



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 Moléculaire et Cellulaire

Thème

**Expression du marqueur CD20 dans la leucémie lymphoblastique
aigue par immunophénotypage par cytométrie en flux**

Présenté par : ZITOUNI TERKI Baya

OULD AISSA Fatma Zohra

Devant le Jury :

<i>Mme RAHIM I</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Président (e)</i>
<i>Mme AISSANI R</i>	<i>MCB</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, Blida</i>	<i>Co-Promoteur (ice)</i>

Session 2019 / 2020

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu de nous avoir donné la santé et la volonté pour terminer ce travail.

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrant Dr Mokrane A, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon terme.

Nos remerciements s'étendent également au Pr Oukid S pour nous avoir accueillis dans le service d'Hématologie au niveau du CAC de Blida, ça a été un honneur pour nous de bénéficier de notre encadrement.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements aux membres du jury : Dr AISSANI et Dr Rahim, d'avoir examiné et juger notre travail, et de nous avoir accordé de leurs précieux temps.

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements au Dr SAADI L et à tous les enseignant(e)s qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin dans l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie notre travail a chaque membre de ma famille, mes parents, ma grand-mère, mon frère, mes oncles, mes cousin et cousine, mais plus particulièrement pour mon très cher grand-père paix a son âme qui nous a quittés après c'être longuement battu contre le SARS-CoV-2 (COVID19).

Lui qui a toujours était un exemple pour ces enfants et ces petit enfants, lui qui nous a appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler, avril dernier c'est son âme qui nous a était voler, Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer toute la gratitude, l'amour et le respect que j'avais pour lui.

Certains veulent réussir, d'autre aimerais réussir, et les autres font leurs réussite, tu as fait partis des autres et j'espère en faire partie un jour moi aussi.

ZITOUNI TERKI Baya

Dédicace

A MES CHERS PARENTS

Je n'aurais jamais pu réussir mes études sans eux je leurs remercie pour leur appui, leur encouragement et leur soutien.

A MON MARI

Qui a toujours été là pour moi et qui m'a beaucoup aider tout au long de mon parcours universitaire et qui a eu la patience de me supporter durant le mémoire

A MA BELLE FAMILLE

Qui m'a apportée son soutien inconditionnel et son grand amour

A MA BELLE SŒUR ET MON FRÈRE

Qui m'ont soutenu de loin pendant les moments difficiles vécus, je vous aime

A MON ONCLE ET SA FEMME

Qui ont toujours étaient là pour moi et m'aider à franchir les obstacles et les barrières

A MA TANTE Q 'ALLAH L'ACCUEIL DANS SON VASTE PARADIS

Qui m'a donnée tant d'amour et de tendresse et qui ma toujours poussée dans mes intérêts.

A MON CHER BINÔME BAYA

Qui ma toujours soutenue et ma encourager et aider durant mon cursus universitaire, que dieu nous garde l'une pour l'autre inchallah.

A tous mes amis qui m'ont encouragé de près ou de loin

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi

OULD AISSA Fatma Zohra

Résumé

La leucémie aigue lymphoblastique (LAL) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération de cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse, elle implique la production excessive des lymphoblastes, cellules immatures qui détruisent les cellules sanguines normales, les empêchant ainsi d'accomplir leurs tâches. Les données cliniques, l'hémogramme, l'analyse du frottis sanguin peuvent orienter vers une leucémie aigue lymphoblastique mais l'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) confirme le diagnostic et précise le phénotype.

Notre étude porte sur l'immunophénotypage par CMF dans le cadre du diagnostic des LAL et de précision des sous-groupes de cette maladie. Nous avons également pour objectifs : d'établir une association entre l'analyse cytologique reçus et les résultats obtenus par immunophénotypage, évaluer le pourcentage des LAL B et des LAL T et enfin estimé le taux d'expression du CD20 dans les LAL B.

Il s'agit d'une étude prospective qui a été réalisée au niveau du laboratoire du CAC Frantz Fanon de Blida. 15 échantillons prélevés des patients atteints de LAL ont été analysés. Ces patients présentaient un tableau clinique évocateur d'une leucémie aigüe et ont bénéficié d'une analyse immunophénotypique par cytométrie en flux afin de confirmer le diagnostic d'une leucémie aigue lymphoblastique. L'immunophénotypage par CMF consiste à marquer les cellules leucémiques par des anticorps monoclonaux en suivant un panel adapté à notre recherche et en respectant les étapes de la manipulation.

Les résultats de la CMF ont révélé qu'il y a trois types de LAL dont 8 cas sont des LAL B soit (53%), 2 cas LAL T soit (13%) et 5 cas LAL bi phénotypique soit (33%). Nous avons remarqué aussi qu'il y a une légère prédominance masculine avec un sex ratio de 1.14 et une moyenne d'âge de 32 ans. Après avoir posé le diagnostic de la LAL, nous avons analysé le marqueur CD20 qui est une cible thérapeutique dans les LAL B et nous avons une expression de ce marqueur chez 5 patients soit un taux de 62 ,5%, par contre il n'est pas exprimé dans les LAL bi phénotypique.

Mots clés : CD20, leucémie aigue lymphoblastique, cytométrie en flux, lymphoblastes, immunophénotypage.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant hemopathy characterized by the proliferation of hematopoietic stem cells in the bone marrow; it involves the excessive production of lymphoblasts, immature cells that destroy normal blood cells, thus preventing them from performing their tasks. Clinical data, complete blood count, analysis of the blood smear may point to acute lymphoblastic leukemia, but flow cytometric immunophenotyping (CMF) confirms the diagnosis and specifies the phenotype.

Our study focuses on CMF immunophenotyping for the diagnosis of ALL and the precision of subgroups of this disease. We also had the following objectives: to establish an association between the cytological analysis received and the results obtained by immunophenotyping, to establish the percentage of ALL B and ALL T and finally to establish the level of CD20 expression in ALL B.

This prospective study was carried out at the laboratory of CAC Frantz Fanon of Blida. 15 samples taken from patients with ALL were analyzed. These patients presented with a clinical picture suggestive of acute leukemia and underwent immunophenotypic analysis by flow cytometry to confirm the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. Immunophenotyping by CMF consists of labeling leukemia cells with monoclonal antibodies by following a panel adapted to our research and respecting the steps of the manipulation.

The results of the CMF revealed that there are three types of ALL of which 8 cases are ALL B or (53%), 2 cases ALL T or (13%) and 5 cases biphenotypic ALL (33%). We also noticed that there is a slight male predominance with a sex ratio of 1.14 and an average age of 32 years. After having made the diagnosis of ALL, we analyzed the CD20 marker which is a therapeutic target in ALL B and we have an expression of this marker in 5 patients, i.e. a rate of 62.5%, on the other hand it is not expressed in bi-phenotypic ALL.

Keywords: CD20, acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry, lymphoblasts, immunophenotyping.

ملخص:

ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد هو اعتلال دم خبيث يتميز بتكاثر الخلايا الجذعية المكونة للدم في نخاع العظام ، وينطوي على الإنتاج المفرط للأرومات اللمفاوية ، وهي خلايا غير ناضجة تدمر خلايا الدم الطبيعية ، وبالتالي تمنعها من أداء مهامها. قد تشير البيانات السريرية ، تعداد الدم الكامل ، تحليل مسحة الدم إلى ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد ، لكن النمط الظاهري المناعي المتدفق الخلوي يؤكد التشخيص ويحدد النمط الظاهري.

تركز دراستنا على التمييز الخلوي المناعي للتدفق من أجل تشخيص ALL ودقة المجموعات الفرعية لهذا المرض. كان لدينا أيضاً الأهداف التالية: إنشاء ارتباط بين التحليل الخلوي الذي تم الحصول عليه والنتائج التي تم الحصول عليها عن طريق التمييز المناعي ، لتحديد النسبة المئوية لابييضاض الدم الليمفاوي B الحاد وسرطان الدم الليمفاوي التائي الحاد وأخيراً تحديد مستوى التعبير عن CD20 في ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد ب.

هذه دراسة استطلاعية تم إجراؤها في مختبر فرانس فانون CAC البلدية، تم تحليل 15 عينة مأخوذة من مرضى سرطان الدم الليمفاوي الحاد. قدم هؤلاء المرضى مع صورة سريرية توحى بسرطان الدم الحاد وخضعوا لتحليل النمط المناعي عن طريق قياس التدفق لتأكيد تشخيص سرطان الدم الليمفاوي الحاد. يتكون التمييز المناعي عن طريق قياس التدفق الخلوي في تمييز خلايا سرطان الدم بأجسام مضادة وحيدة النسيلة من خلال اتباع لوحة تتكيف مع أبحاثنا واحترام خطوات المعالجة. أظهرت نتائج قياس التدفق الخلوي وجود ثلاثة أنواع من ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد منها 8 حالات ابيضاض الدم الليمفاوي B الحاد (53%) ، حالتان من سرطان الدم الليمفاوي الحاد T أو (13%) و 5 حالات ابيضاض الدم. ورم ليمفاوي حاد ثنائي النمط (33%). كما لاحظنا أن هناك غلبة طفيفة للذكور بنسبة جنس 1.14 ومتوسط عمر 32 سنة. بعد إجراء تشخيص سرطان الدم الليمفاوي الحاد ، قمنا بتحليل علامة CD20 وهي هدف علاجي في سرطان الدم الليمفاوي B الحاد ولدينا تعبير عن هذه العلامة في 5 مرضى ، أي بمعدل 62.5% ، من ناحية أخرى. لا يتم التعبير عنه في ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد ثنائي النمط.

الكلمات المفتاحية: CD20 ، ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد ، قياس التدفق الخلوي ، الأرومات اللمفاوية ، التمييز المناعي.

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans le maintien des CSH.....	9
Figure 2 : Composition d'un cytomètre de flux.....	11
Figure 3 : Principe de la focalisation hydrodynamique.....	12
Figure 4 : Un système complexe de filtres et de détecteurs permet de faire plusieurs mesures simultanées.....	14
Figure 5 : Lymphoblastes médullaires. Images en microscopie optique objectif x100 après coloration May Grünwald Giemsa, issues des prélèvements de trois patients différents.....	18
Figure 6 : Coloration cytochimique, d'après Benzineb.....	19
Figure 7 : Le chromosome de Philadelphie avant et après la translocation.....	23
Figure 8 : Cytomètre en flux FACS Calibur BD.....	29
Figure 9 : Sysmex (Laboratoire d'hématologie CAC Blida).....	30
Figure 10 : Centrifugeuse réfrigérée.....	30
Figure 11 : CaliBRITE.....	32
Figure 12 : Les anticorps monoclonaux (04 couleurs).....	33
Figure 13 : Le panel et le consommable de la CMF.....	34
Figure 14 : Hemogramme (Laboratoire d'hématologie CAC Blida).....	35
Figure 15 : Image de compensation	40
Figure 16 : Masque d'acquisition.....	40
Figure 17 :Dot plot présentant les différentes populations du sang.....	41
Figure 18 : Ajustement de la zone négative.....	41
Figure 19 : Dot plot bi-paramétrique.....	42
Figure 20 : Représentation graphique des patients selon leur sexe.....	44
Figure 21 : représentation graphique des patients selon leurs âges.....	45
Figure 22 :Type de prélèvement pour la CMF.....	46
Figure 23 :Gating sur des blastes CD19++ et CD3-.....	49
Figure 24 : Blastes Lymphoïdes B CD19+, CD34+, CD20+ et CD22.....	49
Figure 25 : Blastes lymphoïdes B CD19+, CD10+ et HLADr+.....	49
Figure 26 : Blastes Lymphoïdes T CD3+, CD34+ et CD5+.....	50
Figure 27 : Blastes Lymphoïdes T CD5+, CD2+, CD7+et TCR-.....	51

Figure 28 : Blastés Lymphoïdes T CD3 cy+, TdT+, CD2-	51
Figure 29: Taux d'expression du marqueur CD20 dans les LAL B.....	53
Figure 30: Absence d'expression du CD20 à gauche et CD20++ à droite.....	53

Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux lasers utilisés en cytométrie de flux.....	13
Tableau II : Classification morphologique des LAL : FAB.....	19
Tableau III : Classification EGIL des LAL.....	21
Tableau IV : Classification des LAL B selon l'EGIL.....	21
Tableau V : Score d'EGIL	22
Tableau VI : Les différentes solutions utilisées par le cytomètre en flux.....	31
Tableau VII : Récapitulatif des billes de calibration couplées à des fluorochromes	31
Tableau VIII : Les marqueurs utilisés pour les différentes lignées.....	33
Tableau IX : Panel des LA.....	34
Tableau X : principe de la compensation d'un cytomètre à 04 couleurs.....	40
Tableau XI : Résultat de la cytologie.....	45
Tableau XII : Richesse des GB dans la MO.....	46
Tableau XIII : Résultats de la CMF.....	47
Tableau XIV : Le sous types de LAL B	47
Tableau XV : Taux d'expression des marqueurs dans les LAL B.....	48
Tableau XVI : taux d'expression du CD20 dans les LAL B.....	52

Liste des abréviations

A

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide Ribo-Nucléique

AG : AntiGène

APC : Allo-Phyco-Cyanine

AC : AntiCorps

B

BCR : B Cell Receptor

C

CMF : Cytométrie en Flux

CSH : Cellule souche Hématopoïétique

CD : Cluster de Différenciation

CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

D

DLL-4 : Ligand Notch Delta-Like 4

E

EGIL : European Group for the Immunological characterization of Leukemias

EDTA : EthylèneDiamineTétraAcétique

F

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FAB : Franco-Américano-Britannique

FSC : Forward Scatter Channel

H

HGF : Hepatocyte Growth Factor

I

ITK : Inhibiteurs de la tyrosine kinase

L

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique

LLC : Leucémie Lymphoblastique Chronique

LT : Lymphocyte T

LB : Lymphocyte B

LIC : Cellule Initiatrice Leucémique

LIF : Facteur Inhibiteur de la Leucémie

M

MSCs : Mesenchymal Stromal Cells

N

NLCs : Nurse Like Cells

NFS : Numération de Formule Sanguine

NK : Natural Killer

O

OMS: Organisation Mondial de la Santé

P

PMT : Photo-Multiplicateur

PD : PhotoDiodes

PE : Phycoérythrine

PerCP : Périidine-Chloro-Phylle

S

SSC : Side Scatter Channel

Sommaire

INTRODUCTION.....	01
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	04
I.1. Généralité sur la leucémie aigue lymphoblastique	05
I.1.1. Définition de la leucémie aigue lymphoblastique	05
I.2. Epidémiologie de leucémie aigue lymphoblastique	05
I.3. Etiopathogénie.....	05
I.3.1. Facteurs exogènes.....	05
I.3.2. Facteurs endogènes.....	06
I.4. Physiopathologie.....	06
I.5. Diagnostic	07
I.5.1. Circonstance de découverte.....	07
I.5.2.Examen clinique.....	07
I.5.3. Examen complémentaire.....	08
I.6. Diagnostic différentiel.....	12
I.8. Traitement	12
I.8.1. La molécule CD20.....	13
I.8.2. CD20 et LAL.....	13
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	14
II.1. Matériel.....	15
II.1.1. Matériel biologique.....	15
II.1.2. Matériel non biologique.....	15
II.2. Méthodes.....	17
II.2.1. Cytomètre en flux.....	18
II.3- Application de la cytométrie en flux.....	22
II.4 - Immunophénotypage par cytométrie en flux.....	23
II.5- Techniques.....	26

CHAPITRE III : RESULTATS	34
III.1. Caractéristiques cliniques de la population étudiée.....	35
III.1.1. Répartition des patients selon le sexe.....	35
III.1.2. Répartition des résultats des patients selon l'âge	36
III.2. Caractéristiques biologiques	36
III.2.1. Résultats de la Cytologie	36
III.2.2. Résultats de l'immunophénotypage par CMF	37
CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS	45
CONCLUSION	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

La leucémie aiguë est une hémopathie maligne monoclonale affectant les cellules souches hématopoïétiques médullaires donnant naissance à des cellules malignes jeunes immatures qui sont les cellules blastiques. Les cellules blastiques prennent la place des cellules sanguines normales en les empêchant d'accomplir leurs tâches et entraîne des symptômes liés aux cytopénies (Société canadienne du cancer, 2020).

Il existe deux types de leucémies aiguës (LA) : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et leucémie aiguë non lymphoblastique (LAM).

La LAL s'installe brutalement et elle entraîne le plus souvent une altération rapide de l'état général et une association de symptômes qui traduit l'incapacité de la moelle osseuse à fabriquer les cellules hématopoïétique, en raison de la prolifération des cellules leucémiques par les signes d'insuffisance sanguine et des symptômes liés à la prolifération des cellules blastiques dans les organes réalisant un syndrome tumoral.

Les données cliniques, l'hémogramme et l'analyse morphologique du frottis sanguin orientent le diagnostic, l'analyse morphologique du médullogramme pose le diagnostic d'une LA. L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) confirme le diagnostic de leucémie aiguë et précise le phénotype des LAL.

L'immunophénotypage cellulaire par CMF est un examen clé indispensable dans le diagnostic des leucémies aiguës car celui-ci contribue à la caractérisation précise du clone leucémique en déterminant l'appartenance à une lignée cellulaire et en décrivant son stade de maturation (Bassot, 2018) et dans les LAL, la CMF permet la détermination exacte des sous-groupes. En plus, la CMF a un intérêt thérapeutique dans les LAL pour le traitement par l'anti CD20, un intérêt pronostic, et elle a un intérêt dans la détection de la rechute précoce par la recherche de la maladie résiduelle.

Notre travail porte sur l'immunophénotypage par CMF dans le cadre du diagnostic des LA et de précision des sous-groupes des LAL avec comme objective :

- Evaluer l'apport de la CMF dans le diagnostic des LA.
- Etablir une corrélation entre l'analyse cytologique reçus et les résultats obtenus par immunophénotypage.
- Etablir le pourcentage des LAL B et des LAL T.
- Etablir le taux d'expression du CD20 dans les LAL B.

CHAPITRE I :
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- Généralité sur la leucémie aigue lymphoblastique

I.1.1- Définition

La leucémie aigue lymphoblastique est une hémopathie maligne monoclonale caractérisée par la prolifération de cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse qui donne naissance à des cellules malignes jeunes immatures (blastiques) touchant la lignée lymphoïde.

I.2- Épidémiologie

Les LAL représentent 80% des leucémies aiguës chez l'enfant et 20% des leucémies aiguës chez l'adulte. La fréquence est de l'ordre de 1 à 3 cas pour 100 000 personnes/année. C'est le plus fréquent des cancers chez l'enfant avec un pic d'incidence survenant entre 3 et 4 ans. Chez l'adulte il s'agit plus souvent d'un homme que d'une femme. La fréquence augmente avec l'âge qui est un critère de gravité (Bories, 2018).

En Algérie, la leucémie aiguë lymphoblastique représente 20% des cas de leucémie aiguë de l'adulte avec une incidence restée stable à 0,32 et ce jusqu'aux derniers résultats de l'enquête nationale effectuée de 1994 à 2010. Dont les résultats montraient que la LAL touchent les sujets de plus en plus jeunes avec une discrète prédominance masculine et que son incidence avait augmenté ces dernières années (Zouaoui et *al.*, 2016).

I.3- Etiopathogénie

Les phénomènes intervenant dans le développement des LAL sont mal connus. Néanmoins, certains facteurs exogènes et endogènes sont reconnus comme ayant un rôle important dans la survenue de la maladie.

I.3.1- Les facteurs exogènes

I.3.1.1- Les radiations

Les enfants exposés à de fortes doses de radiation émises lors d'accidents de réacteurs nucléaires risquent davantage d'être atteints de leucémie. La plupart des leucémies qui apparaissent après une exposition à une radiation sont une LAM, mais il arrive aussi que ce soit une LAL (Société canadienne du cancer, 2020).

I.3.1.2- Radiothérapie et chimiothérapie

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Les personnes qui ont déjà reçu certains types de chimiothérapie pourraient être plus à risque d'avoir la leucémie. La plupart des leucémies qui apparaissent sont les LAL plutôt que les LAM. La leucémie se manifeste habituellement au cours des 5 ans qui suivent le traitement (Godley et Larson, 2008).

I.3.2- Les facteurs endogènes

I.3.2.1- Facteurs génétiques

L'anomalie génétique est définie par un changement, ou mutation, dans un ou plusieurs gènes. Être atteint de certains syndromes génétiques peut accroître le risque d'apparition d'une LAL (Baruchel et Leblanc, 2015). Le syndrome de Down Les personnes atteintes du syndrome de Down risquent davantage d'avoir plusieurs troubles médicaux, dont la leucémie infantile car cette maladie est causée par la présence d'une copie supplémentaire (troisième copie) du chromosome 21. Les personnes atteintes du syndrome de Bloom sont plus susceptibles d'être atteintes de différents types de cancer, dont la LAL, est plus élevée (Baruchel et Leblanc, 2015).

I.4.- Physiopathologie

I.4.1- Leucémogénèse

Au cours de la leucémie aigüe, il y'a une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologiques normaux, et qui se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique, avec blocage de la différenciation cellulaire, source d'une accumulation de cellules blastiques dans la moelle osseuse entraînant ainsi une défaillance de l'hématopoïèse normale responsable du tableau clinique révélateur de leucémie aigüe (El Jouaidi, 2016).

La leucémie peut survenir à n'importe quel stade de l'hématopoïèse, depuis la cellule souche pluripotente jusqu'aux précurseurs déjà bien engagés dans une lignée précise, quel que soit le stade où survient la leucémie, on aura une prolifération de cellules monomorphes. La leucémie se développe en règle dans la moelle osseuse, puis s'étend au sang ou à d'autres organes non hématopoïétiques (peau, gencives, système nerveux central) ce qui est responsable du syndrome tumoral. L'accumulation des cellules leucémiques n'est pas due seulement à une prolifération importante, mais plus à une perte de la capacité de la différenciation totale pour arriver à des cellules matures, ce qui donne aux cellules leucémiques un avantage de survie lié à un échappement aux règles de la mort cellulaire (Khattar, 2014).

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.4.2.- Le microenvironnement

La résistance à l'apoptose *in vivo*, qui caractérise la maladie, et à l'inverse. L'augmentation de l'apoptose spontanée lorsque les cellules sont cultivées *ex vivo*, impliquent le rôle important que joue le microenvironnement dans ces mécanismes. Ce dernier, contient principalement des MSCs (Mesenchymal Stromal Cells) dans les niches vasculaires de la moelle osseuse, des NLCs (Nurse Like Cells), des lymphocytes T et des cellules dendritiques folliculaires dans les organes lymphoïdes secondaires. Les MSCs qui sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires sécrètent systématiquement des chimiokines qui recrutent les cellules leucémiques (Chiarini *et al.*, 2016).

Il a été démontré que le contact direct des MSCs avec les cellules leucémiques, ne permet pas seulement la survie et la prolifération des cellules leucémiques, mais ils favorisent également un changement métabolique des cellules leucémiques en augmentant la synthèse du glutathion et la glycolyse à travers l'axe Notch1 -c-Myc, qui à son tour, affecte la survie cellulaire et la résistance aux traitements. La niche ostéoblastique est principalement impliquée dans le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (CSH), tandis que la niche vasculaire favorise vraisemblablement la prolifération, la différenciation et la mobilisation des CSH (**Figure 1**) (Chiarini *et al.*, 2016).

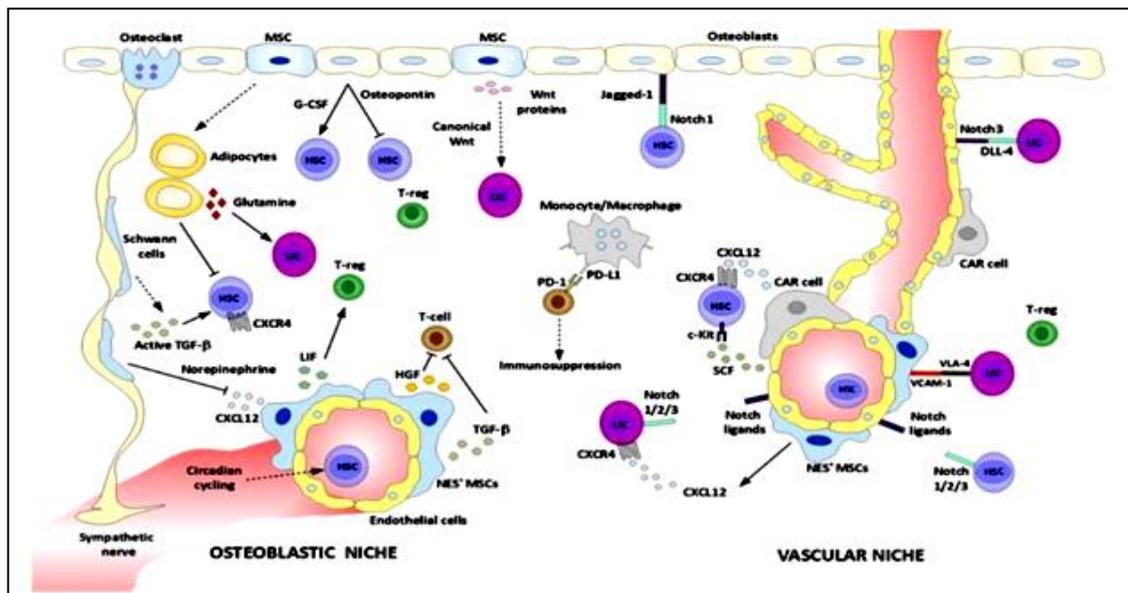


Figure 1 : Mécanismes impliqués dans le maintien des CSH (Chiarini *et al.*, 2016)

Les ostéoblastes sont capables à la fois de maintenir et de réguler négativement la prolifération des CSH, par le biais du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), de la signalisation Jagged-1 / Notch1 et de l'ostéopontine. L'état dormant de HSC est régulé par la

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

signalisation du facteur de croissance transformant β (TGF- β), dont l'activation est régulée par des cellules de Schwann non myélinisantes. Le système nerveux sympathique régule également la libération de HSC dans la circulation sanguine au moyen de la noradrénaline circadienne sécrétion qui régule à la baisse l'expression du ligand 12 du motif chimiokine C-X-C (CXCL12) dans les cellules mésenchymateuses nestine + (NES + MSC).

Les adipocytes diminuent la fréquence des CSH au repos, tandis qu'ils peuvent également maintenir des cellules initiatrices leucémiques (LIC), par exemple par la sécrétion de glutamine. En raison du fait que les niches sont un environnement immunosuppresseur, immunisé les cellules T-régulatrices du système (T-reg) participent à la création d'une zone localisée protégée des attaques immunitaires (Chiarini et *al.*, 2016).

Le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) pourrait favoriser l'expansion des cellules T-reg, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le TGF- β présentent tous deux une activité inhibitrice sur les lymphocytes T. Des niveaux élevés de ligand Notch Delta-like 4 (DLL-4) sont exprimées dans les cellules endothéliales et activent spécifiquement la signalisation Notch3 dans les LIC, favorisant ainsi la sortie des tumeurs de la dormance (Chiarini et *al.*, 2016).

Dans les effets protecteurs des cellules leucémiques: les protéines Wnt exogènes fournies par les CSM sont impliquées dans l'activation de la signalisation Wnt dans les LIC, soutenant ainsi leur prolifération (Chiarini et *al.*, 2016). Les molécules d'adhésion jouent également un rôle de premier plan dans l'homéostasie BM, fournissant des signaux de quiescence et de prolifération des HSC / LIC (Chiarini et *al.*, 2016).

I.5- Diagnostic de la leucémie aigue lymphoblastique

I.5.1- Circonstance de découverte

L'installation des signes cliniques est le plus souvent brutale. Lors de l'exploration d'un syndrome anémique ou/et un syndrome hémorragique, ou et un syndrome infectieux, ou et un syndrome tumoral fait d'adénopathie ou lors de complications exemple : CIVD.

I.5.2- Examen clinique

- Syndrome anémique
- Syndrome hémorragique, peut être cutané (Purpuras pétéchiales ou ecchymoses, des hématomes, des gingivorragies) ou des hémorragies viscérales comme cérébrale.

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

- Syndrome tumoral est défini par des adénopathies de petites ou de grandes tailles (augmentation du volume des ganglions), une splénomégalie (augmentation du volume de la rate), une hépatomégalie (augmentation du volume du foie), une hypertrophie testiculaire, localisation neuro-méningé ...

I.5.3- Examens complémentaires

I.5.3.1- Hémogramme

Il est toujours anormal et représente l'examen d'orientation majeur (Doval, 2015):

- ✓ Anémie presque constante, parfois sévère.
- ✓ Thrombopénie : très fréquente, parfois < 10 G/L.
- ✓ et une Leucocytose très variable, allant de la leucopénie (< 3 G/L) à l'hyperleucocytose majeure (> 100 G/L).
- ✓ Neutropénie fréquente (< 1.5 G/L).

I.5.3.2- Frottis sanguin

Un frottis sanguin consiste en une goutte de sang que l'on étale sur une lame de verre et qui est ensuite traitée avec un colorant spécial afin d'y examiner et évaluer les cellules sanguines. Les blastes circulants peuvent représenter l'essentiel des leucocytes (formes hyperleucocytaires), mais sont parfois absents ou très rares (formes leucopéniques). Leur aspect morphologique varie d'une leucémie aigüe à l'autre, leur identification peut être difficile (Bain, 2005). Il permet de :

- ✓ Comparer la taille, la forme et l'apparence générale des globules blancs à celles établies des cellules « normales ». Il détermine également les cinq différents types de globules blancs et leur pourcentage relatif (formule leucocytaire différentielle manuelle) ;
- ✓ Évaluer la taille, la forme et la couleur (indicateurs du contenu en hémoglobine) des globules rouges (morphologie des érythrocytes) ;
- ✓ Estimer le nombre de plaquettes présentes.

I.5.3.3- Le myélogramme

La ponction de l'os iliaque (MO) permet de réaliser un examen cytologique (myélogramme) et diverses techniques complémentaires. Elle est systématique pour poser le diagnostic de certitude d'une leucémie aigüe. Le myélogramme est un examen clé du diagnostic, il est indispensable même s'il existe des blastes circulants. Il permet d'affirmer le diagnostic et de typer la leucémie. La richesse

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

médullaire est généralement augmentée à cause de l'envahissement par les cellules malignes, alors que les lignées médullaires normales (lignées granuleuses, érythroblastiques et mégacaryocytaires) sont diminuées. L'envahissement est variable, jusqu'à la quasi-absence des cellules normales de la moelle osseuse. L'aspect des lymphoblastes de la moelle osseuse est généralement proche de celui des lymphoblastes circulants (**Figure 5**) (Coster, 2018).

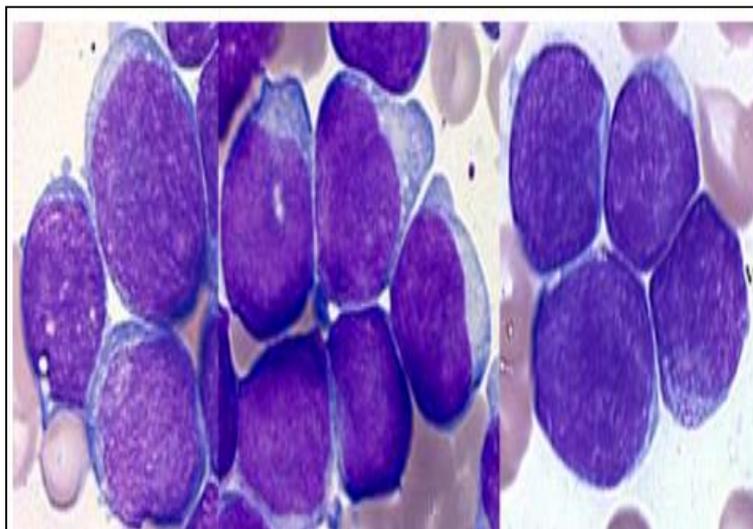


Figure 5: Lymphoblastes médullaires.

Images en microscopie optique objectif x100 après coloration May GrünwaldGiemsa, issues des prélèvements de trois patients différents (Coster, 2018)

Divers critères morphologiques des blastes vont permettre de séparer les leucémies aigues en 2 grands groupes:

- ✓ Leucémies aigues lymphoblastiques: blastes de taille petite ou moyenne et cytoplasme peu abondant agranulaires.
- ✓ Leucémies aigues myéloïdes: blastes contenant souvent quelques granulations et des bâtonnets d'Auer.

La classification FAB (Franco-américano-britannique) a été établie en 1976, celle-ci se base sur les caractéristiques morphologiques et cytochimiques des cellules blastiques. Le premier élément de classification étant la nature myéloïde ou lymphoïde des blastes. Cette classification distinguait les LAL à petit lymphoblastes (LAL1), des LAL à grand lymphocytes (LAL2) et les LAL de type Burkitt (LAL3) (**Tableau II**). Cette classification n'est plus utilisée aujourd'hui (Bassot, 2018).

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau II : Classification morphologique des LAL : FAB (Lachachi, 2018)

Type	L1	L2	L3
Taille	Petite homogène	Grande hétérogène	grande homogène
Rapport N/P	Elevé	Moins élevé	Moyen
Noyau	Régulier	Irrégulier, encoché	Régulier, rond ou ovale
Chromatine	Homogène	Variable	Variable
Nucléole	0 ou 1, petit	1 ou +, volumineux	1 ou +, volumineux
Cytoplasme	Basophile faible	Variable, parfois intense	Très intense
Vacuoles	Présence variable	Présence variable	Présentes et volumineuse

Coloration cytochimique : Myéloperoxydase ou Noir soudan, permettent de préciser le type de la leucémie aiguë (**Figure 6**), cette coloration est :

- 1- Négative dans la leucémie aiguë lymphoblastique.
- 2- Positive dans la leucémie aiguë myéloblastique.

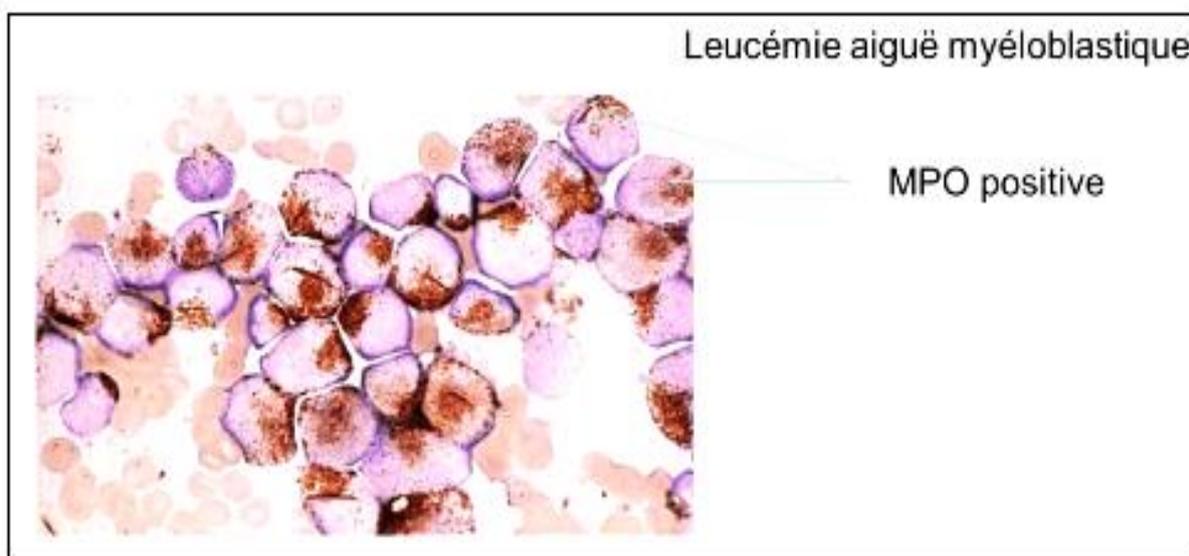


Figure 6 : Coloration cytochimique, d'après Benzineb (Cours en ligne)

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

➤ Généralités sur le CD 20

Le CD20 est un membre de la famille de gènes 4A recouvrant la membrane. Ce gène code pour une molécule de surface des lymphocytes B qui joue un rôle dans le développement et la différenciation des cellules B en plasmocytes, L'expression de CD20 est observée dans tous les lymphocytes B matures mais perdue dans les plasmocytes différenciés terminaux. Le CD20 est l'un des marqueurs les plus importants pour les cellules B. Il marque presque tous les lymphomes à cellules B matures, la moitié des lymphomes / leucémies lymphoblastique (www.clinisciences.com)

I.6.-La cytogénétique

L'analyse cytogénétique (caryotype complété si besoin par les analyses FISH adéquates) est un examen indispensable lors du diagnostic d'une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). Elle est prise en compte dans les protocoles thérapeutiques actuels en raison de sa valeur diagnostique et pronostique. Cytogénétique moléculaire recherche des anomalies récurrentes surtout pour la translocation t (9 ;22) qui touche essentiellement les lymphocytes B et qui a un apport pronostic et thérapeutique (**Figure 7**). Environ un adulte atteint de LAL sur cinq et un petit nombre d'enfants LAL ont la LAL Ph+ (<http://cmlsociety.org/comprendre-la-lmc/?lang=fr>)

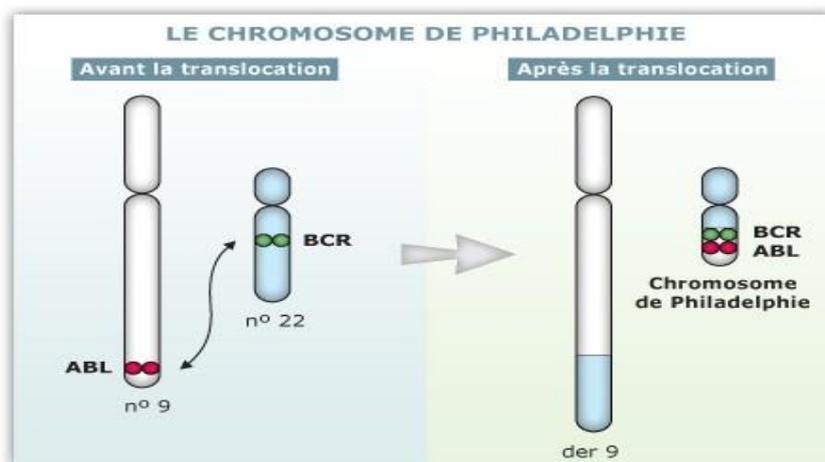


Figure 7: Le chromosome de Philadelphie avant et après la translocation

La formation du chromosome Philadelphie se produit lorsqu'il y a un échange entre des parties du chromosome 9 et du chromosome 22. Cette translocation forme un chromosome 9 extra-long et, à l'inverse, un chromosome 22 extra-court qui résulte en un gène anormal que l'on nomme le gène BCR-ABL. Ce dernier est contenu dans le chromosome Philadelphie (www.cmlsociety.org)

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.7.- Diagnostic différentiel

- Leucémie lymphoïde chronique (LLC) touche les sujets âgés avec une hyper lymphocytose sanguine avec des cellules sanguines matures d'évolution chronique, dans ce cas la CMF tranchera avec l'application du score de Matutes.
- Syndrome lympho-prolifératif chronique en conversion leucémique surtout en cas des Lymphome de Manteau : Dans ce cas, on a une hyper lymphocytose sanguine faite de cellules matures et parfois blastoïdes d'où l'intérêt de l'immunophénotypage par CMF posera le diagnostic

I.8- Traitement

Le traitement des LAL est basé sur la chimiothérapie à forte dose ou immunothérapie pour obtenir une rémission complète et selon les cas on peut indiquer la greffe des cellules souches hématopoïétiques si donneur HLA compatible. La transplantation est rarement pratiquée chez les patients de > 65 ans (Emadi et *al.*, 2018).

Actuellement, les Inhibiteur de la tyrosine kinase chez les patients avec le chromosome Philadelphie bloquent les effets leucémiques de la mutation génique BCR-ABL chez plusieurs patients (Mahon, 2001).

L'Immunothérapie est basée sur l'utilisation du système immunitaire pour vaincre le cancer, stimuler ses activateurs, réprimer ses inhibiteurs, rendre la tumeur plus immunogène, forcer le bouclier anti-immunitaire derrière lequel la tumeur se plait à prospérer (Xiong, 2016).

Depuis quelques années apparition des anticorps monoclonaux qui sont de grandes molécules produites en laboratoire dont leur mode d'action est similaire aux anticorps naturels produits par le système immunitaire. Ils reconnaissent et se lient spécifiquement à certaines protéines présentes à l'extérieur ou à la surface des cellules cancéreuses et qui les incitent à se diviser de façon incontrôlée ou à survivre. En agissant de la sorte, ils tendent à neutraliser ces protéines et par conséquent à stopper la croissance maligne. (Goubet, 2018). Dans la LAL le plus utilisé est l'anti-CD20.

I.8.1- La molécule CD20

La molécule CD20 est une phosphoprotéine transmembranaire de 35/37 kDa exprimée à la surface des cellules B depuis un stade précoce de leur maturation et jusqu'au stade plasmocyte. L'antigène CD20 est présent à la surface d'environ 90 % des lymphomes des cellules B, ainsi qu'à la surface

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

d'autres tumeurs lymphoïdes issues des cellules B. Le ligand physiologique et l'exacte fonction biologique du CD20 sont actuellement inconnus. Le CD20 agirait comme un canal calcique et régulerait les premières étapes de l'activation des lymphocytes (Boross et *al.*, 2012). L'expression de CD20 débute au stade prè-B du développement des LB et se termine au stade plasmoblaste : les cellules pro-B et plasmocytes sont CD20- (Yamamura et Miyake, 2012). Ce marqueur est recherché par CMF, son expression sur les cellules lymphoblastique B permet d'indiquer le traitement par les anticorps monoclonaux.

I.8.2- CD20 et LAL

De manière intéressante, cet antigène est conservé sur les LB tumoraux de leucémies et lymphomes, ce qui en a rapidement fait une cible thérapeutique potentielle. La CMF occupe une place centrale dans la démarche diagnostique de la leucémie aigue lymphoblastique, car elle permet de mettre en évidence pour chaque type de leucémie un profil phénotypique caractéristique, elle a aussi un intérêt pronostique, thérapeutique et évaluation de la maladie résiduelle, son application dans le domaine médicale s'est accrue ; surtout avec la mise à disposition d'une large gamme d'anticorps et de fluorochromes. Toutes ces nouveautés ont largement amélioré la capacité à identifier les différentes lignées cellulaires ainsi qu'à reconnaître les aberrations phénotypiques même celles présentes sur une toute petite partie de la population analysée (Gamonet, 2015).

Chapitre II :

MATERIELS ET METHODES

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hématologie au CAC à l'hôpital de Frantz Fanon de Blida, du mois de 01février 2020 au 12 mars 2020 et du 16Juillet 2020 au 30 Aout 2020.

Nous avons analysé les patients qui présentaient un tableau clinique évocateur d'une leucémie aigüe et ayant bénéficié d'une analyse immunophénotypique par cytométrie en flux pour confirmer le diagnostic et typer la leucémie aigüe. Après avoir posé le diagnostic de la LAL, nous avons analysé le marqueur CD20 qui est une cible thérapeutique dans les LAL B.

II.1- Matériels

II.1.1- Matériel biologique

II.1.1.1- Prélèvements

L'immunophénotypage par CMF en cas des leucémies aigües est réalisée sur un prélèvement médullaire (moelle osseuse) prélevée au niveau de l'os iliaque ou au niveau de la région sternale sur des tubes contenant de l'EDTA et rarement l'analyse est effectuée sur du sang périphérique (prélèvement au pli de coude). La manipulation est effectuée le jour même rarement le lendemain matin, si la manipulation est retardée l'échantillon est conservé à température ambiante.

II.1.1.2- Recueil des données

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

- L'identité du patient : nom, prénom, âge
- Les données cliniques
- Les données biologiques
- Les données cytologiques
- Le diagnostic suspecté

II.1.2-Matériel non biologique

Le matériel non biologique comporte un équipement spécifique et non spécifique et du matériel consommable. (**Annexe 02**)

II.2 - Préparation du panel

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

La préparation du panel est basée sur la sélection d'anticorps qui sont adaptés et conjugués à des fluorochromes, ce qui rendra la recherche plus rapide et plus pratique (**Tableau IX**) (**Figure 13**).

Tableau IX: Panel des LA

	FITC	PE	PERCP CY5	APC
01 Témoin	-	-	-	-
02	CD13	CD33	CD45	CD34
03	CD15	CD117	CD45	CD34
04	CD61	CD36	CD45	CD34
05	CD14	CD64	CD45	CD34
06	HLADR	CD33	CD45	CD11c
07	CD3	CD34	CD19	CD45
08	CD3cy	MPO	CD79a	CD45
09	FMC7	CD10	CD19	CD79b
10	LAMBDA	KAPPA	CD19	CD5
11	CD20	CD22	CD19	CD34
12	IgM	TDT	CD19	CD45
13	HLADR	CD38	CD19	CD138
14	CD16	CD56	CD3	CD2
15	CD7	CD2	CD3	CD1a
16	CD4	CD8	CD3	CD5
17	CD57	TCR ab	CD3	TCR gd



Figure 13: Le panel et le consommable de la CMF (Laboratoire d'hématologie CAC Blida).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.2. Méthodes

II.2-1 Cytométrie en flux

II.2.1.1- Historique

En 1934, Moldavan, à Montréal, conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans une fine capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique. En 1945, Coulter W, a mis au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation de résistivité du courant liquidien. En 1953, Crosland-Taylor utilise un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire (système décrits par Reynolds en 1883). En 1965, Kamensky permet une avancée en permettant l'analyse de 2 constituants cellulaires (DNA/protéine). En 1969, Dan villa utilise le laser comme source lumineuse car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité du chromatisme (Magniez, 2009).

Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales (Magniez, 2009).

II.2.1.2- Principe de l'immunophénotypage par CMF

La cytométrie (cyto = cellule ; métrie = mesure) est définie selon Howard Shapiro en 1948 : « La cytométrie en flux est 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 » (Roger et *al.*, 1988). C'est une technique qui consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des particules en suspension dans un liquide. Elle utilise la fluorescence, des moyens fluidiques, optiques et le soutien informatique pour le traitement des signaux ou des images (EL Henati et *al.*, 2009).

Les signaux optiques ou physiques émises par la particule étudiée, coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc sont mesurés essentiellement en relation avec :

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

- Les propriétés optiques intrinsèques des particules, correspondant aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules.
- Les propriétés optiques induites de fluorescence, obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonction cellulaires. Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle puisqu'il est multiparamétrique, il peut s'effectuer à une vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes mono ou bi-paramétriques sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La fonction de tri des cytomètre de flux les plus évolués, permet de trier physiquement, une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques (Debleds et Lagarda, 2005).

II.2.1.3- Composition d'un cytometre en flux

Il est basé sur la combinaison de trois systèmes (Lees, 2000) (**Figure 2**):

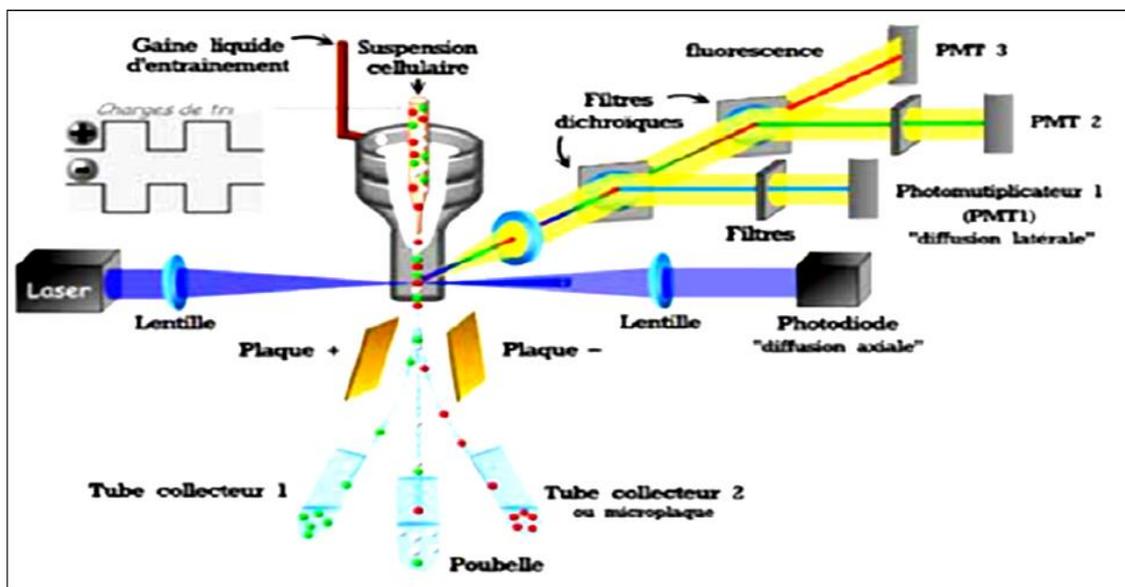


Figure 2 : Composition d'un cytomètre de flux (Nunez, 2001)

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.2.1.4 -Système fluide

Le système de distribution de l'échantillon consiste en un système de fluide sous pression, qui a pour but de diriger l'échantillon (cellules/particules), dans un flux et un courant soigneusement contrôlés (système de centrage hydrodynamique), qui coupent un faisceau étroit de lumière. Essentiellement, le système fluide comprend un noyau /canal central à travers lequel l'échantillon est injecté, entouré d'une gaine extérieure qui contient plus vite l'écoulement du fluide. Comme la gaine fluide se déplace, il crée un effet de glissement massives sur le rétrécissement de la chambre centrale. Cela modifie la vitesse du fluide central dont le front de débit devient parabolique avec la plus grande vitesse en son centre et la vitesse à la paroi de zéro (Abuaf et *al.*, 2004).

L'effet crée un fichier unique des particules et il est appelé « Focalisation Hydrodynamique » (Robinson et *al.*, 2006) (**Figure 3**).

Dans des conditions optimales (flux laminaire) le fluide dans la chambre centrale ne se mélangera pas avec le liquide de la gaine. Les caractéristiques de l'écoulement du fluide central sont estimées à l'aide de la loi Reynolds, avec :

D = diamètre du tube.

V = la vitesse moyenne du fluide.

ρ = densité du fluide.

μ = viscosité du fluide Lorsque $Re > 2300$, le flux peut être turbulent, ce qui accélère la diffusion.

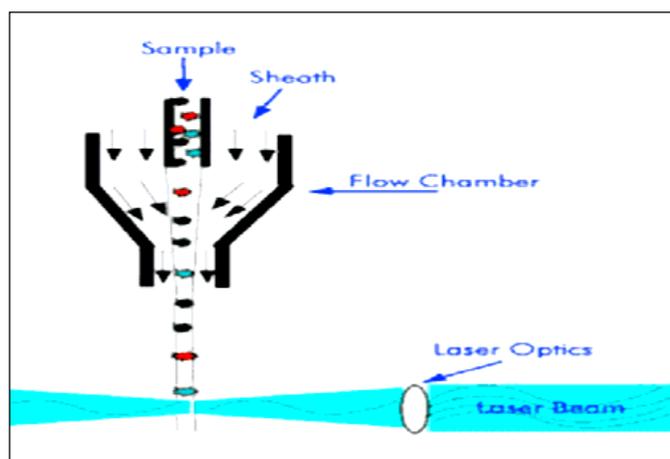


Figure 3: Principe de la focalisation hydrodynamique (Rahman, 2006)

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.2.1.5- Système optique

- **Source d'énergie**

Il est nécessaire de focaliser une source lumineuse sur les cellules qui doit permettre une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'excitation. Deux types de sources sont actuellement utilisés: les lasers (les plus fréquemment utilisés)

La présence de plusieurs lasers de types différents permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes (**Tableau I**).

Tableau I : Les principaux lasers utilisés en cytométrie de flux (Wulff, 2006)

<i>Type du laser</i>	<i>Longueur d'onde correspondante (nm)</i>
Argon(Ar) (plus utilisés)	352 et 488
Krypton (Kr)	Lignes rouges
Hélium Néon (He-Ne)	633
Hélium Cadmium (He-Cd)	325 et 441
YAG	525
Violet	405
Lasers solides	-

Il existe trois types de canaux :

- Canal " taille " (FSC « FowardScatter Channel »)
- Canal " structure " (SSC « SideScatter Channel »)
- Canal "fluorescence" (FL1, FL2, FL3...)

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs dichroïques et de filtres. Suivant le traitement de la surface, on peut obtenir trois types de miroirs: passe-haut (Long Pass) qui transmettent des longueurs d'ondes supérieures à une longueur d'onde donnée, passe-bas (Short Pass) qui transmettent les longueurs d'ondes inférieures et passe bande (Band Pass) qui transmettent les longueurs d'ondes comprises entre deux valeurs. En général, des détecteurs multiples sont utilisés

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

d'une manière simultanée pour étudier les paramètres de diffusion (FSC, SSC) et de fluorescence (Wulff, 2006).

- **Détecteurs**

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou une photodiode.

Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires (Wulff, 2006) (**Figure 4**),

On distingue généralement :

Les photodiodes (PD) : Sensibilité plus faible. C'est un détecteur utilisé pour les signaux forts : taille.

Les photomultiplicateurs (PMT): Plus sensible qu'une photodiode, offrant un gain important.

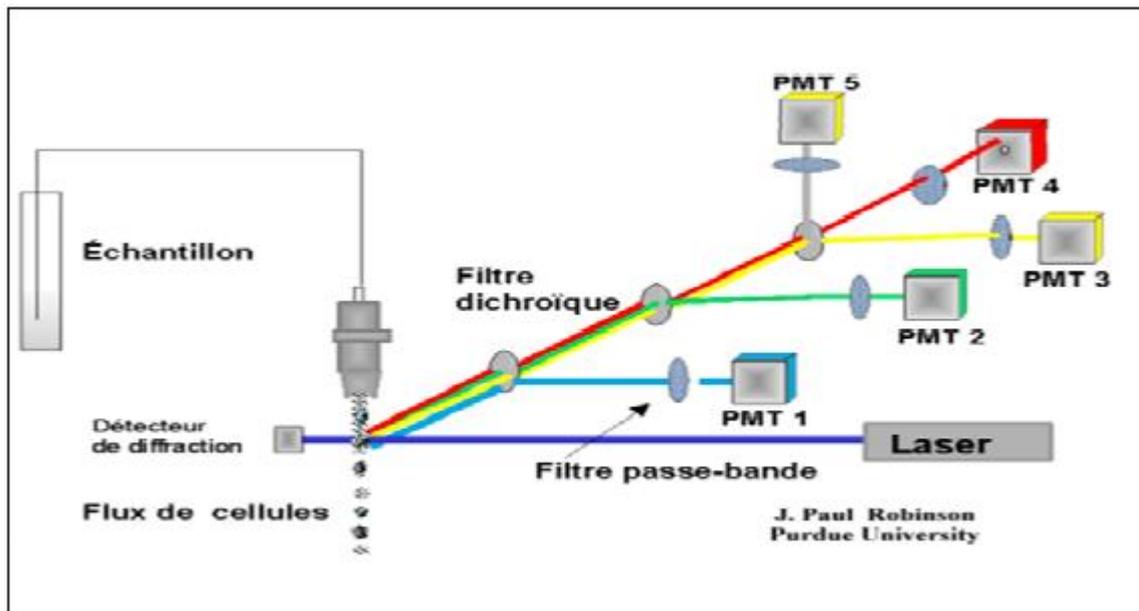


Figure 4: Un système complexe de filtres et de détecteurs permet de faire plusieurs mesures simultanées(www.cyto.purdue.edu)

- **Fluorescence émise**

La CMF est principalement utilisée pour mesurer la fluorescence des cellules qui ont été colorées soit par des techniques d'immunofluorescence soit par l'utilisation de sondes fluorescentes.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

- **L'immunofluorescence**

C'est une technique employée communément en CMF, consiste à marquer (marquage direct ou indirect), une cellule avec des anticorps conjugués à des fluorochromes pour identifier les antigènes cellulaires, les récepteurs ou les protéines de surface (Marti et *al.*, 2001).

Des fluorochromes avec différents pics d'absorption et de réémission peuvent être combinés pour permettre l'analyse multicolore de cellules individuelles. La fluorescence totale mesurée est composée de la fluorescence spécifique due aux liaisons antigène-anticorps formées et d'une fluorescence non spécifique (Marti et *al.*, 2001).

II.2.1.5- Système électronique

Les signaux lumineux sont amplifiés et transformés en signaux électriques par des photomultiplicateurs. L'intensité des signaux électriques est analysée par un système informatique et représentée graphiquement. Chaque signal est traité séparément, et un programme peut être écrit pour ne prendre en compte l'intensité de fluorescence d'une cellule qu'à la condition que ses signaux de diffusion correspondent à une morphologie particulière. Ceci permet, par exemple, de limiter le phénotypage d'une suspension cellulaire aux seuls lymphocytes.

II.3- Application de la cytométrie en flux

- Immunophénotypage: (hématologie, immunologie);
- Expression quantitative d'antigènes de surface ou intracellulaires;
- Quantification de l'ADN (cancérologie, cytogénétique);
- Etude du cycle cellulaire ;
- Caryotype en flux;
- Flux calcique;
- pH intracellulaire;
- Fluidité membranaire;
- Mesure du stress oxydatif.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.3.1- Avantages de la cytométrie en flux

- Etude quantitative de nombreuses caractéristiques (présence d'un antigène, quantité d'ADN ou d'ARN, activité enzymatique etc...).
- Analyses précises sur des critères très différents et très nombreux.
- Séparation des cellules avec une très grande pureté en condition stérile.
- N'abime pas les cellules.

II.3.2- Inconvénients de la cytométrie en flux

- Les cellules doivent être en suspension.
- Le nombre de cellules doit être de l'ordre de quelques centaines de milliers au minimum.
- Pas d'image des cellules analysées.
- L'analyse étant qu'à un unique instant donné, on ne peut pas faire de véritable étude cinétique portant sur une même cellule.

II.4 - Immunophénotypage par cytométrie en flux

L'immunophénotypage est devenu une étape incontournable du diagnostic des leucémies aiguës, complément indispensable de l'examen morphologique des cellules au microscope. Il permet de confirmer la lignée cellulaire engagée dans le processus leucémique, et de préciser le stade de blocage des blastes dans leur différenciation (Béné et *al.*, 1995).

Cette technique recherche par cytométrie de flux (CMF) l'expression de divers antigènes de différenciation membranaires ou intra-cytoplasmiques. La cytométrie en flux occupe une place centrale dans la démarche diagnostique, car elle permet de mettre en évidence pour chaque type de leucémie un profil phénotypique caractéristique, elle a aussi un intérêt pronostique, thérapeutique et évaluation de la maladie résiduelle. La CMF sert à étudier à haut débit, sur toute préparation cellulaire (prélèvement sanguin, de moelle osseuse ou du liquide céphalo-rachidien...), les antigènes exprimés par ces cellules CD (Cluster of Differentiation), grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes : c'est l'immunophénotypage. Bien que le principe de la CMF soit connu depuis les années 1930 ce

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

n'est que durant ces dernières années que son application dans le domaine médicale s'est accrue ; surtout avec la mise à disposition d'une large gamme d'anticorps et de fluorochromes. Toutes ces nouveautés ont largement amélioré la capacité à identifier les différentes lignées cellulaires ainsi qu'à reconnaître les aberrations phénotypiques même celles présentes sur une toute petite partie de la population analysée (Béné et *al.*, 1995).

Selon la classification EGIL, les LAL peuvent être divisées en différents sous types: précurseurs de la lignée B (LAL-B) et précurseurs de la lignée T (LAL-T) (**Tableau III**).

Tableau III: Classification EGIL des LAL (Béné et *al.*, 1995)

A) LAL de la lignée B					
	cCD79, CD19, c ou sCD22	CD10	μ cytoplasmique	Ig membranaires	
BI	+	-	-	-	
BII	+	+	-	-	
BIII	+	+	+	-	
B IV	+	+	+	+	
B) LAL de la lignée T					
	CD3 cytoplasmique	CD7	CD2, CD5, CD8	CD1a	CD3+/CD1a-
TI	+	+	-	-	-
TII	+	+	+	-	-
TIII	+	+	+	+	-
TIV	+	+	+	-	+

Une classification immunologique des leucémies aiguës a été établie en 1995 par l'EGIL. Celle-ci s'effectue par cytométrie en flux et repose sur l'immunophénotypage des cellules blastiques.

Les LAL de la lignée B sont caractérisées par la positivité de plusieurs marqueurs spécifiques de la lignée B présent tout au long de leur maturation, ce sont les marqueurs Pan B : CD19, CD79a et CD22. A l'inverse leur immunophénotype ne doit pas mettre en évidence de marqueurs myéloïdes (CD13, CD33, CD117) ou lymphoïde T (CD3). Cependant il arrive dans certains cas que le blaste exprime des marqueurs aberrants ou plusieurs phénotypes dans le cadre des LAL dites de phénotype mixte selon la classification OMS en 2016, entité rare et de mauvais pronostic (Bassot, 2018). Une fois l'assignation du blaste à la lignée B, la classification selon l'EGIL va s'effectuer selon la

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

positivité ou non de différents marqueurs qui se succèdent durant la période de maturation du lymphoblaste (**Tableau IV**).

Tableau IV: Classification des LAL B selon l'EGIL (Béné et al., 1995)

	CD19, c-CD79a	CD10	c-IgM	s-IgM
B/ (pro B)	+	-	-	-
B// (commune)	+	+	-	-
B/// (pré-B)	+	+/-	+	-
B //// (B mature)	+	+/-	+/-	+

L'immunophénotypage est réalisé sur le plus souvent sur un prélèvement de moelle osseuse ou du sang si la blastose sanguine est suffisante. Il permet la distinction entre lymphoblastes et blastes myéloïdes via l'utilisation d'anticorps marqués ciblant des antigènes de surface ou intracytoplasmiques des cellules. Ces antigènes varient suivant le type de cellule, myéloïde ou lymphoïde, et en fonction de la différenciation de la cellule. Le marquage est détecté cellule par cellule par la mesure de la fluorescence émise. Les marqueurs CD45 et CD34, marqueur d'immaturité des cellules hématopoïétiques permettent de centrer l'analyse sur les blastes. L'immunophénotypage est une analyse majeure pour différencier les LAL et les LAM lorsque l'analyse morphologique ne permet pas de trancher. Il permet également de différencier les LAL-B et les LAL-T. Toutes les LAL-B ont au moins deux des trois antigènes suivants : CD19, CD22 (de surface ou cytoplasmique) et CD79a cytoplasmique. Les autres marqueurs lymphoïdes, CD10, chaîne μ intracytoplasmique et immunoglobulines de surface, permettent de classer la LAL selon la classification de l'EGIL (European Group for the Immunological characterization of Leukemias). Elle reprend les stades normaux de maturation des cellules lymphoïdes dans la moelle osseuse et le thymus, de B-I le plus immature, à B-IV le plus mature. La LAL B-II, également appelée LAL-B commune est la plus fréquente (Lucie, 2018).

L'application du score EGIL (**Tableau V**), permet de déterminer l'appartenance d'une cellule à une lignée ; ainsi il faut au moins un score de 02 dans une lignée pour affirmer l'appartenance à cette lignée. La CMF permet aussi de diagnostiquer une forme particulière des LA qui sont les LA biphénotypiques qui représentent 10 % des LAL: les blastes co-expriment des marqueurs B et/ ou des

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

marqueurs T et /ou marqueurs myéloïdes de signification forte, cotés en point par le score d'EGIL qui doit être supérieur à 2 pour deux lignées (Béné et *al.*, 1995).

Tableau V : Score d'EGIL (Béné et *al.*, 1995)

Score	Lignée B	Lignée T	Lignée myéloïde
2	Cy CD22, CD79, μ Cy	CD3, TCR	MPO
1	CD19,CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13,CD33,CD117,CD65
0,5	Tdt, CD24	TdT, CD7,CD1a	CD14, CD15, CD64

On dispose d'anticorps qui reconnaissent :

- Des lignées cellulaires: lymphocytes T, lymphocytes B, cellules Natural Killers (NK), Cellules Myéloïdes, Monocytes et Macrophages, depuis la cellule souche jusqu'à la cellule mature...
- Des marqueurs d'adhésion ou d'activation des récepteurs de cytokines.
- Des populations fonctionnellement définies: cellules cytotoxiques, sécrétrices, auxiliaires, suppressives, mémoires...

En plus des marqueurs d'immatunités (CD34 et HLADr), l'analyse d'une LAL de la lignée B doit comporter au minimum l'usage du CD19, CD20, CD22, CD79a éventuellement complétée par la recherche de chaîne μ intra cytoplasmique, de CD22 intra cytoplasmique et de l'expression d'immunoglobulines de membrane et pour la lignée T : CD3 de surface, CD3cy (cytoplasmique), CD2, CD5, CD7, CD4 et CD8.

II-4.1 Détection des antigènes intracellulaires

Cette détection nécessite une perméabilisation préalable des cellules afin d'assurer l'entrée intra cytoplasmique des réactifs impliqués dans la réaction d'immunofluorescence.

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que certains antigènes peuvent être détectés au stade intra cytoplasmique le plus précoce de la différenciation tel que le CD3 dans les LAL de type T et le CD22 dans les LAL de type pré-B.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.5- Techniques

II.5.1- Protocole de l'immunophénotypage :

- **La 1^{ère} étape** : Réalisation d'un hémogramme après la réception de l'échantillon à fin de déterminer le taux de globules blancs (GB) (**Figure 14**).

Si le taux des GB dépasse les 50 000 elts / μ l, une dilution de l'échantillon sera réalisée.



Figure 14: Hémogramme (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

- **La 2^{ème} étape** : Préparation des échantillons :

D'une part on prépare les tubes Falcon de 5ml et on les dispose sur le portoir sans oublier de les marquer (T1,T2 ...T17),d'une autre part on prépare les différentes pipettes nécessaires (0.5 μ L,20 μ L,100 μ L,500 μ L,2000 μ L).

On met dans chaque tube sauf pour le Tube 1 (témoin), 20 μ L de chaque anticorps (4 fluorochromes) tout en suivant le panel LA.

Pour notre étude, nous avons préparé 17 tubes pour chaque patient en suivant le protocole de la CMF et le panel préétabli :

- 1- Ajouter 20 μ L de chaque anti corps monoclonal marqué par un fluorochrome (4 marqueurs par tube) à 100 μ l de sang total dans un tube Falcon.
- 2- Vortexer et laisser incuber 15 à 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante (entre 20 et 25 °C).
- 3- Ajouter 2 ml de BD FACS Lysing solution.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

- 4- Vortexer délicatement et incuber pendant 10 minutes dans l'obscurité à température ambiante.
- 5- Centrifuger à 1500 T / min pendant 5 minutes puis retirer le surnageant par retournement.
- 6- Ajouter 2 à 3 ml de solution BD Cell Wash et centrifuger à 1500 T/min pendant 5 min à fin d'éliminer les globules rouges lysés. (refaire cette étape 2 fois).
- 7- Préparation du culot de lecture, on ajoute 0,5 ml de Cell Wash pour la lecture.
- 8- Dans le cas rare ou en peut pas faire la lecture le jour même, Ajouter 0,5 ml de solution BD CellFix pour la fixation des échantillons à condition que la lecture se fera dans les 4 jours suivant.

Le protocole est similaire pour tous les tubes sauf pour le :

- ✓ **Tube 1** qui est un tube témoin ne contient aucun anticorps (on doit mettre que 100 µl de sang.
- ✓ **Tube 8 et 12** : marquage est intra cytoplasmique : dans ce cas, on effectue un Perméabilizing pour les AC intra cytoplasmique après avoir effectué un marquage de surface.
- ✓ **Tube 10** : kappa lambda : dans ce cas on doit faire un lavage de sang. Ajouter 100µl de sang + 2 cc de Cell Wash puis à l'aide d'un vortex homogénéiser la solution et centrifuger (à 1500 Tours /min), éliminer le surnageant et répéter 2 a 3 fois jusqu'à l'éclaircissement du surnageant.

- **Procédure de manipulation :**

- **Méthode d'allumage et d'arrêt 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 pour avoir une analyse rigoureuse et avoir des résultats corrects (**Annexes 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. Pour atteindre ce but des billes de CaliBRITE 3 et de l'APC CaliBRITE sont utilisées.

- **Mode opératoire :**

- Préparer deux tubes A et B.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

- 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 3ml 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.

➤ 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 ul d'un anticorps monoclonal (un anticorps par tube) + 100 ul de sang.
- Le panel utilisé pour des compensations 4 couleurs comprend :
- **Tube 1** : 100 ul de sang. Ce tube est le contrôle négatif, il n'est pas soumis à un marquage.
- **Tube 2** : 100 ul de sang + 20 ul d'AC lié à un conjugue type FITC.
- **Tube 3** : 100 ul de sang + 20 ul d'AC lié à un conjugue type PE.
- **Tube 4** : 100 ul de sang + 20 ul d'AC lié à un conjugue type PerCP Cy5.5.
- **Tube 5** : 100 ul de sang + 20 ul d'AC lié à un conjugue type APC.
- **Tube 6** : 100 ul de sang + 20 ul d'AC lié aux 4conjugues 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 (1500T/5 min) puis éliminer le surnageant.
- Effectuer ensuite 2 lavage des échantillons.
- Après le deuxième lavage éliminer le surnageant et ajouter 1000 ul de Cell Wash pour la lecture.

● Lecture des compensations :

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

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 02 à 05 : Ce sont des tubes monomarqués, servent à éliminer les chevauchements des spectres qui peuvent être superposés en effectuant une soustraction des signaux.

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 (**Tableau X**).

FL1 : correspond à une population marquée par FITC.

FL2 : correspond à une population marquée par PE

FL3 : correspond à une population marquée par PerCPCy5.5.

FL4 : correspond à une population marquée par APC.

Tableau X: 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 15**).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

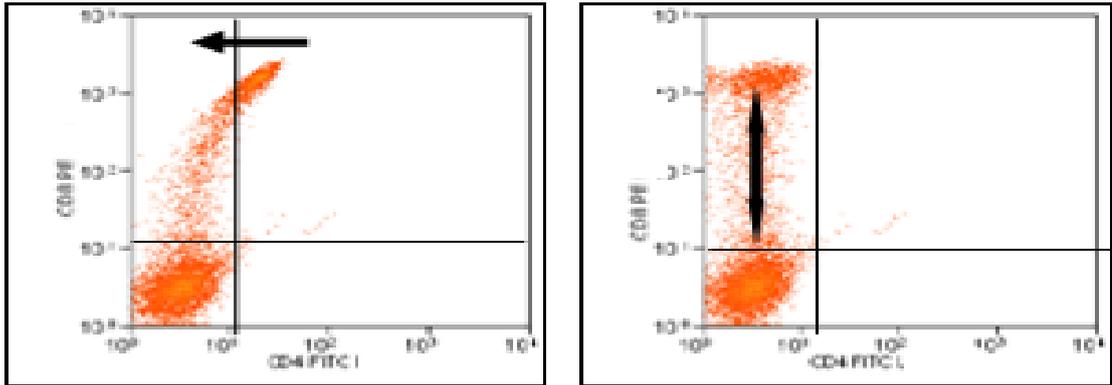


Figure 15: Image de compensation (Oukid, 2016)

➤ 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 (Figure 16).

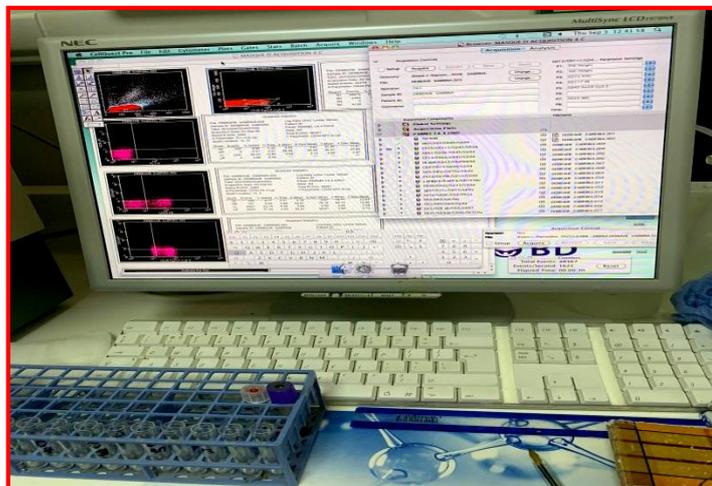


Figure 16 : Masque d'acquisition (Laboratoire d'hématologie CAC Blida).

Avant de commencer l'acquisition, on fait appel aux compensations préenregistrées.

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 blastique dans le cas de notre étude) (Figure 17) et on doit ajuster les zones négatives des Dot Plots durant l'acquisition du contrôle négative (Figure 18).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

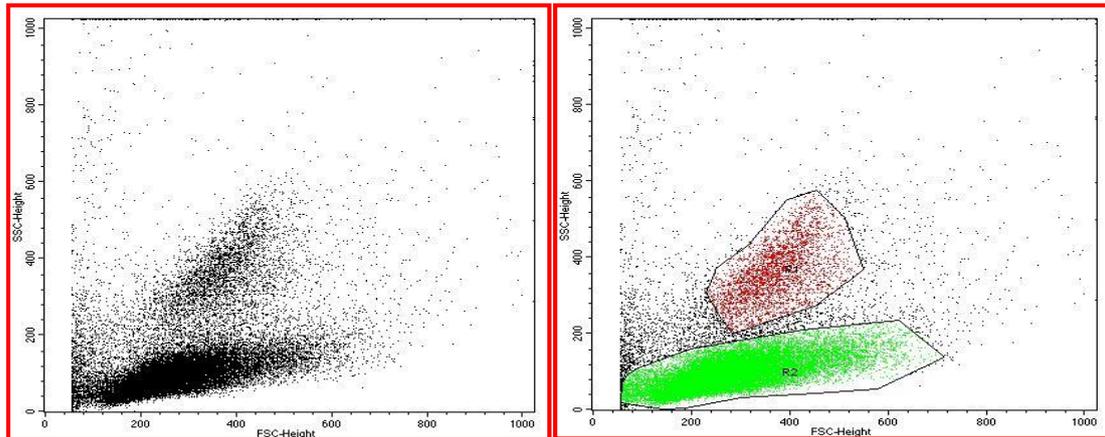


Figure 17 : Dot plot présentant les différentes populations du sang. Laboratoire hématologie du CAC Blida
(Originale)

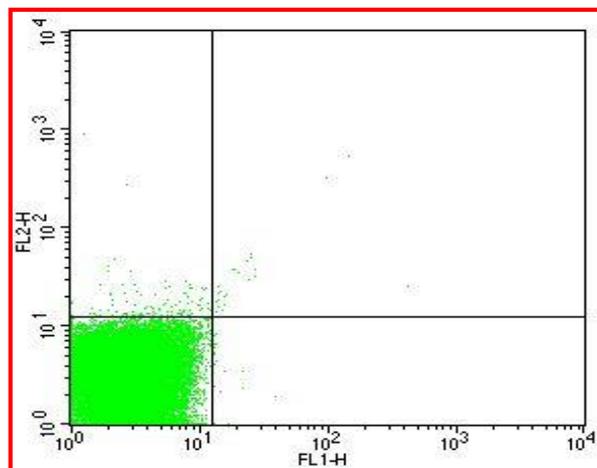


Figure 18: Ajustement de la zone négative.

Laboratoire hématologie du CAC Blida (Originale)

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.

La lecture en cas des LA débutera par le gating de la région blastique puis gating sur le CD45 qui a une fluorescence faible en cas de blaste. Le 2^{ème} gating se fait sur les blastes CD19+ en cas des LAL B et CD3+ en cas des LAL T. après le gating, on débutera l'analyse de la positivité et de la négativité des différents fluorochromes utilisé dans le panel.

➤ 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.
- Cibler la population cellulaire à étudier (gating).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

- 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 quadrants qui ont pour but de délimiter les zones négatives des zones positives (**Figure 19**).

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.

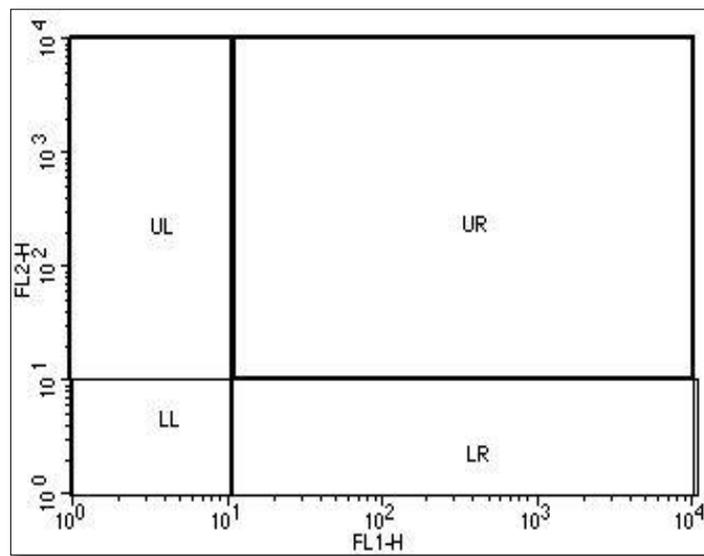


Figure 19: Dot Plot bi-paramétrique. Laboratoire d'hématologie CAC Blida (Originale)

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+.

Chapitre III :
RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS

Du 01 février 2020 au 12 mars 2020 et du 16 juillet au 30 août 2020, au cours de notre stage nous avons effectué un immunophénotypage par cytométrie en flux pour suspicion d'une leucémie aigüe chez 33 cas de leucémie aigüe, dont 15 cas soit 45% l'immunophénotypage par CMF a confirmé qu'il s'agit d'une LAL.

Dans notre étude nous allons analyser les caractéristiques des patients présentant une LAL et nous avons analysé l'expression du CD20 dans les LAL B.

III.1- Caractéristiques cliniques de la population étudiée

III.1.1- Répartition des patients selon le sexe

Les résultats de la répartition des patients en fonction du sexe son représenter dans la **figure20** ci-dessous :

- **Hommes** : 08 cas (53%).
- **Femmes** : 07 cas (47%).

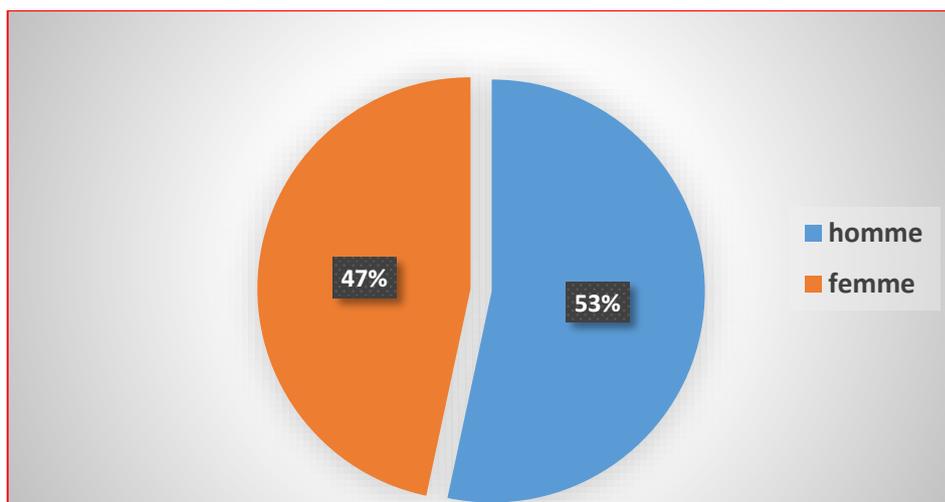


Figure 20 : Répartition des patients selon le sexe

Sex ratio : 1,14 avec une légère prédominance masculine

CHAPITRE III : RESULTATS

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

Dans notre étude, 15 patients ont été inclus. La moyenne d'âge était de 32 ans (02 – 71), dont les résultats de la répartition des patients selon l'âge sont illustrés dans la **figure 21**.

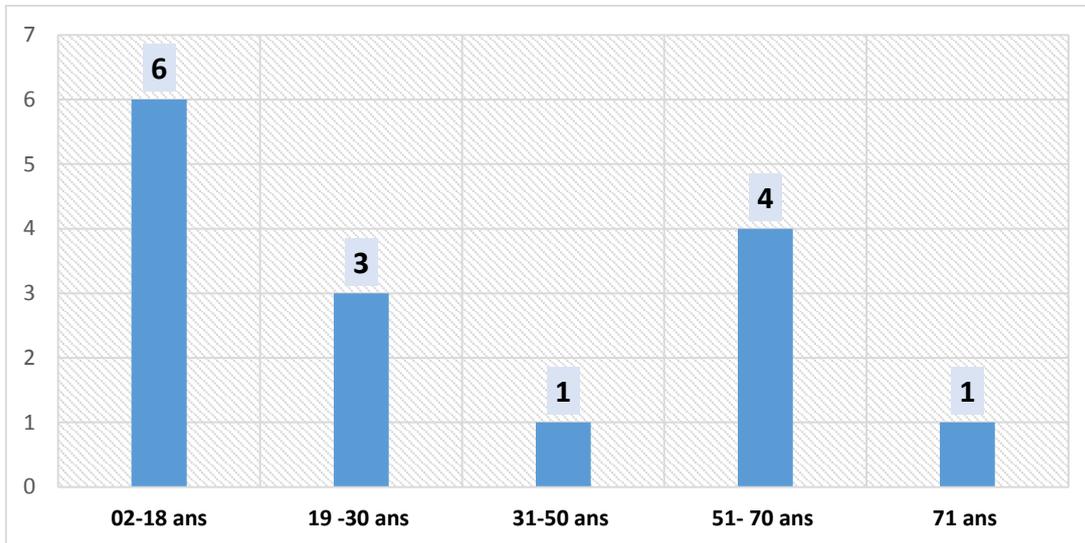


Figure 21 : Répartition des patients selon les tranches d'âge

On note que les patients ayant un âge :

- Inférieure à 16 ans : 01 cas.
- Entre 16 et 18 ans : 05 cas (33%).
- Entre 19 et 50 ans : 04 cas (27%).
- Supérieure à 50 ans : 05 cas (33%)

III.2- Caractéristiques biologiques

III.2.1- Résultats de la Cytologie

Les résultats de l'analyse cytologique sont représentés dans le **tableau XI**.

Tableau XI : Résultat de la cytologie

Résultats cytologique	LA	LAM	LAL
Nombre	4	3	8
Pourcentage %	27	20	53

CHAPITRE III : RESULTATS

L'analyse morphologique du frottis sanguin et de la moelle osseuse a évoqué une :

- **LAL** : 53 %.
- **LAM** : 20 %.
- **LA indifférencie** : 27%.

I III.2.2- Résultats de l'immunophénotypage par CMF

III.2.2.1- Type de Prélèvement

Nous avons effectué un immunophénotypage par CMF sur un prélèvement (**Figure 22**):

- **Médullaire (Moelle osseuse : MO)** : 12 cas (80%) ;
- **Sanguin** : 3 cas (20%).

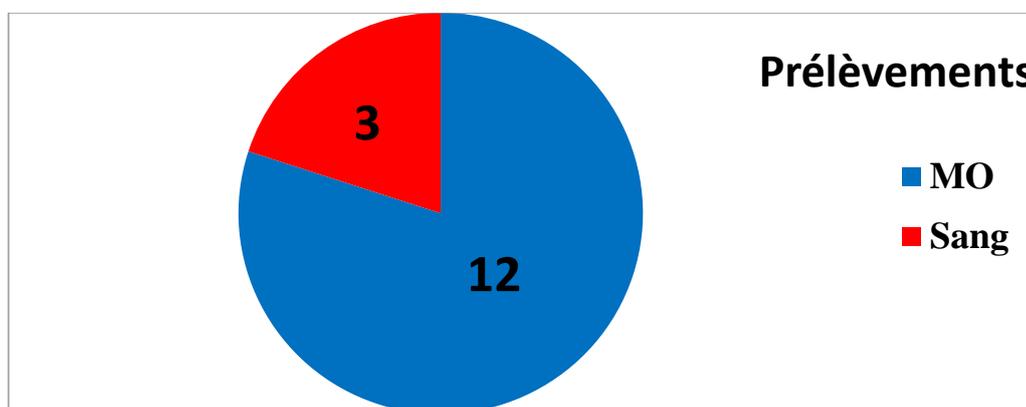


Figure 22: Type de prélèvement pour la CMF

III.2.2.2- La richesse des prélèvements

➤ **Sang** : 03 cas

- Dans les 03 cas, on note une hyperleucocytose franche $> 100\ 000/\mu\text{l}$.
- La moyenne des taux de globules blancs est de $540\ 783/\mu\text{l}$ ($257\ 180 - 734\ 390$).

➤ **Richesse de la Moelle** : 12 cas

- La richesse des globules blancs est représentée dans le tableau XII

Tableau XII: Richesse des GB dans la MO

Richesse de la MO	Nombre	%
<10 000	1	8
[10 000 – 50 000]	7	59

CHAPITRE III : RESULTATS

[50 0000 – 100 000]

4

33

- La moyenne est de 36 343 elts/ μ l (4 490 à 86 100).
- Dans plus de 92% des cas la MO était riche.

III.2.2.3- Résultat de la CMF

-Tableau XIII

- ✓ **LAL B** : 08 cas (54%) (**Annexe 04**) ;
- ✓ **LAL T** : 02 cas (13%) (**Annexe 05**) ;
- ✓ **LA bi-phénotypiques** : 05 cas (33%) (**Annexe 06**).

Tableau XIII : Résultats de la CMF

Résultats de la CMF	LAL B	LAL T	LA Biphénotypique
Nombre	08	02	05
Pourcentage	54	13	33

- Dans plus de 54% des cas prédominance des LAL B.
- Dans 33% des cas, on a une LA bi-phénotypique.

✚ **Les sous types des LAL B** : 08 cas

Le diagnostic des sous types des LAL B est représenté dans le **tableau XIV**, ci-dessous :

Tableau XIV : Le sous types de LAL B

Sous types	LAL B	LAL Pré B	LAL Pré Pré B	LAL Pro B
Nombre de cas	2	1	4	1
%	25	12,5	50	12,5

- Dans 50% des cas, on note une LAL Pré Pré B.
- Dans 25% des cas, on note une LAL B.

✚ **Les LAL T** : 02 cas

- Une LAL PRO T.

CHAPITRE III : RESULTATS

- Une LAL T Cortical.

✚ Les LA Biphénotypiques : 05 cas

On remarque 03 groupes :

- ✓ **LAL B + LAM** : 02 cas (40%).
- ✓ **LAL T + LAM** : 02 cas (40%).
- ✓ **LAL B + LAL T** : 01 cas (20%).

- Taux d'expression des marqueurs

➤ LAL B

Le **tableau XV** et les **figures 23, 24 et 25** illustrent la répartition d'expression des marqueurs dans les LAL B.

Tableau XV : Taux d'expression des marqueurs dans les LAL B

<u>Les marqueurs</u>	<u>Expression</u>		<u>Taux d'expression (%)</u>
	Nombre	%	
CD19	8	100%	83 (76 à 94)
CD22	8	100%	89 (69 à 97)
CD79a	8	100%	80 (69 à 97)
CD20	5	63%	43 (1,37 à 95)
CD34	6	75%	57 (14 à 95)
CD10	6	75%	60 (6 à 90)
HLA Dr	8	100%	85 (70 à 96)

- Toutes les cellules blastiques B expriment les marqueurs Pan B CD19, le CD20 et le CD79a.
- Pour les marqueurs de l'immaturation : CD34 est exprimé dans 75% des cas et le HLA Dr dans 100%.
- Le Marqueur calla (CD10+) est exprimé dans 75% des cas.

CHAPITRE III : RESULTATS

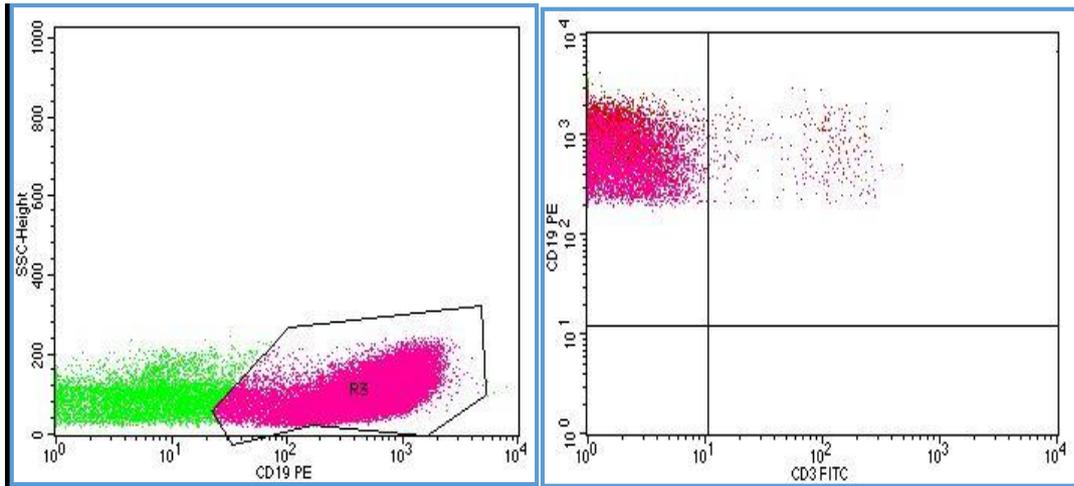


Figure 23 : Gating sur des blastes CD19⁺⁺ et CD3⁻ (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)
(Originale)

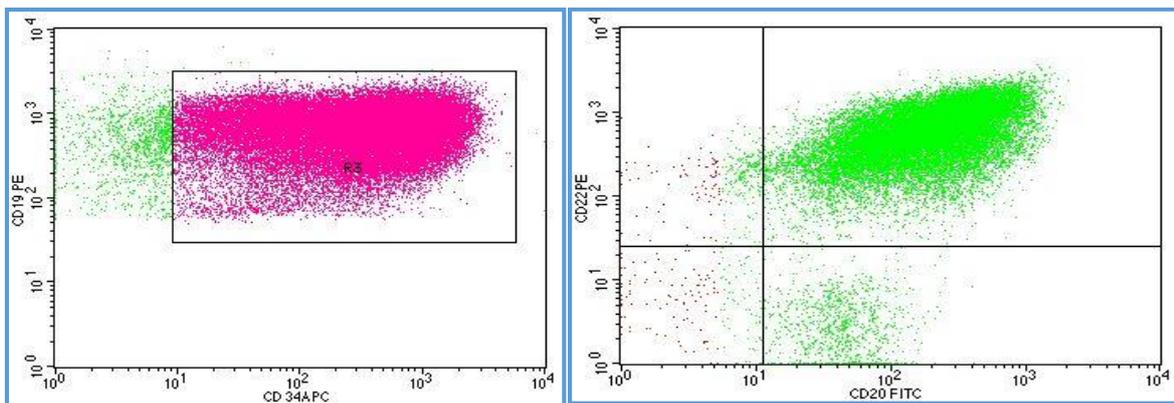


Figure 24: Blastés lymphoïdes B CD19⁺, CD34⁺, CD20⁺ et CD22⁺ (Laboratoire d'hématologie CAC Blida) (Originale)

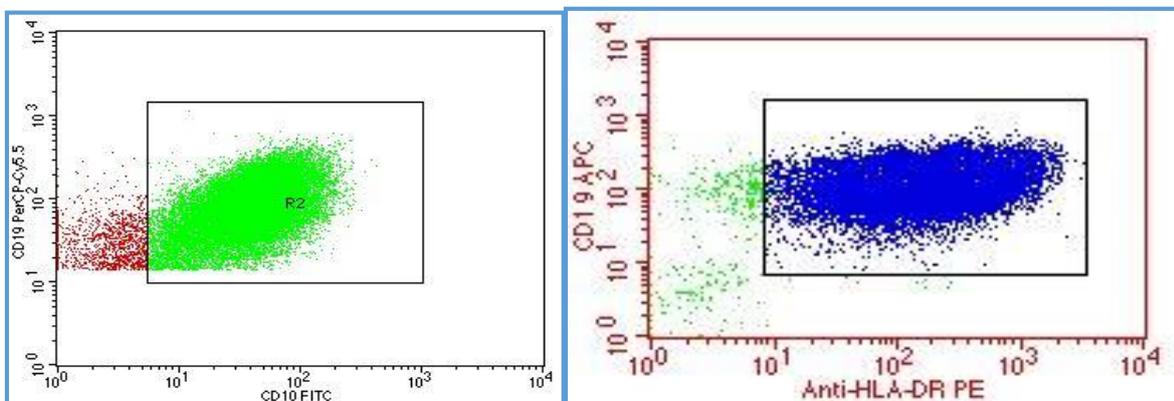


Figure 25: Blastés lymphoïdes B CD19⁺, CD10⁺ et HLA-DR⁺ (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)
(Originale)

CHAPITRE III : RESULTATS

➤ LAL T

Les **figures 26, 27 et 28** représentent la répartition d'expression des marqueurs dans les LAL T.

- **LAL Pro T** : Expression du CD3 intracytoplasmique, CD5+, CD34+ et absence d'expression du CD2, CD7, CD4 et CD8. Dans ce cas, on a un double trou phénotypique (CD2- et CD7-) et une inversion du rapport CD4/CD8.
- **LAL T Cortical** : Expression du CD3 intracytoplasmique, CD5+, CD2+, CD7+, CD8 et absence d'expression du CD4. Dans ce cas, on a une inversion du rapport CD4/CD8.

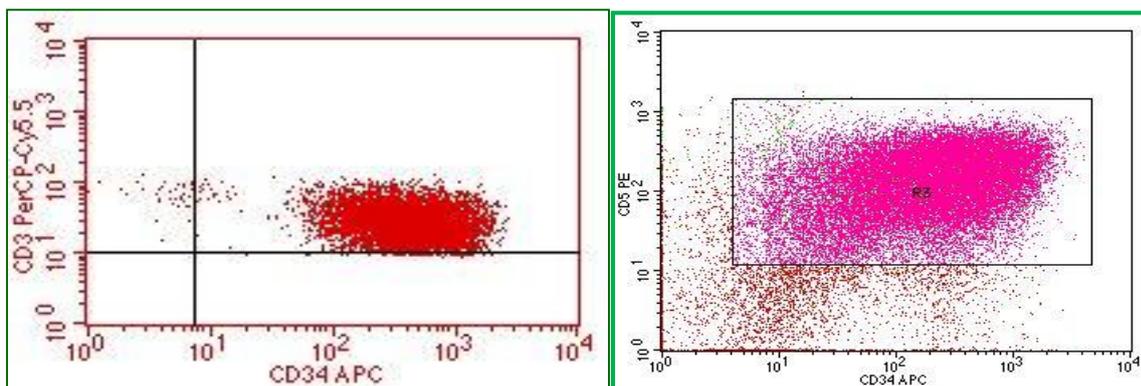


Figure 26: Blastés lymphoïdes T CD3+, CD34+ et CD5+ (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

(Originale)

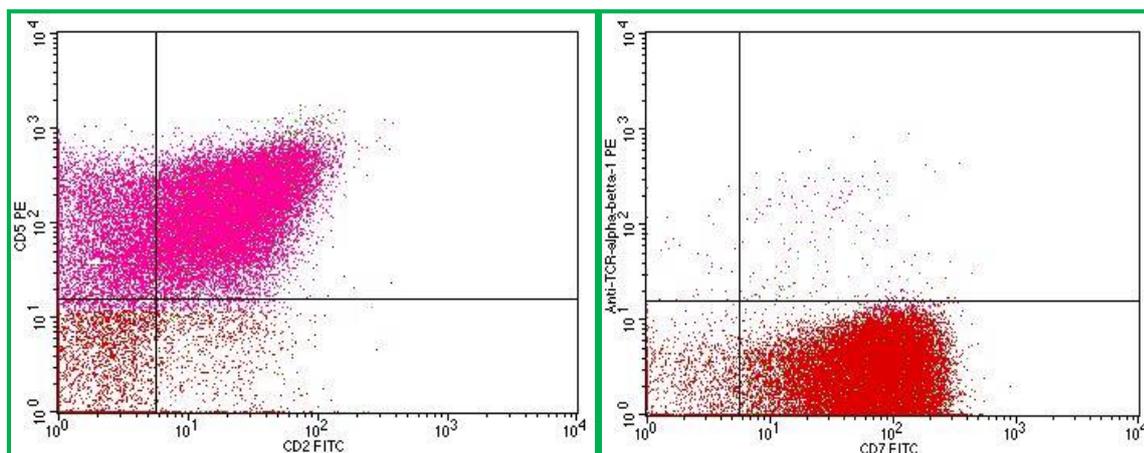


Figure 27: Blastés lymphoïdes T CD5+, CD2+, CD7+ et TCR- (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

(Originale)

CHAPITRE III : RESULTATS

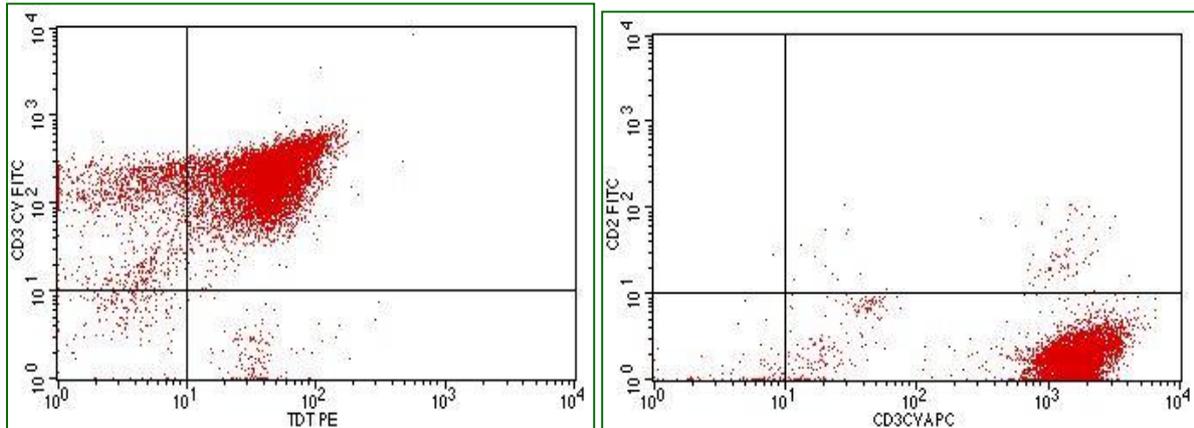


Figure 28: Blastés lymphoïdes T CD3 cy+, TdT+, CD2- (trou phénotypique) (Laboratoire d'hématologie CAC Blida) (Originale)

➤ **LA bi-phénotypique :**

Selon le score de l'EGIL, on distingue 03 groupes qui sont :

LAL B + LAL M : 02 cas

- **Score B à 3,5 et un score M à 4** avec expression des marqueurs lymphoïdes B suivants CD19+, CD79+, TdT et des marqueurs myéloïdes suivants le CD33+, MPO+ et le CD117+.
- **Score B à 7 et un score M à 4,5** avec expression des marqueurs lymphoïdes B suivants CD19+, CD79+, CD22+ , IgM+ et des marqueurs myéloïdes suivants le CD33+, MPO+ et le CD117+.
- Dans les 02 cas expression des marqueurs d'immaturité.
- Absence d'expression du CD20 dans les 02 cas.

LAL T + LAL M : 02 cas

- **Score T à 7 et un score M à 4,5** avec expression des marqueurs lymphoïdes T suivants
- CD3+, TCR+, CD2+, CD7+, CD5+, TdT+ et des marqueurs myéloïdes suivants le CD13+, MPO+, CD15+ et le CD117+.

CHAPITRE III : RESULTATS

- **Score T à 4,5 et un score M à 3** avec expression des marqueurs lymphoïdes T suivants CD3cy+, CD7, CD2+ , CD5+ et des marqueurs myéloïdes suivants le CD33+, CD13+ et le CD117+.
- Dans les 02 cas expression des marqueurs d'immaturation (CD34+ et HLA Dr+).

LAL B+ LAL T : 01 cas

- **Score B 4,5** : expression des marqueurs lymphoïdes B : CD79a, CD22 et le TdT.
- **Score T 5** : expression des marqueurs lymphoïdes T : CD3 de surface, CD3 intracytoplasmique (CD3cy), CD7, CD2, CD5 et TdT.

✓ **Le marqueur CD20**

Le taux d'expression du CD20 dans les LAL B varie de 1,37 à 95% avec une moyenne d'expression de 23%.

- Les Taux d'expression du CD20 dans les LAL B sont représentés dans le **tableau XVI** et les **figures 29 et 30**:

Tableau XVI : Taux d'expression du CD20 dans les LAL B

Patients	P1	P2	P3	P4	P8	P9	P10	P15
CD20	4	91	1,37	1,7	26	37	95	84

CHAPITRE III : RESULTATS

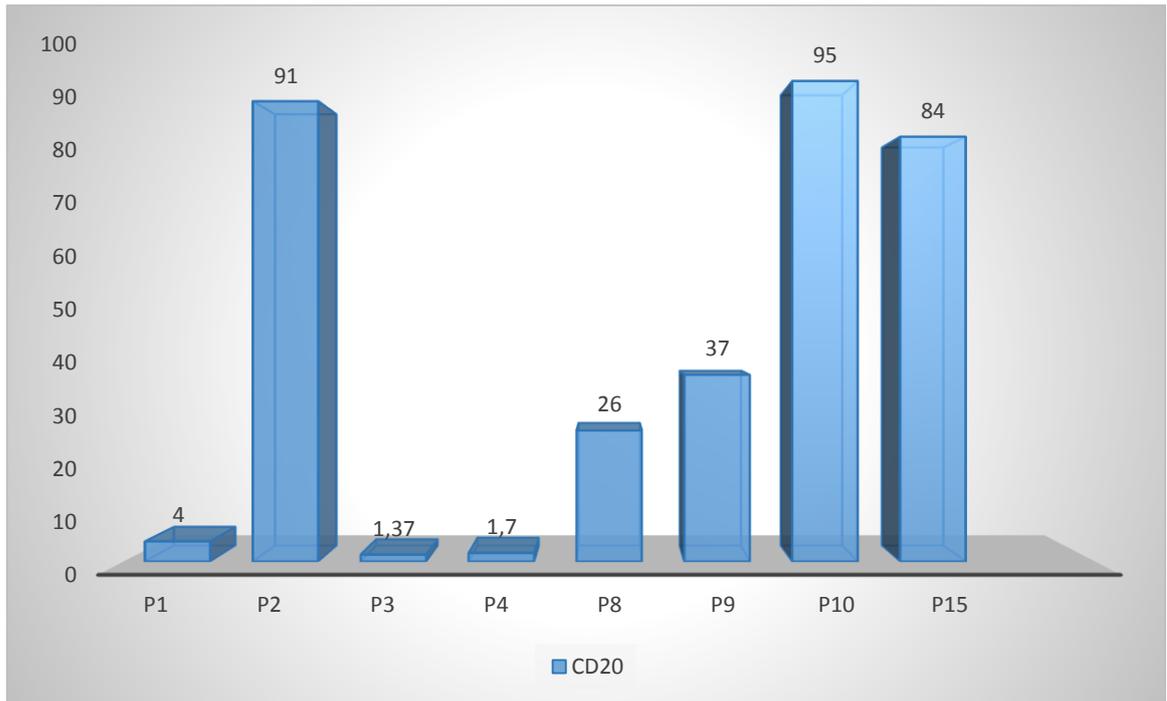


Figure 29: Taux d'expression du marqueur CD20 dans les LAL B

- ✓ Sur les 08 cas de LAL B, le CD20 est exprimé chez 5 patients soit 62,5%.
- ✓ Dans les LAL Biphénotypiques (03 cas) absence d'expression du CD20.

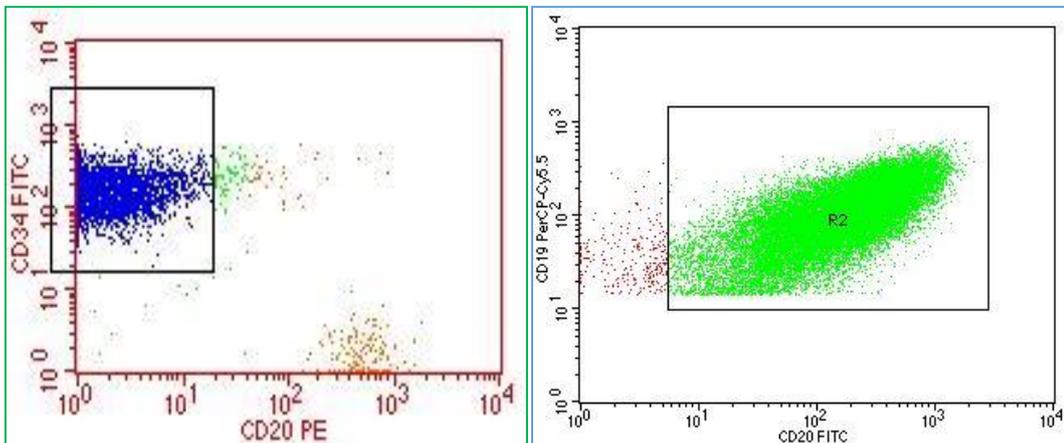


Figure 30: Absence d'expression du CD20 à gauche et CD20++ à droite (Laboratoire d'hématologie CAC Blida) (Originale)

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

IV-Discussion des résultats

Dans notre étude prospective nous avons pu rassembler 15 patients atteints de LA, nous avons analysé les données relative de cette population.

L'immunophénotypage par CMF a permis d'établir le taux d'expression des différents marqueurs à fin d'identifier les différents types de LAL.

Sur les 15 cas analysés par cytométrie en flux, nous avons rapporté 8 cas de LAL B soit 53% des immunophénotypage réalisés. Ces résultats rejoignent les résultats de l'étude d'Oukid qui est de 48,3% sur 112 cas adultes analysés (Oukid et *al.*,2015) .

- **Sexe**

Malgré que le nombre de malades de notre étude est réduit, on note une légère prédominance masculine avec un sex ratio de H /F = 1,14. Ces données sont convergent avec l'étude Zouaoui qui a trouvé un sex ratio de 1,6 (Zouaoui et *al.*, 2013), par contre les deux études d'Oukid et *al* et Taoussi et *al* ont montré une prédominance large du sexe masculin avec un sex ratio de 2,24, et de 2,2, respectivement (Oukid et *al.*, 2015 ;Taoussi et *al.*, 2016). On déduit que la leucémie aigue lymphoblastique touche un peu plus d'hommes que de femmes.

- **Age**

D'après notre étude, l'âge moyen des patients atteints de leucémie aigüe est de 32 ans avec des âges extrêmes de 15 à 71 ans chez les 14 patients ayant un âge >14 ans. Dans l'étude du Zouaoui et *al*, l'âge médian au diagnostic est de 31ans (18 à 87) (Zouaoui et *al.*, 2013).De même une étude effectuée à CAC Blida par Oukid et *al*, montre que la moyenne d'âge est de31,6 ans et des extrémités de 16 à 82 ans (Oukid et *al.*,2015).

- **Cytologie**

Dans notre étude, on note que l'analyse cytologique des cellules blastiques retrouve 53% des cas qui ont évoqués une LAL et rejoignent les données de l'étude d'Oukid et *al* qui ont trouvé un aspect cytologique en faveur d'une LAL dans 63%.

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

- **Prélèvement :**

Dans notre étude, nous avons analysé 12 prélèvements médullaires soit 80% et 20% pour les prélèvements sanguins, ces les données rejoignent l'étude d'Oukid et *al.*, 73,4% pour les prélèvements médullaires et dans 26,6% pour les prélèvements sanguins (Oukid et *al.*, 2015).

- **Résultats de la CMF**

Le **tableau XV** représente une comparaison de nos données à ceux d'autres études :

Tableau XV: Comparaison des résultats de la CMF

Résultats	Notre étude	Oukid 2015	Taoussi 2016	Zouaoui 2013	Kaci 2015
LAL B	53%	48,3%	60%	57%	70%
LAL T	13%	52,7%	38%	38%	30%
LA Bi phénotypique	33%	/	2%	1,8%	/

Dans notre étude sur les LAL On note une prédominance des LAL B à 53% ce qui rejoint les étude de (Taoussi et *al.*, 2016 ; Zouaoui et *al.*, 2013) avec une prédominance des LAL B à 60%, et à 57%, tandis que l'étude d'Oukid a noté une prédominance des LAL T à 52% (Oukid et *al.*, 2015)..

- **Les sous types de LAL**

➤ Les sous types des LAL B comparés avec d'autres études le **tableau XVI** :

Tableau XVI : Classification immunophénotypique des différentes études.

Sous-type	Notre étude	Oukid 2015	Braham 2009
LAL B	2	7	12
LAL Pré B	1	22	44
LAL Pré Pré B	4	17	/
LAL Pro B	1	3	/

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

Dans notre étude note une prédominance des LAL Pré Pré B. Dans l'étude d'Oukid de 2015 et celle du Braham de 2009, Il y a une prédominance des LAL Pré B (Oukid et *al.*, 2015) (Braham et *al.*, 2009).

- Les sous types des LAL T comparés avec d'autres études (**Tableau XVII**) :

Tableau XVII : Comparaison des sous type de LAL T

Sous-type	Notre étude	S. Oukid 2015	N. Braham 2009
LAL T cortical	1	13	12
LAL Pro T	1	13	/
Autres LAL T		32	

Dans l'étude d'Oukid et *al.*, une prédominance des LAL T Mature puis suivi des LAL T Cortical et LAL ProT.

- Analyse des marqueurs
- Fréquence des différents marqueurs dans LAL B :

Tableau XVIII : Comparaison des fréquences d'expression des différents marqueurs dans LAL B

Les marqueurs	Les fréquences	
	notre étude	S.Oukid 2015 (87 LAL)
CD19	100%	95%
CD22	100%	76%
CD79a	100%	/
CD20	63%	44%
CD34	75%	64%
CD10	75%	75%
HLA Dr	100%	97%

CHAPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS

Dans notre étude, nous avons constaté que :

- ✓ Le CD19, CD22 et le CD79a sont exprimé dans 100% des cas et par contre dans l'étude d'Oukid et *al* en 2015 le CD19 est exprimé à 95% et le CD22 à 76%.
- ✓ Pour le CD20, il est exprimé chez 5/8 patients soit 63% des cas un taux supérieurs aux taux analysé par le Oukid et *al* en 2015 de 44%.
- ✓ Pour le CD10, et les marqueurs d'immaturités, leurs expressions. Ces résultats rejoignent ceux de l'étude d'Oukid et *al* en 2015.
- ✓ Cette différence d'expression peut être expliquée en partie par le nombre des patients de notre étude qui est réduit.

➤ **Fréquence des différents marqueurs dans LAL T**

Dans notre étude, nous rapportons 02 cas de LAL et notons un trou phénotypique du CD7- et CD2- dans un cas et une inversion du rapport CD4/CD8 dans les 02 cas.

Dans l'étude d'Oukid en 2015, il a été enregistré un trou phénotypique dans 33% des cas pour le CD2, dans 14.5% pour le CD5 et dans 4.7% pour le CD7.

• **Le marqueur CD20**

Le CD20 est un facteur pronostique de la LAL dont l'expression permet de prévoir la progression de la maladie, la réponse thérapeutique et la survie selon l'essai clinique GRAALL-2005. Dans notre étude, ce facteur est exprimé chez 5 patients avec une expression forte chez 3 cas, expression faible chez 2 cas.

Dans l'étude de Lamraoui et *al* qui a colligé 13 cas (31%) de LAL B CD20+ sur 42 cas de LAL B, 11 cas ont rentré en rémission après adjonction d'un Anti CD20 à la chimiothérapie (Lamraoui et *al.*, 2020).

CONCLUSION

Conclusion

Nous avons effectué un stage de 02 mois au sein du d'hématologie du CAC de Blida qui nous a permis de déterminer l'importance et l'utilité de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans le diagnostic de la leucémie aigue lymphoblastique.

Dans notre étude nous avons pu avoir et acquérir un bagage théorique qui nous a permet de mieux connaitre la leucémie aigue lymphoblastique à savoir sur son épidémiologie, etiopathogénie, physiopathologie, la présentation clinique et biologique et sur son évolution.

De plus nous avons acquis un bagage expérimental tout en réalisant l'immunophénotypage par cytométrie en flux qui est une technique simple et rapide si l'on pratique en respectant les règles d'utilisation et en suivant les étapes de manipulation des différents marqueurs nécessaire à notre étude.

Nous avons analysé 15 cas de LAL avec une moyenne d'âge de 32 ans et une légère prédominance masculine avec un sex ratio de 1,14. Les résultats de la CMF ont révélé qu'il y'a une prédominance de LAL B avec 8 cas soit (54%) ,2 cas de LAL T soit (13%) et 5 cas de LA Bi phénotypique soit (33%) ,la CMF reste toujours un moyen indispensable pour le diagnostic des LA car elle complète les examens cytologique et cytochimique, elle a souvent été utile dans l'affirmation du type de LA mais aussi dans la précision du phénotype B ou T ou autres et enfin l'orientation thérapeutique .

Notre deuxième but était l'analyse de l'expression du marqueur CD 20 qui est considéré par plusieurs études comme un facteur de mauvais pronostique. Dans notre travail, sur les 8 cas de LAL B, le CD20 est exprimé chez 5 patients soit 62,5% et dans les LAL bi-phénotypique (3 cas) il y a absence de son expression.

Actuellement, la CMF est de plus en plus utilisée par les différents laboratoires soit comme une technique de routine pour le diagnostic des hémopathies, la recherche des facteurs de pronostique ou la recherche des cibles thérapeutiques.

Références

1. Bain, Barbara J. (2005). Diagnosis from the Blood Smear. *New England Journal of Medicine*, 353, p 498-507.
2. Baruchel A, Leblanc T. (2015). Leucémies aiguës de l'enfant et de l'adolescent. Parcours de soins. *Le concours médical*. Tome 137, 9, p 695-735.
3. Bassot L. (2018). Évaluation de la cytométrie en flux pour le suivi de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant au CHU de Rouen. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Rouen Normandie UFR sante. France. p 154.
4. Béné et al. (2015). Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires, Hématologie leucémies aiguës*, 471, p 35-41.
5. Bories P. (2018). Épidémiologie des leucémies aiguës myéloblastiques. Leucémie aiguë myéloblastique (LAM). *Horizons Hémato*, 08, p 1-3.
6. Boross P, Leusen J.H.W (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*, 2, p 676-690.
7. Camille M. (2015). Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosine kinases et mise en place d'une technique de dosage. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier. France. p 150.
8. Canadian Cancer Society. (2020). What is acute lymphocytic leukemia? - Consulté le 4 juillet 2020, à l'adresse <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia-acute-lymphocytic-all/acute-lymphocytic-leukemia/?region=on>
9. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, Cappellini A, Neri L M, McCubrey J A, Martelli A M. (2016). Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1963, p 449-463.
10. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C. (2016). Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863, p 449-463.
11. Clappier E, Ludovic L, Rathana K. (2020). La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës lymphoblastiques : aspects biologiques. *Hématologie*, 26, p 25-38.

12. Clinis science, Anti-CD20 CE/IVD pour IHC - Pathologies hématologiques .
URL : <https://www.clinisciences.com/achat/cat-anti-cd20-ce-ivd-pour-ihc-pathologies-4395.html>
(page consultè le 02.08.2020).
13. Coster L. (2018). Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques: perspectives et limites. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Toulouse III Paul Sabatier. France. p 90.
14. Debleds V, Lagarda C. (2005). Mesure par cytométrie en flux de l'activation in vitro des basophiles par des allergènes. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Française des Laboratoires*, 370, p 57-60.
15. Doumbia M, Uwingabiye J, Bissan A, Rachid R, Benkirane S, Masrar A. (2018). Aspects épidémiologiques, cliniques, cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës chez les enfants: expérience du laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire IBN Sina. *Pan Afr Med J*, 23, p 258.
16. Doval C. (2015). La leucémie aiguë lymphoblastique chez l'enfant: Physiopathologie, états actuels des traitements et perspectives d'avenir. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Picardie Jules Verne. France. p 85.
17. EL Jouaidi S. (2016). Diagnostique biologique des leucémies aiguës. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed 5 Rabat. Maroc. p 18.
18. Emadi A, Law J.Y. (2018). Revue générale des leucémies. URL : <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/h%C3%A9matologie-et-oncologie/leuc%C3%A9mies/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-leuc%C3%A9mies>
19. Farnault L, Boudjarane J, Baccini V, Costello R. (2015). Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. *EMC- Hématologie*, 10, p 1-14.
20. Gamonet C. (2015). Identification de nouveaux transcrits alternatifs du gène CD20 humain, différenciellement exprimés dans les hémopathies impliquant le lymphocyte B. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. Ecole Doctorale Homme Environnement Santé. France. p 210.
21. Godley L.A, Larson R.A. (2008). Therapy-related Myeloid Leukemia. *Semin Oncol*, 35, p 418-429.
22. Goubet A.G, Derosa L, Marabelle A, Zitvogel L. (2018). Anticorps monoclonaux en oncologie: déclencher une réponse immunitaire en plus de la réduction tumorale spécifique. *Communication.Bull. Acad. Natle Méd.*, 202, p 707-735.
23. Hafez M, Al-Tonbary Y, El-Bayoumi M.A, Hatem N, Hawas S, Mansour A, Marzouk I, Hafez M.M, Yahia S, Farahat N. (2007). Markers of apoptosis and proliferation related gene products as

- predictors of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 12, p 209-218.
24. Iobagiu F, Lambert Z. (2009). La cytométrie et ses applications. *Revue Francophone des Laboratoires*, 410, p 23-32.
 25. Jmili, N. Braham, S. Souguir, S. Yacoub, A. Khelif, et M. Kortas. « Etude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques : analyse de 152 cas par cytométrie en flux ». *Annales de Biologie Clinique*, 67, p 543-551.
 26. Khattar M. (2014). Profile épidémiologique et cytologique des leucémies aiguës chez l'enfant étude rétrospective effectuée au laboratoire central d'hématologie de l'hôpital Ibn Sina Rabat. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed 5 Rabat. Maroc. p 168.
 27. La cytométrie en flux [en ligne]. URL: [http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm/consulté 03/11/2011](http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm/consulté%2003/11/2011)
 28. Lachachi S. (2018). Profils épidémiologique et biologique des leucémies aiguës chez l'adulte au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Abou BekrBelkaïd de Tlemcen. Algérie. p 149.
 29. Lees O. (2000). Immunophénotypage: apport de la cytométrie en flux à la biologie clinique. *Revue Française des Laboratoires*, 327, p 91-103.
 30. Lucie C. (2018). Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques : perspectives et limites. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Toulouse III Paul Sabatier. France. p 90.
 31. Lamraoui F, Rekab N, Benlabiod KM, Taoussi Souad, Oukid S, Mezroud M, Ziani Ahmed A, Rebouh A, Brahim H, Bouchakor MY, Boucherit C, Guezlane C, Abad Mohand T, Bradai M. (2020). L'adjonction du Rituximab dans le traitement des LAL B Philadelphie négatives CD20 positives. Service d'hématologie EHS ELCC CAC Blida. laboratoire de recherche sur les hemopathies malignes et les hemoglobinopathies. Faculté de médecine, université de Blida Algerie. *SFH*.
 32. Mahon F.X. (2001). Leucémie myéloïde chronique et inhibiteurs de tyrosinekinase. *RevMéd Interne*, 22, p 894-899.
 33. Marti G, Stetler-Stevenson M, Bleasing J. (2001). Introduction to flow cytometry: *SeminHematol*, 38, p 93-99.
 34. Mayola E. (2011). Etudes des mécanismes de mort cellulaire et résistance des cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques: modèle du mélanome. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Paris XI. France. p 202.

35. Allouda M, Gherras S, Ait Ali H, Hamdi S, Ahmed Nacer R, Hamladji RM, Kaci Z, Boudjerra N, Belhani M, Sidi Mansour N, Saidi M, Mehalhal N, Taoussi S, Abad MT, Bendjaballah B, Mesli N. Evaluation du protocole Linker dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte étude multicentrique. *Société Algérienne d'hématologie et de Transfusion Sanguine*, 1, p 50-62.
36. Nebe T, Bettelheim B, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I, Matutes E, Maynadié M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu A.M, Zini G, Faure G.C, Prwit A. (2011). Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*, 25, p 567-574.
37. Nunez R. (2001). Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. *Curr Issues Mol. Biol*, 3, p 39-45.
38. Rahman M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Serotec Ltd edition.
39. Rajoely NB, Gaouar H, Leynadier F. (2004). Contribution de la cytométrie en flux au diagnostic d'une allergie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 44, p 37-44.
40. Riley SD, Edwin M, Mahin J. (1988). Clinical applications of flow cytometry. ASCP national meeting, Las Vegas, Nevada, 24, p 5-7.
41. Robinson JP, Gregori G. (2006). Principles of Flow Cytometry: In flow cytometry with plant cells. Dolezel, Greilhuber, Suda (Eds.), 26, p24-26.
42. La société de la leucémie. URL: <http://cmlsociety.org/comprendre-la-lmc/?lang=fr>
43. S. Oukid, S. Taoussi, F. Lamraoui, N. Hendaoui, K.M. Benlabiod, N. Rekab, Y.M. Bouchakor, H. Brahimi, C. Boucherit, M. Mezroud, C. Guezlane, M.T. Abad. Profil phénotypique des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) dans la région de Blida. Service Hématologie, EHS ELCC CAC Blida. Université de Blida I, Algérie XIIème congrès national de la SAHTS du 01 au 03 Octobre 2015.
44. Wulff S. (2006). Guide to flow cytometry/ 2nd Edition Dako. p 68.
45. Xiong Y. (2016). Impact du G-CSF sur le phénotype et les fonctions des cellules NK dans le cadre d'une immunothérapie post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Thèse de Doctorat en sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lorraine. France. p 227.
46. Zouaoui Z, Benlazar M, Taleb M, Bentahar Z, Hamdi S, Benlabiod K.M, Abad M.T, Zouiten M, Grifi F, Akrouf S, Ahmed Nacer R, Hamladji R.M, Kaci Z, Boudjerra N, BelhaniM, Krim M, Bekadja MA, Allouda M, Ait Ali H, Aiche M, Saidi M, Bouabdallah S, Sidi Mansour N, Zouani S, Touhami H, Chalabi H, Mehalhel N, Talbi F, Ardjoun F.Z, Benzineb B, Mesli N. (2016). Etude épidémiologique nationale des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte (LAL) travail

coopératif du groupe Algérien d'étude des LAL sur une période de 04 ans (Jan 2010 –Dec 2013).
Revue Algérienne d'Hématologie, 12, p 5-9.

- 47.** Zouaoui Z. Benlazar M et al. Etude epidemiologique nationale des leucémies aigues lymphoblastiques de l'adulte (LAL) travail coopératif du groupe algérien d'étude des LAL sur une période de 04 ans (Jan 2010-Dec 2013).

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 :

II.1.2.1- Equipement spécifique

Nous avons utilisé un cytomètre en flux à 04 couleurs de type FACSCalibur Becton- Dickinson (BD), avec deux lasers (**Figure 8**).



Figure 8: Cytomètre en flux FACS Calibur BD (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

II.1.2.2- Equipement non spécifique

- **Pour L'appareillage**

Nous avons utilisé:

- ✓ Un automate pour hématimètre de type Sysmex ou l'analyseur d'hématologie qui est un appareil permettant d'effectuer une numération de formule sanguine (NFS) ou hémogramme (**Figure 9**). Il effectue une analyse quantitative et qualitative des éléments figurés du sang : globules rouges (érythrocytes), globules blancs (leucocytes) et plaquettes (thrombocytes).



Figure 9: Sysmex (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

✓ Une centrifugeuse réfrigérée de paillasse qui est une centrifugeuse qui nous permet de centrifuger des substances fragiles (ex. cellules, anticorps...) et un Agitateur rotatoire de type Vortex (Figure 10).



Figure 10: centrifugeuse réfrigérée (Gauche) et Vortex à droite (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

- ✓ Un Réfrigérateur pour mettre au frais nos solutions car ils ne supportent pas la chaleur.
- ✓ Un chronomètre.

- **Matériel consommable**

Pour le matériel consommable nous avons utilisé:

✓ Des tubes Falcon de 5ml (adaptables au cytomètre) qui sont des éléments essentiels
 Pour l'isolation, la stratification ou la séparation en gradients de densité d'échantillons lors de l'utilisation de centrifugeuses.

- ✓ Pointes jaunes et bleus.
- ✓ Des portoirs pour la suspension des tubes
- ✓ Des pipettes (20 µl, 100 µl, 500 µl, 2000 µl).

II.1.2.3- Réactifs

1/ – Les solutions (Tableau VI)

Tableau VI: Les différentes solutions utilisées par le cytomètre en flux

Solutions	Rôles
FACS Flow	Liquide de gaine ou liquide vecteur
FACS Lysing	Liquide qui détruit les globules rouges
FACS Rinse	Liquide qui permet le rinçage des tubulures du cytomètre
FACS Clean	Liquide qui désinfecte les tubulures du cytomètre
L'eau distillée	Liquide qui permet la protection de l'aiguille du cytomètre
Cell Wash	Solution tampon pour le lavage des cellules

2/- Billes de calibration

La CaliBRITE 3 se présente sous forme d'un kit tricolore accompagné d'un flacon de l'APC (Tableau VII) (Figure 11).

Tableau VII: Récapitulatif des billes de calibration couplées à des fluorochromes

Flacon	Billes
Blanc	Contient des billes Qui représentent les cellules non marquées
Vert	Contient des billes couplées au fluorochrome FITC
Rouge	Contient des billes couplées au fluorochrome PE
Rose	Contient des billes couplées au fluorochrome PerCP
Bleu	Contient des billes couplées au fluorochrome APC



Figure 11: CaliBRITE 3 (Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

3/- Anticorps monoclonaux conjugués aux fluorochromes

➤ Les contrôles isotypiques

Ce sont des anticorps monoclonaux qui ont le même isotype, même concentration et même protocole que les anticorps monoclonaux conjugués aux différents fluorochromes (**FITC**, **PE**, **PerCPCy 5**, **APC**), leur but est d'occuper les liaisons non spécifiques à fin de mieux déterminer les régions négatives des régions positives, tout en se liant aux chaînes lourdes gamma 1 et 2 des immunoglobulines.

➤ Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des CD qui sont spécifiques à un antigène (Ag) donné (**Tableau VIII**) (**Figure 12**), il en existe quatre types :

- 1- L'isothiocyanate de fluorescéine (**FITC**) qui correspond à la couleur verte.
- 2- La phycoérythrine (**PE**) qui correspond à la couleur rouge.
- 3- La péridinine chlorophylle (**PerCP**) qui correspond à la couleur mauve.
- 4- L'allophycocyanine (**APC**) qui correspond à la couleur bleue.

Tableau VIII: Les marqueurs utilisés pour les différentes lignées

Anticorps monoclonaux	
Lignée cellulaire	Marqueurs
Lymphoïde B	CD 19,CD22,CD20,CD79b, FMC7,CD23,Chaînes légères Kappa et Lambda,IgM,IgG

Lymphoïde T	CD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8
Lymphoïde NK	CD16, CD56
Myéloïde	CD13, CD33, CD117, CD15
Marqueurs d'immaturité	CD34, HLADR



Figure 12: Les anticorps monoclonaux (04 couleurs)
(Laboratoire d'hématologie CAC Blida)

Annexe 03 : Procédures d'allumage, d'arrêt et de maintenance du cytomètre en flux

- **Acquisition des calibrations à l'aide du logiciel FACS Comp :**

- Sur le système informatique du cytomètre, on met en marche le 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 (**Annexe 03**).
- Répéter l'opération en cas de non réussite, si non faire appel à l'équipe de maintenance.

➤ **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 3ml 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)

