ Rapidité d'analyse sur un logiciel simplifié.
- ✓ Une grande sensibilité et reproductibilité.
- ✓ Analyse Qualitative et Quantitative.
- ✓ Analyse Multiparamétrique.
- ✓ Analyse de plusieurs caractères sur une même cellule.
- ✓ Possibilité de Trier « stérilement » et de remettre en culture.
- ✓ Rechercher des marqueurs pronostiques, thérapeutiques.
- ✓ Suivre l'efficacité d'un traitement et/ou dépister précocement une rechute.
- ✓ Évaluer la maladie résiduelle.

I.5.5.2- Inconvénients de la CMF

- ✓ Le coût.
- ✓ Absence d'étalon international de fluorescence.
- ✓ Pas d'analyse des structures (ganglion).

I.6- Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique

I.6.1- Diagnostic clinique

I.6.1.1- Circonstance de découverte

Le diagnostic peut être évoqué devant une exploration (Nudel, 2018):

- ✓ Une hyperlymphocytose persistante constatée sur un hémogramme. La circonstance la plus fréquente de découverte surtout dans les pays développés ;
- ✓ Exploration d'adénopathies et ou de splénomégalie ;
- ✓ Exploration des cytopénies auto-immunes : Anémie hémolytique ;
- ✓ Complications infectieuse.

I.6.1.2- Signes cliniques

• **Adénopathies** : augmentation de taille d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques. Dans les hémopathies malignes, les adénopathies sont un des éléments du syndrome tumoral (Bidet et *al.*, 2011). Les adénopathies sont en générale de petites tailles et symétriques.

- **Splénomégalie** : rate de volume augmenté et de taille variable. (Bidet et *al.*, 2011).
- **Hypertrophie amygdalienne** (François, 2004).

I.6.2- Diagnostic Biologique

I.6.2.1- Hémogramme

La numération formule sanguine est une analyse automatisée à nos jours qui permet d'obtenir une évaluation quantitative et qualitative des éléments figurés du sang soit des globules rouges, des globules blancs, des plaquettes ou autres(Lamrabet, 2019).

L'hémogramme retrouve une lymphocytose sanguine supérieure à $5 \times 10^6/L$ (5000/ μ l) persistante plus de trois mois (Troussard, 2013). Le taux des plaquettes et des globules rouges peuvent être normaux ou pathologiques.

I.6.2.2- Frottis sanguin

Le frottis sanguin précise la morphologie des cellules et quantifie les ombres de Gumprecht. Il permet de distinguer (Troussard, 2013) une :

• **LLC typique** : les cellules lymphoïdes ont une petite taille, le noyau est entouré d'un anneau de cytoplasme peu étendu et régulier et le cytoplasme est homogène, faiblement basophile et dépourvu de granulations. Le noyau présente des renforcements sombres nettement séparés par des espaces plus

clairs, donnant l'impression de mottes chromatinienne; les nucléoles ne sont pas ou peu visibles. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé. Des cellules de plus grande taille avec des cellules clivées ou des prolymphocytes < 10% peuvent être observées (**Figure 09**) (Troussard, 2013).

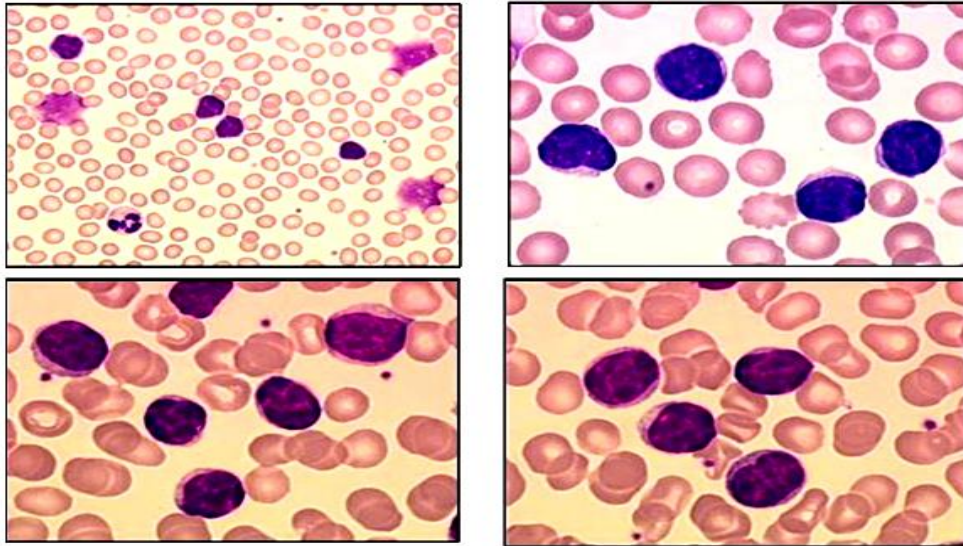


Figure 09 : Forme typique et ombres de Gumprecht (Troussard, 2013).

- **LLC atypique** est un mélange de lymphocytes à grand cytoplasme et de lymphocytes avec noyau au contour irrégulier (**Figure 10**) (Zandecki, 2006).

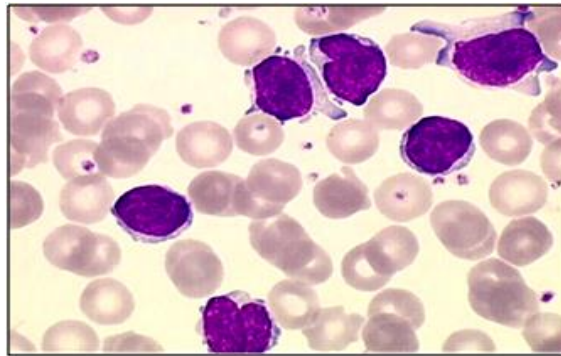


Figure 10 : Forme atypique de la LLC (Zandecki, 2006).

- **LLC mixte** est à petits et grands lymphocytes, au moins 15% de lymphocytes avec cytoplasme abondant (**Figure 11**) (Zandecki, 2006).

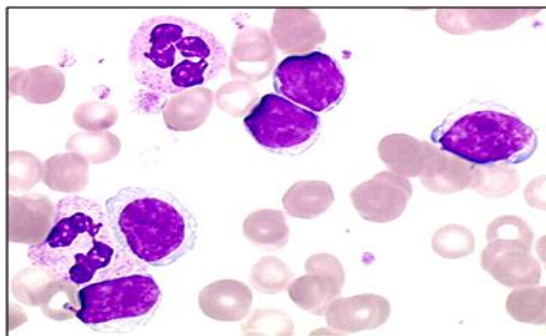


Figure 11: LLC morphologiquement mixte (Zandecki, 2006).

Les données de l'hémogramme et l'analyse du frottis sanguin oriente le diagnostic vers une LLC ou un autre SLPC d'où indication d'un immunophénotypage par CMF.

I.6.2.3- Médullogramme

Dans LLC, Il n'a plus d'indication du médullogramme au diagnostique depuis l'instauration de la CMF.

I.6.2.4-Cytométrie en flux

C'est l'équipe de Matutes (*Royal Marsden Hospital* - Londres) qui a proposé en 1994 un système de score immunophénotypique basé sur 5 marqueurs : Ig membranaire, CD5, CD23, FMC7, CD22 (ou CD79b qui correspond au score de Moreau). Le score varie de 0 à 5, un score élevé (≥ 4) est en faveur d'une LLC (**Tableau I**). Un score plus faible oriente vers un autre syndrome lymphoprolifératif (Serrier, 2012).

Tableau I: Score de Matutes (Bouideghaghen et Teghbit, 2018)

Marqueurs	Score de Matutes	
	1 point	0 point
Intensité de l'immunoglobuline de surface monotypique	Faible	Forte
Expression du CD5	+	-
Expression du CD23	+	-
Expression de FMC7	-	+
Expression du CD79b	Faible	Forte
Expression du CD22	Faible	Forte

- Expression des marqueurs

Dans la LLC typique, la cellule leucémique exprime des marqueurs classiques de lymphocytes B, tels que le CD19 et le CD20 à un taux plus faible que les lymphocytes B normaux, mais aussi de manière pathologique le CD5 qui est un marqueur classique des cellules T (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

La cellule leucémique exprime également le CD23, élément diagnostique clé de la LLC vis-à-vis d'autres syndromes lymphoprolifératifs B. Enfin, le FMC7 (épitope conformationnel du CD20) ainsi que la chaîne β du BCR ne sont que peu ou pas exprimés. Il est, de plus, nécessaire pour confirmer le diagnostic pour déterminer le caractère monoclonal de l'expansion leucémique via l'expression d'une seule chaîne légère d'immunoglobuline Kappa (K) dans 2/3 des cas ou Lambda (λ) dans les autres cas (**Figure 12**) (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

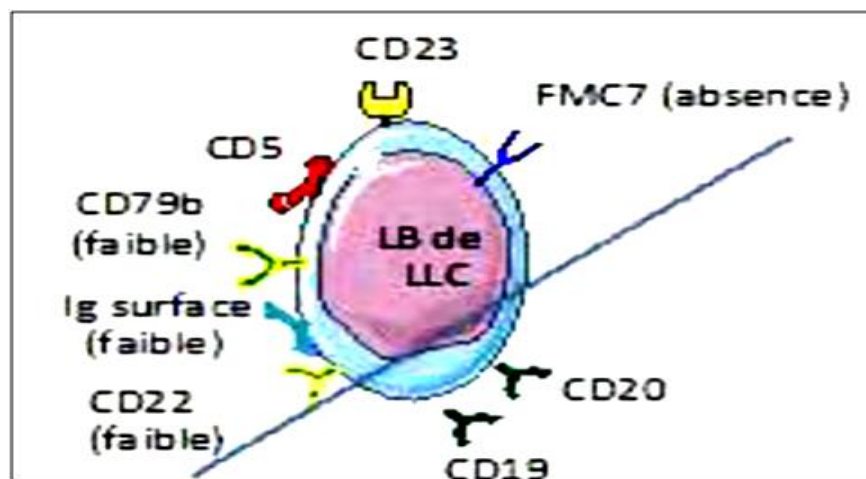


Figure 12: Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC
(Score de Matutes) (Bouideghaghen et Teghbit, 2018)

L'immunophénotypage sanguin permet de confirmer la clonalité des lymphocytes et d'éliminer les autres syndromes lymphoprolifératifs. Les lymphocytes de LLC co-expriment :

- Des antigènes de la lignée B (CD19, CD20, CD22, CD79b).
- Du CD20, du CD79b et du CD22 est cependant classiquement plus basse que sur les lymphocytes B normaux.
- Du CD23, récepteur de faible affinité pour les IgE.
- Du CD5, de façon quasi-constante et aberrante.
- Des chaînes légères d'immunoglobines Kappa ou Lambda, dont l'expression est également moindre à celle des lymphocytes B non pathologiques. L'expression monotypique de l'une de ces deux chaînes permet d'affirmer le caractère clonal de la LLC (Le bouar, 2017).

I.7- Classification morphologique

I.7.1- Classification de Binet

Cette classification est la plus utilisée en Europe. Elle est déterminée par le nombre d'aires ganglionnaires atteintes (**Figure 13**), le plus souvent bilatérales, les troubles de l'hémogramme (**Tableau II**), et divise les patients en trois groupes (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

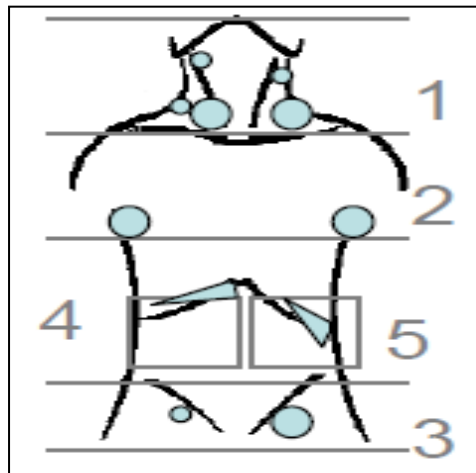


Figure 13: Les cinq aires lymphoïdes palpables. Une aire = un étage, uni ou bilatérale (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

Cette classification est hautement prédictive de la survie des patients, avec une médiane de survie supérieure à 12 ans pour les patients au stade A, tandis que les patients au stade B ont des médianes de survie de 5 à 8 ans et ceux au stade C des médianes de survie de moins de 5 ans (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

Aujourd'hui, avec l'apparition de nouveaux traitements de la LLC, cette classification est toujours d'actualité (**Tableau II**) (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

Tableau II: Stade de Binet (Bouideghaghen et Teghbit, 2018)

Niveau de risque	Stade	Caractéristiques cliniques et biologiques
Faible	A	Lymphocytose avec ou sans lymphadénopathie, atteinte de moins de 03 aires ganglionnaires sans anémie (HGB > 10 g/dl) et sans thrombopénie (un taux plaquette > 100 000 e/mm ³)
Intermédiaire	B	Lymphadénopathie et atteinte de 03 aires ganglionnaires ou plus sans anémie (HGB > 10 g/dl) et sans thrombopénie (un taux plaquette > 100.10 ³ /mm ³)
Elevé	C	Lymphocytose avec ou sans lymphadénopathie et une anémie* (HGB <10 g/dl) et/ou thrombopénie* (plaquette < 100.10 ³ /mm ³)
* Hors anémie hémolytique ou thrombopénie auto-immune.		

I.7.2- Classification de RAI

La classification de RAI définit quatre stades par l'existence d'un syndrome tumoral et la présence de cytopénies (anémie, thrombopénie) (**Tableau III**) (Bouideghaghen et Teghbit, 2018).

Tableau III : Classification de RAI (Bouideghaghen et Teghbit, 2018)

Niveau de risque	Stade	Caractéristiques clinique
Faible	0	Lymphocytose seule
Intermédiaire	I	Lymphocytose avec lymphadénopathie
	II	Splénomégalie et/ou hépatomégalie avec ou sans lymphadénopathie
Elevé	III	Anémie* (HGB<10 g/dl) avec ou sans lymphadénopathie, avec, Splénomégalie ou hépatomégalie.
	IV	Thrombopénie* (plaquette<100.10 ³ /mm ³) avec ou sans anémie et/ou lymphadénopathie, Splénomégalie ou hépatomégalie.
* anémie hémolytique auto-immune ou thrombopénie auto-immune.		

I.8- Facteurs pronostiques

Depuis des décennies, la variabilité d'évolution de la LLC a été justifiée par la recherche des marqueurs de pronostic.

I.8.1- Les facteurs biologique**I.8.1.1- Le temps de doublement lymphocytaire**

Le temps de doublement lymphocytaire (LDT) est la période de temps nécessaire pour que le nombre des lymphocytes observé au moment du diagnostic double. Un LDT < à 12 mois est un facteur de mauvais pronostic qui prédit d'une progression rapide (Min, 2013).

I.8.1.2- La β 2-microglobuline

La β 2-microglobuline (β 2m) est un composant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, qui sont exprimées par toutes les cellules nucléées. Une élévation des taux sériques de β 2m libre est observée chez les patients présentant une LLC. Le taux de β 2m est corrélé avec la charge tumorale et le stade clinique d'une part, et d'autre part est associé à une survie courte sans traitement (Min, 2013).

I.8.1.3- Thymidine kinase

La Thymidine kinase (TK) est une enzyme impliquée dans le contrôle de la synthèse de l'ADN dans les cellules en division. Un taux sérique de TK élevé est de mauvais pronostic (Min, 2013).

I.8.1.4- La forme soluble de la molécule CD23

La molécule CD23 est une glycoprotéine transmembranaire de 45 kDa, est un récepteur de faible affinité pour les IgE, exprimé notamment sur les cellules B de LLC (Min, 2013).

La forme soluble de CD23 se comporte comme un facteur de croissance, induisant la prolifération des lymphocytes B normaux et leucémiques. Des études ont rapporté que le niveau de CD23 soluble (sCD23) des patients atteints de LLC était 3 à 500 fois plus élevé que chez des patients atteints d'autres syndromes lymphoprolifératifs et chez des sujets sains (Min, 2013). De nombreuses études ont montré que sCD23 était un marqueur de la charge tumorale, associé inversement à la survie sans progression et à la survie globale, corrélé avec le stade clinique et l'expression de CD38 et de ZAP-70 (Min, 2013).

I.8.1.5- Statut mutationnel IgVH

La recherche de mutations somatiques au sein des régions variables des gènes IGVH dans la LLC permet de définir deux groupes de patients avec une évolution bien distincte. Une homologie de plus de 98% avec le gène germlinal définit le statut «non muté» et une homologie inférieure à 98% définit le statut «muté» (Min, 2013). Les patients avec un profil non muté (environ 50% des patients) ont une évolution clinique plus agressive et une espérance de survie inférieure par rapport aux patients dont l'Ig des cellules de LLC est mutée (Min, 2013).

Par ailleurs, le profil non muté est associé de façon significative avec les autres facteurs pronostiques défavorables, comme les délétions des chromosomes 17p ou 11q23, une morphologie lymphocytaire atypique ou la positivité de l'expression de CD38 ($\geq 30\%$) (Min, 2013).

I.8.1.6- Délétion de la 17p

La délétion 17p (del (17p)), aboutit à la délétion du gène p53 qui code pour une protéine suppresseur de tumeur importante dans la prévention des cancers. Cette anomalie peut être détectée en FISH (Fluorescence in situ hybridization) sur mitoses ou dans des cellules interphasiques. Elle est rare au moment du diagnostic initial (5-10%), mais assez fréquente chez les patients atteints de LLC réfractaire ou en rechute (45%).

Les patients présentant une del (17p) ont une médiane de survie plus courte (32 mois), et une médiane de survie sans traitement de 9 mois (**Figure 14**). Le dysfonctionnement de la voie p53 peut être un facteur important dans la résistance à la chimiothérapie (Min, 2013).

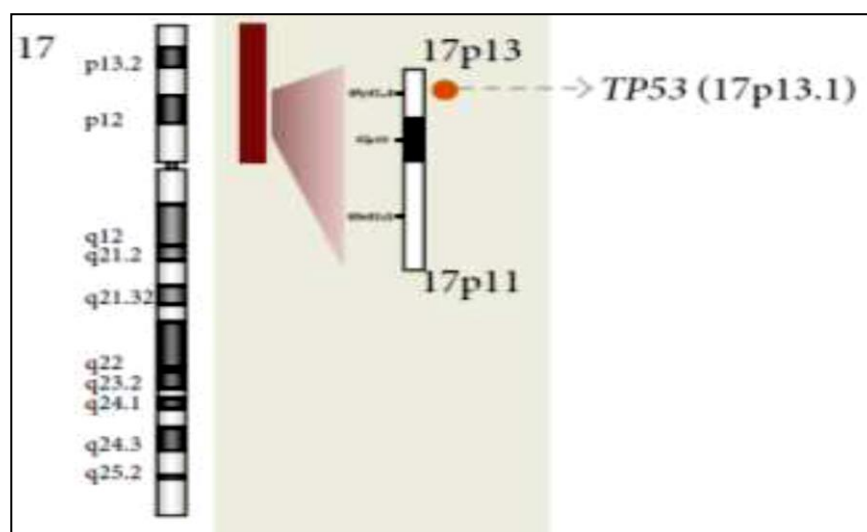


Figure 14 : Délétion de la 17p dans la LLC (Puiggros et *al.*, 2014).

I.8.2- Facteur immunophénotypique

I.8.2.1- La molécule CD38

CD38 ou T10, a été identifié en 1980 au niveau de la surface cellulaire des leucocytes humains à l'aide des anticorps monoclonaux murins spécifiques aux thymocytes (Van de Donk *et al.*, 2016).

Au début, le CD38 était reconnu comme un marqueur de différenciation et d'activation des lymphocytes. Plus tard, il a été utilisé comme marqueur phénotypique dans la classification des tumeurs malignes des cellules T et B, et identifié comme une cible prometteuse pour les thérapies à base d'anticorps (Van de Donk *et al.*, 2016).

Le CD38 humain est une glycoprotéine transmembranaire de type II, qui a une fonction de récepteur et molécule d'adhésion qui induit; l'activation des lymphocytes T, B et lymphocytes NK (Trinchieri, 1989; Kitanaka *et al.*, 1999; Slaughter, 2003). Cette molécule joue un rôle d'un ectoenzyme, qui a une activité enzymatique impliquée dans le métabolisme de l'ADP où elle a une activité NAD glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase ou encore ADP-ribose cyclique hydrolase. Il est physiologiquement présent sur les lymphocytes B, T, les cellules NK et les monocytes. A la surface de ces cellules, le CD38 peut s'associer avec le CMH de classe III et jouer un rôle de co-récepteur dans l'activation des lymphocytes T induite par les super-Ag (Boissard, 2015b).

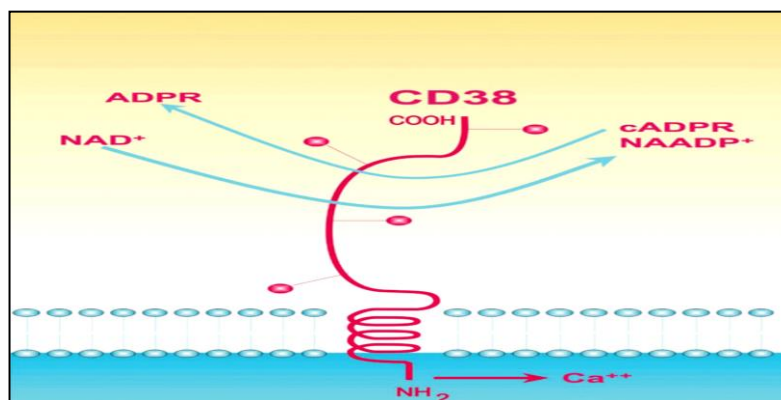


Figure 15: Représentation schématique de la structure et de l'activité enzymatique du CD38

CD38 convertit le substrat NAD⁺ en ADP ribose cyclique et NAADP⁺; il peut également agir sur son propre produit, le cADPR, pour former la molécule linéaire ADP-ribose. Indépendamment de son activité enzymatique, le CD38 peut déclencher des cascades de signalisation intracellulaire qui mobilisent les réserves de calcium intracellulaires (Czura *et al.*, 2006)

I.8.2.2- Expression de la molécule CD38

L'expression de CD38 au niveau des cellules hématopoïétiques dépend de l'état de différenciation et d'activation de la cellule. Le CD38 est également exprimé à la surface des cellules B; par lequel les plasmocytes expriment des niveaux particulièrement élevés de CD38. Son expression est fortement régulée lors de l'ontogenèse cellulaire, elle est exprimée à des niveaux élevés dans les précurseurs de la moelle osseuse et dans les plasmocytes terminaux différenciés (Mokrane, 2018).

I.8.2.3- CD38 et leucémie lymphoïde chronique

Le CD38 joue un rôle de récepteur dans les cellules leucémiques et ses signaux sont médiés par le ZAP-70, un autre facteur pronostique négatif de la maladie et un facteur limitant de l'activation médiée par le CD38 (Deaglio et al., 2003, 2007). La réaction du CD38 avec les chimiokines et leurs récepteurs, en particulier CXCL12/CXCR4, qui influence les réponses migratoires et contribue à la recirculation des cellules néoplasiques du sang vers les organes lymphoïdes (Vaisitti et al., 2010) et avec une adhérence spécifique à la famille des intégrines (Zucchetto et al., 2009, 2012).

L'activation du complexe CD38/CD31 déclenche une voie de signalisation intracellulaire et ces signaux stimulent et améliorent la chimiotaxie et la prolifération des cellules B néoplasiques. Dans le même temps, ces preuves contribuent à la présence de la croissance des cellules leucémiques et module également l'acquisition séquentielle et l'accumulation d'altérations génétiques (Malavasi et al., 2011). Divers marqueurs moléculaires ont été déterminés avec une importance pronostique pour distinguer différents groupes de patients. Les indicateurs moléculaires les plus largement attribués sont l'absence de mutations dans les gènes IgVH et l'expression de CD38 et Zap-70 (Cramer et Hallek, 2011).

Dans la LLC, CD38 est à la fois un reflet de l'activité proliférative et de l'interaction avec le microenvironnement. Il a tout d'abord été décrit comme un marqueur de substitution au statut IgHV. Cependant, après de nombreuses études aux résultats controversés, il est maintenant considéré comme un marqueur indépendant dans la LLC (Boissard, 2015b).

Les principaux problèmes limitant l'utilisation de ce marqueur en clinique sont que le taux de CD38 peut varier au cours de l'évolution de la maladie chez un même patient, et que le taux de positivité fait encore débat. En effet, à l'origine, un taux arbitraire de 30% a été défini, valeur confirmée plus tard par des études statistiques mais certaines équipes ont proposé des taux beaucoup plus faibles jusqu'à 7% (Boissard, 2015b). Ce pourcentage, même faible, serait le reflet de la part proliférante des cellules leucémiques. Son rôle dans le microenvironnement tumoral serait dû à la liaison avec son ligand, le CD31 aussi appelé PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molécule-1). La fixation

de ce ligand, exprimé par les cellules stromales et les Nurse-Like Cells (NLC) provoque dans la cellule leucémique, l'activation d'une cascade de signalisation favorisant la survie de ces dernières (Boissard, 2015b). L'expression du CD38 est associée à un mauvais pronostic qui est caractérisé par un stade avancé de la maladie, incidence plus importante d'adénopathies, hépatomégalie, taux de $\beta 2$ microglobuline et CD23s élevés, et LDT court (Boissard, 2015 b).

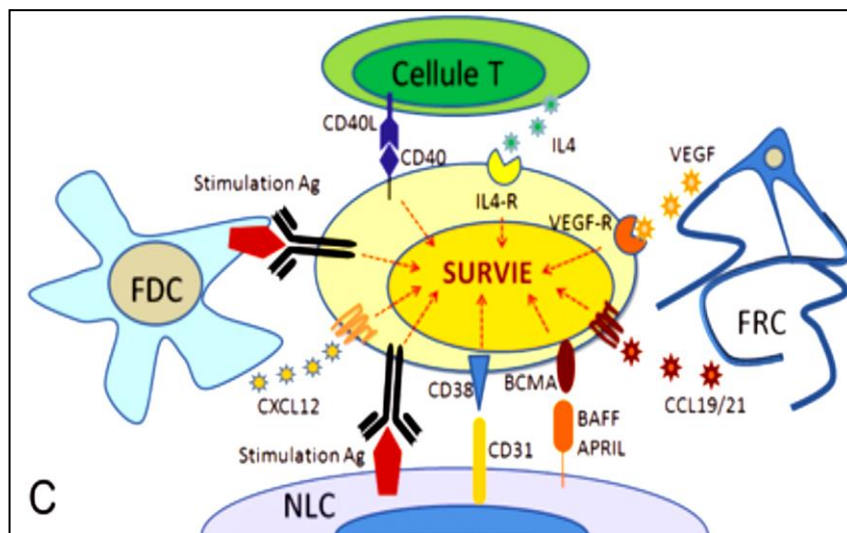


Figure 16 : Augmentation survie des cellules de LLC (Ledoux, 2012)

FDC : cellule dendritique folliculaire ; NLS : cellule nurse-like ; FRC : cellule réticulaire Fibroblastique

I.9- Evolution

La LLC demeure stable de longue année elle peut être émaillée de multiples complications responsable des décès (Moueden, 2018), comme :

- **Infection** : bactérienne, virale, opportunistes (candidose, aspergillose, pneumocystose), qui sont la première cause de mortalité, liée au déficit immunitaire, et/ou la neutropénie, et certains traitements (Immunosuppresseurs, Corticoïdes) favorisent leur apparition.
- **Aggravation de l'insuffisance médullaire** : anémie, thrombopénie, neutropénie, avec conséquence hémorragique et infectieuse lies soit à la maladie ou suite une chimiothérapie.
- **Complication auto-immunes** : accentuation d'une anémie ou d'une thrombopénie auto-immunes.
- **Syndrome de Richter** : apparition d'un lymphome de haut grade de malignité ou d'une maladie de Hodgkin chez un patient suivi pour LLC. Le lien entre le clone lymphocytaire et le clone lymphomateux existe rarement. Le syndrome de Richter commence habituellement par une altération rapide de l'état général avec augmentation rapide de la taille d'adénopathie, le pronostic est très péjoratif. (Survie souvent < 1 an).

- **Fréquence accrue d'une seconde néoplasie** : le risque de Leucémie Aigue secondaire après une chimiothérapie est augmenté. Il existe également une fréquence élevée de survenue de tumeurs solides.

I.10- Diagnostic différentiel

I.10.1- Le lymphome à cellules du manteau (LCM)

Le diagnostic à évoquer devant des lymphocytes B monotypiques CD5+ et CD23– et un score de Matutes inférieur à 3. En plus du syndrome tumoral, le LCM présente souvent une atteinte médullaire (80%) et une dissémination sanguine (50 à 80%), avec une hyperlymphocytose dans 30–50% des cas. La cellule classique du LCM est de taille moyenne avec un noyau irrégulier. Il existe une surexpression de la cycline D1 en biologie moléculaire et au caryotype une translocation t(11; 14)(q13;q32). (Jacque et Leblond, 2019).

I.10.2- Le lymphome folliculaire (LF)

Ce lymphome se présente avec une infiltration médullaire fréquente (50%), mais l'envahissement sanguin, généralement faible, ne concerne qu'environ 10% des patients. Le frottis sanguin comporte de petites cellules clivées, dites en « grain de café ». Dans la majorité des cas, CD5 et CD23 sont absents et la caractéristique immunophénotypique majeure est l'expression de CD10. La translocation t(14;18) (q32;q21), très évocatrice, induit une hyperexpression de Bcl2 (Jacque et Leblond, 2019).

I.10.3- La leucémie à tricholeucocytes (Hairy Cell Leukemia [HCL])

Le tricholeucocyte est une cellule de grande taille dont le cytoplasme étendu présente de nombreuses projections cytoplasmiques fines d'aspect chevelu. Le score de Matutes est inférieur à 2, sans expression du CD5 ni CD23. La HCL exprime le CD103 et actuellement un score de tricholeucocyte est appliqué basé sur l'expression du CD103, CD11c, CD25 et CD123 (Jacque et Leblond, 2019).

I.10.4- Le lymphome de la zone marginale (LZM)

Le LZM regroupe plusieurs entités : le LZM splénique présente souvent un passage sanguin, alors que le LZM ganglionnaire ou du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) disséminé rarement dans le sang. La population lymphoïde est d'aspect hétérogène. Les cellules lymphomateuses sont le plus souvent négatives pour CD5, CD23 et le CD10 (Jacque et Leblond, 2019).

I.11- Traitements

Le traitement de la LLC a pour buts de ralentir la croissance des cellules de LLC, d'obtenir de longues périodes de rémission (pendant lesquelles il n'y a pas de signes de LLC) aussi prolonger la survie et éviter et traiter les complications. Les médicaments utilisés dans la LLC incluent les agents alkylants, les analogues de purines et les anticorps monoclonaux. On peut également traiter la LLC par greffe de cellules souches hématopoïétiques (Louis, 2017).

I.11.1- Agents alkylants

Les agents alkylants agissent en établissant des liaisons covalentes avec l'ADN, ce qui empêche la réplication et la transcription. De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en œuvre des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales. Les agents alkylants les plus utilisés sont le Chlorambucil, en monothérapie (ou parfois associé à une corticothérapie) et Actuellement les plus utilisés en 1^{ère} ligne chez les sujets Fit : Cyclophosphamide, essentiellement en association avec les analogues des purines tels que la Fludarabine (Min, 2013).

I.11.2- Les analogues de purines

Les analogues des purines sont des médicaments qui ressemblent aux purines, mais quand les cellules essayent de les utiliser pour fabriquer leur ADN, ces analogues bloquent le processus et empêchent la cellule de se diviser. Les analogues de purines plus utilisés sont la Fludarabine et la Cladribine, en monothérapie ou essentiellement associés avec des agents alkylants et/ou des anticorps monoclonaux. L'inconvénient de ces médicaments est qu'ils sont également toxiques pour tous les lymphocytes et rendent les sujets particulièrement immunodéficients, les exposant à des complications infectieuses (Min, 2013).

I.11.3- Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps identiques, reconnaissant le même épitope, obtenus par génie génétique. Dans la LLC, les antigènes CD19, CD5, CD20, CD52, CD23, CD37 et les antigènes idiotypiques sont exprimés à des degrés divers à la surface des cellules tumorales et certains d'entre eux peuvent constituer des cibles thérapeutiques pour les anticorps monoclonaux. Les plus utilisés sont les anticorps anti-CD20 (Rituximab) et anti-CD52 (Alemtuzumab). Ces deux anticorps monoclonaux ont fait l'objet de nombreuses études dans la LLC, en monothérapie ou en association à diverses chimiothérapies, en première ligne ou chez des patients en rechute ou réfractaires à la chimiothérapie (Min, 2013).

I.11.4- La greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques inclut l'autogreffe et l'allogreffe. L'autogreffe n'a pas d'indication en première intention. Elle est recommandée chez des patients en rechute ou réfractaires non éligibles pour une allogreffe, sous réserve d'une sensibilité au traitement de rattrapage. L'allogreffe est indiquée dans les traitements de rattrapage des LLC chez les patients jeunes ayant un donneur HLA-Dr (Min, 2013).

Comme il y a plusieurs stratégies thérapeutiques dans le traitement de la LLC, il est important de choisir la meilleure façon pour traiter un patient donné. Le choix du traitement dépend de plusieurs paramètres : caractéristiques moléculaires de la maladie du patient (anomalies cytogénétiques, statut IgVH), caractéristiques cliniques de la maladie ("disease bulk", cytopénies auto-immunes), caractéristiques du patient (âge, insuffisances fonctionnelles, comorbidités) (Min, 2013).

CHAPITRE II

MATERIELS & METHODES

II- Matériels & Méthodes

Il s'agit d'une étude prospective, effectuée au niveau du laboratoire d'hématologie de service d'hématologie de l'EHS ELCC *Centre* Anti-Cancer (CAC) à l'hôpital de Frantz Fanon de Blida, sur une période allant du 01 Février 2020 au 12 Mars 2020 et du 16 Juillet 2020 au 30 Aout 2020.

Notre étude est composé de 22 patients, présentaient un tableau clinique évocateur d'un SLPC (Syndrome Lymphoprolifératif Chronique en conversion leucémique), qui avaient bénéficié d'une analyse immunophénotypique par cytométrie en flux afin de poser le diagnostic.

II.1- Matériels**II.1. 1- Matériel biologique****➤ Prélèvements sanguin**

L'immunophénotypage par cytométrie en flux dans les SLPC en conversion leucémique est fait sur du Sang veineux : 5 ml de sang veineux est prélevé au pli du coude du malade. Les prélèvements sont ensuite placés dans des tubes « vacutainers » contenant un anticoagulant EDTA, et soumis au protocole d'immunophénotypage dans les 24h qui suivent le prélèvement. En cas de conservation du prélèvement pour une manipulation de lendemain, l'échantillon est conservé dans le tube d'origine, à température ambiante (20 - 25°C).

➤ Recueil des données

Les prélèvements sanguins sont accompagnés d'une fiche de renseignements : **(Annexe 01)**

- L'identité du patient : nom, prénom, âge, sexe ;
- La date de réception ;
- Le nom du médecin traitant ;
- Les signes cliniques ;
- Données de l'hémogramme et du frottis sanguin ;
- Le diagnostic suspecte.

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel nécessaire pour le fonctionnement d'un laboratoire de CMF comporte un équipement spécifique et non spécifique.

➤ Equipement spécifique

Nous avons utilisé un cytomètre en flux multicolore type FACS Calibur de Becton- Dickinson (BD), avec deux lasers à 04 couleurs (**Figure 17**).



Figure 17 : FACS Calibur BD du laboratoire d'hématologie du CAC Blida (Originale, 2020)

➤ Equipement non spécifique

❑ Appareillages

- Centrifugeuse réfrigérée de paillasse ;
- Réfrigérateur ;
- Agitateur rotatoire type Vortex ;
- Automate pour Hématimétrie de type Sysmex ;
- Chronomètre.

❑ Matériels consommables

- Tubes Falcon de 5ml (adaptables au cytomètre) ;
- Micropipettes (20 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 2000 μ l) ;
- Embouts jaunes et bleus ;
- Portoirs.

➤ Réactifs

☐ Solutions

Le **tableau IV** résume les solutions utilisées pour réaliser une cytométrie en flux.

Tableau IV: Solutions du cytométrie en flux

Solutions utilisés	Rôle
Cell Wash	Solution tampon pour le lavage des cellules
FACS Lysing	Solution de lyse des globules rouges
FACS Flow	Liquide de gaine, dit aussi liquide vecteur
FACS Clean	Solution désinfectante des tubulures du cytomètre
FACS Rinse	Solution de rinçage des tubulures du cytomètre
L'eau distillée	Solution pour protéger l'aiguille de cytomètre

☐ Billes de calibration

- **Calibrite 3** : qui est un kit tricolore comprenant (**Figure 18**):
 - **Flacon blanc** : contient des billes qui représentent les cellules non marquées ;
 - **Flacon vert** : contient des billes couplées au fluorochrome FITC ;
 - **Flacon rouge** : contient des billes couplées au fluorochrome PE ;
 - **Flacon rose** : contient des billes couplées au fluorochrome PerCP ;
 - **Billes APC CaliBRITE** : Flacon bleu qui contient des billes couplées au Fluorochrome APC.



Figure 18 : Calibrite 3 : Les Billes de calibration 3.

Laboratoire d'hématologie du CAC Blida (Originale, 2020)

□ Anticorps monoclonaux conjugués aux fluorochromes

- Les contrôles isotypiques

C'est des anticorps monoclonaux conjugués aux différents fluorochromes (FITC, PE, PerCP, Cy5.5, APC), et ayant les mêmes caractéristiques que les AC monoclonaux (Même isotype, même fournisseur, même fluorochrome, même concentration, même protocole et ne reconnaître aucun marqueur), ils vont se lier aux chaînes lourdes gamma 1 et 2 des immunoglobulines. Ils sont utilisés afin d'occuper toutes les liaisons non spécifiques pour mieux déterminer les régions négatives des régions positives.

- Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont couplés à un fluorochrome, (FITC, PE, PerCP, APC) pour déterminer le phénotype cellulaire et rechercher des marqueurs membranaires spécifiques et non spécifiques (**Figure 19**) (**Tableau V**).



Figure 19: Exemple de 04 Anticorps monoclonaux du laboratoire d'hématologie du CAC Blida (Originale, 2020)

Tableau V: Les marqueurs des cellules lymphoïdes (B, T, NK)

Anticorps monoclonaux	
Les marqueurs des lymphocytes B.	CD19 (Pan B), CD22, CD20, CD79b, FMC7, CD23, chaînes légères Kappa et Lambda, IgM, IgG
Les marqueurs des lymphocytes T	CD3 (Pan T), CD5, CD2, CD7, CD8, CD4
Les marqueurs des lymphocytes NK	CD16, CD56
Autres marqueurs	CD38, , CD81, CD11c, CD43, CD25, CD138, IgD
Fluorochromes	
L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La phycoérythrine (PE). La péricidine chlorophylle (PerCP). L'allophycocyanine (APC).	

❑ Panel SLPC B

Une sélection d'anticorps adaptée et conjuguée à des fluorochromes, constitue un panel, permet la recherche simultanée et rapide, de plusieurs marqueurs antigéniques impliqués dans les SLPC B (Tableau VI).

Tableau VI : Panel des SLPC B

FLUOROCHROMES	ANTICORPS			
	FITC	PE	PerCp-Cy5.5	APC
Tube 1 (Témoïn)	-	-	-	-
Tube 2	Kappa	Lambda	CD19	CD5
Tube 3	FMC7	CD23	CD19	CD5
Tube 4	CD81	CD5	CD19	CD11C
Tube 5	CD20	CD5	CD19	CD10
Tube 6	CD43	CD25	CD19	CD79b
Tube 7	CD5	CD138	CD19	CD38
Tube 8	CD22	IgD	CD19	CD5
Tube 9	CD4	CD7	CD3	CD8

II.2- Méthodes

II.2.1- Présentation du cytomètre en flux

Il est basé sur la combinaison de trois systèmes :

- Un système fluïdique : distribution de l'échantillon ;
- Un système optique : source d'excitation et de récupération des signaux ;
- Un système électronique : traitement électronique des données.

II.2.2- Principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux

Les cellules traversent un système fluïdique (**Figure 20, phase1**) permettant aux cellules de passer une à une devant un faisceau laser d'excitation (**Figure 20, phase 2**). Chaque cellule va alors diffracter la lumière selon des paramètres propres, renseignant ainsi la taille de la cellule (FSC) et sa complexité interne ou granularité (SSC) (**Figure 20, phase 3**).

L'excitation par le laser permet également l'émission de fluorescence : les photons émis sont « triés » dans la boîte à filtre, collectés et le signal est amplifié sur des photomultiplicateurs (PMT) qui permet

de transformer le signal lumineux en signal électrique puis numérique. Le traitement informatique des données permet alors de mesurer les caractéristiques de la population cellulaire (**Figure 20, phase 4**).

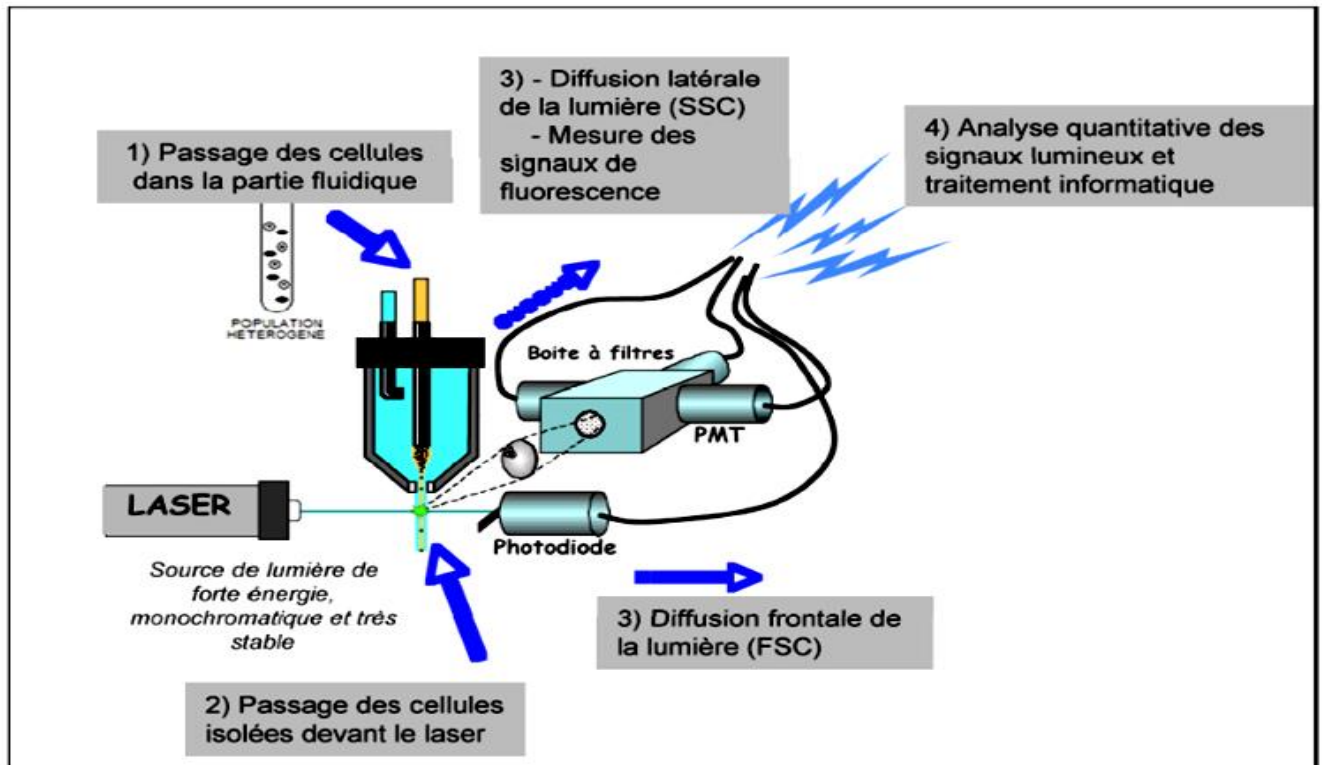


Figure 20: Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux

(www.invitrogen.com).

II.2.3- Principe du marquage

La cytométrie en flux permet de réaliser un immunophénotypage grâce à des anticorps conjugués avec des fluorochromes (substances organiques qui sous l'influence d'une radiation de longueur d'onde donnée émettent une lumière d'onde supérieure). Les anticorps se lient à leurs récepteurs spécifiques à la membrane des cellules. Une combinaison d'anticorps permet d'identifier à la surface d'une cellule plusieurs antigènes et donc des populations cellulaires (Orabona, 2011).

II.2.4- Technique

II.2.4.1- Protocole de l'immunophénotypage

- **La 1^{ère} étape : réalisation d'un hémogramme après réception d'échantillon (Figure 21) :**
 - Faire un hémogramme pour déterminer le taux de globules blancs (GB) ;
 - Procéder à une dilution de l'échantillon si le taux des GB > 50 000 elts/ul.

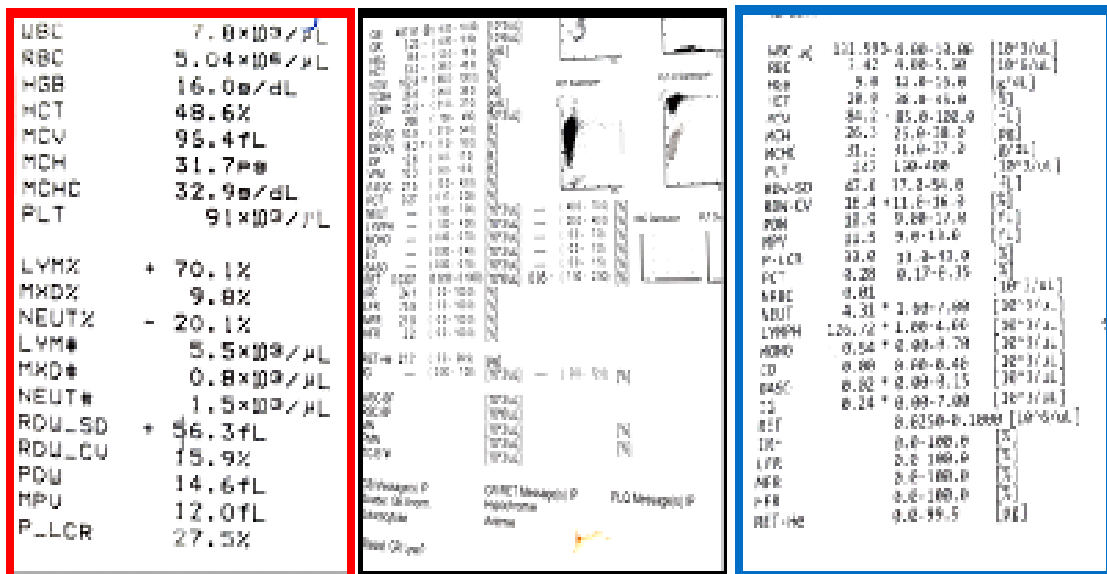


Figure 21: Hémogramme. Rouge : taux de GB normal avec une hyperlymphocytose. Noir et bleu : hyperleucocytose majeure (Originale, 2020)

- **La 2^{ème} étape : Préparation des échantillons**
 - Préparer les tubes Falcon de 5 ml, les disposer dans un portoir et les marquer (T1, T2, T3...T9) ;
 - Préparer les différentes pipettes nécessaires (0.5 μl, 20 μl, 100 μl, 500 μl, 2000 μl) ;
 - Dans le tube 1 (témoin) pas d'anticorps ;
 - Mettre dans les autres tubes 20 μl de chaque anticorps suivant le panel SLPC B, donc 4 fluorochromes dans chaque tube ;
 - Pour le marquage des immunoglobulines (Kappa et Lambda), on prend un volume de 100 μl de sang total, le mettre dans un tube à part et on doit faire 3 lavages à cet échantillon.

- **Technique de lavage du sang de tube 2**
- ✓ Ajoutez 2000 μ l de Cell Wash au 100 μ l du sang total, puis homogénéisez la solution à l'aide d'un vortex ;
- ✓ Centrifugez la solution (à 1500 tours/min pendant 5 minutes) ;
- ✓ Eliminez le surnageant. Répétez 3 fois jusqu'à ce que surnageant soit claire ;
- Ajoutez 100 μ l de sang total dans tous les autres tubes (**Figure 22**), mis à part le tube 2 auquel on ajoute 100 μ l de sang lavé au préalable ;
- Homogénéisez la solution a l'aide d'un vortex (**Figure 23**), et laisser incuber 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- Ajoutez 2000 μ l de solution de lyse à chaque tube (**Figure 24, 25**), homogénéisez la solution par vortex (**Figure 23**), et laisser incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- Centrifuger la totalité des tubes (1500 tours/min pendant 5 min), puis éliminez le surnageant ;
- Lavage 2 fois par la solution Cell Wash pour éliminer les globules rouges lysés en respectant les étapes suivantes:
 - ✓ Un volume de 2000 μ l de Cell Wash est ajouté ;
 - ✓ Vortexer ;
 - ✓ Centrifuger (1500 tours/min pendant 5 min), puis éliminez le surnageant.
 - ✓

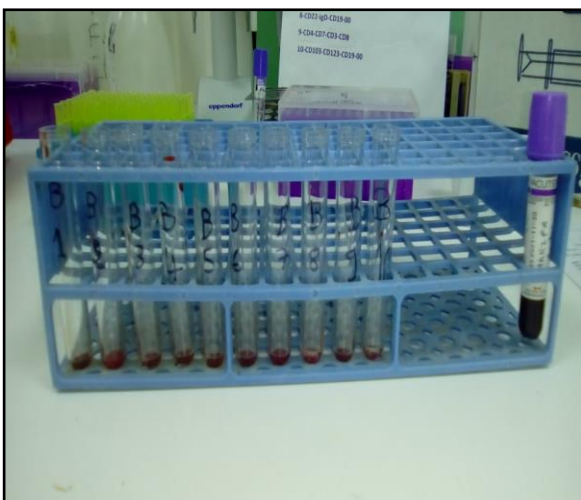


Figure 22 : L'ajout de 100 μ l du sang
(Originale, 2020)



Figure 23 : Homogénéisation par vortex
(Originale, 2020)



Figure 24 : L'ajout de la lyse (Originale, 2020)



Figure 25 : Suspension contenant la solution de lyse (Originale, 2020)

- A la fin, ajoutez 500 µl de Cell Wash dans chaque tube, vortexer avant la lecture (**Figure 26**).

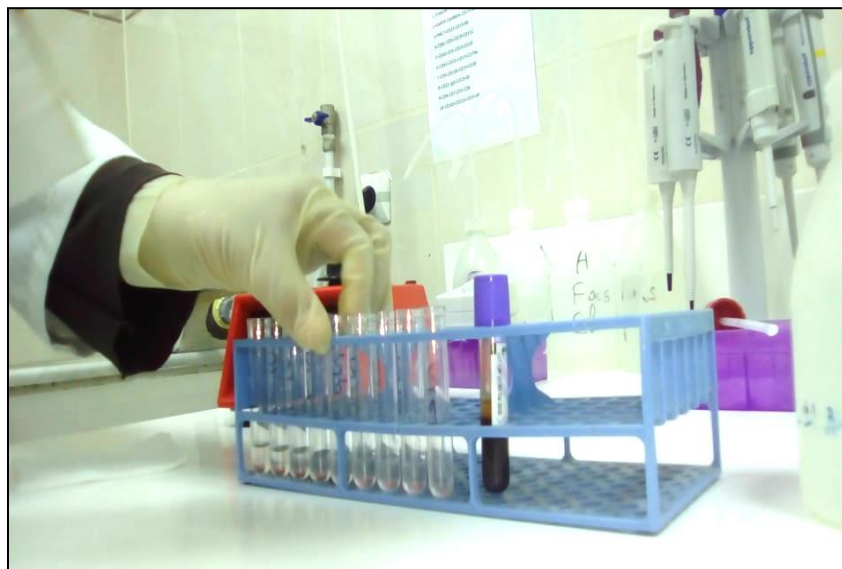


Figure 26 : Tubes Falcon contenant la suspension cellulaire marquée (Laboratoire d'hématologie CAC Blida) (Originale, 2020)

II.2.4.2. Procédure de manipulation

➤ **Méthode de mise en marche, d'arrêt et de maintenance du cytomètre en flux**

Les étapes d'allumage, d'arrêt et de maintenance du cytomètre en flux sont expliquées dans le manuel et doivent être respectés avant chaque analyse (**Annexe 02**).

➤ **Procédure de calibration du cytomètre**

Avant toute utilisation du cytomètre, il est important d'effectuer ces procédures pour assurer le bon fonctionnement et la sensibilité des lasers. Les billes de CaliBRITE 3 et de l'APC CaliBRITE sont utilisées pour cette opération.

• **Mode opératoire**

- Préparer deux tubes A et B ;
- Disposer dans le tube A 1 ml de FACS Flow et une goutte des billes non marqués, ce tube est destiné pour le réglage des PMT du cytomètre ;
- Mettre 3 ml de FACS Flow et une goutte de chaque type de billes dans le tube B, ce dernier servira à régler les compensations des fluorochromes ;
- Vortexer les tubes, et procéder directement à la calibration.

• **Acquisition des calibrations à l'aide du logiciel FACS Comp (Annexe 03)**

- Sur le système informatique du cytomètre, on met en marche du logiciel FACS Comp, puis sélection du réglage (Lyse/Wash) ;
- Introduction des numéros d'identification des lots de billes (Calibrite 3 ; APC CaliBRITE) ;
- Mettre le tube A au niveau de l'aiguille de l'appareil, puis activation du mode RUN et à la vitesse High ;
- Commencer l'acquisition, sélectionner l'icône START ;
- Remplacer le tube A par le tube B pour une 2^{ème} acquisition ;
- Le logiciel FACS Comp affichera (Pass) si la procédure est réussie, ou (Fail) si la procédure a échoué ;
- Répéter l'opération en cas de non réussite, si non faire appel à l'équipe de maintenance.

➤ **Procédure de compensations manuelles**

• **Principe de la procédure**

- Effectuer une soustraction de la superposition des signaux des différents fluorochromes utilisés, pour éliminer les chevauchements des spectres d'émissions ;
- Ainsi une population cellulaire marquée par un fluorochrome n'émétra pas un signal comme étant marquée par un autre fluorochrome.

• **Mode opératoire**

- Echantillon : un sang prélevé chez un sujet sain ;
- Faire un hémogramme pour déterminer le taux de GB ;
- Prendre 6 tubes Falcon, les numéroter, et disposer 20 µl d'un anticorps monoclonal (un anticorps par tube) + 100 µl de sang ;
- Le panel utilisé pour des compensations 4 couleurs comprend :
 - Tube 1** : 100 µl de sang. Ce tube est le contrôle négatif, il n'est pas soumis à un marquage ;
 - Tube 2** : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un conjugué type FITC ;
 - Tube 3** : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un conjugué type PE ;
 - Tube 4** : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un conjugué type PerCP Cy5.5 ;
 - Tube 5** : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un conjugué type APC ;
 - Tube 6** : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié aux 4 conjugués utilisés dans les tubes précédents ;
- Homogénéiser les 6 tubes à l'aide d'un Vortex et les laisser incuber dans l'obscurité pendant 15 min ;
- Ajouter 2 ml de lyse dans chaque tube, les vortexer et laisser incuber 15 min à l'obscurité ;
- Centrifuger (1500 tours/5 min) puis éliminer le surnageant ;
- Effectuer ensuite 2 lavage des échantillons ;
- Après le deuxième lavage éliminer le surnageant et ajouter 1000 µl de Cell Wash pour la lecture.

• **Lecture des compensations**

Avant la lecture des compensations, s'assurer de suivre la procédure de mise en marche et de calibration du cytomètre.

- Acquisition des échantillons de compensation :

Tube 1 : a pour but l'ajustement du gain des amplificateurs FSC et SSC pour que les différentes populations présentes soient visibles, et réduire la zone de débris.

On fait le « gating » sur le Dot plot FSC/SSC, pour cibler la population lymphoïde afin d'indiquer les cellules à analyser, ainsi on pourra ajuster les zones négatives par réglages des PMT de chaque fluorochrome au niveau des Dot Plot des fluorochromes.

Tube 2 à 5 : Ce sont des tubes monomarqués, servent à éliminer les chevauchements des spectres qui peuvent être superposés en effectuant une soustraction des signaux (**Tableau VII**).

Exemple du tube 2 : pour les 2 fluorochromes FITC et PE, le niveau des compensations (FL2-FL1) est réglé de façon à ce que la population FITC soit alignée le long de l'axe des ordonnées avec la population des billes non marquées, puis on effectue les autres ajustements du fluorochrome FITC.

FL1 : correspond à une population marquée par FITC ;

FL2 : correspond à une population marquée par PE ;

FL3 : correspond à une population marquée par PerCP Cy5.5 ;

FL4 : correspond à une population marquée par APC ;

Tableau VII : principe de la compensation d'un cytomètre à 04 couleurs

Tube N° 2	Tube N° 3	Tube N° 4	Tube N° 5
FL2 - FL1 = %.	FL1 - FL2 = %.	FL1 - FL3 = %.	FL1 - FL4 = %.
FL3 - FL1 = %.	FL3 - FL2 = %.	FL2 - FL3 = %.	FL2 - FL4 = %.
FL4 - FL1 = %.	FL4 - FL2 = %.	FL4 - FL3 = %.	FL3 - FL4 = %.

Tube 6: Ce tube comporte les 4 conjugués, il sert à s'assurer que les voltages et compensations sont bons (**Figure 27**).

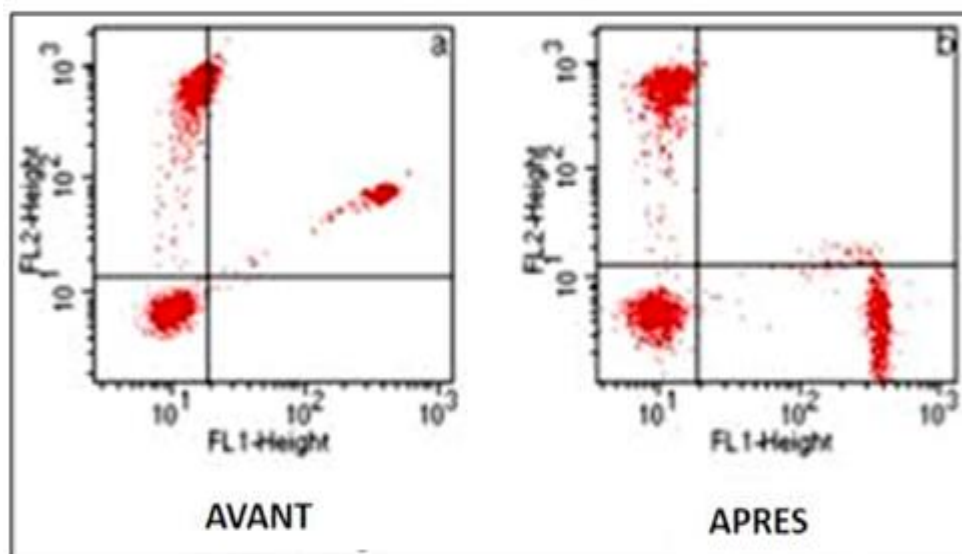


Figure 27: Image de compensation (Originale, 2020)

➤ **Acquisition et analyse des échantillons**

Après avoir effectué les compensations et les calibrations, on procède à la lecture des échantillons à l'aide du logiciel Cell Quest pro.

L'acquisition des échantillons débutera par l'ouverture du masque d'acquisition sur l'ordinateur, qui est une page créée au préalable, comportant les différents graphes d'acquisition qui peuvent être des histogrammes, des Dot-Plot bi-paramétriques et des graphes de densités qui sont vides des événements cellulaires.

Avant de commencer l'acquisition, on fait appel aux compensations pré-enregistrées.

Le tube 1 est le contrôle négatif, permet d'observer la projection des différentes cellules et leurs répartitions, il sert aussi à cibler la région qu'on veut analyser (la région lymphoïde dans le cas de notre étude) (**Figure 28**) et on doit ajuster les zones négatives des Dot Plot durant l'acquisition du contrôle négative (**Figure 29**).

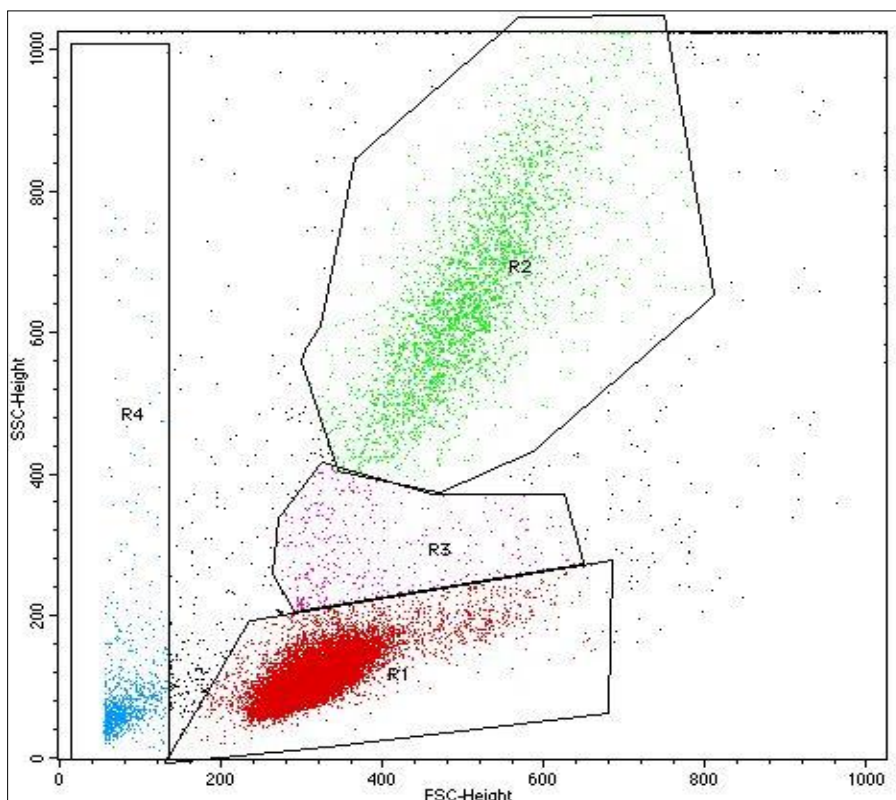


Figure 28 : Dot Plot présentant les différentes populations du sang.
Laboratoire hématologie du CAC Blida (Originale, 2020)

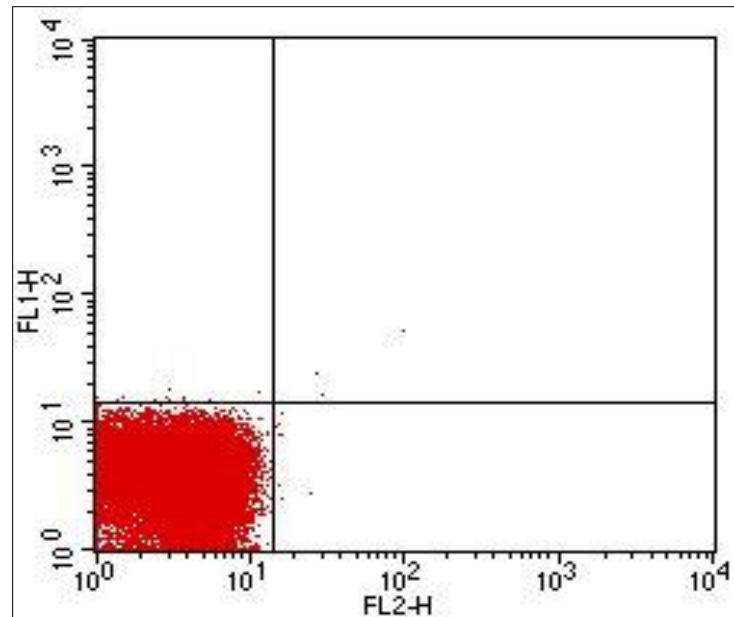


Figure 29 : Ajustement de la zone négative.

Laboratoire hématologie du CAC Blida (Originale, 2020)

L'analyse des tubes suivants permettra d'interpréter l'expression des différents antigènes en termes de positivité ou négativité et de déterminer l'intensité de la fluorescence.

➤ Analyse des résultats

Après l'étape d'acquisition débutera l'étape de lecture qui consiste à analyser des résultats enregistrés au préalable, elle nous permet de:

- Définir les différentes populations cellulaires présentes (Figure 28);
- Cibler la population cellulaire à étudier (gating) ;
- EN cas de LLC, on effectue un gating sur la région lymphoïde, puis 2^{ème} gating de la population CD19 positive.
- Définir la positivité ou la négativité de l'expression d'un antigène, sachant que le seuil de positivité utilisé au laboratoire est de plus de 20% ;
- Définir l'intensité d'expression de chaque antigène ;
- Déterminer la présence d'une monoclonalité.

Un Dot plot est séparé en 4 quadrant qui ont pour but de délimiter les zones négatives des zones positives (**Figure 30**). Une analyse logarithmique qui apprécie l'intensité de la fluorescence pour chaque quadrant nous permet de détecter la positivité ou la négativité de la fluorescence ainsi que son intensité.

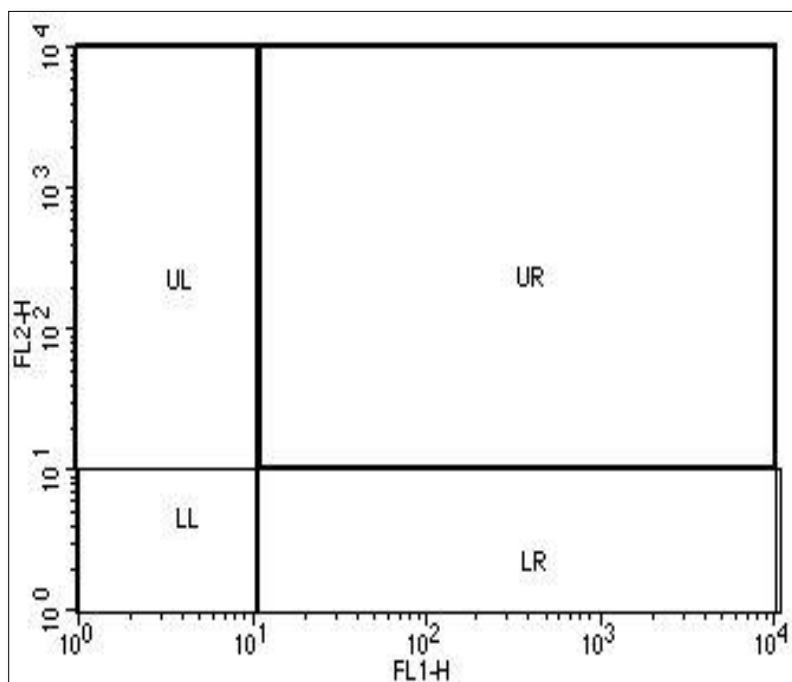


Figure 30: Dot Plot bi-paramétrique.

Laboratoire d'hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

Les quatre quadrants sont intitulés :

- **UL** : objectif des cellules exprimant seulement le FL2+ ;
- **UR** : objectif des cellules à double positivité pour le FL1+ et FL2+ ;
- **LL** : objectif les cellules à double négativité pour le FL1- et FL2- ;
- **LR** : objectif les cellules exprimant seulement le FL1+.

II.3. Etude statistique (Annexe 04)

CHAPITRE III

RESULTATS

III- Résultats

Du 01 Février 2020 au 12 Mars 2020 et du 16 Juillet 2020 au 30 Aout 2020, nous avons effectué 50 immunophénotypages par cytométrie en flux pour suspicion d'un Syndrome Lymphoprolifératif Chronique en conversion Leucémique et dont 22 patients soit 44% sont des Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC).

L'étude est prospective porter sur les 22 cas de Leucémie Lymphoïde Chronique dans laquelle nous avons recherché l'expression du marqueur CD38 qui est considéré comme un facteur de mauvais pronostic. Dans ce travail, en plus de l'analyse de l'apport de la CMF dans le diagnostic des LLC, nous analyserons les caractéristiques des patients LLC qui sont CD38+ et CD38-.

III.1- Caractéristiques cliniques de la population étudiée

III.1.1- Répartition des patients selon le sexe

Parmi les 22 patients, sujets de notre étude (**Figure 31**), on dénombre :

- ✓ **Femmes** : 05 cas (22,73% des cas) ;
- ✓ **Hommes** : 17 cas (77,27% des cas).
- ✓ **Sex ratio** (h/f) = 3,4 avec prédominance masculine.

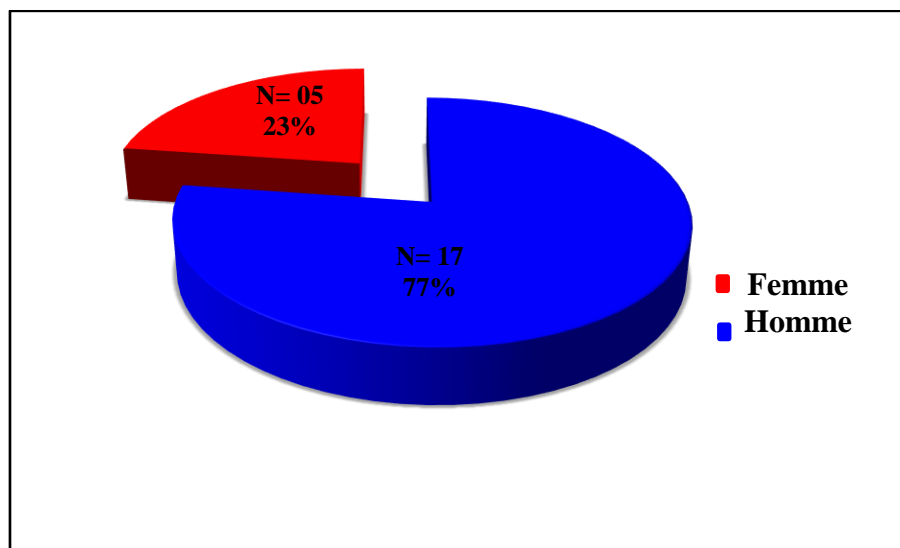


Figure 31 : Répartition des patients selon le sexe (Originale, 2020)

III.1.2. Répartition des résultats des patients selon l'âge

Dans notre cas d'étude, l'âge moyen des patients au moment du diagnostic est de 70.81 ans (53 – 86), dont les résultats de la répartition des prélèvements des patients en fonction des tranches d'âge sont représentés comme suit:

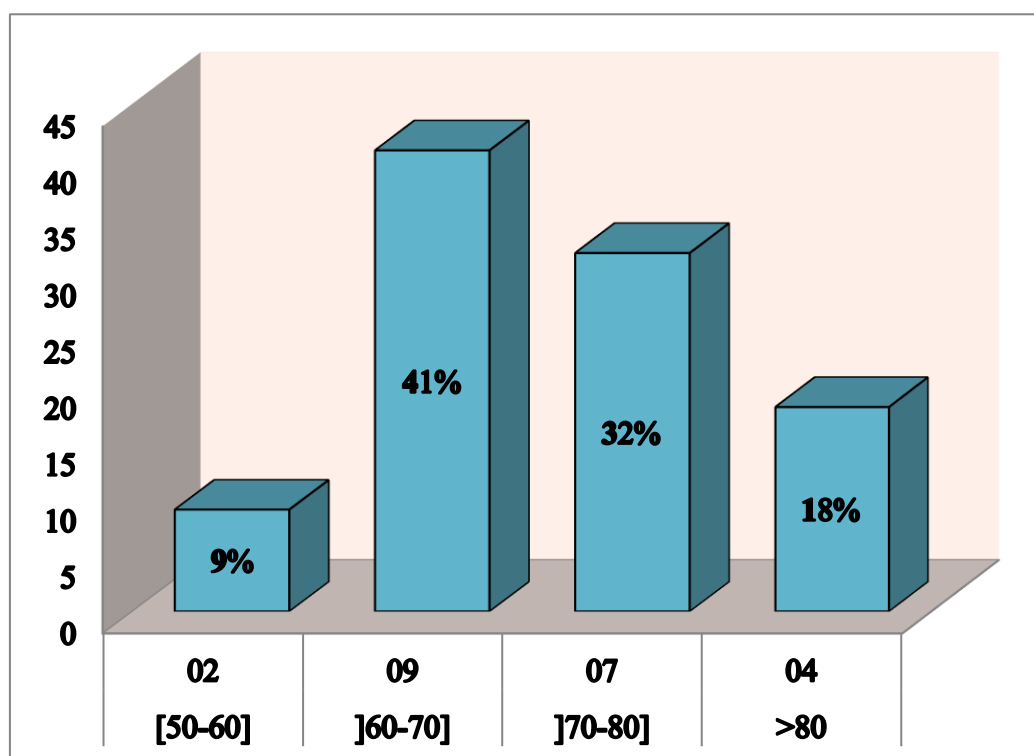


Figure 32 : Répartition des patients selon les tranches d'âge (Originale, 2020)

Nous constatons que :

- ✓ La leucémie lymphoïde chronique touche beaucoup plus les patients ayant un âge entre 60 et 70 ans avec un pourcentage de 41%.
- ✓ Les patients qui ont un âge de 70 à 80 ans représentent 32%.
- ✓ Les patients qui ont plus de 80 ans représentent 18%.
- ✓ Seulement 9% des patients ont moins de 60 ans.

III.2- Caractéristiques biologiques

III.2.1- Hémogramme

III.2.1.1- Analyse des taux des Globules Blancs :

Les résultats du taux des Globules Blancs sont figurés dans le **tableau VIII**:

Tableau VIII : Taux des globules blancs (Original, 2020)

Globules Blancs (μl)	<10 000	10 000 à 50 000	50 000 à 100 000	> 100 000
Taux (%)	4,55%	54,55%	22,73%	18,18%
Nombre	1	12	5	4

- **Taux moyen des globules blancs (GB) :** 83 254,5 / μl (6800 – 478 780) ;
- **Hyperleucocytose :** 21 cas (95%) ;
- **Taux de GB normal (< 10 000 elts/ μl) :** 01 cas (5%) mais avec une hyperlymphocytose.

III.2.1.2. Analyse des taux des Lymphocytes

Les résultats du taux des lymphocytes sont illustrés dans le **tableau IX**:

Tableau IX: Taux des lymphocytes (Original, 2020)

les lymphocytes/ μl	4000 à 10 000	10 000 à 50 000	50 000 à 100 000	> 100 000
%	4,55	54,55	22,73	18,18
Nombre	1	12	5	4

- **Taux moyen des Lymphocytes :** 65 580/ μl (5150– 428000) ;
- **Hyperlymphocytose majeures plus de 100 000 elts/ μl :** 04 cas (18,18%).

III.2.2- Cytologie

L'analyse morphologique du frottis sanguin a conclu à un SLPC dans 64% des cas (**Tableau X**).

Tableau X: Résultats de la cytologie (Original, 2020)

Résultats cytologiques	LLC	SLPC
Nombre	8	14
Taux (%)	36%	64%

III.2.3- Résultats de l'immunophénotypage par CMF

III.2.3.1- Prélèvements

L'analyse immunophénotypique par CMF a été effectuée sur prélèvement sanguine dans 100% des cas car tous les patients présentés une hyperlymphocytose.

III.2.3.2- Résultats de la CMF

L'immunophénotypage par CMF a été effectuée chez 50 patients présentant une hyperlymphocytose, elle conclue à une LLC chez 22 patients soit 44% des cas et à un autre syndrome lymphoprolifératif chronique en conversion leucémique chez 28 patients soit 56% (**Tableau XI**).

Tableau XI : Résultats de l'immunophénotypage par CMF (Original, 2020)

Résultats CMF	LLC	SLPC
Nombre	22	28
Taux (%)	44%	56%

III.2.3.3- Score de Matutes

La cytométrie en flux a permis de confirmer le diagnostic d'une LLC dans 22 cas soit 44% des SLPC en conversion leucémique en se basant sur l'aspect immunophénotypiques des cellules et de l'application du score de Matutes (**Tableau XII**).

➤ Application du score de Matutes

Sur les 22 patients le score de Matutes est de :

- ✓ **Score 5/5** : 10 cas (45,5 %).
- ✓ **Score 4/5** : 10 cas (45,5 %).
- ✓ **Score 3/5** : 2 cas (9%).

Tableau XII: Score Matutes (Original, 2020)

score Matutes	3/5	4/5	5/5
Nombre	2	10	10
Taux (%)	9%	45,5%	45,5%

Dans notre étude (**Tableau XII**), 91% des LLC ont un score de Matutes ≥ 4 et seulement 9% ont un score à 3. La CMF a confirmé une LLC typique dans 91% des cas et une LLC atypique dans 9% des cas.

➤ Expression des marqueurs du score de Matutes

Le **tableau XIII** et la **figure 31** illustrent la répartition d'expression des marqueurs du score de Matutes.

Tableau XIII : Taux d'expression des marqueurs du score de Matutes (Original, 2020)

Marqueurs	CD19	FMC7	CD23	CD5	CD22	CD79b	Kappa	Lambda
Taux %	100	0	100	100	54	73	27	50
Patients atteints de LLC	22	0	22	22	12	16 (10 Cas faible expression)	6	11

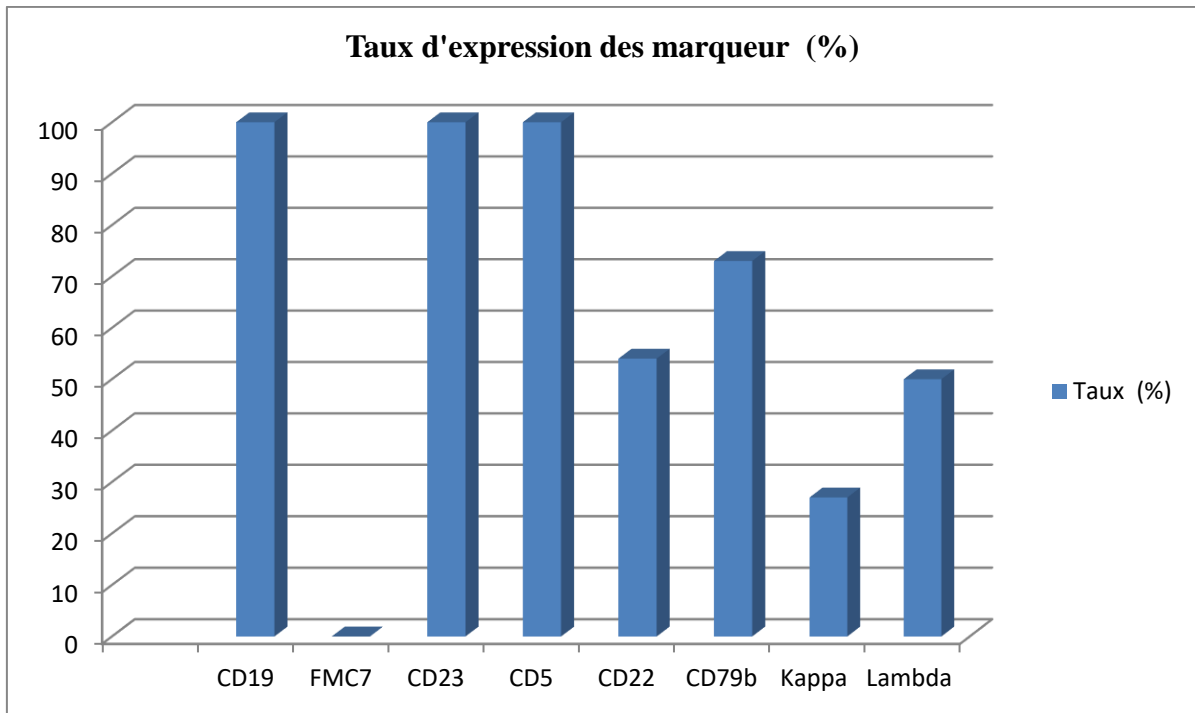


Figure 33 : Représentation graphique de Taux d’expression des marqueurs du score de Matutes (Originale, 2020)

- Le marqueur Pan B qui est le **CD19** est exprimé dans 100% des cellules lymphoïdes B (Figure 34).

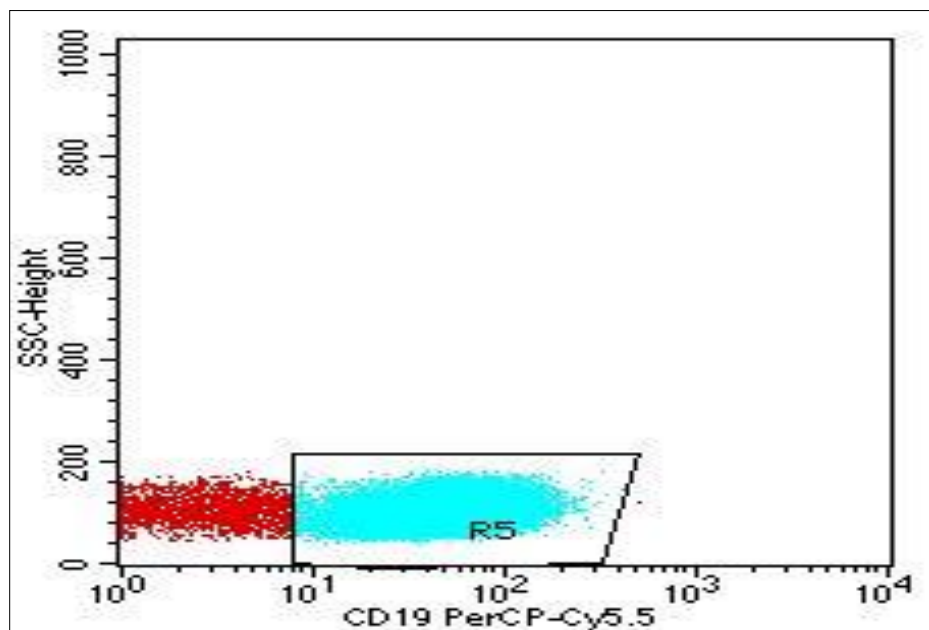


Figure 34: Population lymphoïde B CD19+.

Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

Selon la **figure 35** :

- Les marqueurs **CD23**, **CD5** sont exprimées chez les 22 patients soit un taux de 100%.
- Absence d'expression du marqueur **FMC7** chez tous les patients.

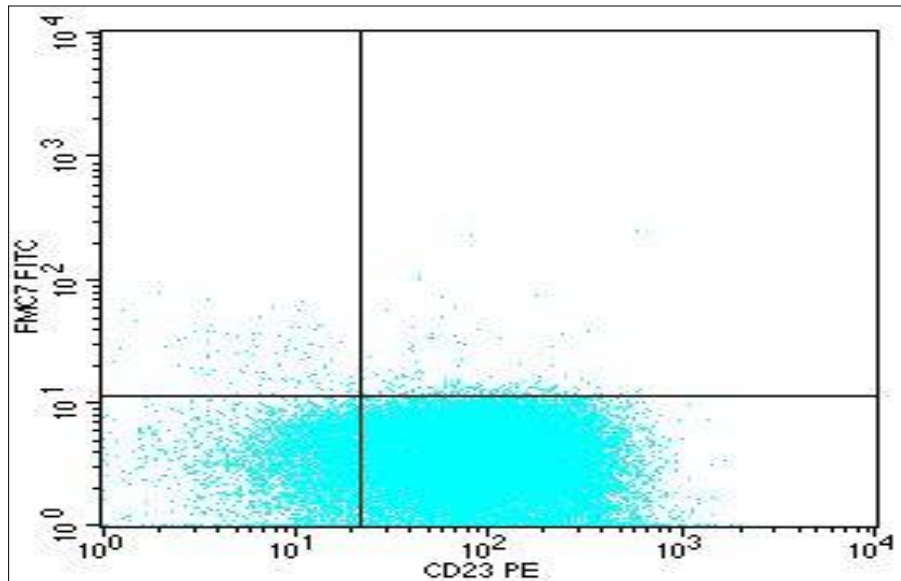


Figure 35: Lymphocyte B CD19+ ; CD23+ et FMC7-.
Laboratoire d'hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

- Analyse du marqueur CD79b (Figure 36), retrouve une :

- **Absence d'expression du CD79b** : 06 cas (27,27%) ;
- **Expression faible** : 10 cas (45,45%) ;
- **Expression forte** : 06 cas (27,27%)

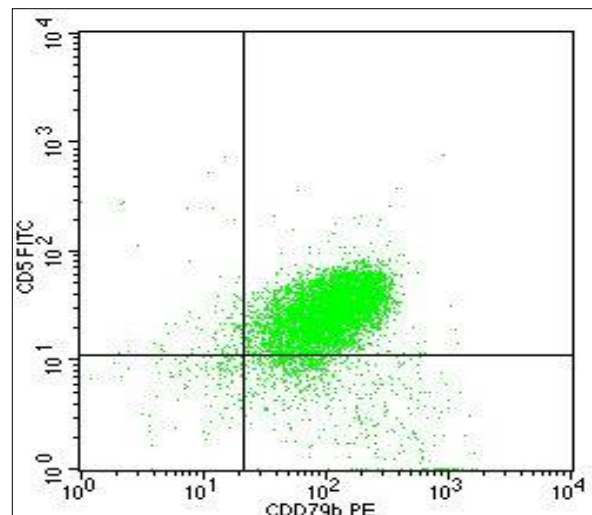
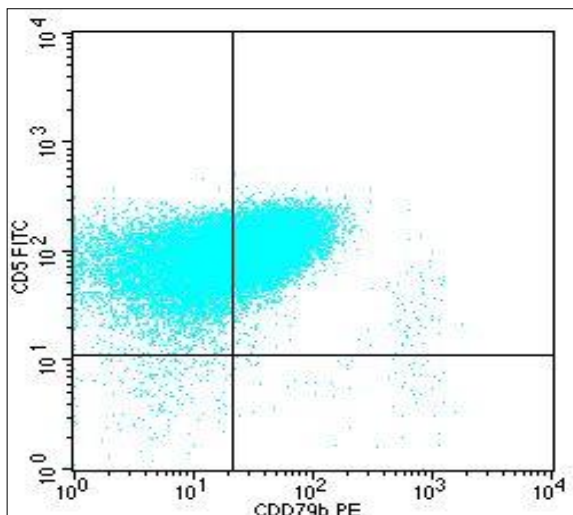


Figure 36: Expression faible du CD79b (Bleu) et expression forte de CD79b (Vert).
Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

- **Monoclonalité (Figure 37) (Tableau XIV) :**

- Monoclonalité Kappa : 06 cas (27,27%)
- Monoclonalité Lambda : 10 cas (45,45%)
- Pas d'expression des chaines légères : 06 cas (27,27%)

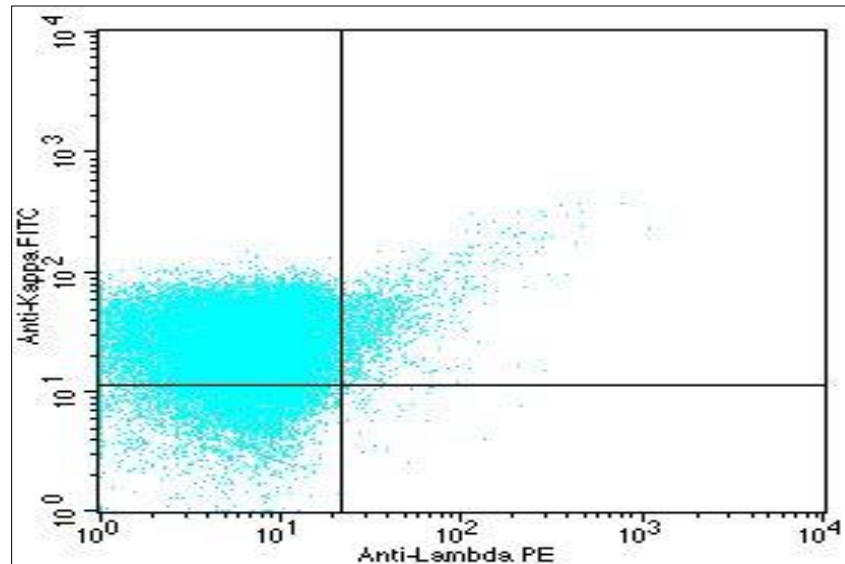


Figure 37: Monoclonalité Kappa. Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

Tableau XIV : Expression de monoclonalité (Original, 2020)

Monoclonalité	Kappa	Lambda	Absence des chaines légères
Nombre	6	10	6
Taux (%)	27,27%	45,45%	27,27%

- Dans plus de 72% des cas, il y'a une expression de la monoclonalité ;
- Prédominance de la monoclonalité Lambda de 45% des cas ;
- La monoclonalité Kappa est exprimé dans 27% des cas ;
- Dans 27% des cas, pas d'expression des chaines légères.

➤ Expression des autres marqueurs

Les taux des autres marqueurs sont représentés dans le **tableau XV** et la **figure 38**:

Tableau XV : Taux d’expression des autres marqueurs (Original, 2020)

Les marqueurs	CD10	CD20	CD43	CD11c	CD81	IgD	CD25
Taux (%)	0	95,45	90,91	54,55	68,18	86,36	86,36
Nombre de patient	0	21	20	12	15	19	19

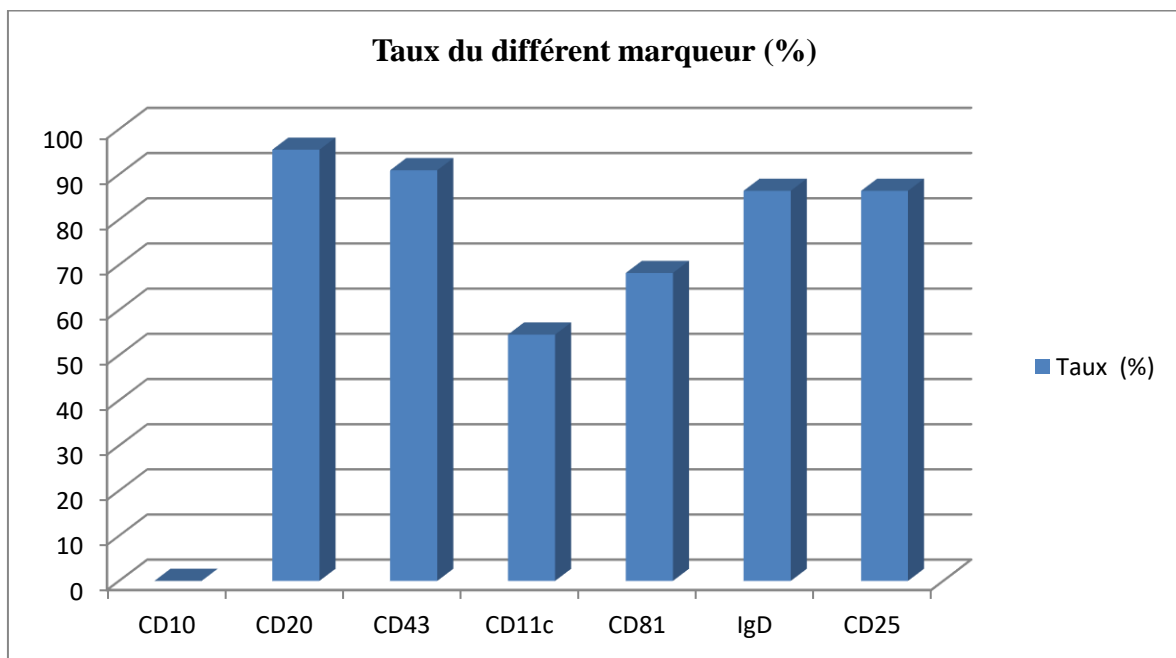


Figure 38 : Représentation graphique des taux du différent marqueur des patients (Originale, 2020)

- **CD10** : absence d'expression du CD10 dans 100% des cas éliminant le lymphome folliculaire (Figure 39).

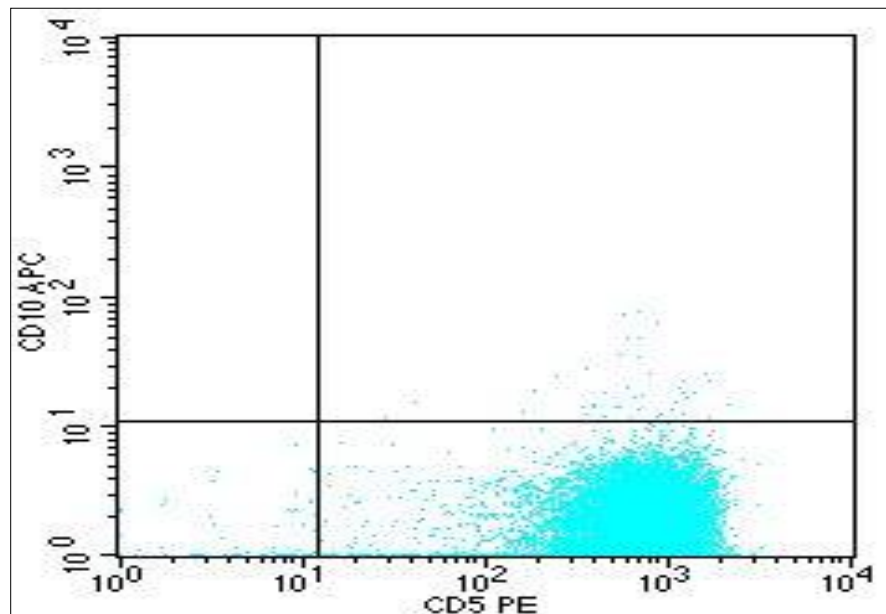


Figure 39: Lymphocytes B CD5+ et CD10-.
Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

- **CD20** : il est exprimé dans 95% des cas. le CD20 est faiblement exprimé dans 20 cas (91%) et fortement exprimé dans 02 cas (9%) (Figure 40).

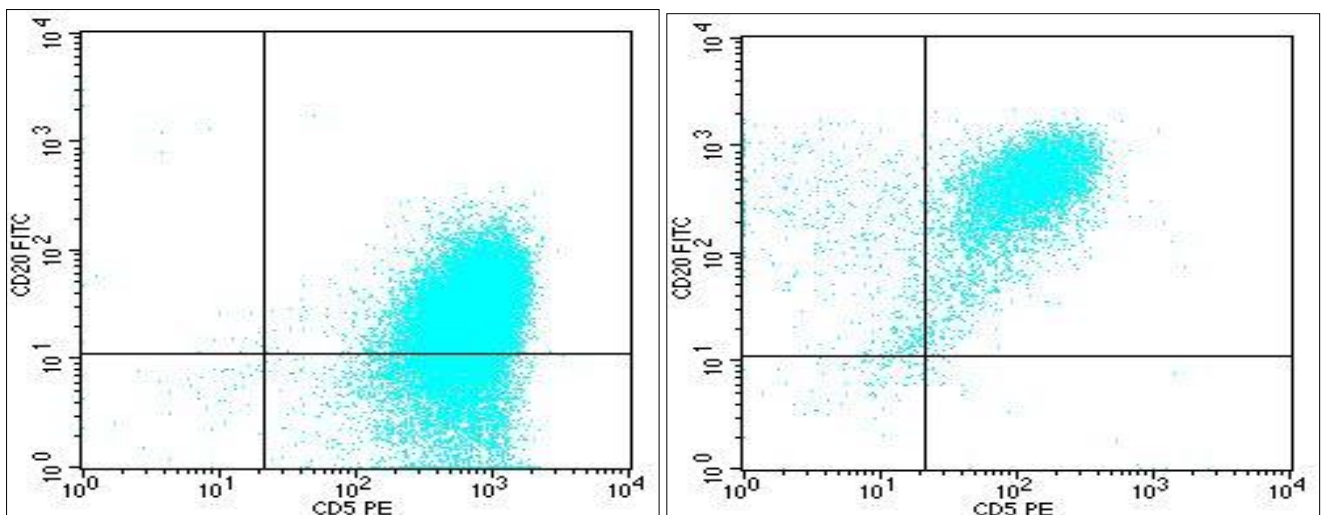


Figure 40: Expression faible du CD20 (Gauche) et expression forte de CD20 (Droite).
Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

- **CD43** : il est exprimé dans plus de 90% des cas.

➤ **Stade de Binet :**

Le **tableau XVI** et la **figure 41** illustrent la répartition des patients selon le stade de Binet.

Tableau XVI : Répartition des patients selon le stade de Binet (Original, 2020)

Stade de binet	A	B	C
Taux (%)	68,18%	4,55%	27,27%
Nombre	15	1	6

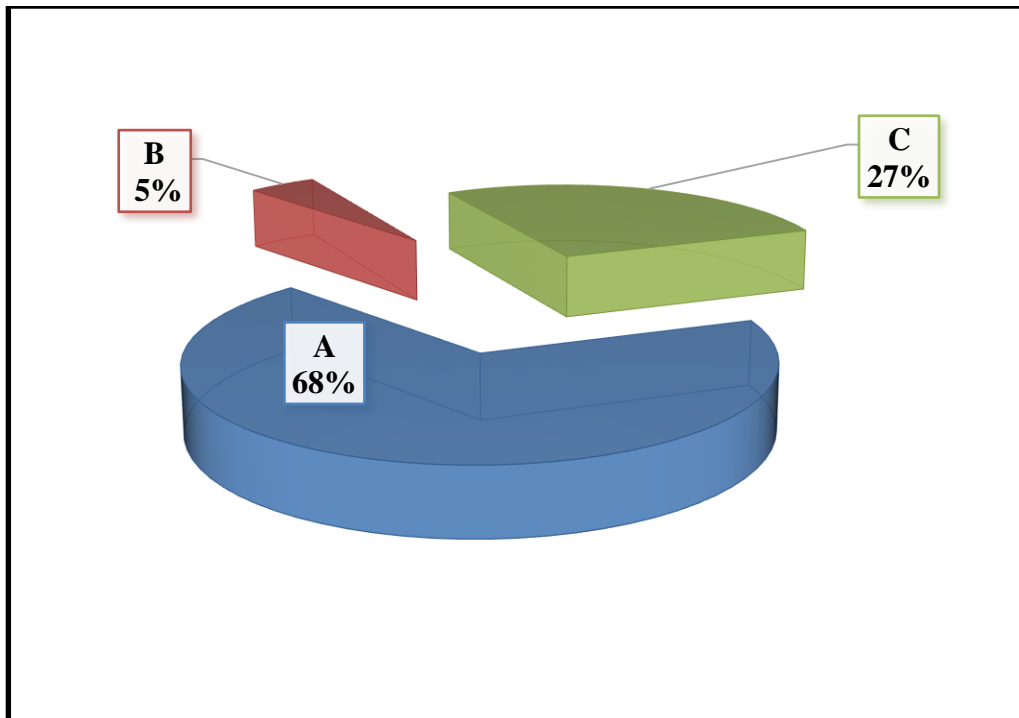


Figure 41 : Répartition des patients selon le stade de Binet (Originale, 2020)

Selon la classification de Binet : 68% des patients sont des stades A, 5% sont des stades B et 27% sont des stades C.

➤ **Expression du CD38**

Les taux d'expression du CD38 sont représentés dans le Tableau XVII.

Tableau XVII : Taux d'expression de la molécule CD38 (Original, 2020)

patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
CD38 (%)	1,6	2,38	38	85	86	79	19	31	41	20	66	8	55	51	0,2	5	97	5	92	0,6	1	2

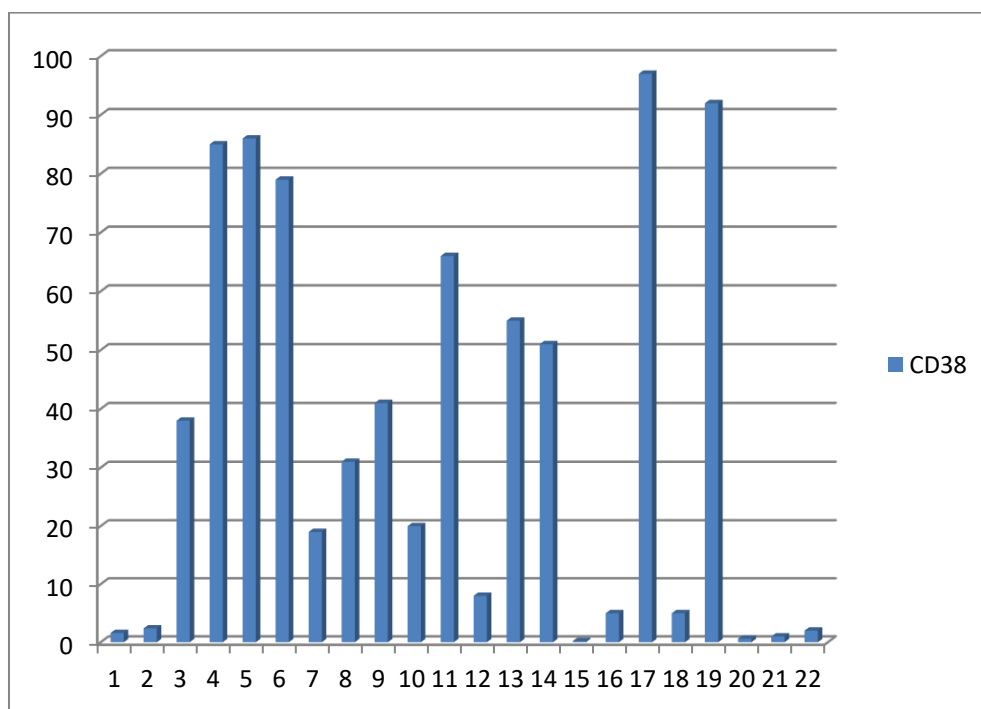


Figure 42 : Représentation graphique des taux d'expression du CD38 (Originale, 2020)

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au marqueur CD38 (**Figure 42, 43, et 44**) :

- ✓ Le pourcentage du CD38 varie de 0,20 à 97 % de la population lymphoïde avec un taux moyen à 35,7% ;
- ✓ Dans notre étude 10 patients avaient un taux de CD38 < 20% soit 45,5% des cas et 12 patients soit 54,5% avaient un taux d'expression du CD38 >20% ;
- ✓ Dans le groupe des patients ayant un CD38 > 20%, 08 patients soit 66,7% avaient un taux d'expression du CD38 >50%.

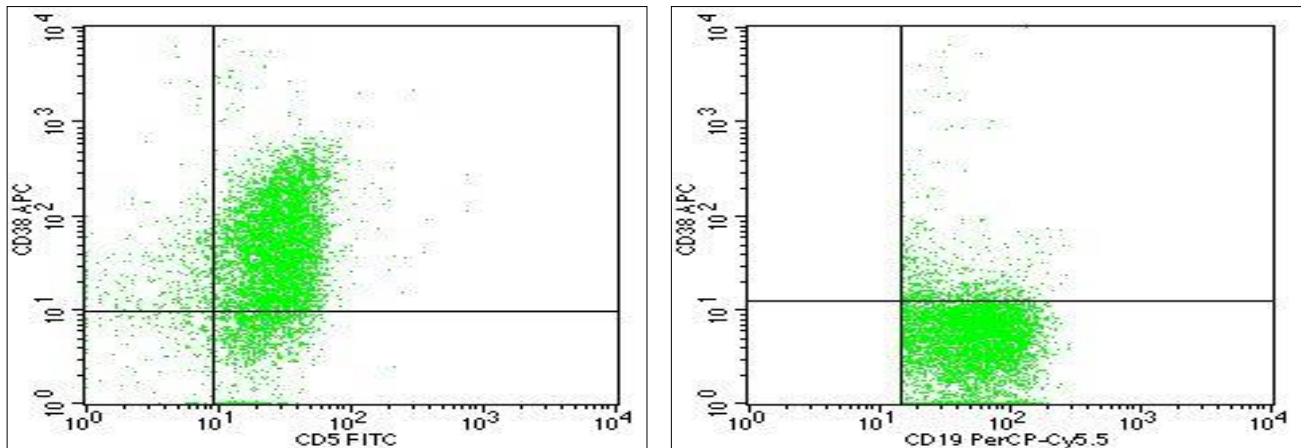


Figure 43: Expression du CD38 (Gauche) et absence d'expression du CD38 (Droite).
Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020)

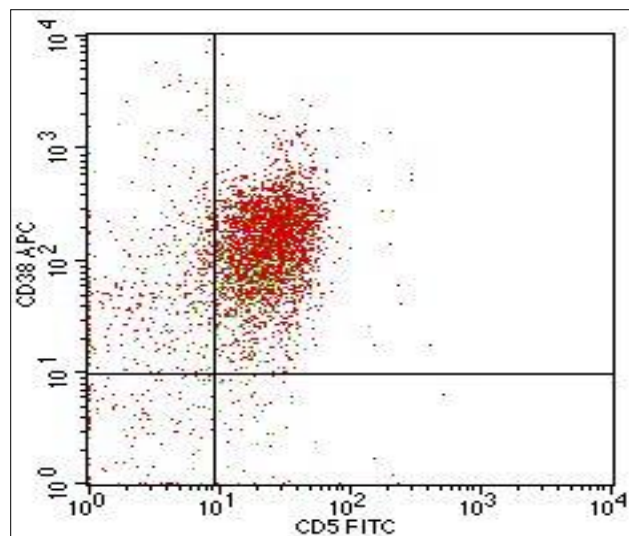


Figure 44: Forte expression du CD38. Laboratoire hématologie CAC Blida (Originale, 2020).

➤ **Analyse du taux d'expression du CD38 par apport au stade de Binet (Tableau XVIII) (Figure 45)**

- **Stade A** : 15 patients : 07 cas soit 58% expriment un taux de CD38 > 20%.
- **Stade B** : 01 patient : il exprime un taux de CD38 > 20%.
- **Stade C** : 06 patients : 04cas soit 66,7% expriment un taux de CD38 > 20%.

- **CD38 > 20% :**
 - **Stade A : 07 cas.**
 - **Stade B ; 01 cas.**
 - **Stade C : 04 cas.**

- **CD38 < 20% :**
 - **Stade A : 08 cas.**
 - **Stade C : 02 cas.**

Tableau XVIII: Taux de CD38 et stade de Binet (Original, 2020)

stade Binet	C	A	A	A	C	A	C	C	A	A	C	A	A	B	A	A	C	A	A	A	A	A
Taux de CD38%	1,6	2,38	38	85	86	79	19	31	41	20	66	8	55	51	0,2	5	97	5	92	0,6	1	2

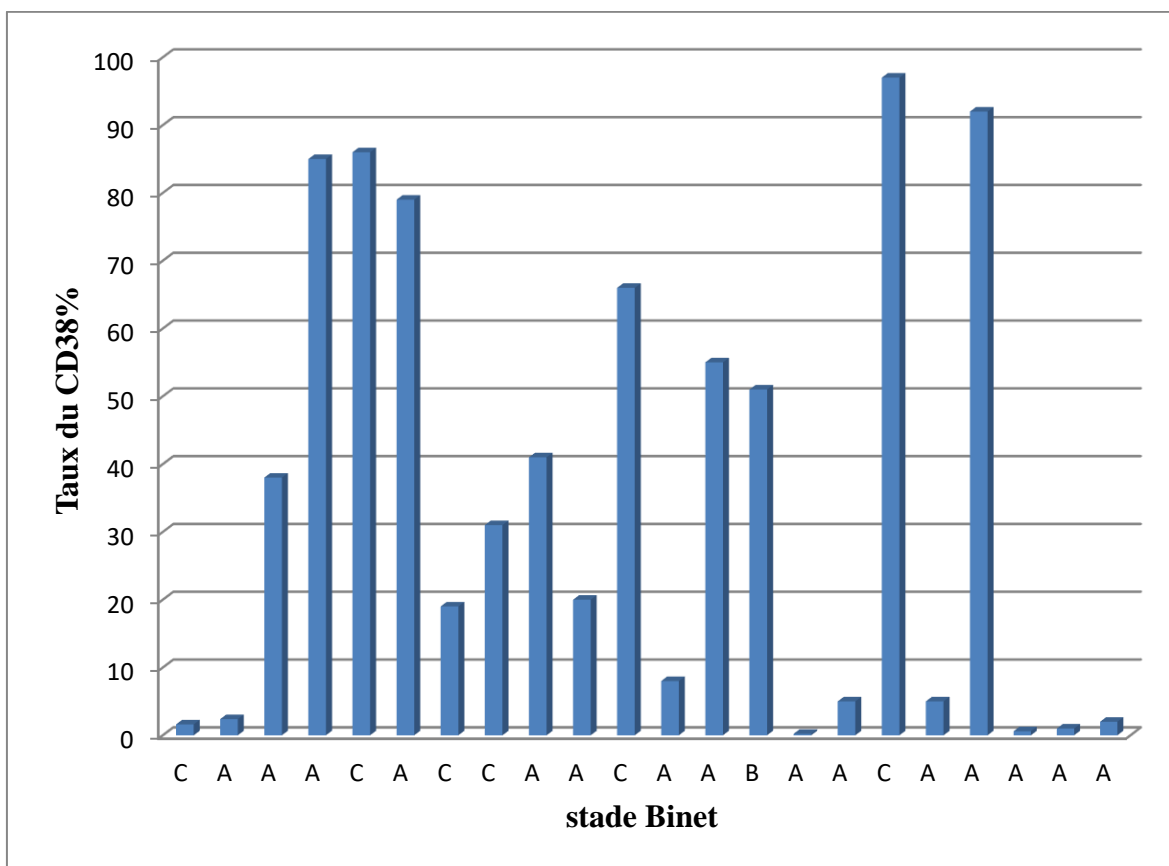


Figure 45: Représentation graphique selon le taux de CD38 et le stade de Binet (Originale, 2020)

CHAPITRE IV

***DISCUSSION
DES
RESULTATS***

IV- Discussion des Résultats

Dans notre étude prospective ayant colligée 22 patients atteints de LLC, nous avons analysé les données relative à cette populations.

L'immunophénotypage par CMF a permis d'établir le pourcentage d'expression et l'intensité des différents marqueurs et de calculer le score de Matutes pour identifier les différents types de SLPC. Sur les 50 cas analysés par cytométrie en flux, nous avons rapporté 22 cas de LLC soit 44% des immunophénotypages pour un syndrome lymphoprolifératifs chronique.

Ces résultats rejoignent les résultats de l'étude d'Oukid de 2015 qui est de 64% sur 464 de cas analysés.

• Sexe

Selon le sexe, il y a une prédominance masculine avec un sex ratio de H/F = 3,4. Ces données convergent avec l'étude de Bouideghaghen et Teghbit, (2018) avec un sex ratio = 1,5, étude de Serrier, 2012 avec un sex ratio de 1,61 et dans l'étude de Sidzanbnoma, (2004) conclue que la leucémie lymphoïde chronique est le cancer le plus fréquent chez les hommes que chez les femmes.

• Age

Selon l'âge moyen des patients affectés par la leucémie lymphoïde chronique est de 70.8 ans avec des âges extrêmes (53 – 86). Dans l'étude de Bouideghaghen et Teghbit, la moyenne d'âge est 70.4 ans pour la population de Béjaia (Bouideghaghen et Teghbit, 2018). De même une étude de Sidzanbnoma, montre que le risque de la maladie touche les personnes qui ont un âge plus de 54 ans (Sidzanbnoma, 2004). Dans l'étude national effectuée par Bekadja en 2012, on note un âge moyen de 64,5 ans et comme celle du CAC Blida de l'Oukid en 2015 qui retrouve 65 ans.

• Hémogramme**➤ Analyse des taux des globules blancs**

Nous avons noté, dans un cas un taux de globules blancs normale à 6800/ μ L et dans 21 cas nous avons constaté une hyper leucocytose avec des 13600– 478 780 /mm³.

Ces résultats sont analogues à ceux de Sidzanbnoma qui a trouvé des taux extrêmes de 27 100 à 390 600 /mm³ de globules blancs (Sidzanbnoma, 2004).

➤ **Analyse des taux des Lymphocytes**

Les données biologiques obtenues montrent qu'une hyperlymphocytose chez les 22 cas, ce qui rejoint la littérature.

Des taux extrêmes de l'hyperlymphocytose est entre 5150– 428000/ mm³, et dans l'étude de Sidzanbnoma montre des taux extrêmes des lymphocytes varié entre 12 910 - 387 000/ mm³ (Sidzanbnoma, 2004).

• **Score de Matutes**

Le tableau suivant compare les données du score de Matutes obtenus dans notre étude et les autres travaux en cas de LLC.

TableauXIX : Comparaison des résultats du score de Matutes

	Notre étude	Oukid et al (2015)	Bouideghaghen et Teghbit (2018)	Guillaume et al (2002)	Troussard et al (2002)
Nombre de cas	22	300	28	79	77
Matutes ≥ 4 (%)	91	90,6	89	91	87
Matutes = 3 (%)	9	9,4	10	8	13

Un taux de 91% des patients avaient un score de Matutes ≥ 4 rejoint les données de la littérature. Il n'y a pas de différence d'expression du score de Matutes dans les répartitions observées avec les 4 études.

• **Analyse des marqueurs du score de Matutes**

Tableau XX : Comparaison d'expression des marqueurs du score de Matutes

Etudes	Notre étude n = 22	Oukid et al (2015) n = 300	Wyrwas et al (2015) n= 45	Saidi et al (2010) n = 183	Bezzar et al (2005) n = 46	Chakou et Amalou (2013) n = 46
CD5+	100%	100%	95%	98.4%	100%	91.3%
CD23+	100%	98.4%	100%	98.9%	100%	93.5%
FMC7-	100%	87%	31%	93.4%	90%	84.8%
CD79b- ou Faible	73%	63%	82%	89.6%	/	82.6%

Le tableau ci-dessus compare la fréquence d'expression des différents marqueurs impliqués dans le score de Matutes utilisés dans le diagnostic de la LLC.

Ce qui concerne les marqueurs CD5, CD23, et CD79b, il existe des variations d’expressions entre les différents travaux qui ne sont pas importantes.

Dans notre cas d’étude on a constaté ce qui suit :

- ✓ Le CD19, CD23 et le CD5 sont exprimés chez les 22 patients (100%) rejoignant l’étude de Bezzari 2005 ;
- ✓ Pour le CD22, il est exprimé chez 54% des cas, par contre, l’étude de Wyrwas en 2015 montre que le marqueur CD22 est exprimé chez 44 patients ;
- ✓ Le FMC7 est non exprimé chez 100% des cas, par contre l’étude de Wyrwas en 2015 montre une expression de ce marqueur chez 69% des cas.

• Monoclonalité

La monoclonalité Lambda est majoritaire chez 10 cas (45,45%), et seulement 6 cas présentes une monoclonalité Kappa (27,27%) avec absence d’expression des chaines légères chez 6 cas (27,27%).

Tableau XXI : Comparaison de la monoclonalité

Etudes	Notre étude n = 22	Oukid et al (2015) n = 287	Chakou et Amalou (2013) n = 46	Bezzari et al (2005) n = 46
Monoclonalité Kappa	27%	54%	77.5%	85%
Monoclonalité Lambda	45%	28%	22.6%	/
Non exprimée	27%	18%		

Et suite à notre étude, il est a noté qu’une prédominance de l’expression de la monoclonalité Lambda, alors que dans les autres études on note qu’une prédominance de la chaine Kappa. Cette différence peut être expliquée par le petit nombre de notre échantillon.

Dans notre cas d’étude, la monoclonalité n’est pas exprimée dans 27% des cas, dans l’étude d’Oukid (2015) l’absence d’expression des chaines légères s’élève à 18%, et dans l’étude de Chakou et Amalou (2013) elle est de 19.57%, les résultats des deux travaux sont semblables à nos résultats.

• Autres marqueurs

Les résultats de notre étude démontrent la répartition du taux d'expression des autres marqueurs comme suit :

- ✓ Le CD20 est exprimé à 95% dans notre étude, rejoignant l'étude de Wyrwas en 2015 où le CD20 est exprimé à 93% et celle de Oukid 2015 à 98% des cas. Dans notre étude, le CD20 est faiblement exprimé dans 91% et fortement exprimé dans 9% par contre dans l'étude d'Oukid 2015, le CD20 est faiblement exprimé chez 69% et dans 31% il est fortement exprimé. Cette différence peut être due à notre effectif réduit ;
- ✓ Le CD43 est exprimé chez 90% des cas, le CD81 chez 68% et le CD25 à 86%. En revanche l'étude de Wyrwas en 2015 retrouve un CD43 exprimé chez 44 patients soit 97%, et CD81 et CD25 sont exprimés chez les 45 patients (100%).

• Stade de binet

Dans notre étude le stade A représente 68%, stade B représente 4% et le stade C représente 27%. Ces résultats étaient comparés à l'étude de Serrier, dont il a constaté que le stade A (347 patients soit 71,7%) est majoritaire, et la proportion de stade B et C sont quasi-identique (67 patients soit 13,8% ; 70 patients soit 14,5%) respectivement (Serrier, 2012).

• Le marqueur CD38

Le CD38 est un facteur pronostique de la LLC dont l'expression permet de prévoir la progression de la maladie, la réponse thérapeutique et la survie selon l'étude de Del poeta et al (2001).

Dans notre étude, ce facteur est exprimé chez 11 patients avec une expression forte chez 5 cas, expression faible chez 6 cas et le pourcentage de ce marqueur varie de 0,20% à 97% de la population lymphoïde rejoignant l'étude de Serrier montre que l'expression de CD38 varie entre 0 et 100% (Serrier, 2012).

Et la fréquence d'expression du CD38 est de 50%, cela rejoint les résultats des études de Oukid (2015) et celle de Taoussi (2012) qui ont respectivement noté les fréquences d'expression de 51% et 50,4% ; ainsi que l'étude d'Ocko Gokaba (2020) : sur 19 patients atteints de LLC montre que le CD38 était exprimé chez 14 patients.

Dans notre étude, Le CD38 est positif dans 66% des stades C de la classification de Binet et positif dans le seul cas de stade B. Dans l'étude d'Oukid (2015) le CD est exprimé dans 52% des cas des stades C vs 46% dans l'étude de Durig (2002).

CONCLUSION

Conclusion :

Nous avons effectué un stage de plus de 02 mois au sein du d'hématologie du CAC de Blida qui nous a permis de déterminer l'importance de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique par l'application du score de Matutes.

Notre émersion au sein du laboratoire, nous a permet en premier lieu d'avoir et d'acquérir un bagage expérimentale toute on manipulant les différents marqueurs pour immunophénotypage par la cytométrie en flux qui est une technique facile a utiliser si on est rigoureux dans la manipulation et surtout on respectant toutes les étapes de la manipulation.

De plus on a acquis un bagage théorique qui nous a permet de mieux connaitre la leucémie lymphoïde chronique à savoir sur la physiopathologie, la présentation clinique et biologique et sur son évolution.

Nous avons analysé 22 cas de LLC avec un âge moyen de 70 ans et une prédominance masculine. Tous les patients présentés une hyper lymphocytose sanguine. L'application du score de Matutes est ≥ 4 chez 91% dés cas. Grâce à l'immunophénotypage par CMF, nous avons pu émettre un diagnostic de certitude d'une LLC chez 44% des cas des SLPC en conversion leucémique. La CMF reste le meilleur moyen de diagnostic des SLPC en conversion leucémique surtout les LLC et la meilleur technique pour préciser le phénotype.

Notre deuxième but était l'analyse de l'expression du marqueur CD38 qui est considéré par plusieurs études comme un facteur de mauvais pronostique. Dans notre travail, 50% des cas exprimé le CD38+.

La LLC reste à ce jour incurable, malgré l'utilisation des différentes chimiothérapies. Nos données démontrent que 50% des patients expriment le CD38, qui est considéré comme un facteur de mauvais pronostic dans la LLC, et que ce marqueur peut être une cible thérapeutique de la maladie dans l'avenir.

Actuellement, la CMF est de plus en plus utilisé par les différents laboratoire soit comme une technique de routine pour le diagnostic des hémopathies, la recherche des facteurs de pronostique ou la recherche de cible thérapeutique et le suivi de la maladie résiduelle soit dans la recherche comme l'analyse du cycle cellulaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Ait Ali H, Taoussi S, Aftisse H, Belhadri F, Harieche FF, Hamladji RM, Kerrar C, Belhani M, Ould Kablia F, Belakehal SE, Ardjoun FZ, Abad MT, Saidane N, Saidi M, Rached B, Grifi F, Mahdad S, Bekadja M.A, Saidi D, Touhami H, Benhalilou M, Berrahma, Sidi Mansour N, Amirouche H, Zouaoui Z, Bouhadda Z, Hamdi S, Khiat R, Mesli N, Mehalhal-Gaid M, Bendjaballah B, Bachiri A. (2014). Approche épidémiologique de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en Algérie. Société Alger. Hématologie Transfus. *Sang*, 9 (8), p 72.
2. Baseggio L, Felman P. (2013). Diagnostic des lymphocytoses hors LLC-typique. *Rev. Francoph. Lab*, 452, p 93-102.
3. Bekadja M, Ait Ali H et collaborateurs (2012, Leucémie Lymphoïde Chronique, Hémophilie, Maladie de Vaquez, IXème congrès national d'hématologie, *SAHTS*) 8, 1-64.
4. Bergereau E, Boucraut P.J, Nataf P.S, Vermersch P.P, Liblau P.R. (2010). Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC : influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative. Thèse de doctorat en immunologie. Université de Toulouse III Paul Sabatier. France. p 246.
5. Bezzari M et al (2005, Hémopathie lymphoïde chronique B, diagnostic cytologique et immunophénotypage sanguin. Laboratoire Casa Blanca Maroc).
6. Bidet A, Guérin E, Lippert E, Marit G, Milpied N, Pralora V. (2011). Glossaire d'hématologie. L'URF médicale de l'université de bordeaux. France. 2. p 27.
7. Blanc P. (2015). Expression et fonction du récepteur antigénique B membranaire sur les plasmocytes médullaires producteurs d'IgM 210. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université de Claude Bernard-Lyon 1. France. p 210.
8. Boissard F. (2015a). Etude de l'impact des « nurse-like » cells sur la survie des patients et la résistance aux traitements dans la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Toulouse III Paul Sabatier. France. p 166.
9. Boissard F. (2015b). Bases moléculaires de l'interaction entre cellules B de leucémie lymphoïde chronique et nurse like cells: nouveaux rationnels pour de nouveaux traitements dans la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Toulouse III Paul Sabatier. France. p 261.
10. Boonstra J.G , van Lom K , Langerak A.W , Graveland W.J , Valk P.J.M , Gratama J.W . (2006). CD38 as a Prognostic Factor in B Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia (B-CLL): Comparison of Three Approaches to Analyze Its Expression. *Wiley Interisci*, p136-141. URL: <https://doi.org/DOI: 10.1002/cyto.b.20106>

11. Bouideghaghen S, Teghbit L. (2018). Aspect épidémiologique des Leucémies Lymphoïdes Chroniques à Béjaïa. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de Abd Errahmane Mira. Algérie. p 88.
12. Brochet X. (2008). Conception et integration d'un systeme d'information dedie a l'analyse et a la gestion des sequences rearrangees des recepteurs d'antigenes au sein d'imgt® : Application a la leucemie lymphoïde chronique. Thèse de Doctorat en Bioinformatique. Université de Montpellier 1. France. p 228.
13. Caillat-Zucman S., Thibault G., Vivier É. (2018). Les lymphocytes NK (Natural Killer). *Elsevier Masson SAS*. p 6.
14. Caron Servan, Hémar. (2012). Recommandations pour le diagnostic et l'interprétation d'une hyperlymphocytose sanguine. *Laboratoire CERBA*, 3, p 36.
15. Chakou M, et Amalou M (2013), Apport de l'immunophénotypage par cymomètre en flux dans le diagnostic et le pronostic de la Leucémie Lymphoïde Chronique de type B, thèse en vue de l'obtention du diplôme de master, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene USTHB) 36, 16-31.
16. Cramer P, Hallek M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know?. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, p 38-47.
17. Czura A.W, Czura C.J. (2006). CD38 and CD157: Biological Observations to Clinical Therapeutic Targets. *researchgate*, 12 (11-12), p 3 0 9-3 1 1. <https://doi.org/DOI: 10.2119/2007-00006.Czura> · Source: PubMed.
18. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhrensen U, Malavasi F. (2003). CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 102, p 2146-2155.
19. Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, Bergui L, Omede P, Genazzani A.A, Malavasi F. (2007). CD38/CD19: A lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*, 109, p 5390-5398.
20. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al (2001, Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*) 98, 2633-3639.
21. Duffaut C. (2009). Les lymphocytes du tissu adipeux humain: caractérisation et rôles. thèse de doctorat en Innovation Pharmacologique. Université Paul Sabatier Toulouse III. France. p 144.
22. Dupperay Ch. (2011). La cytométrie en flux. https://nanopdf.com/download/cyto_pdf

23. Durig J 1 et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic Leukaemia. *Leukemia* (2002) 16, 30–35. 2002 Nature.
24. François M. (2004). Hypertrophie amygdalienne bilatérale et amygdalectomie chez l'enfant - Bilateral tonsil enlargement and tonsillectomy in children. *Lett. D'Oto-Rhino-Laryngol. Chir. Cervico-Faciale*. 295, p2.
25. Gauthier M. (2017). Suivi de la reconstitution immunitaire après immunochimiothérapie par rituximab, fludarabine et cyclophosphamide en première ligne de leucémie lymphoïde chronique : Implications pour la prise en charge thérapeutique. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de Toulouse III Paul Sabatier. France. p 87.
26. Guillaume N. Pertinence des analyses cytologiques et immunophénotypiques dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique B Volume 60, numéro 6, Novembre - Décembre 2002.
27. He C , Liu Z , Ji J , Zhu H . (2017). Prognostic significance of CD38 for chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 10, p 4305-4312.
28. Howard M, Grimaldi J.C, Bazan J.F, Lund F.E, Santos-Argumedo L, Parkhouse R.M, Walseth T.F, Lee H.C. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, 262, p 1056-1059.
29. Ibba O. (2012). Applications de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V de Rabat. Maroc. p 190.
30. Jacque N, Leblond V. (2019). La leucémie lymphoïde chronique : mise au point. *Presse Médicale*, 48, p 807–815.
31. Kitanaka A, Suzuki T, Ito C, Nishigaki H, Coustan-Smith E, Tanaka T, Kubota Y, Campana D (1999). CD38-mediated signaling events in murine pro-B cells expressing human CD38 with or without its cytoplasmic domain. *J Immunol*, 162, p 1952-1958.
32. Lamrabet S. (2019). Interprétation des résultats de la numération formule sanguine obtenu par le Sysmex XT-4000i. université sidi mohamed ben abdellah faculté des sciences et techniques département de biologie, p26.
33. Le Bouar M. (2017). Intérêt du dosage des chaînes légères libres sériques dans la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Toulouse III Paul Sabatier. France. p 96.
34. Ledoux D. (2012). Rôle du micro-environnement lymphoïde dans la LLC. *Horiz. Hémato*, 02 (01), p3.

35. Lefranc M. P, Giudicelli V, Ginestoux C , Jabado-Michaloud J , Folch G , Bellahcene F , Wu Y, Gemrot E , Brochet X , Lane J, Regnier L , Ehrenmann F, Lefranc G , Duroux P. (2009) . IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system (R). *Nucleic Acids Research*, 37, D1006-D1012.
36. Louis J. (2017). Le guide de la leucémie lymphoïde chronique. *La Société de leucémie et lymphome*. p 48.
37. Lt O.G., Tn D. (2020). Aspects Cytologiques et Immunophénotypiques des Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques B à Petites Cellules à Dakar (Sénégal) 21, p 5.
38. Malavasi F. (2011). CD38 and retinoids: A step toward a cure. *J Leukoc Biol*, 90, p 217-219.
39. Merle-Béral H. (2012). Diagnostic cytologique, histologique, phénotypique de la LLC. *Horizons Hémato*, 02, p3.
40. Min C. (2013). Effets de la stimulation des cellules de leucémie lymphoïde chronique via TLR-7 et TLR-9. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lorraine. France. p 198.
41. Mokrane A. (2018). The CD38 molecule. CD38 expression in hematopoietic and non-hematopoietic lineage. Lambert. Germany. p 10-11.
42. Moueden M.A. (2018). Stratégie diagnostique de la mutation P53 dans les leucémies aiguës et chroniques lymphoïde : du phénotype cytologique et immuno-détection indirecte au génotype moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Médicales. Université d'Oran Ahmed Ben Bala. Algérie. p 219.
43. Nudel M. (2018). Description d'une nouvelle entité de la leucémie lymphoïde chronique : l'atteinte bronchique symptomatique. Thèse de Doctorat en Médecine. Université du droit et de la santé - Lille 2. France. p 62
44. Orabona M. (2011). Intérêts diagnostique et pronostique d'un immunophénotypage leucocytaire étendu par cytométrie en flux à la phase aiguë du sepsis : étude septiflux .Thèse de doctorat en Médecine. Université de Limoges. France. p127.
45. Oukid S, Taoussi S, Brahim H, Lamraoui F, Bouchakor Y, Moussa, Rekab N, Benlabiod KM, Boucherit C, Guezlane C, Abad MT. Profil phénotypique des Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC) par cytométrie en flux. Service Hématologie, EHS ELCC Blida. Faculté de médecine, Université de Blida I, Algérie. 12ème Congrès Maghrébin d'Hématologie. 29 au 30 Mai 2015 à l'hôtel Le Royale Hammamet, Tunis.

46. Pittner B.T , Shanafelt T.D , Kay N.E , Jelinek D.F. (2005). CD38 expression levels in chronic lymphocytic leukemia B cells are associated with activation marker expression and differential responses to interferon stimulation. *Leukemia*, 19, p 2264-2272.
47. Poleszczuk L. (2015). Apport de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la classification morphologique des leucémies aiguës myéloïdes. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Toulouse III- Paul Sabatier. France. p141.
48. Puiggros A , Blanco G , Espinet B . (2014). Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *BioMed Res. Int*, p 1–13. URL: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/435983/>
49. Rizzo R, Audrito V, Vacca P, Rossi D, Brusa D, Stignani M, Bortolotti D, D'Arena G, Coscia M, Laurenti L, Forconi F, Gaidano G, Mingari MC, Moretta L, Malavasi F, Deaglio S. (2014). HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism. *Haematologica*, 99 (5): 888–896.
50. Saidi D, Touhami H; Kehal S, Brahimi M, Bekadja M (2010, service d'hématologie CHU et EHU d'oran, communication 2eme journées scientifiques de Blida).
51. Serrier C. (2012). Expression de la molécule CD5 dans une série de patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique . Thèse d'université de Lorraine.p173.
52. Sidzanboma I. N. (2004). les leucémies lymphoïdes chroniques au centre hospitalier universitaire yalgado ouedraogo d'Ouagadougou. Thèse de Doctorat en Médecine. Université d'Ouagadougou. Burkina Faso. p 114.
53. Slaughter N. (2003).The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin. Immunol*, 108, p 138-140.
54. Taoussi S (2012), Évaluation des examens immunocytologiques et cytogénétiques à visée diagnostique et pronostique dans la leucémie lymphoïde chronique. Thèse pour le diplôme de docteur en sciences médicales; faculté de médecine, université Saad Dahleb Blida) ,172 : 03- 53.
55. Terra R. (2012). La cytométrie de flux : un rôle majeur dans le diagnostic des néoplasies hématologique. *L'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec*, 2, p36.
56. Trinchieri G. (1989). Biology of natural killer cells. *J. Immunol*, 47, p 187.
57. Troussard X. (2012). épidémiologie de la LLC. *Horiz. Héματο*, 02 (01),p 4

58. Troussard X. (2013). Nouveautés sur les hémopathies lymphoïdes chroniques B matures. *Immuno-Anal. Biol. Spéc*, 28, p 174-182.
59. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, Cottino F, Bergui L, D’Arena G, Bonello L, Horenstein A.L, Brennan P, Pepper C, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. (2010). CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 24, p 958-969.
60. Van de Donk N.W.C.J, Janmaat M.L , Mutis T , Lammerts van Bueren J.J , Ahmadi T , Sasser A.K , Lokhorst H.M , Parren P.W.H.I. (2016). Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol. Rev.* 270, p 95-112.
61. Wongvaranon P, Pongrakhananon V, Chanvorachote P. (2014). Molecular mechanisms of chemotherapeutic resistance in lung cancer. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, p5.
62. Wyrwas M. (2015). Evaluation du panel d’exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B matures. Une cohorte de patients du CHU de Nancy 144.
63. Zandecki P.M. (2006). Leucémie lymphoïde chronique (LLC). *Document: Hématologie biologique, Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers*. France. p11.
64. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi F.M, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del Poeta G, Deaglio S, Gaidano G, Tedesco F, Malavasi F, Gattei V. (2009). CD38/ CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*, 69, p 4001-4009.
65. Zucchetto A, Vaisitti T, Benedetti D, Tissino E, Bertagnolo V, Rossi D, Bomben R, Dal Bo M, Del Principe M.I, Gorgone A, Pozzato G, Gaidano G, Del Poeta G, Malavasi F, Deaglio S, Gattei V. (2012). The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 26, p 1301-1312.

ANNEXES

Annexe 01 : Fiche technique requise pour chaque patient

Service Hématologie, EHS ELCC Blida

Fiche technique pour Immunophénotypage des Hémopathies Malignes

N° FC :

N° DH :

Nom :

Prénom :

Age :

Origine :

Date du diagnostic :

Antécédents:

Date de début :

1^{er} signe clinique :

Tableau clinique :

Hémogramme : GB :

PN :

Lym :

Blaste :

HB :

VGM :

Retic :

Plaq :

FS : GR :

GB : (, , , ,) Myélemie :

Blastes : % . Type :

MO : Cellularité : , Méga :

Gr : % Eb : % Lym : % Plasmocyte : %

Blastes : % .

GP :

Anapath :

Diagnostic suspecté :

Accord du Laboratoire

Le :

DR :

Annexe 02: Procédures d'allumage, d'arrêt et de maintenance du cytomètre en flux

➤ **Méthode d'allumage du cytomètre en flux selon le la manuelle de la machine**

- Mettre le FACS Calibur sous tension ;
- Mettre le système informatique FAC Station sous tension ;
- Remplir le réservoir de liquide de gaine aux $\frac{3}{4}$ avec du FACS-Flow bien fermer le bouchon, tuyaux orienté vers la droite ;
- Vider le réservoir à déchets. Ajouter 200 ml de l'eau de javel à 12° dans le fond du réservoir ;
- Fermer le bouchon ;
- Commuter la valve de mise sous pression du réservoir de FACS-Flow sur position ON ;
- Vérifier que le réservoir contenant le FACS-Flow se gonfle ;
- Retirer le tube d'eau distillée (mise en place la veille lors de la procédure d'arrêt) ;
- Vérifier si des bulles d'air sont présentes dans le filtre salin actionner le système de purge ;
- Appuyer sur le bouton PRIME pour éliminer les bulles dans la chambre d'analyse (Sans tube installé), renouveler cette étape 2 fois ;
- Pipeter 3 ml d'eau distillée dans un tube Falcon installer le tube et le laisser 10 min en position RUN et en vitesse HIGH ;
- Retirer ce tube.

➤ **Procédure d'arrêt du cytomètre**

Elle est basée sur :

- Préparer 2 tubes Falcon «A» et «B» ;
- Pipeter 3 ml de solution FACS Clean dans le tube «A» et 3 ml de solution FACS Rinse dans le tube «B» ;
- Mettre en place le tube «A». Rabattre le support de tube et le laisser 10 min en position RUN et en vitesse HIGH ;
- Dégager le support de tube et attendre la vidange complète du tube «A» pour le retirer ;
- Retirer le tube «A» mettre en place le tube « B » et laisser le support de tube dégagé. Après aspiration de 2 ml, rabattre le support de tube et laisser en position RUN pendant 10 min ;
- Retirer le tube « B », mettre en place un tube d'eau distillée et laisser en RUN pendant 10 min ;

- Appuyer sur le bouton STANDBY, laisser en place le tube d'eau et dépressuriser le réservoir de FACS Flow en commutant la valve de mise sous pression sur sa position OFF ;
- Couper l'alimentation du FACS Calibur et du système informatique FAC Station par la fonction Shutdown.

➤ **Procédure de maintenance du cytomètre**

La maintenance débutera par la préparation de 2 tubes Falcon 12 x 75 mm remplis par :

- **Tube A** : 3 ml de FACS Clean.
 - **Tube B** : 3 ml de FACS Rinse.
- La valve de mise sous pression doit être sur la position « OFF », pour vider le réservoir de déchets et changer le réservoir FACS Flow par un autre réservoir de FACS Clean ;
 - Déconnecter le filtre salin, et à sa place on connecte celui du réservoir le liquide de gaine ;
 - (Ceci a pour but de court-circuiter le filtre salin).
 - Mettre la valve de mise sous pression sur position « ON » et on effectue un PRIME de l'instrument 5 fois ;
 - On met le tube A sur le SIT pendant 30 minutes et le CMF sur la position RUN et sur la vitesse High ;
 - A la fin du temps, on retire le tube, en laissant le support du tube dégagé et le commutateur des fluides sur la position RUN ;
 - On remet la valve de mise sous pression sur position « OFF » pour vider le réservoir à déchets et changer le réservoir de FACS Clean par un réservoir FACS Rinse ;
 - On rince les détecteurs de niveau avec de l'eau distillée.
 - On remet la valve de mise sous pression sur la position « ON » et on effectue un PRIME de l'instrument 5 fois ;
 - On place le tube B, et on met sur la position RUN et la vitesse High, en le laissant en place pendant 30 min ;
 - A la fin du temps, on retire le tube, en laissant le support de tube dégagé et le commutateur des fluides sur la position RUN ;
 - On remet la valve de mise sous pression sur position « OFF » pour vider le réservoir à déchets et changer le réservoir de FACS Clean par un réservoir FACS Flow ;

- On rince les détecteurs de niveau avec de l'eau distillée ;
- On remet la valve de mise sous pression sur la position « ON » et on effectue un PRIME de l'instrument 5 fois ;
- A cette étape on reconnecte le filtre salin et on effectue un deuxième PRIME à 5 reprises ;
- On place un tube d'eau distillée et on le laisse pendant 10 minutes ;
- A la fin, pour éteindre le cytomètre, on laisse le tube d'eau distillée en place et on remet la valve de mise sous pression sur la position « OFF », puis on coupe l'alimentation du système informatique par l'activation de la fonction Shutdown. Ce tube est laissé en place pour éviter la cristallisation des liquides sur l'aiguille (SIT).

Annexe 03: Compte rendu FACS Comp Report (Pass)

4-Color Lyse/Wash FACSComp Report

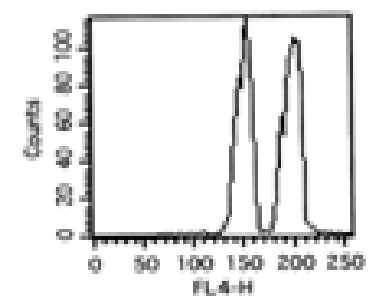
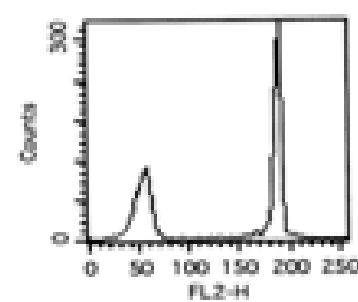
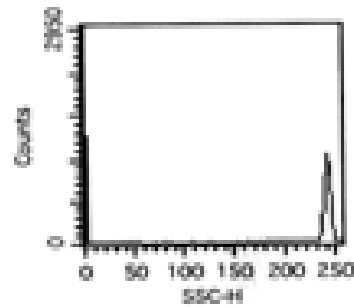
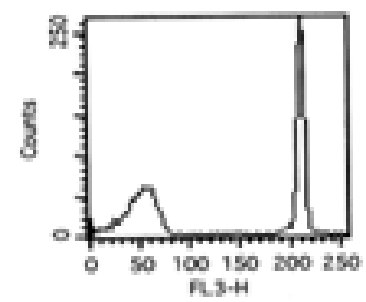
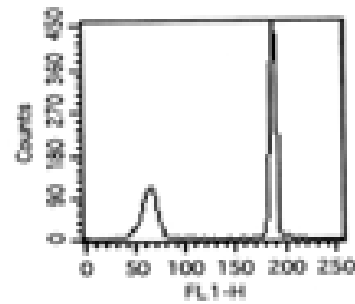
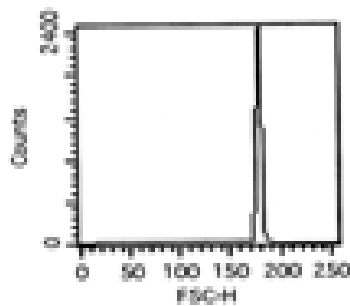
Institution: CAC
 Director: Hematologie
 Operator: Facs

Date: 1
 Software: FACSComp 5.2
 Cytometer: FACSCalibur 0123456789

Parameter	High	Low	Separation	Minimum	Result	Lot ID
FSC	175	16	159	100	Pass	25902I
SSC	207	0	207	210	Pass	25902I
FL1	183	62	121	93	Pass	24136Q
FL2	183	52	131	128	Pass	24137I
FL3	205	48	157	143	Pass	23752K
FL4	194	147	47	44	Pass	13865Q

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold	Blue Laser Current	5.26 Amps
FSC	800	2.00	52	Blue Laser Power	16.00 mWatts
SSC	362	1.00			
FL1	692	Log			
FL2	610	Log			
FL3	717	Log			
FL4	645	Log			

Compensation	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	FL3-%FL4	FL4-%FL3
	1.6	16.1	0.0	18.4	1.1	11.4



Comments:

Time Delay Calibration Passed.

Annexe 04 : Etude statistique

	Variance	Ecart type
Le sexe	72	8,48528137
Globules Blancs	21,6666667	4,65474668
Lymphocytes	21,6666667	4,65474668
Cytologie	18	4,24264069
Score Matutes	21,3333333	4,61880215
marqueurs du score de Matutes	66,9821429	8,1842619
monoclonalité	5,33333333	2,30940108
autres marqueurs	54,4761905	7,38079877
Stade de Binet	50,3333333	7,09459888

La variance :

$$Var(x) = \sigma_{ech}^2 = \left(\frac{\sum n_i x_i^2}{N} \right) - (\bar{X})^2$$

L'écart type :

Écart type= c'est la racine carrée de la variance.

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$$