

UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT

ANNEE : 2012

THESE N° : 35

APPLICATIONS DE LA CYTOMÉTRIE
EN FLUX DANS LES LEUCÉMIES AIGÜES

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

M^{lle} Ouafae IBBA

Née le 01 août 1986 à Nador

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN
PHARMACIE

MOTS CLES : Cytométrie en flux- Leucémie aiguë- Diagnostic- Maladie
résiduelle

MEMBRES DE JURY

Mr. A. BELMEKKI

Professeur d'hématologie

Mr. A. MASRAR

Professeur agrégé d'hématologie biologique

Mme. N. MESSAOUDI

Professeur agrégé d'hématologie biologique

Mme. M. NAZIH

Professeur agrégé d'hématologie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِكَ مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT
Conservateur : Ahmed ZAHIDI

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLI Abdeslam Neurochirurgie
4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie – Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

- 11. Pr. ABROUQ Ali*
- 12. Pr. BENOMAR M'hammed
- 13. Pr. BENSOUA Mohamed
- 14. Pr. BENOSMAN Abdellatif
- 15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Oto-Rhino-Laryngologie
Chirurgie-Cardio-Vasculaire
Anatomie
Chirurgie Thoracique
Physiologie

Novembre 1983

- 16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*
- 17. Pr. BALAFREJ Amina
- 18. Pr. BELLAKHDAR Fouad
- 19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia
- 20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Neurochirurgie
Rhumatologie
Cardiologie

Décembre 1984

- 21. Pr. BOUCETTA Mohamed*
- 22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil
- 23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz
- 24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
- 25. Pr. NAJI M'Barek *
- 26. Pr. SETTAF Abdellatif

Neurochirurgie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Immuno-Hématologie
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

- 27. Pr. BENJELLOUN Halima
- 28. Pr. BENS Aid Younes
- 29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
- 30. Pr. IHRAI Hssain *
- 31. Pr. IRAQI Ghali
- 32. Pr. KZADRI Mohamed

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

- 33. Pr. AJANA Ali
- 34. Pr. AMMAR Fanid
- 35. Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép.TAOBANE
- 36. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq
- 37. Pr. EL HAITEM Naïma
- 38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*
- 39. Pr. EL YAACOUBI Moradh
- 40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
- 41. Pr. LACHKAR Hassan
- 42. Pr. OHAYON Victor*

Radiologie
Pathologie Chirurgicale
Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Cardiologie
Chimie-Toxicologie Expertise
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Médecine Interne

43. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib

Chirurgie Pédiatrique

45. Pr. DAFIRI Rachida

Radiologie

46. Pr. FAIK Mohamed

Urologie

47. Pr. HERMAS Mohamed

Traumatologie Orthopédie

48. Pr. TOLOUNE Farida*

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed

Médecine Interne

50. Pr. AOUNI Mohamed

Médecine Interne

51. Pr. BENAMEUR Mohamed*

Radiologie

52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali

Cardiologie

53. Pr. CHAD Bouziane

Pathologie Chirurgicale

54. Pr. CHKOFF Rachid

Urologie

55. Pr. KHARBACH Aïcha

Gynécologie -Obstétrique

56. Pr. MANSOURI Fatima

Anatomie-Pathologique

57. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Neurologie

58. Pr. SEDRATI Omar*

Dermatologie

59. Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

60. Pr. AL HAMANY Zaïtounia

Anatomie-Pathologique

61. Pr. ATMANI Mohamed*

Anesthésie Réanimation

62. Pr. AZZOUZI Abderrahim

Anesthésie Réanimation

63. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM

Néphrologie

64. Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Chirurgie Générale

65. Pr. BENABDELLAH Chahrazad

Hématologie

66. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif

Chirurgie Générale

67. Pr. BENSOUDA Yahia

Pharmacie galénique

68. Pr. BERRAHO Amina

Ophtalmologie

69. Pr. BEZZAD Rachid

Gynécologie Obstétrique

70. Pr. CHABRAOUI Layachi

Biochimie et Chimie

71. Pr. CHANA El Houssaine*

Ophtalmologie

72. Pr. CHERRAH Yahia

Pharmacologie

73. Pr. CHOKAIRI Omar

Histologie Embryologie

74. Pr. FAJRI Ahmed*

Psychiatrie

75. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*

Chirurgie Générale

76. Pr. KHATTAB Mohamed

Pédiatrie

77. Pr. NEJMI Maati

Anesthésie-Réanimation

78. Pr. OUAALINE Mohammed*

Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène

79. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH

Pharmacologie

80. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

- 81. Pr. AHALLAT Mohamed
- 82. Pr. BENOUDA Amina
- 83. Pr. BENSOUDA Adil
- 84. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
- 85. Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
- 86. Pr. CHRAIBI Chafiq
- 87. Pr. DAOUDI Rajae
- 88. Pr. DEHAYNI Mohamed*
- 89. Pr. EL HADDOURY Mohamed
- 90. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
- 91. Pr. FELLAT Rokaya
- 92. Pr. GHAFIR Driss*
- 93. Pr. JIDDANE Mohamed
- 94. Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
- 95. Pr. TAGHY Ahmed
- 96. Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale
Microbiologie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie Réanimation
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

- 97. Pr. AGNAOU Lahcen
- 98. Pr. AL BAROUDI Saad
- 99. Pr. BENCHERIFA Fatiha
- 100. Pr. BENJAAFAR Nouredine
- 101. Pr. BENJELLOUN Samir
- 102. Pr. BEN RAIS Nozha
- 103. Pr. CAOUI Malika
- 104. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
- 105. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
- 106. Pr. EL AOUAD Rajae
- 107. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
- 108. Pr. EL HASSANI My Rachid
- 109. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur
- 110. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
- 111. Pr. ERROUGANI Abdelkader
- 112. Pr. ESSAKALI Malika
- 113. Pr. ETTAYEBI Fouad
- 114. Pr. HADRI Larbi*
- 115. Pr. HASSAM Badredine
- 116. Pr. IFRINE Lahssan

Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Radiothérapie
Chirurgie Générale
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Cardio- Vasculaire
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale

- 117. Pr. JELTHI Ahmed
- 118. Pr. MAHFOUD Mustapha
- 119. Pr. MOUDENE Ahmed*
- 120. Pr. OULBACHA Said
- 121. Pr. RHRAB Brahim
- 122. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
- 123.** Pr. SLAOUI Anas

Anatomie Pathologique
 Traumatologie – Orthopédie
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie –Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

- 124. Pr. ABBAR Mohamed*
- 125. Pr. ABDELHAK M'barek
- 126. Pr. BELAIDI Halima
- 127. Pr. BRAHMI Rida Slimane
- 128. Pr. BENTAHILA Abdelali
- 129. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
- 130. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
- 131. Pr. CHAMI Ilham
- 132. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
- 133. Pr. EL ABBADI Najia
- 134. Pr. HANINE Ahmed*
- 135. Pr. JALIL Abdelouahed
- 136. Pr. LAKHDAR Amina
- 137.** Pr. MOUANE Nezha

Urologie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Neurologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Gynécologie – Obstétrique
 Traumatologie – Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Neurochirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Mars 1995

- 138. Pr. ABOUQUAL Redouane
- 139. Pr. AMRAOUI Mohamed
- 140. Pr. BAIDADA Abdelaziz
- 141. Pr. BARGACH Samir
- 142. Pr. BEDDOUCHE Amocrane*
- 143. Pr. BENAZZOUZ Mustapha
- 144. Pr. CHAARI Jilali*
- 145. Pr. DIMOU M'barek*
- 146. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
- 147. Pr. EL MESNAOUI Abbes
- 148. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
- 149. Pr. FERHATI Driss
- 150. Pr. HASSOUNI Fadil
- 151. Pr. HDA Abdelhamid*
- 152. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
- 153. Pr. IBRAHIMY Wafaa
- 154. Pr. MANSOURI Aziz

Réanimation Médicale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Gastro-Entérologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gynécologie Obstétrique
 Médecine Préventive et Santé Publique
 Cardiologie
 Urologie
 Ophtalmologie
 Radiothérapie

155. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia
 156. Pr. RZIN Abdelkader*
 157. Pr. SEFIANI Abdelaziz
 158. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Ophtalmologie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Génétique
 Réanimation Médicale

Décembre 1996

159. Pr. AMIL Touriya*
 160. Pr. BELKACEM Rachid
 161. Pr. BELMAHI Amin
 162. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
 163. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
 164. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
 165. Pr. GAOUZI Ahmed
 166. Pr. MAHFOUDI M'barek*
 167. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
 168. Pr. MOHAMMADI Mohamed
 169. Pr. MOULINE Soumaya
 170. Pr. OUADGHIRI Mohamed
 171. Pr. OUZEDDOUN Naima
 172. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Chirurgie réparatrice et plastique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Parasitologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumo-phthisiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie

Novembre 1997

173. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
 174. Pr. BEN AMAR Abdesslem
 175. Pr. BEN SLIMANE Lounis
 176. Pr. BIROUK Nazha
 177. Pr. BOULAICH Mohamed
 178. Pr. CHAOUIR Souad*
 179. Pr. DERRAZ Said
 180. Pr. ERREIMI Naima
 181. Pr. FELLAT Nadia
 182. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
 183. Pr. HAIMEUR Charki*
 184. Pr. KANOUNI NAWAL
 185. Pr. KOUTANI Abdellatif
 186. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
 187. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
 188. Pr. NAZI M'barek*
 189. Pr. OUAHABI Hamid*
 190. Pr. SAFI Lahcen*
 191. Pr. TAOUFIQ Jallal
 192. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Neurologie
 O.R.L.
 Radiologie
 Neurochirurgie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Radiologie
 Anesthésie Réanimation
 Physiologie
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Neurologie
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

- 193. Pr. AFIFI RAJAA
- 194. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
- 195. Pr. ALOUANE Mohammed*
- 196. Pr. BENOMAR ALI
- 197. Pr. BOUGTAB Abdesslam
- 198. Pr. ER RIHANI Hassan
- 199. Pr. EZZAITOUNI Fatima
- 200. Pr. KABBAJ Najat
- 201. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-Laryngologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

- 202. Pr. BENKIRANE Majid*
- 203. Pr. KHATOURI ALI*
- 204. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

- 205. Pr. ABID Ahmed*
- 206. Pr. AIT OUMAR Hassan
- 207. Pr. BENCHERIF My Zahid
- 208. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
- 209. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
- 210. Pr. CHAOUI Zineb
- 211. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
- 212. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
- 213. Pr. EL FTOUH Mustapha
- 214. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
- 215. Pr. EL OTMANY Azzedine
- 216. Pr. GHANNAM Rachid
- 217. Pr. HAMMANI Lahcen
- 218. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
- 219. Pr. ISMAILI Hassane*
- 220. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
- 221. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
- 222. Pr. TACHINANTE Rajae
- 223. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

- 224. Pr. AIDI Saadia
- 225. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
- 226. Pr. AJANA Fatima Zohra
- 227. Pr. BENAMR Said
- 228. Pr. BENCHEKROUN Nabih

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie

229. Pr. CHERTI Mohammed
 230. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
 231. Pr. EL HASSANI Amine
 232. Pr. EL IDGHIRI Hassan
 233. Pr. EL KHADER Khalid
 234. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
 235. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
 236. Pr. HSSAIDA Rachid*
 237. Pr. LACHKAR Azzouz
 238. Pr. LAHLOU Abdou
 239. Pr. MAFTAH Mohamed*
 240. Pr. MAHASSINI Najat
 241. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
 242. Pr. NASSIH Mohamed*
 243. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Pédiatrie
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Urologie
 Rhumatologie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Anesthésie-Réanimation
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Neurochirurgie
 Anatomie Pathologique
 Pédiatrie
 Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
 Neurologie

Décembre 2001

244. Pr. ABABOU Adil
 245. Pr. AOUAD Aicha
 246. Pr. BALKHI Hicham*
 247. Pr. BELMEKKI Mohammed
 248. Pr. BENABDELJLIL Maria
 249. Pr. BENAMAR Loubna
 250. Pr. BENAMOR Jouda
 251. Pr. BENELBARHDADI Imane
 252. Pr. BENNANI Rajae
 253. Pr. BENOUACHANE Thami
 254. Pr. BENYOUSSEF Khalil
 255. Pr. BERRADA Rachid
 256. Pr. BEZZA Ahmed*
 257. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 258. Pr. BOUHOUCHE Rachida
 259. Pr. BOUMDIN El Hassane*
 260. Pr. CHAT Latifa
 261. Pr. CHELLAOUI Mounia
 262. Pr. DAALI Mustapha*
 263. Pr. DRISSI Sidi Mourad*
 264. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
 265. Pr. EL HIJRI Ahmed
 266. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 267. Pr. EL MADHI Tarik
 268. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
 269. Pr. EL OUNANI Mohamed
 270. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil

Anesthésie-Réanimation
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Néphrologie
 Pneumo-phtisiologie
 Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Rhumatologie
 Anatomie
 Cardiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie

271. Pr. ETTAIR Said
 272. Pr. GAZZAZ Miloudi*
 273. Pr. GOURINDA Hassan
 274. Pr. HRORA Abdelmalek
 275. Pr. KABBAJ Saad
 276. Pr. KABIRI EL Hassane*
 277. Pr. LAMRANI Moulay Omar
 278. Pr. LEKEHAL Brahim
 279. Pr. MAHASSIN Fattouma*
 280. Pr. MEDARHRI Jalil
 281. Pr. MIKDAME Mohammed*
 282. Pr. MOHSINE Raouf
 283. Pr. NABIL Samira
 284. Pr. NOUINI Yassine
 285. Pr. OUALIM Zouhir*
 286. Pr. SABBAH Farid
 287. Pr. SEFIANI Yasser
 288. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
289. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Décembre 2002

290. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 291. Pr. AMEUR Ahmed *
 292. Pr. AMRI Rachida
 293. Pr. AOURLARH Aziz*
 294. Pr. BAMOU Youssef *
 295. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 296. Pr. BENBOUAZZA Karima
 297. Pr. BENZEKRI Laila
 298. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 299. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 300. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 301. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 302. Pr. CHKIRATE Bouchra
 303. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 304. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 305. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 306. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 307. Pr. EL MANSARI Omar*
 308. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 309. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 310. Pr. HADDOUR Leila
 311. Pr. HAJJI Zakia
 312. Pr. IKEN Ali

Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Rhumatologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie

313. Pr. ISMAEL Farid
 314. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 315. Pr. KRIOULE Yamina
 316. Pr. LAGHMARI Mina
 317. Pr. MABROUK Hfid*
 318. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 319. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 320. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 321. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 322. Pr. OUJILAL Abdelilah
 323. Pr. RACHID Khalid *
 324. Pr. RAISS Mohamed
 325. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 326. Pr. RHOUE Hakima
 327. Pr. SIAH Samir *
 328. Pr. THIMOU Amal
 329. Pr. ZENTAR Aziz*
 330. Pr. ZRARA Ibtisam*

Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

331. Pr. ABDELLAH El Hassan
 332. Pr. AMRANI Mariam
 333. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 334. Pr. BENKIRANE Ahmed*
 335. Pr. BENRAMDANE Larbi*
 336. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 337. Pr. BOULAADAS Malik
 338. Pr. BOURAZZA Ahmed*
 339. Pr. CHAGAR Belkacem*
 340. Pr. CHERRADI Nadia
 341. Pr. EL FENNI Jamal*
 342. Pr. EL HANCHI ZAKI
 343. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 344. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 345. Pr. HACHI Hafid
 346. Pr. JABOUIRIK Fatima
 347. Pr. KARMANE Abdelouahed
 348. Pr. KHABOUZE Samira
 349. Pr. KHARMAZ Mohamed
 350. Pr. LEZREK Mohammed*
 351. Pr. MOUGHIL Said
 352. Pr. NAOUMI Asmae*

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Chimie Analytique
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie

353. Pr. SAADI Nozha
 354. Pr. SASSENOU ISMAIL*
 355. Pr. TARIB Abdelilah*
 356. Pr. TIJAMI Fouad
 357. Pr. ZARZUR Jamila

Gynécologie Obstétrique
 Gastro-Entérologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

358. Pr. ABBASSI Abdellah
 359. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 360. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
 361. Pr. ALLALI Fadoua
 362. Pr. AMAR Yamama
 363. Pr. AMAZOUZI Abdellah
 364. Pr. AZIZ Noureddine*
 365. Pr. BAHIRI Rachid
 366. Pr. BARKAT Amina
 367. Pr. BENHALIMA Hanane
 368. Pr. BENHARBIT Mohamed
 369. Pr. BENYASS Aatif
 370. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 371. Pr. BOUKLATA Salwa
 372. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
 373. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 374. Pr. EL HAMZAoui Sakina
 375. Pr. HAJJI Leila
 376. Pr. HESSISSEN Leila
 377. Pr. JIDAL Mohamed*
 378. Pr. KARIM Abdelouahed
 379. Pr. KENDOSSI Mohamed*
 380. Pr. LAAROUSSI Mohamed
 381. Pr. LYAGOUBI Mohammed
 382. Pr. NIAMANE Radouane*
 383. Pr. RAGALA Abdelhak
 384. Pr. SBIHI Souad
 385. Pr. TNACHERI OUZZANI Btissam
 386. Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Néphrologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 424. Pr. AFIFI Yasser
 425. Pr. AKJOUJ Said*
 426. Pr. BELGNAoui Fatima Zahra
 427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 428. Pr. BENCHEIKH Razika

Rhumatologie
 Dermatologie
 Radiologie
 Dermatologie
 Hématologie
 O.R.L

429. Pr. BIYI Abdelhamid*
 430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 432. Pr. CHEIKHAOUI Younes
 433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 434. Pr. DOGHMI Nawal
 435. Pr. ESSAMRI Wafaa
 436. Pr. FELLAT Ibtissam
 437. Pr. FAROUDY Mamoun
 438. Pr. GHADOUANE Mohammed*
 439. Pr. HARMOUCHE Hicham
 440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine
 442. Pr. JROUNDI Laila
 443. Pr. KARMOUNI Tariq
 444. Pr. KILI Amina

445. Pr. KISRA Hassan
 446. Pr. KISRA Mounir
 447. Pr. KHARCHAFI Aziz*
 448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra *
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *

Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie

Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Médecine Interne
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire

469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad *
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Noureddine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia
 476. Pr. MASRAR Azlarab
 477. Pr. RABHI Monsef *
 478. Pr. MRABET Mustapha *
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
 480. Pr. SEFFAR Myriame
 481. Pr. LOUZI Lhoussain *
 482. Pr. MRANI Saad *
 483. Pr. GANA Rachid
 484. Pr. ICHOU Mohamed *
 485. Pr. TACHFOUTI Samira
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 487. Pr. MELLAL Zakaria
 488. Pr. AMMAR Haddou *
 489. Pr. AOUI Sarra
 490. Pr. TLIGUI Houssain
 491. Pr. MOUTAJ Redouane *
 492. Pr. ACHACHI Leila
 493. Pr. MARC Karima
 494. Pr. BENZIANE Hamid *
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual *
 496. Pr. EL OMARI Fatima
 497. Pr. MAHI Mohamed *
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib*
 499. Pr. KEBDANI Tayeb
 500. Pr. SIFAT Hassan *
 501. Pr. HADADI Khalid *
 502. Pr. ABIDI Khalid
 503. Pr. MADANI Naoufel
 504. Pr. TANANE Mansour *
 505. Pr. AMHAJJI Larbi *

Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie
 Parasitologie
 Parasitologie
 Pneumo phtisiologie
 Pneumo phtisiologie
 Pharmacie clinique
 Pharmacie galénique
 Psychiatrie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Réanimation médicale
 Réanimation médicale
 Traumatologie orthopédie
 Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes
 Pr. AZENDOUR Hicham *
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. OUKERRAJ Latifa

Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie
 Cardiologie

Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha
 Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimi Hachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. BASSOU Driss *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. KADI Said *

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. CHERRADI Ghizlan
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. KANOUNI Lamya
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. EL HAFIDI Naima

Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Dermatologie
 Gastro-entérologie
 Gynécologie obstétrique
 Hématologie biologique
 Hématologie biologique
 Hématologie clinique
 Médecine interne
 Médecine interne
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

Médecine interne
 Gastro entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie réanimation
 Radiothérapie
 Radiologie
 Radiologie
 Pédiatrie

Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. BOUSSIF Mohamed*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. RAISSOUNI Zakaria*
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. ZOUAIDIA Fouad
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. CHADLI Mariama*

Pédiatrie
 Médecine aérotrique
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Chirurgie pédiatrique
 Urologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Ophtalmologie
 Hématologie
 Anatomie pathologique
 Anatomie pathologique
 Physiologie
 Biochimie chimie
 Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES **PROFESSEURS**

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naima
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hammed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRIS Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
 Biochimie
 Pharmacologie
 Histologie-Embryologie
 Chimie Organique et Pharmacie Chimique
 Applications Pharmaceutiques
 Génétique Humaine
 Microbiologie
 Biochimie
 Physiologie
 Chimie Analytique
 Pharmacognosie
 Zootechnie
 Pharmacologie
 Chimie Organique
 Biotechnologie
 Biochimie
 Biologie
 Biochimie
 Chimie Organique
 Pharmacognosie
 Pharmacologie
 Chimie Organique

*** Enseignants Militaires**

Je dédie cette thèse à...

À mes très chers parents

Vous avez été pour moi au long de mes études le plus grand symbole d'amour, de dévouement qui ont ni cessé ni diminué.

Votre bonté et votre générosité sont sans limite.

Vos prières m'ont été un grand soutien au cours de ce long parcours.

J'espère de tout mon cœur qu'en ce jour vous êtes fières de moi, et que je réalise l'un de vos rêves.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand amour que je n'ai su exprimer avec les mots.

Puisse Dieu vous accorder sa sainte miséricorde, santé et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

A mon cher frère Hatim

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi mon cher frère.

Tu es le frère idéal pour moi, qui m'a accompagné dans chaque étape de ma vie. Sans toi ma vie n'aurait pas eu le même goût.

Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Merci pour tous, cher frère, merci pour votre soutien sans faille, j'espère que tu trouves dans ce modeste travail le témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout ce que tu m'apporte et de tout mon amour.

Que Dieu t'accorde une longue vie pleine de santé, de bonheur et de réussite dans ta vie privée et professionnelle.

A mes chères sœurs :

Widad, Rajae et Samah

*Les mots ne sauraient exprimer l'entendu de l'affection que j'ai
pour vous et ma gratitude.*

*J'espère avoir été à la hauteur de vos estimeS et que ce travail
soit un témoignage de mes sentiments les plus chers que j'ai
pour vous et représente le bon modèle pour vous.*

*Que Dieu vous protège et vous accorde un brillant avenir avec
une vie pleine de joie, de bonheur et Succès.*

A mes chères amies

Hind Laribia:

*Tu as toujours fait la preuve d'attachement, de sincérité, et de
considération envers ma personne.*

*Je voudrais pouvoir vous apporter ici la chaleur de mon
affection et de mon amour. Votre aide, votre générosité extrême,
votre soutien, étaient pour moi une source de courage, de
conscience et de patience.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, vous combler de santé, de bonheur
et vous procurer longue vie.*

*Aicha Bouricht, Amal Azzamouri, Najoua
Achabi...*

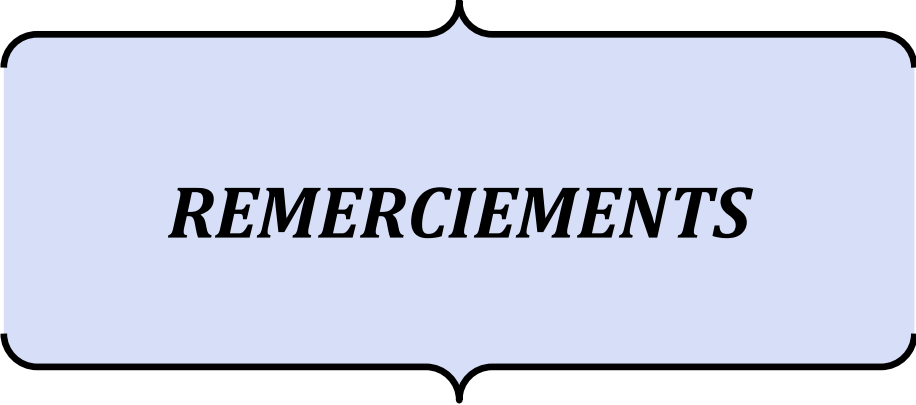
*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous
les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce
travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A tous les membres de la famille IBBA et
de la famille EL NAOUAIJ petits et
grands*

*A toute personne qui a contribué de près ou
de loin à la réalisation de ce travail*

*A tous ceux à qui je pense et que j'ai omis
de citer*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le
plus profond et mon affection la plus sincère.*



REMERCIEMENTS

*A notre Maître et
Président de Thèse
Mr. Le Professeur A. BELMEKKI
Professeur d'hématologie*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en
acceptant de présider le jury de ce travail.*

*Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre
compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement.*

*Veuillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail,
l'expression de notre très haute considération et notre profonde
gratitude.*

*A notre maître et
Rapporteur de thèse
Mr. le Professeur A.MASRAR
Professeur Agrégé d'Hématologie
Biologique*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt
et nous guider à chaque étape de sa réalisation.*

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos
obligations professionnelles.*

*Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre
gentillesse méritent toute admiration.*

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre
profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

A notre maître et juge de thèse
Mme N.MESSAOUDI
Professeur Agrégée d'Hématologie
biologique

*Nous sommes très sensibles par l'honneur que vous nous faites
en acceptant de juger notre travail.*

*Je vous suis très reconnaissante de la spontanéité et de
l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce
travail.*

*Veillez trouver, cher maître, à travers ce modeste travail la
manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments les
plus respectueux.*

*A Notre Maître et
Juge de Thèse
Mme M.NAZIH
Professeur Agrégée d'Hématologie*

*Vous avez accepté en toute simplicité de juger ce travail et c'est
pour nous un grand honneur de vous voir siéger parmi notre
jury de thèse.*

*Veillez trouver, cher maître, à travers ce modeste travail
la manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments
les plus respectueux.*

A notre maître
Mme le Professeur S. BENKIRANE
Professeur Assistante d'Hématologie

*Votre bonté, votre contact chaleureux et toujours sympathique
restent pour moi l'exemple marquant.*

*Je ne saurais vous remercier en quelques lignes ma gratitude et
mon respect.*

Vous m'avez accordé beaucoup de votre temps si précieux.

*Veuillez trouver ici, l'expression de notre très haute
considération et notre profonde gratitude.*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principe d'un cytomètre de flux.....	8
Figure 2: Principe de la focalisation hydrodynamique.....	10
Figure 3: Un système complexe de filtres et de détecteurs permet de faire plusieurs mesures simultanées.....	14
Figure 4: Principe de la fluorescence.....	15
Figure 5: Différents fluorochromes utilisés en cytométrie en flux avec leurs spectres.....	20
Figure 6: Milieu ficoll-isopaque.....	23
Figure 7: Représentation graphique d'un histogramme.....	27
Figure 8: Représentation de la taille et de la granulosité.....	28
Figure 9: Représentation de la densité relative des événements.....	29
Figure 10: Représentation des contours.....	30
Figure 11: Représentation des résultats en 3 dimensions.....	31
Figure 12: Principe du tri cellulaire.....	34
Figure 13: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et relation avec les LAM.....	49
Figure 14: LAM 1« Envahissement médullaire par une majorité de myéloblastes (Wright-Giemsa, x 1000) ».....	49

Figure 15: LAM 2 « Aspect hétérogène avec présence de blastes, myéloblastes et maturation granuleuse anormale » (Wright-Giemsa, ×1000).....	47
Figure 16: LAM 3 « Blastos hypergranuleux à noyaux bilobés et fagots de corps d'Auer (Wright-Giemsa, ×1000) ».....	50
Figure 17: LAM 4« les noyaux sont monocytoides mélangée avec éosinophiles anormaux (Wright-Giemsa, ×1000)».....	50
Figure 18: LAM 5« Mélange de monoblastes et d'éléments monocytaires différenciés (Wright-Giemsa, ×1000)».....	51
Figure 19: LAM 6« Mélange d'éléments de maturation érythroblastiques et dysérythropoïétiques et de myéloblastes (Wright-Giemsa, ×1000) ».....	51
Figure 20: LAM 7« Les cellules blastiques sont grandes, finement granuleuse, et cytoplasme légèrement basophile (Wright-Giemsa, ×1000)».....	52
Figure 21: LAL 1« Le rapport nucléocytoplasmique est très élevé et l'absence de nucléoles ».....	60
Figure 22: LAL 2« Présence des nucléoles visible et cytoplasme plus abondant».....	61
Figure 23: LAL 3« Présence d'un envahissement médullaire par de grandes cellules blastiques à cytoplasme hyperbasophile vacuolaire ».....	61
Figure 24: Prélèvement veineux au pli du coude pour la réalisation d'hémogramme	74
Figure 25: Etapes de la réalisation d'un myélogramme.....	76

Figure 26: Frottis médullaire.....	77
Figure 27: Absence d'activité myéloperoxydasique dans les blastes (LAL) alors qu'un précurseur granulocytaire résiduel apparaît nettement positif.....	80
Figure 28: LAM (LAM3v selon la classification de FAB) réaction positive au myéloperoxydase.....	80
Figure 29: LAL : réaction cytochimique à l'acide périodique Schiff.....	81
Figure 30: Etapes de l'analyse en cytogénétique.....	83
Figure 31: CD45 Gating (exemple de cytogramme CD45/ structure « SSC : Side Scatter ».....	92
Figure 32: Cytogrammes obtenus du CD45 Gating des LAM.....	99
Figure 33: A) et B) présence de blastes sans grains intracytoplasmiques.....	108
Figure 34: Présence de moins de 3% de blastes positives à la présence de la myéloperoxydase.....	108
Figure 35: Analyse taille/structure de la population cellulaire.....	109
Figure 36: Les différences dans l'expression phénotypique entre LAL et LAM.....	116
Figure 37: Protocole pour la détection de la MRD par la CMF.....	117
Figure 38: Suivi de la cinétique de disparition de leucémie aiguë par CMF.....	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principaux lasers utilisés en CMF.....	11
Tableau II : Principaux antigènes utilisés dans le diagnostic hématologique.....	19
Tableau III: Caractéristiques des fluorochromes les plus utilisés.....	21
Tableau IV: Application clinique de l'immunophénotypage par CMF.....	37
Tableau V: Fréquence des phénotypes aberrants détectés par CMF dans les cancers hématologiques.....	38
Tableau VI: Classification FAB des LAM.....	46
Tableau VII: Classification de l'EGIL des LAM	53
Tableau VIII: Classification OMS « 2001 » des LAM.....	56
Tableau IX: Classification OMS « 2008 » des LAM.....	58
Tableau X : Classification FAB des LAL.....	59
Tableau XI: Classification de l'EGIL des LAL.....	63
Tableau XII : Classification OMS « 2001 » des LAL.....	64
Tableau XIII: Modification apportée par la classification OMS « 2008 ».....	65
Tableau XIV: Identification de BAL par détermination du score de l'EGIL...	68
Tableau XV: Tableau clinique des leucémies aiguës.....	73

Tableau XVI: Quelques entités clinico-biologiques classiques au sein des LA (fréquence respectives entre parenthèses).....	84
Tableau XVII: Panels des anticorps testés pour le phénotypage des LA.....	93
Tableau XVIII: Panels des anticorps utilisés pour chaque étape du phénotypage des leucémies aiguës.....	95
Tableau XIX: Classification immunologique des LAL B selon l'EGIL.....	101
Tableau XX: Classification immunologique des LAL T selon l'EGIL.....	102
Tableau XXI: Classification immunologique des LAM, certains marqueurs caractéristiques des cellules myéloïdes indifférenciées, myélomonocytaires ou granuleuses.....	101
Tableau XXII : Les 8 cas possibles pour une BAL.....	107
Tableau XXIII: Synthèse des résultats de l'analyse par CMF.....	109
Tableau XXIV: La détermination des marqueurs exprimés ou non par les lignées B, T et myéloïdes permet le calcul du score immunologique de l'EGIL.....	110
Tableau XXV: Les combinaisons immunologiques utilisées pour la détection de la MRD dans les LAL.....	120
Tableau XXVI: Les combinaisons immunologiques utilisées pour la détection de la MRD dans les LAM.....	121

LISTE DES SCHEMAS

<i>Schéma 1: Composants de la classification OMS</i>	<i>42</i>
<i>Schéma 2: Approche algorithmique sur la classification des LA.....</i>	<i>72</i>
<i>Schéma 3: L’algorithme reprenant le rôle de la CMF dans le diagnostic des leucémies aiguës.....</i>	<i>111</i>
<i>Schéma 4: Algorithme général proposé pour le diagnostic et le suivi des LAM.....</i>	<i>123</i>
<i>Schéma 5: Algorithme de diagnostic des LAM par CMF.....</i>	<i>124</i>
<i>Schéma 6: Algorithme général proposé pour le diagnostic et le suivi des LAL.....</i>	<i>126</i>
<i>Schéma 7: Algorithme de diagnostic des LAL par CMF.....</i>	<i>127</i>

TABLE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps

AcMo : Anticorps Monoclonaux

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigène

BAL : Biphenotypic Acute Leukemia

BD: Becton Dickinson

BOM: Biopsie Ostéo-Médullaire

CD: Cluster de Differentiation

CFU-S: Colony Forming Unit in Spleen

CMF: Cytométrie en Flux

EGIL: European Group for the Immunological

FAB: Franco-Américano-Britannique

FISH: Hybridation in Situ en Fluorescence

FL: Fluorescence

FSC: Forward Scatter Channel

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor

GR: Globule Rouge

Ig: Immunoglobine

IL : Interleukine

LA : Leucémie Aiguë

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LC : Leucémie Chronique

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDH: Lactate Déshydrogénase

LSR: Laser

M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor

MO: Moelle Osseuse

MPO: Myéloperoxydase

MRD: Minimal Residual Disease

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PD: Photodiode

PL: Ponction Lominaire

PLT : *Plaquette sanguine*

PMT: *Photomultiplicateur*

PN : *Polynucléaire*

RC: *Rémission complète*

SMD: *Syndrome Myélodysplasique*

SSC: *Side Scatter Channel*

SSE: *Statut Socio-Economique*

TCA: *Temps de Céphaline avec Activateur*

TGF: *Transforming Growth Factor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TP: *Taux de Prothrombine*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE « LA CYTOMETRIE EN FLUX : ASPECTS TECHNIQUES »

A. HISTORIQUE.....	3
B. DEFINITION DE LA CMF.....	6
C. REALISATION DE L'ANALYSE CYTOMETRIQUE.....	7
1. Principe de la CMF.....	7
2. Système fluidique.....	8
3. Système optique	10
3.1. Sources d'énergie.....	10
3.2. Canaux optiques.....	12
3.3. Détecteurs.....	13
3.4. Fluorescence émise.....	14
3.5. L'immunofluorescence.....	17
3.5.1. Anticorps monoclonaux.....	17
3.5.2. Fluorochromes.....	19
3.6. Marquage des cellules.....	22

3.6.1.	Préparation de la suspension cellulaire.....	22
3.6.2.	Etude en monomarquage.....	23
3.6.3.	Etude en double marquage.....	24
3.6.4.	Inconvénients des marquages multiples.....	24
4.	Système électronique.....	25
5.	Présentation des résultats.....	26
6.	Interprétation des résultats.....	32
6.1.	Validation technique.....	32
6.2.	Validation clinique.....	32
D.	SPECIFICITES DE LA CMF.....	33
E.	LIMITES DE LA CMF.....	35
F.	APPLICATIONS DE LA CMF.....	36

DEUXIEME PARTIE « APPLICATIONS DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES »

A.	INTRODUCTION.....	40
B.	CLASSIFICATIONS DES LEUCEMIES AIGUES.....	41
1.	Leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....	42
1.1.	Classification FAB	42
1.2.	Classification de l'EGIL.....	52

1.3.	Classification de l'OMS.....	53
2.	Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).....	58
2.1.	Classification FAB.....	58
2.2.	Classification de l'EGIL.....	62
2.3.	Classification de l'OMS.....	63
3.	Leucémies aiguës biphénotypiques	67
4.	Limites des classifications des LA.....	70
5.	Approche algorithmique de la classification des LA.....	70
C.	DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES.....	73
1.	Clinique.....	73
2.	Diagnostic biologique.....	74
2.1.	Diagnostic positif.....	74
2.1.1.	Hémogramme.....	74
a)	Prélèvement.....	72
b)	Interprétation.....	75
2.1.2.	Myélogramme.....	75
a)	Prélèvement.....	76

b)	Préparation.....	77
c)	Interprétation.....	78
2.1.3.	Etude cytochimique.....	78
2.1.4.	Immunophénotypage.....	81
2.1.5.	Etude cytogénétique.....	82
2.1.6.	Biologie moléculaire.....	86
2.1.7.	Autres examens.....	87
2.2.	Diagnostic différentiel.....	88
D.	APPORT DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE PAR LA CMF DANS LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES.....	89
1.	Nature du prélèvement	89
2.	Utilisation du CD45.....	90
3.	Principe du marquage.....	93
4.	Stratégie de l'immunophénotypage.....	94
5.	Immunophénotypage des LAL.....	99
6.	Immunophénotypage des LAM.....	102
7.	Immunophénotypage des BAL.....	106
8.	Algorithme récapitulatif	111
E.	SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES PAR LA CMF : DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE (MRD).....	113
1.	Introduction	113

2. Détection de la MRD par la CMF.....	114
--	-----

ALGORITHMES RECAPITULATIFS DU DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES PAR LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	122
---	------------

CONCLUSION.....	128
------------------------	------------

RESUME

SUMMARY

ملخص

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

La découverte de la cytométrie en flux (CMF), sa mise au point et son application dans le diagnostic des maladies humaines surtout hématologiques et néoplasiques, a permis d'énormes progrès en biologie médicale.

Cette technique repose sur les progrès réalisés dans la science de l'informatique, l'étude du laser, l'obtention d'anticorps monoclonaux, la cytochimie et la chimie des fluorochromes. Bien que le principe de la CMF, soit connu depuis les années 1930, ce n'est que durant ces dernières années que son application dans le domaine médical s'est accrue.

Le terme de leucémies aiguës désigne des pathologies extraordinairement hétérogènes tant au plan clinique que biologique. Elles ont en commun d'être des proliférations cancéreuses de cellules hématopoïétiques immatures et d'envahir la moelle osseuse. Le progrès des techniques cytogénétiques, cytométriques et en biologie moléculaire a abouti à de nouvelles découvertes dans la pathogénie des leucémies aiguës et de nouvelles entités ont été reconnues, classées et diagnostiquées avec plus de précision.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic des leucémies aiguës et faire le point sur son rôle dans la découverte de certains phénotypes anormaux permettant le monitoring de la maladie résiduelle.

PREMIERE PARTIE

« LA CYTOMETRIE EN FLUX: ASPECTS TECHNIQUES »

A.HISTORIQUE :

La cytométrie en flux est née d'un besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang.

Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en **1934**, que **Moldavan** conçut le premier appareil qui réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans une fine capillaire où elles étaient visualisées par un capteur photo électronique.

En 1949, Coulter, en Floride, inventa les compteurs automatiques des cellules sanguines et les analyseurs de volume.

Une analyse multiparamétrique des éléments figurés de sang s'est établie en 1965 par Kamensky et ses collaborateurs permit d'avoir des histogrammes. Le résultat s'est informatisé.

En 1968, Dietrich et Gohde mirent au point des cytophotomètres [1].

En 1969, les travaux de Van Dilla et ses collaborateurs sur l'excitation des cellules avec un laser permirent d'énormes progrès dans l'application de la CMF en biologie fondamentale et dans la clinique médicale [2].

Dans les années 1970, les chercheurs de Los Alamos et de Sandford aux États-Unis associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux, avec des méthodes électrostatique permettent le tri cellulaire dans des conditions vitales. Mais la CMF ne

s'est développée que depuis les années 1980 avec l'apparition des anticorps monoclonaux et certaines applications comme le phénotypage des hémopathies malignes et le suivi des populations lymphocytaires dans les pathologies associées au VIH.

Ainsi, le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la CMF [3].

L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (Exemple : diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes [4].

Deux familles d'instruments : [5]

- Cytomètre de flux analyseur : Analyses des cellules
- Cytomètre de flux analyseur-trieur: Analyse des cellules + Tri (séparation physique)

Exemples de cytomètre de flux : [5,6]

- FACS calibreur®
 - Utilise un refroidissement par air, laser Argon réglementée à 15 mW de puissance et d'une longueur d'onde fixe d'émission de 488 nm.
 - Détection de six paramètres.

- Analyseur + Trieur.

➤ BD LSR TM

- Détection de 8 paramètres (6 couleurs et deux mesures de dispersion).
- Refroidissement à air, double laser : He (325 nm) à 8 mW et laser Argon (488 nm) à 15 MW.
- La BD LSR simplifie les applications UV de routine.
- Une haute performance pour le triage cellulaire.

➤ Becton-Dickinson FACS ®

- Trieuse cellulaire à une vitesse plus élevée que la FACS calibreur®.

➤ Beckman Coulter®

- Grande performance de tri cellulaire.

➤ MoFlo®

- Trieur cellulaire à haut rendement, système pour les applications à haute vitesse de tri.

B. DEFINITION DE LA 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 » [7]. 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 [8].

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 :

- 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 biparamétriques 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 [9].

C.REALISATION DE L'ANALYSE CYTOMETRIQUE:

1. Principe de la CMF :

Il est basé sur la combinaison de trois systèmes : [10]

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

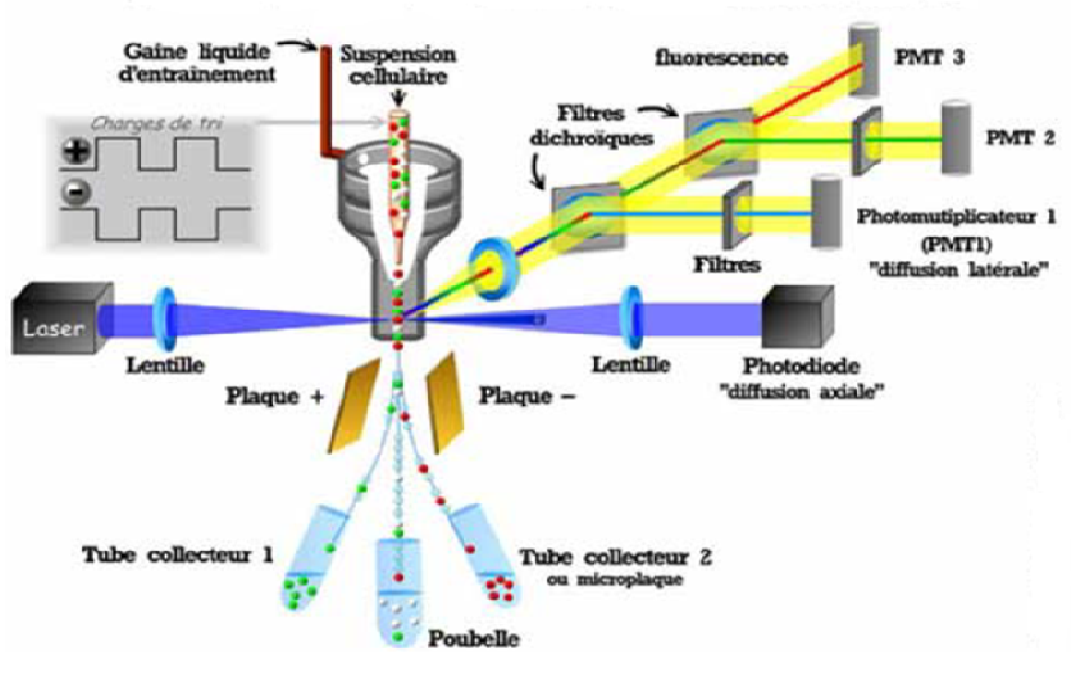


Figure 1 : Principe d'un cytomètre de flux [6].

2. 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 [11].

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

glisser 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 (Figure 2).

L'effet crée un fichier unique des particules et il est appelé « **Focalisation Hydrodynamique** » [12]. 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 : [4]

$$Re = \rho V D / \mu$$

Avec : D = diamètre du tube V = la vitesse moyenne du fluide

 ρ = densité du fluide μ = viscosité du fluide

Lorsque **Re < 2300**, le débit est toujours laminaire.

Lorsque **Re > 2300**, le flux peut être turbulent, ce qui accélère la diffusion.

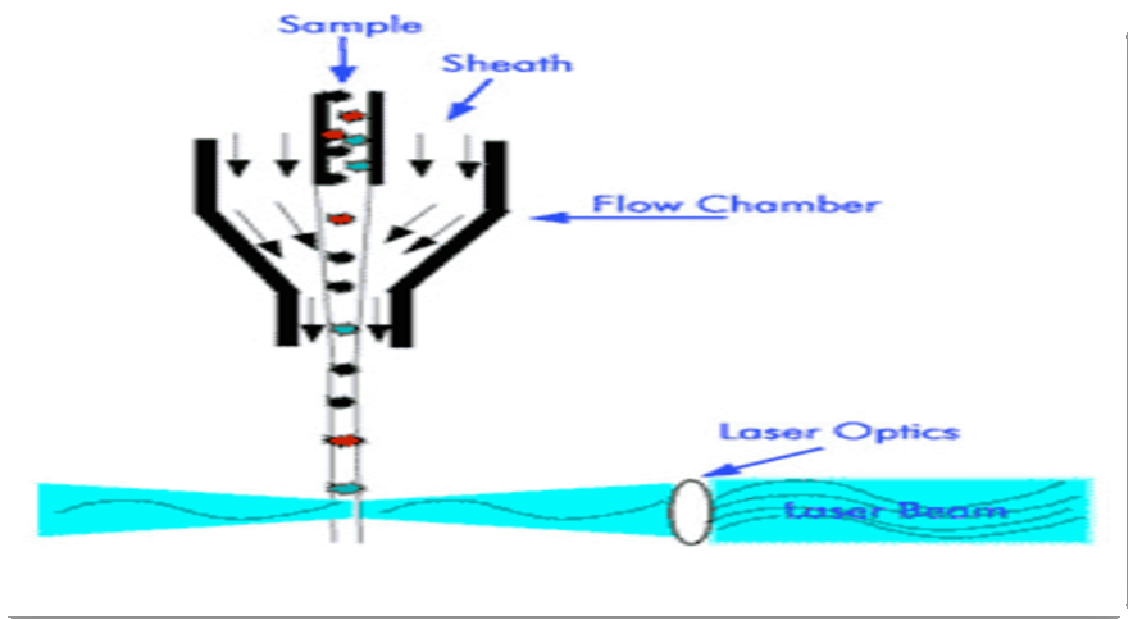


Figure 2: Principe de la focalisation hydrodynamique [4].

3. Système optique :

3.1. Source d'énergie [13]

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)

Ils présentent un grand nombre d'avantages: puissance, stabilité, finesse du faisceau. Les lasers ont des spectres d'émission discontinus et ils fournissent une lumière cohérente. La présence de plusieurs lasers de types différents permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes (Tableau I).

<u>Type du laser</u>	<u>Longueur d'onde correspondante (nm)</u>
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	-

Tableau I : Les principaux lasers utilisés en cytométrie de flux [13]

- Les lampes à vapeur de mercure ou au xénon sont aussi utilisées

La focalisation est moindre que dans le cas du laser, mais le spectre est assez large et leur coût est limité.

3.2. Canaux optiques: [13,14]

Ils correspondent au trajet suivi par la lumière du volume d'illumination aux détecteurs.

Il existe trois types de canaux :

- Canal “ taille ” (FSC « Foward Scatter Channel »)
- Canal “ structure ” (SSC « Side Scatter 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 d'une manière simultanée pour étudier les paramètres de diffusion (FSC, SSC) et de fluorescence.

Ainsi, l'analyse des différents canaux dépend des propriétés spectrales des fluorochromes utilisés, de l'ordre et des caractéristiques des filtres.

3.3. Détecteurs : [13]

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, 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. C'est un détecteur de fluorescence (Figure 3).

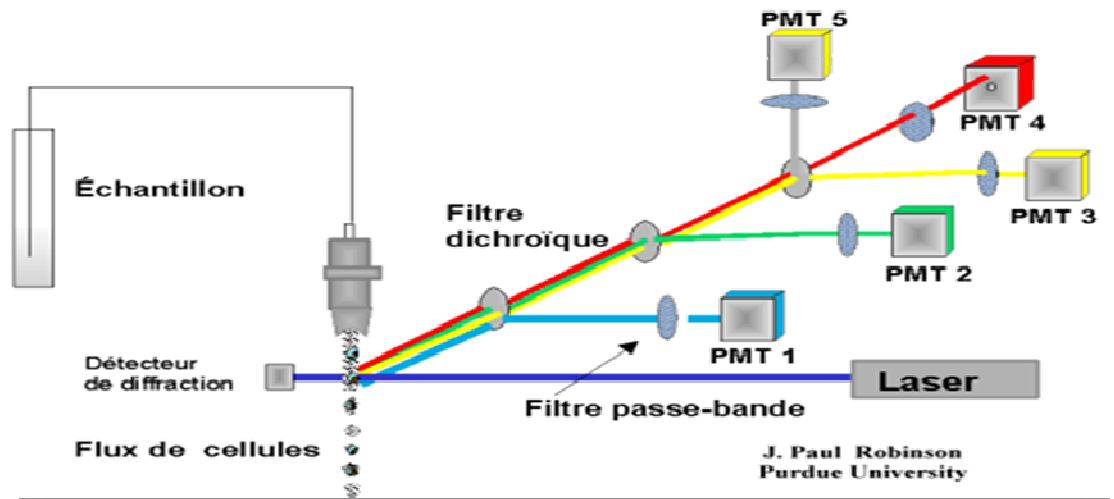


Figure 3: Un système complexe de filtres et de détecteurs permet de faire plusieurs mesures simultanées [15].

3.4. 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.

Principe: [16]

Certaines substances, à l'état de repos (S_0) ont la propriété d'absorber l'énergie émise (S_1) par une source lumineuse extérieure (de fréquence ν_0 , de longueur d'onde λ_0) pour faire passer un électron d'une sous couche à une autre, qui correspond à un état excité (S_1).

Lorsque l'excitation cesse, l'électron va gagner un niveau intermédiaire correspondant à une énergie (S_2), puis dans un second temps, regagner son niveau d'origine (S_0). L'énergie libérée lors de cette seconde étape (S_2-S_0), permet l'émission d'un photon : c'est le phénomène de **fluorescence** (figure 4).

Comme l'énergie S est proportionnelle à la longueur d'onde λ ($S = h \nu$), celle-ci correspond à un niveau d'énergie : $S_2-S_0 = h (\nu_2 - \nu_0)$ (h est la constante de Planck) et comme $\nu = C/\lambda$ (C est la vitesse de la lumière) donc :

$$S_2-S_0 = h (C/\lambda_2 - C/\lambda_0) \quad S_2-S_0 = hC (\lambda_2 - \lambda_0)$$

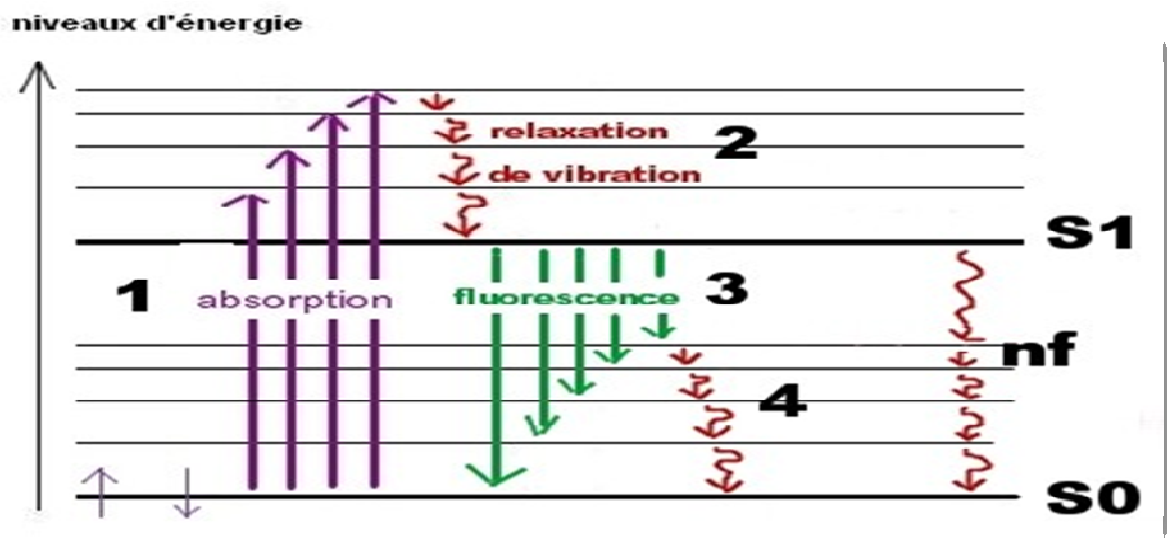


Figure 4: Principe de la fluorescence [16].

Le diagramme Jablonski représentant le phénomène de fluorescence. On retiendra la propriété fondamentale :

λ excitation < λ émission; puisque l'énergie photon d'excitation > énergie photon émis

S_0 : état électronique fondamental

S_1 : état électronique excité

Commentaire :

- **En 1** : phénomènes d'absorption (U.V) : passages à un état électronique excité (10-15s), différents niveaux vibrationnels et rotationnels sont accessible.
- **En 2** : relaxations vibrationnelles (10-12s) : retour sur le niveau de plus basse énergie de l'état excité. Conversion de l'énergie en chaleur.
- **En 3** : la fluorescence : c'est quand le retour au niveau électronique fondamental est réalisé avec émission d'un photon. La durée de vie de l'état excité est classiquement de l'ordre de 10-8s chez un fluorochrome standard. La fluorescence « est immédiate à l'absorption », le photon émis est moins énergétique que le photon absorbé. Ainsi la λ émise est plus longue que la λ absorbée.
- **En 4** : relaxations vibrationnelles (10-12s) : retour sur le niveau de plus basse énergie de l'état fondamental. Conversion de l'énergie en chaleur.
- **En nf** : la fluorescence est en compétition avec les désexcitations non émissives.

Ainsi toutes les molécules qui absorbent ne fluorescent pas (le phénomène est même plutôt rare) : les processus de désactivation non émissive qui vont

réduire la durée de vie de l'état excité sont en compétition avec le phénomène émissif. Si les processus non émissifs sont statistiquement plus rapides que les processus émissifs, la fluorescence ne sera pas observée (cas le plus fréquent).

3.5. 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 [17].

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. Ce signal non spécifique est mesuré à l'aide d'un « contrôle isotopique » [18].

3.5.1. Les anticorps monoclonaux:

Ils sont obtenus par fusion des lymphocytes de la rate avec des cellules du myélome. On clone les cellules hybridées isolées et chacun des clones, sécrète un anticorps monoclonal adapté spécifiquement à un seul déterminant antigénique de la molécule d'antigène.

Le développement des anticorps monoclonaux a permis à la cytométrie en flux de devenir un outil performant d'analyse multiparamétrique cellulaire. Depuis

son introduction, son champ d'application a été élargi et touche non seulement les domaines de l'hémato-oncologie mais également de l'immunologie et de la recherche en biologie cellulaire (Tableau II) [16].

Au cours de ces dernières années, le diagnostic des hémopathies malignes a évolué grâce à l'immunophénotypage, aux examens cytogénétiques, aux analyses moléculaires et aux examens morphologiques.

L'immunophénotypage est devenu depuis sa découverte nécessaire au diagnostic des lymphomes et des leucémies. Il apporte des renseignements sur leur pronostic et leur évolution après traitement (suivi de la maladie résiduelle). Il peut jouer un rôle dans les choix thérapeutiques en guidant l'utilisation de certains anticorps monoclonaux. Ces derniers, le plus souvent d'origine murine, sont regroupés en fonction d'une classification qui assigne une appartenance de la molécule qu'ils reconnaissent à un cluster de différenciation (CD).

L'intensité de la fluorescence donne des informations sur la densité antigénique à la surface des cellules. L'emploi de plusieurs fluorochromes, chacun pouvant être excité avec la même longueur d'onde mais émettant à des longueurs d'onde différentes, permet de mesurer plusieurs propriétés cellulaires à la fois [17].

Marqueur panleucocytaire CD45 (toutes les cellules hématopoïétiques)	Lymphocytes B CD10 (lymphocytes pré-B, précurseurs B) CD19 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD20 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD22 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD23 (lymphocytes B, monocytes) CD24 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs)
Cellules immatures CD34 (précurseurs hématopoïétiques) CD117 (c-kit) (cellules leucémiques myéloïdes) HLA-DR (précurseurs myéloïdes, monocytes, cellules B, cellules T activées) TdT (thymocytes, lymphoblastes, certains myéloblastes)	Plasmocytes CD138 (plasmocytes) CD38 (plasmocytes, lymphocytes T activés)
Cellules myélo/monocytaires CD4 (monocytes) CD11b (lignée granulocytaire et monocyttaire, lymphocytes B, T, et NK) CD13 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD14 (lignée monocyttaire) CD15 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD33 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD65 (lignée granulocytaire et monocyttaire)	Lymphocytes T CD1a (thymocytes corticaux) CD2 (thymocytes, lymphocytes T mûrs et NK) CD3 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD4 (thymocytes, lymphocytes T-helper mûrs) CD5 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD7 (tous les précurseurs et lymphocytes T mûrs, NK) CD8 (thymocytes, lymphocytes T-cytotoxiques)
Lignée plaquettaire CD41 (gp IIb/IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes) CD42b (gp Iba) (mégacaryocytes, plaquettes) CD61 (gp IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes)	Lymphocytes NK CD11b (lymphocytes B, T, et NK, lignée granulocytaire et monocyttaire) CD16 (lymphocytes NK, granulocytes) CD57 (lymphocytes T-LGL, certains lymphocytes NK, monocytes) CD56 (lymphocytes T et NK)
Lignée érythrocytaire Glycophorine A (précurseurs érythroïdes, globules rouges)	

CD : Cluster de différenciation ; **TdT** : Terminal deoxynucleotidyl Transférase ;
NK : Natural Killer; **T-LGL** : T-large granular lymphocytes; **gp** : glycoprotéine
Tableau II: Principaux antigènes utilisés dans le diagnostic hématologique [16].

3.5.2. Les fluorochromes :

Définition: Les fluorochromes sont des substances chimiques naturelles ou synthétiques capables de produire une fluorescence. Ils n'émettent pas ou peu de

fluorescence lorsqu'ils sont en solution, et qui deviennent beaucoup plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés spécifiquement sur un organite ou substance intracellulaire. Chaque fluorochrome possède son propre spectre [19](Figure 5).

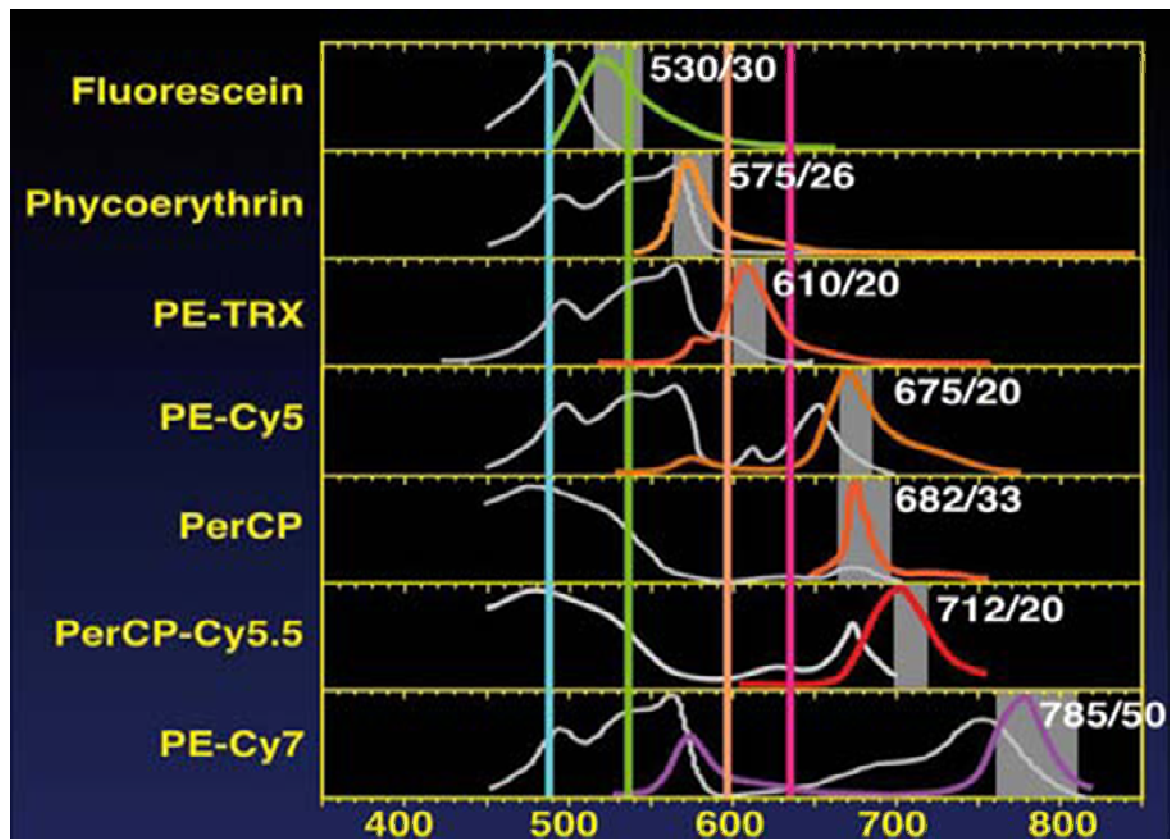


Figure 5: Différents fluorochromes utilisés en cytométrie en flux, avec leurs spectres « Excités (en gris) et spectres émis (en couleur) en nm » [8].

Les fluorochromes les plus utilisés ainsi que leurs caractéristiques figurent sur le tableau suivant :

<u>Fluorochromes</u>	<u>Laser (nm)</u>	<u>Emission maximale (nm)</u>
Alexa Fluor®405	360, 405,407	421
Pacific Blue®	360, 405,407	455
AmCyan	405,407	491
Alexa Fluor ®488	488	519
FITC	488	519
PE	488,532	587
PE-Texas Red® (ECD®)	488,532	615
Texas Red®	595	615
APC	595, 633, 635,647	660
Alexa Fluor® 674	595, 633, 635,647	668
PE-Cy5	488,532	667
PerCP	488,532	678
PerCP-Cy5.5	488,532	695
Alexa Fluor®700	633,635	719
PE-Cy7	488,532	785
APC-Cy7	595, 633, 635,647	785

FITC: Isothiocyanate de fluorescéine; **PerCP**: peridinine chlorophylle-protéine
PE:R-phycoérythrine;**APC**: allophycocyanine;**PerCP-Cy5.5**:PerCP-cyanine5.5;
PE-Cy7: PE-Cyanine7; **APC-Cy7**: APC-Cyanine7; **PE-Cy5**:PE-Cyanine

Tableau III: Caractéristiques des fluorochromes les plus utilisés [20].

Intérêt des fluorochromes : [21]

Les fluorochromes sont très utilisés comme marqueurs d'AcMo et d'autres substances. Ils permettent également d'obtenir de nombreuses informations concernant la cellule. Parmi les propriétés cellulaires déterminées par les fluorochromes, nous pouvons citer :

- ◆ La teneur en acides nucléiques ;
- ◆ Les récepteurs cellulaires de surface ;
- ◆ La composition antigénique de la surface cellulaire ;
- ◆ Les protéines totales de la cellule.

3.6. Marquage des cellules

3.6.1. Préparation de la suspension cellulaire [1]

C'est une étape primordiale dans l'analyse cytométrique. Les liquides corporels constituent des suspensions naturelles de cellules, disponibles et facilement analysables. Toutefois, dans l'analyse des tissus solides, les cellules doivent être dispersées par l'action d'un agent désagrégeant des cellules.

Dans l'analyse des lymphocytes par exemple, le milieu ficoll-isopaque est souvent utilisé pour la séparation et la purification des cellules avant leur marquage (figure 6).

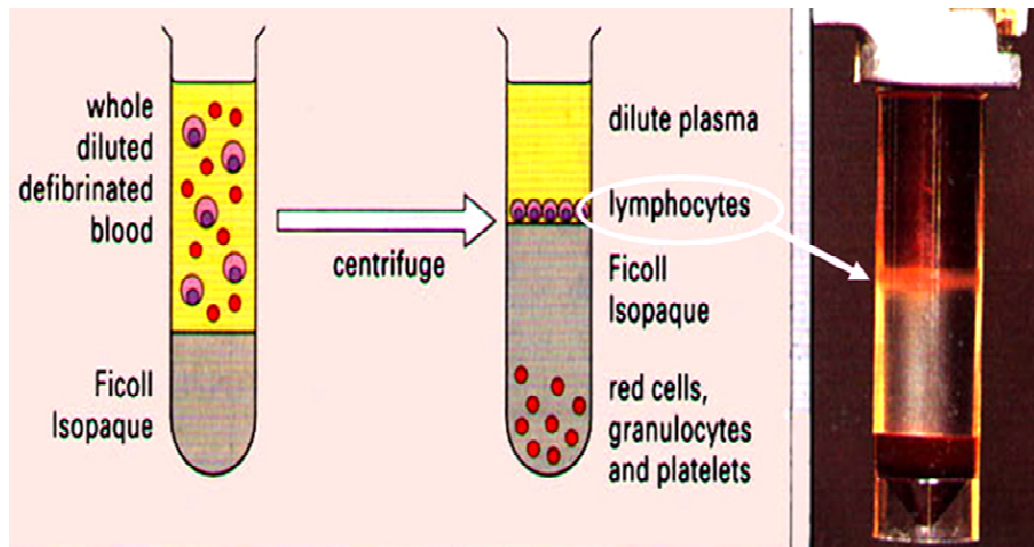


Figure 6 : Milieu ficoll-isopaque [1]

3.6.2. Etude en monomarquage: [10]

Après isolement, purification des cellules et préparation de la suspension cellulaire, arrive l'incubation des cellules en monomarquage (un seul anticorps). Elle peut être réalisée avec des AcMo directement conjugués à la substance fluorescente (immunofluorescence directe) ou avec des anticorps dont la fixation est révélée avec un anticorps anti-immunoglobuline de souris conjugué au FITC (immunofluorescence indirecte). L'utilisation d'anticorps directement conjugués est plus simple et plus rapide, mais l'intensité de fluorescence obtenue est moins forte.

3.6.3. Etude en double marquage : [10]

L'étude des cellules en double marquage (incubation des cellules avec deux anticorps) permet une analyse plus précise de leurs sous-populations. Par cette technique les populations lymphocytaires CD4 et CD8, par exemple, ont pu être différenciées et même subdivisées en populations dont la définition antigénique est plus proche de la définition fonctionnelle.

L'étude en double marquage nécessite l'utilisation de deux anticorps marqués par des fluorochromes différents. On utilise souvent le FITC et la PE dont les signaux de fluorescence sont analysables par la majorité des cytomètres. L'analyse simultanée de la fixation des anticorps sera faite sur un cytogramme analysant les signaux verts et rouges. Il permettra de dénombrer les cellules n'ayant pas fixés spécifiquement d'anticorps, ayant fixé l'un des deux anticorps ou les deux. La technique de double marquage peut être appliquée au repérage des cellules mortes et à leur élimination de l'analyse du signal de fluorescence.

Le marquage au bromure d'éthidium (marqueur de l'ADN) permet de repérer les cellules mortes par leur fluorescence dans le rouge. Sur un cytogramme d'analyse de double marquage, seules les cellules négatives pour le rouge sont prises en compte pour le phénotypage cellulaire.

3.6.4. Inconvénients des marquages multiples : [10]

Les problèmes rencontrés lors de l'utilisation des marquages multiples peuvent être les suivants :

- ❖ Un problème d'immunofluorescence lié, à la présence de cellules mortes, à la fixation non spécifique des anticorps conjugués sur les récepteurs Fc des cellules et à l'autofluorescence ;
- ❖ La superposition des spectres d'émission nécessitant, selon les cas de figure, des compensations de fluorescence ;
- ❖ La résonance du transfert d'énergie : l'émission d'un colorant correspond à l'absorption du suivant.

L'obstacle majeur est le chevauchement important des spectres d'émission des fluorochromes employés pour révéler les anticorps monoclonaux. L'introduction d'un second laser a permis de vaincre une telle interférence en rendant possible l'excitation de plusieurs fluorochromes à spectres d'excitation et d'émission bien distincts. Mais cette technique était trop lourde et complexe pour être couramment utilisée.

4. Système électronique : [10]

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.

Ainsi, les signaux analogiques obtenus sont convertis en signaux digitaux et un ordinateur recueille les données sous formes de graphiques :

- Des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.
- Des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentent deux signaux simultanément.

5. Présentation des résultats : [21,22]

Types de résultats que l'on peut obtenir :

Le moyen le plus simple de représenter les résultats cytométriques obtenus est l'histogramme, qui représente la fluorescence relative par rapport au nombre d'évènements.

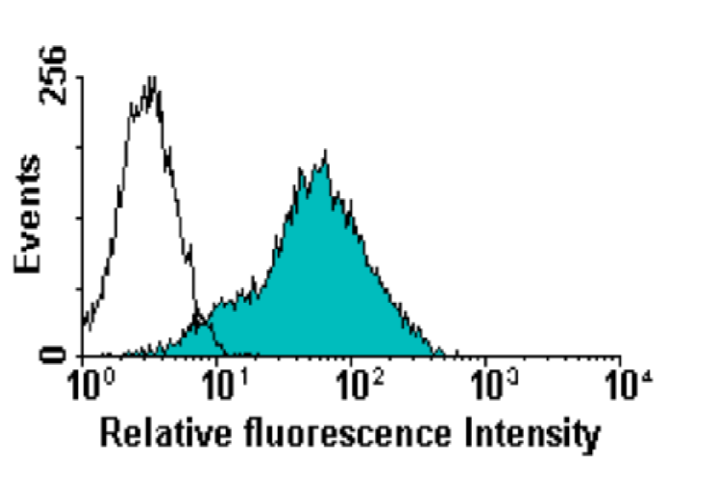


Figure 7: Représentation graphique d'un histogramme [21].

Pour apprécier les caractéristiques relatives aux autres paramètres, il est nécessaire d'utiliser des représentations telle que : « dot plot », « density plot » ou « contour plot ».

❖ **Dot Plot** (Taille et Granulosité)

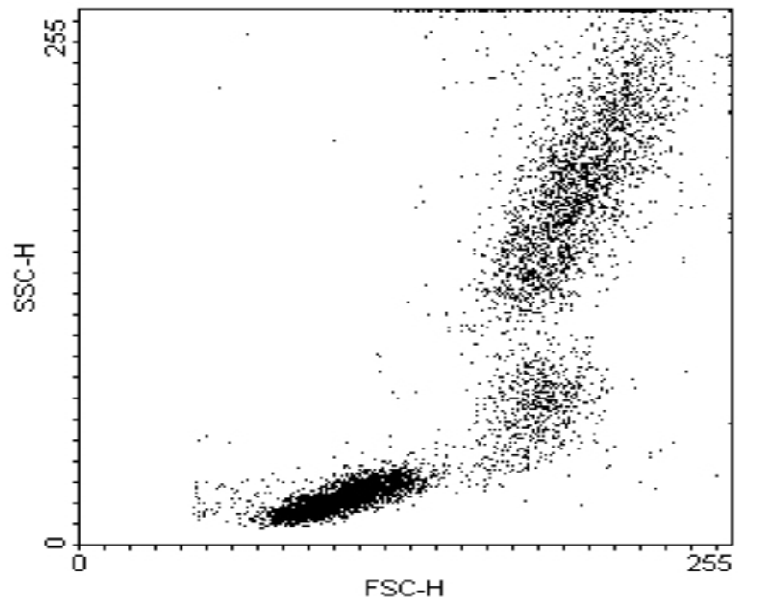


Figure 8 : Représentation de la taille et de la granulosité [21].

Pour chaque cellule qui passe, sa taille est analysée par rapport à sa granulosité. Cela est un bon moyen de détecter un petit nombre d'évènements dont les populations sont clairement séparées mais ne donne pas de renseignement sur la densité relatives des évènements: c'est la raison principale pour utiliser le « density plot ».

❖ Density Plot

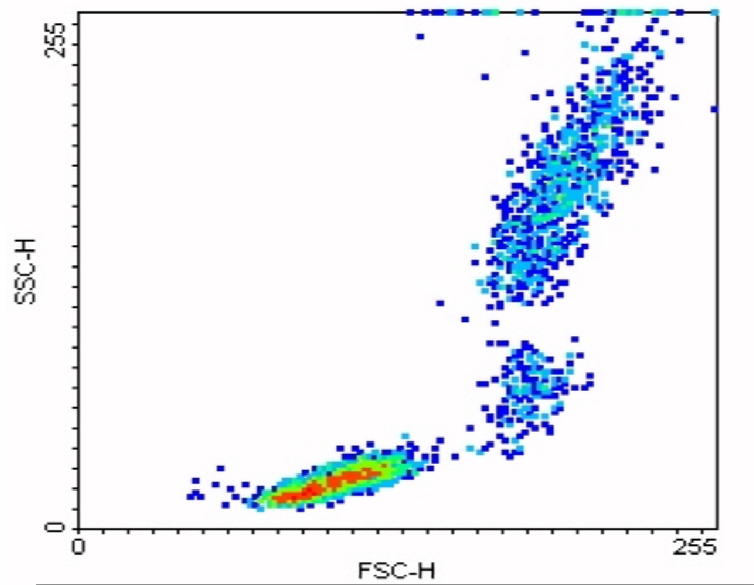


Figure 9 : Représentation de la densité relative des évènements [21].

Cette représentation simule une représentation en 3D où le troisième paramètre est le nombre d'évènements. Cela permet à l'utilisateur, de mettre en évidence une population discrète.

❖ Contour Plot

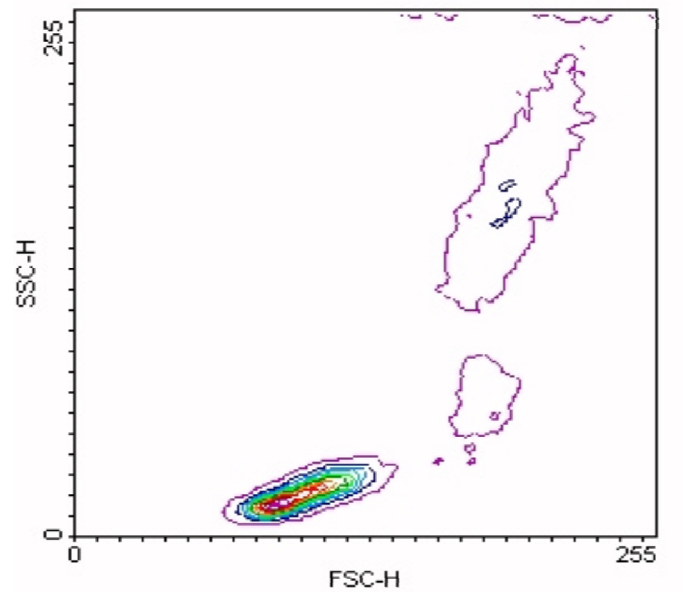


Figure 10: Représentation des contours [21].

Il s'agit là d'une autre représentation en 2 dimensions de populations dont le nombre d'évènements est similaire.

❖ Histogramme Tridimensionnel

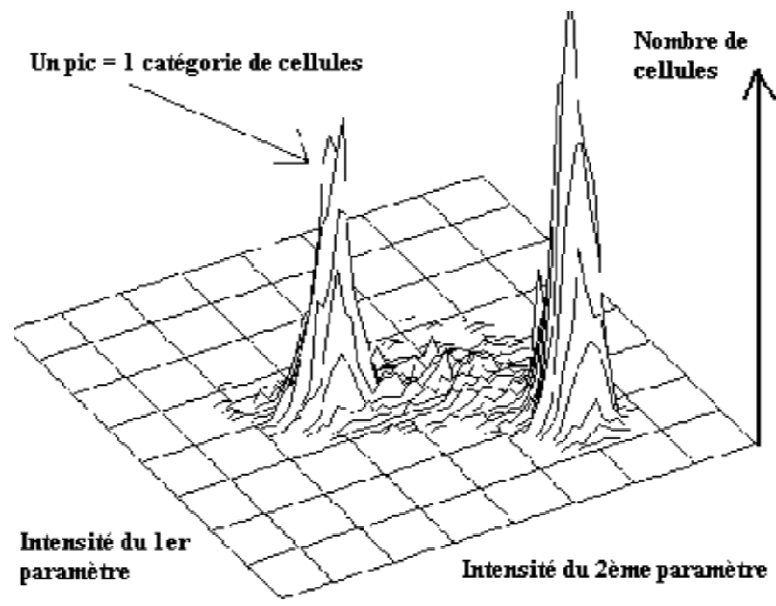


Figure 11: Représentation des résultats en 3 dimensions [21].

Cet histogramme triparamétrique est obtenu à partir d'un biparamétrique auquel on ajoute une troisième dimension représentant le nombre de cellules. Il permet d'avoir une idée de la proportion des différentes catégories de cellules les unes par rapport aux autres.

6. Interprétation des résultats :

Elle se fait par étapes : d'abord technique, marquage par marquage, puis biologique sur l'ensemble de l'immunophénotypage.

6.1. Validation technique d'un marquage : [23,24]

Les marquages sont procédés par le passage du contrôle isotypique correspondant. L'interprétation commence donc par déterminer si le réglage et

le placement des bornes sont corrects au niveau des contrôles, puis si le marquage est conforme à ce qu'on voit habituellement : à titre d'exemple, sur les lymphocytes sanguins, un marquage par le CD28 donne toujours un pic étroit et intense, un marquage par le CD38 est souvent peu intense et la limite entre négativité et positivité repose entièrement sur le placement de la borne sur l'isotype contrôle. L'analyse cytométrique nécessite la constitution d'un panel de tubes contenant le différent marquage multiple destiné au diagnostic, et requiert l'attention exclusive d'un manipulateur expérimenté. Compte tenu de la complexité technique et des anomalies découlant des pathologies, la compétence et l'expérience du personnel qui effectue la lecture au cytomètre restent à l'heure actuelle des éléments déterminants de la qualité de l'analyse.

6.2. Validation clinique :

Elle se fait sur les valeurs usuelles et éventuellement les antécédents du patient. C'est là qu'intervient la connaissance des autres éléments, cliniques, hématologiques, sérologiques ou anatomopathologiques. Il est très souhaitable que des valeurs usuelles pour les paramètres destinés au diagnostic soient établies dans chaque laboratoire [23].

D. SPECIFICITES DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

Ce qui distingue la CMF des autres techniques est qu'elle possède, les six caractéristiques suivantes :

- L'analyse quantitative : C'est un atout majeur par rapport à la microscopie optique courante, de pouvoir quantifier les paramètres observés. Mais des paramètres intervenant dans toute analyse par la CMF imposent, dans le cadre d'une quantification absolue, l'utilisation de standards calibrés : billes fluorescentes [25].
- La sensibilité de détection des signaux de fluorescence :
En immunofluorescence, il est possible de discerner entre le bruit de fond, et une population de cellules lymphoïdes, portant environ 1000 déterminants antigéniques par cellule.
- La vitesse de travail : La vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre est de 1000 cellules par seconde bien qu'il soit possible, sur les appareils modernes, d'analyser de manière fiable jusqu'à 10000 événements par seconde sur plusieurs paramètres.
- L'analyse simultanée de plusieurs paramètres : La cytométrie de flux offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres, ce qui permet de mesurer, deux ou trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire du sang ou de la moelle [10].
- Tri cellulaire : Les cytomètres de haut de gamme sont équipés d'une option préparatrice permettant de trier et de purifier des populations cellulaires après leur analyse. Le principe du tri est simple : le jet liquide, contenant les cellules, est fractionné par la vibration d'un cristal, puis les gouttelettes sont chargées électriquement et seront déviées lors de leur passage dans un champ électrique créé entre les deux plaques d'un

condensateur. Le choix de la gouttelette à charger et le sens de la charge sont effectués par le système informatique en fonction des souhaits de l'utilisateur et des signaux engendrés par l'analyse des cellules contenues dans la gouttelette (figure 12). La mise en œuvre d'un tri est une opération délicate nécessitant des compétences particulières et du temps, et reste réservée aux applications de recherche [25].

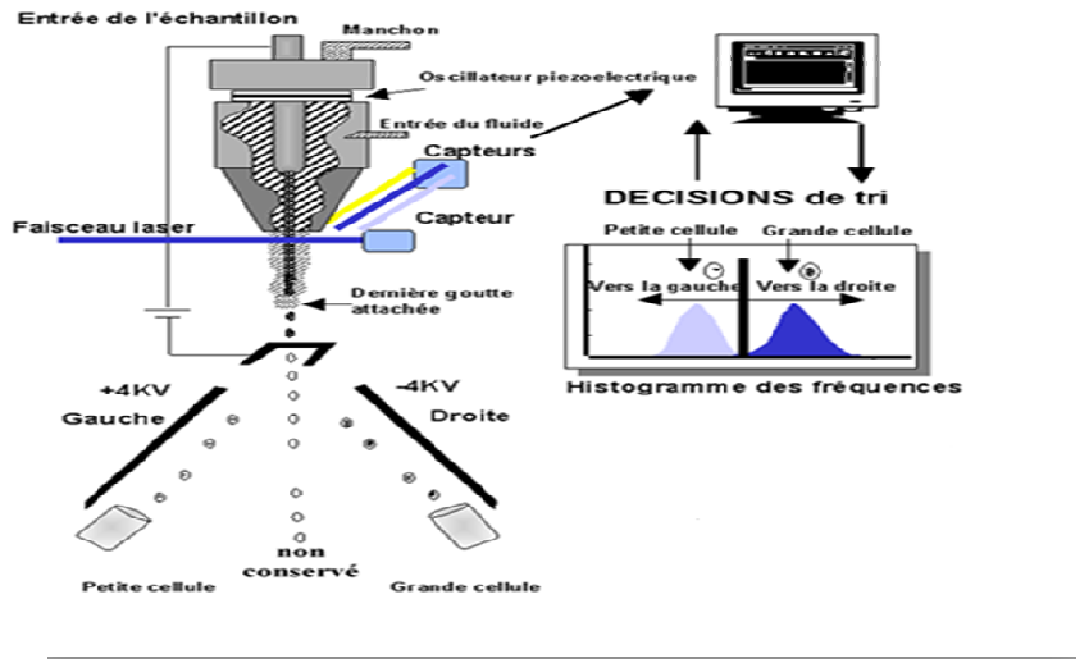


Figure 12: Principe du tri cellulaire [15].

- La maladie résiduelle : Le concept de « maladie résiduelle » désigne habituellement l'identification, à l'aide des techniques sensibles, de cellules pathologiques chez un patient en rémission complète clinique.

Les essais de détection de rechute précoce de tumeurs malignes par l'analyse des marqueurs cellulaires ont été focalisés au niveau du sang périphérique ou de la moelle, puisque ces tissus sont faciles à récupérer et à étudier en simple suspension cellulaire en CMF [26].

E. LIMITES DE LA CYTOMETRIE EN FLUX : [19]

Le champ d'adaptation de la cytométrie est donc très large mais il reste encore des limitations incluant principalement son coût. Une bonne formation et une bonne expérience des utilisateurs sont nécessaires pour bien utiliser cette technique. Les difficultés de réglage font que les analyses à plus de 4 couleurs, sont encore limitées à des laboratoires très spécialisés. Ces instruments sont coûteux en investissement, les lasers restent fragiles et les systèmes fluidiques les plus sophistiqués sont très exposés au bouchage et à l'instabilité du flux. La maintenance de ces appareils est donc coûteuse et cruciale surtout dans les pays émergents qui ont des problèmes de chaleur, poussière, humidité, stabilité de l'alimentation électrique, d'approvisionnement des liquides purifiés, d'achat des réactifs fluorescents onéreux et de maintenance par des ingénieurs spécialisés.

F. APPLICATIONS DE LA CYTOMETRIE EN FLUX : [13]

A l'heure actuelle, les applications de l'immunophénotypage par CMF sont nombreuses et presque infinies. En général, la coloration des cellules avec des anticorps peut être utilisée pour identifier, compter et caractériser tout type de cellules individuelles ou des composants subcellulaires. Dans les deux dernières décennies, de nombreuses applications de l'immunophénotypage ont montré une

grande utilité clinique, principalement dans le domaine de l'hématologie et l'immunologie (Tableaux IV et V).

<u>Maladie</u>	<u>Diagnostic</u>	<u>Classification</u>	<u>Pronostic et/ou MEV*</u>	<u>Suivi de la maladie</u>
Leucémie aiguë	Oui	Oui	<i>Discutable</i>	Oui
Désordre lymphoprolifératif chronique (CLPD)	Oui	Oui	Oui	Oui
Myélodysplasie (MDS)	-	Non	-	Non
Hémoglobinurie paroxystique nocturne (PNH)	Oui	Oui	Non	Oui
Mastocytose	Oui	Oui	Non	Oui
Thrombocytopathies	Oui	<i>Discutable</i>	Oui	Non
Immunodéficience primaire	Oui	Oui	Non	Non
Infection par VIH	Non	Oui	Oui	Oui
Transplantation	Oui	Oui	Oui	Oui

*MEV : mise en évidence

Tableau IV: Applications Clinique de l'immunophénotypage par cytométrie de flux [13].

<u>Hémopathies malignes</u>	<u>(%) des cas aberrants</u>
Précurseur-B leucémie aigue lymphoblastique	>95%
Lymphocytes T leucémie aigue lymphoblastique	>99%
Leucémie myéloblastique aigue	>75%
Leucémie aigüe biphénotypique	100%
Syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules B	>95%
Syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules T	NA
Syndromes lymphoprolifératifs	>40%
Gammapathies monoclonales	>90%
Troubles myélodysplasiques / myéloprolifératifs	NA

Tableau V : Fréquence des phénotypes aberrants détectés par cytométrie en flux dans les cancers hématologiques [13].

NA : Non systématiquement analysées en grandes séries de patients.

Deuxième partie :

***« LA CYTOMETRIE EN FLUX :
APPLICATIONS DANS LE DIAGNOSTIC
ET LE SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES »***

A. INTRODUCTION

La cytométrie en flux est la technique de choix pour la réalisation de l'immunophénotypage des leucémies aiguës. Le but d'un immunophénotypage est de repérer les cellules anormales, de déterminer leur lignée d'origine, d'analyser leur degré d'hétérogénéité et d'en déterminer les caractéristiques phénotypiques. Les cellules à analyser, étant déjà en suspension, sont faciles à recueillir à partir du sang ou de la moelle osseuse. Cette technique est devenue dans le domaine de la routine hématologique grâce à la simplification et à l'amélioration des performances des cytomètres associée à la disponibilité de nombreux anticorps couplés à différents fluorochromes permettant une analyse multiparamétrique [27].

Le diagnostic des leucémies aiguës repose essentiellement sur l'examen cytologique, cytochimique (hémogramme et myélogramme) ainsi que sur l'immunophénotypage de la prolifération blastique [28]. Classiquement il se fait, après l'examen clinique par : [29]

- ❖ Données de l'hémogramme ;
- ❖ Cytologie et histologie médullaires ;
- ❖ Cytochimie complétant l'étude cytologique ;
- ❖ ***Immunophénotypage par la CMF*** pour détecter l'expression d'antigènes ou clusters de différenciation (CD) sur les blastes et rattacher la prolifération blastique à une lignée ou à une autre ;
- ❖ Etude cytogénétique conventionnelle et moléculaire.

B. CLASSIFICATIONS DES LEUCEMIES AIGUES :

La classification des leucémies trouve son origine dans l'organisation du tissu hématolymphopoïétique [30].

Ce tissu s'articule entre plusieurs compartiments dont la MO hématopoïétique qui occupe une position centrale dans la production et la distribution (via le sang) des cellules qu'elle produit. Les leucémies vont intéresser dans un premier temps les deux compartiments que sont la moelle osseuse et le sang, avant d'être multicentriques et ainsi envahir les organes périphériques comme le foie, la rate et les ganglions lymphatiques [31].

On a différents outils pour les classer :

- La cytologie constitue la base de la classification **FAB**.
- À l'heure de la cytométrie en flux et des anticorps monoclonaux, une classification immunologique s'est établie, la classification de l'**EGIL**.
- La cytogénétique et la biologie moléculaire sont venues en complément. Et à l'heure actuelle, on a une classification qui a essayé de regrouper toutes ces classifications : la classification **OMS**.

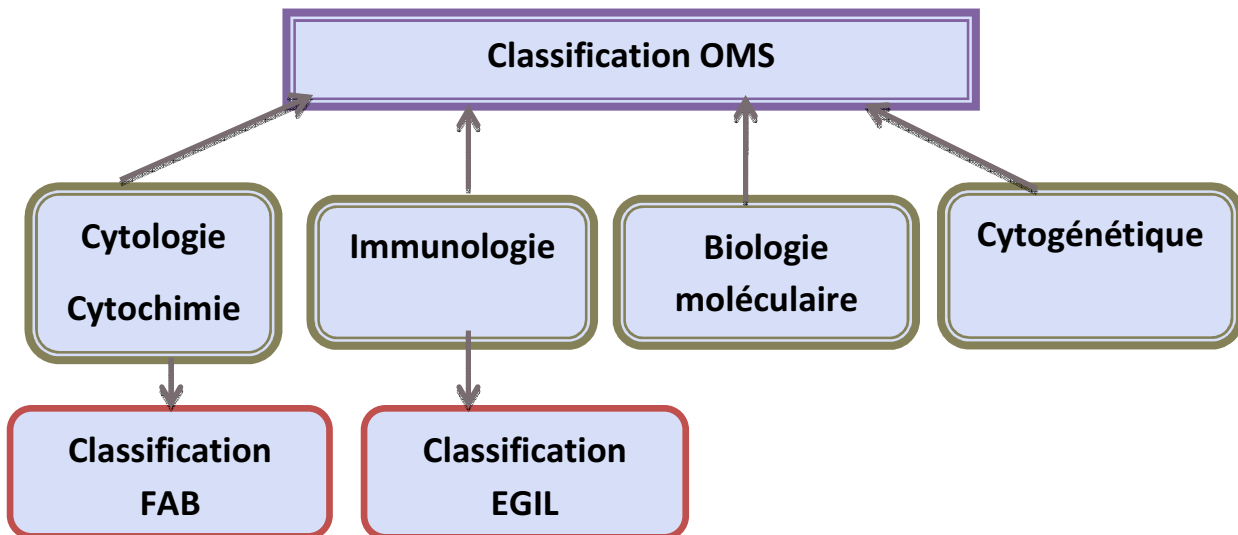


Schéma 1: Composants de la classification OMS [32].

1. Leucémies aiguës myéloïdes :

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une expansion clonale de blastes myéloïdes [33].

1.1. Classification FAB

En **1976**, une classification cytologique internationale des LAM a été mise en place. Cette classification, nommée FAB (Franco-Américano-Britannique), repose sur l'analyse morphologique et biochimique des cellules. Elle concerne essentiellement les LAM classées de **M0** à **M7** [34].

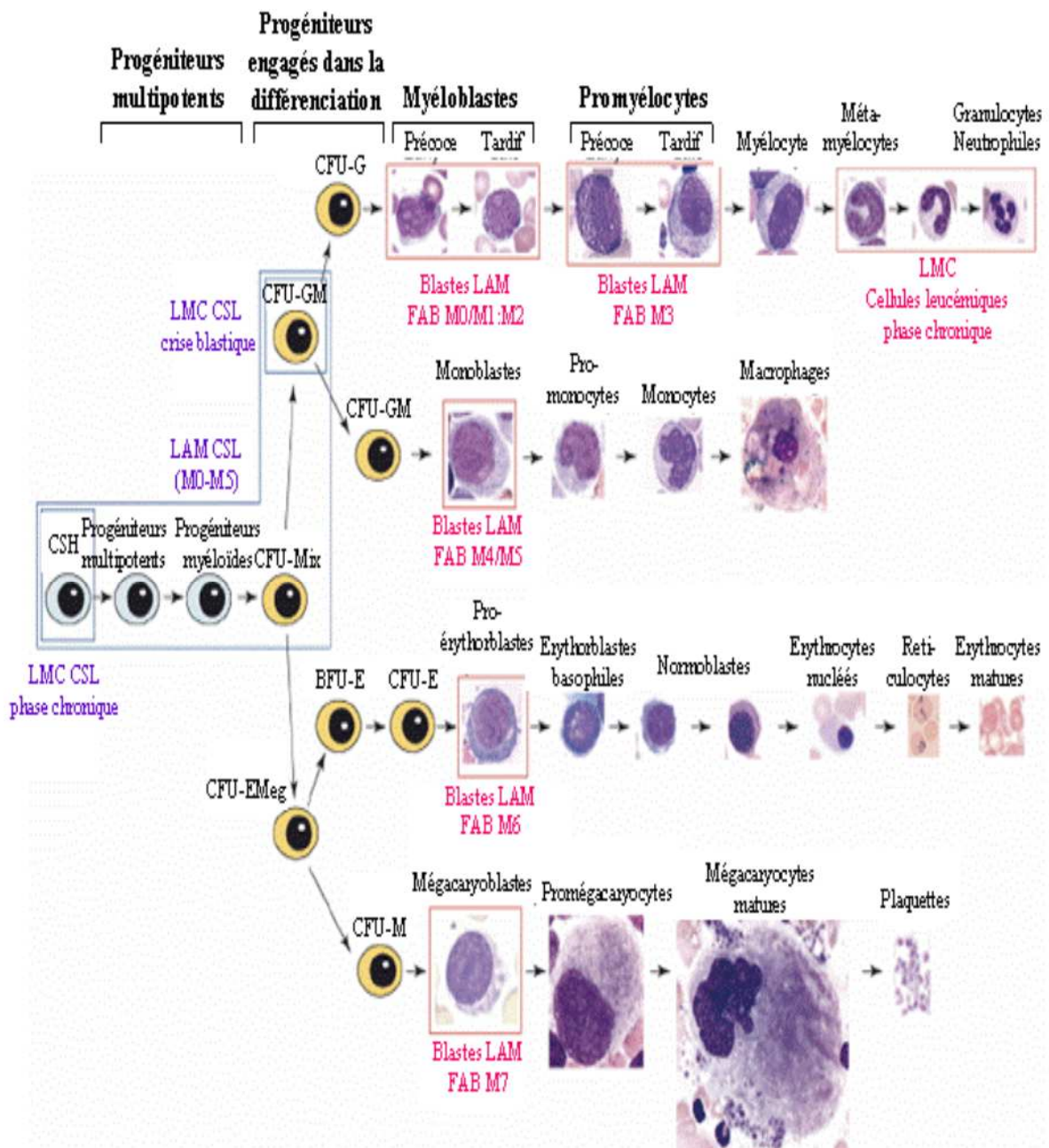


Figure 13: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et relation avec les leucémies aiguës myéloïdes [34].

Commentaires :

Les blastes leucémiques des différentes classes de FAB (LAM M0 à LAM M7) correspondent approximativement aux différentes cellules de chaque lignage. Cette classification FAB est toujours utilisée par les cytologistes quand ils ne disposent d'aucun renseignement clinique ou cytogénétique. Les réactions cytochimiques utilisées pour identifier les LA ont pour but d'aider à préciser la lignée d'appartenance des blastes en montrant la présence ou l'absence d'activité d'enzymes caractéristiques [35].

*** Myéloperoxydase**

La cytochimie de la myéloperoxydase caractérise les cellules myéloïdes granuleuses et à un moindre degré les cellules monocytaires. La présence d'une activité myéloperoxydasique dans les blastes est attestée par la dégradation de la benzidine en produit marron vert en présence de peroxyde d'hydrogène dans les cellules. Les lignées neutrophile et éosinophile montrent une positivité intense, focalisée, alors que les cellules de la lignée monocyttaire expriment la MPO sous forme de granulations cytoplasmiques fines et dispersées [35].

*** Estérases**

Il existe deux types d'estérases. **Les estérases non spécifiques**, capables d'hydrolyser le naphthol-ASD-acétate (NASDA), sont présentes dans les lignées granulocytaire et monocyttaire. L'activité enzymatique est révélée sous la forme de grains bleus. L'activité estérase de la lignée monocyttaire est inhibée par le fluorure de sodium, ce qui la différencie de celle de la lignée granuleuse pour

laquelle il n'y a pas d'inhibition. **Les estérases spécifiques**, appelées butyrate-estérases, caractérisent, les cellules monocytaires différenciées. Les réactions des estérases sont utilisées pour individualiser les cellules granuleuses et monocytaires au sein d'une population blastique [35].

La définition de leucémie aiguë selon le groupe FAB repose sur un taux de blastes au myélogramme supérieur ou égal à 30 %. L'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (AREB-T) représentait alors le stade évolutif intermédiaire entre une AREB, appartenant aux syndromes myélodysplasiques, et une LAM. La blastose de l'AREB-T se situait alors entre 20 et 30% [34].

Selon la classification FAB, qui a évolué au fil du temps, on distingue 8 catégories de LAM (Tableau VI) en fonction de la différenciation cellulaire de la MO vers une ou plusieurs lignées cellulaires et du degré de maturation des cellules. (Figures 14 à 20).

LAM	Caractéristiques	Incidence %
M0 Indifférenciés	• Les blastes médullaires représentent plus de 90 % des cellules nucléées. • Myéloblastes sans granulation ni corps d'Auer ni positivité pour la peroxydase. • Le taux de blastes positifs pour MPO est <3 %. • L'immunophénotypage des cellules blastiques est nécessaire. • Les blastes expriment au moins 2 antigènes myéloïdes et n'expriment aucun marqueur lymphoïde.	3
M1 Myéloblastique sans différenciation	• Plus de 90 % des cellules de la moelle sont des blastes. • Le taux de blastes positifs pour la MPO est supérieur ou égal à 3 %. • Les myéloblastes peuvent contenir quelques granulations et/ou un corps d'Auer.	15-20
M2 Myéloblastique avec différenciation	• MPO positifs (>ou égale à 3%) Les blastes peuvent contenir un corps d'Auer volumineux. Une monocytose peut être présente.	25-30

M3 Promyélocytaire	• Les cellules infiltratives sont des promyélocytes anormaux : cellules hypergranuleuses, renfermant de nombreux grains azurophiles et des corps d'Auer répartis en fagots dans le cytoplasme et pouvant masquer le noyau. • Il existe une variante cytologique, peu granuleuse : <u>variante microgranulaire</u> ou <u>LAM3 variante</u>. • MPO intensément positive.	5-10
M4 Myélomonocytaire	• Ressemble à la LAM-M2 avec un contingent monocytaire sanguin supérieur à 5 G/L ou un contingent monocytaire médullaire supérieur à 20% (monocytes et précurseurs monocytaires). • Une forte activité estérasique.	25-30
M4 E0 Myélomonocytaire avec éosinophiles	• Présente dans la moelle (pas dans le sang). • Un excès d'éosinophiles anormaux: grosses granulations violettes atypiques dispersées dans le cytoplasme au niveau des précurseurs.	25-30

M5 Monoblastique	• Plus de 80 % des cellules de la MO sont des cellules monocytaires (monoblastes, promonocytes ou monocytes). Selon que les blastes sont des monoblastes ou plutôt des monocytes / promonocytes (aspect différencié) on peut distinguer les LAM5a et les LAM5b. • La MPO est faiblement positive et les NASDA estérases sont positifs et inhibées par NaF.	2-10
M6 Erythroblastique ou Erythroleucémie	• La moelle osseuse est infiltrée par >50% d'érythroblastes anormaux. • Il existe un excès de blastes par rapport aux cellules non érythroblastiques (>30% de myéloblastes)	3-5
M7 Mégacaryo- blastique	• Les cellules blastiques sont peu différenciées, pouvant montrer des « blebs » cytoplasmiques. • les MPO sont négatives. • Présence des micromégacaryocytes. • Cette entité est souvent associée à une myélofibrose ce qui rend utile BOM et la CMF pour confronter le diagnostic.	3-12

Tableau VI : Classification FAB des LAM [36].

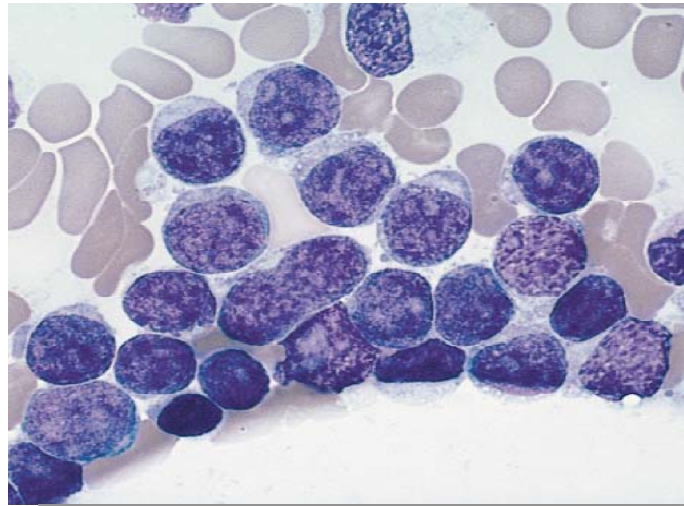


Figure 14: LAM-M1 « Envahissement médullaire par une majorité de myéloblastes (Wright-Giemsa, x 1000) » [36].

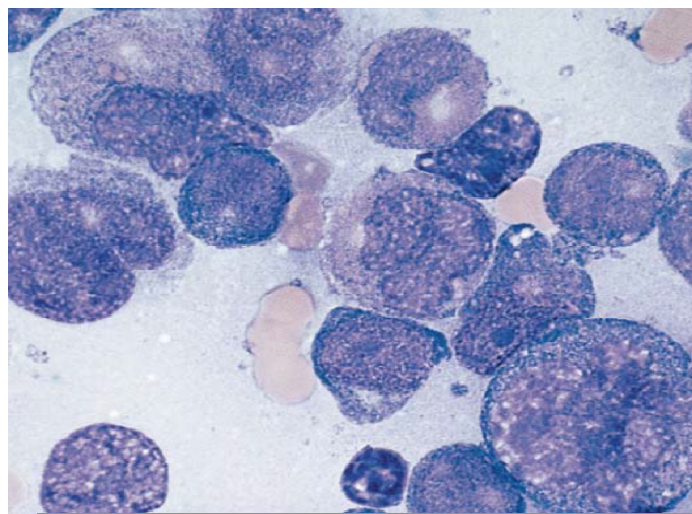


Figure 15: LAM-M2 « Aspect hétérogène avec présence de blastes, myéloblastes et maturation granuleuse anormale » (Wright-Giemsa, ×1000) [36]

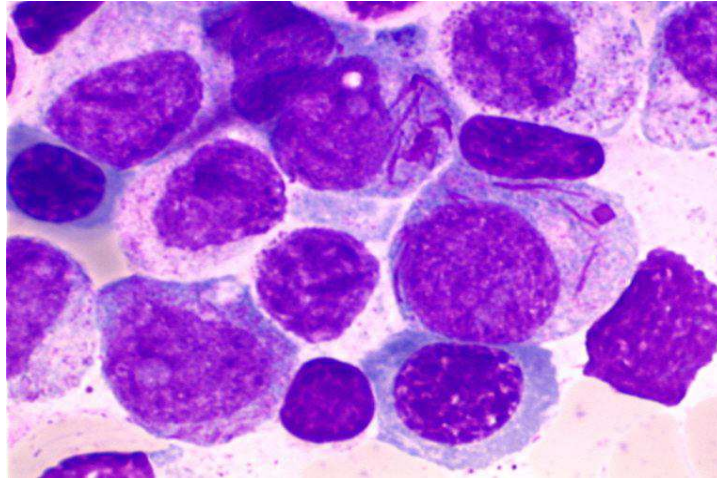


Figure 16: LAM-M3 « Présence de blastes hypergranuleux et fagots de corps d'Auer (Wright-Giemsa, $\times 1000$) » [36].

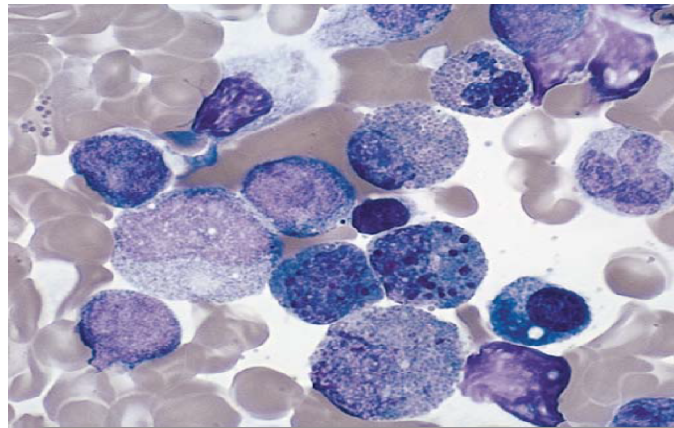


Figure 17: LAM-M4 « les noyaux sont monocytoïdes mélangés avec éosinophiles anormaux (Wright-Giemsa, $\times 1000$) » [36].

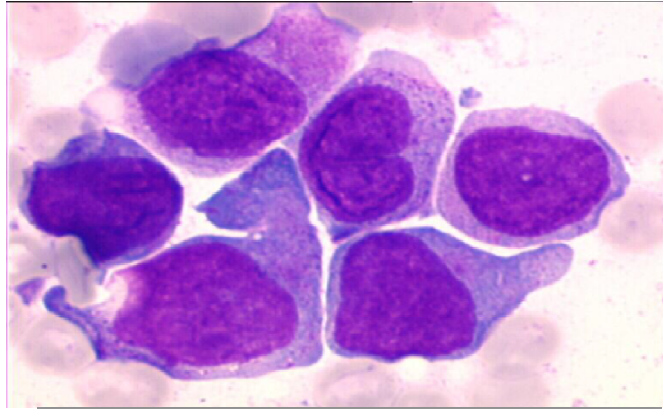


Figure 18: LAM-M5 « Mélange de monoblastes et d'éléments monocytaires différenciés (Wright-Giemsa, $\times 1000$) » [36].

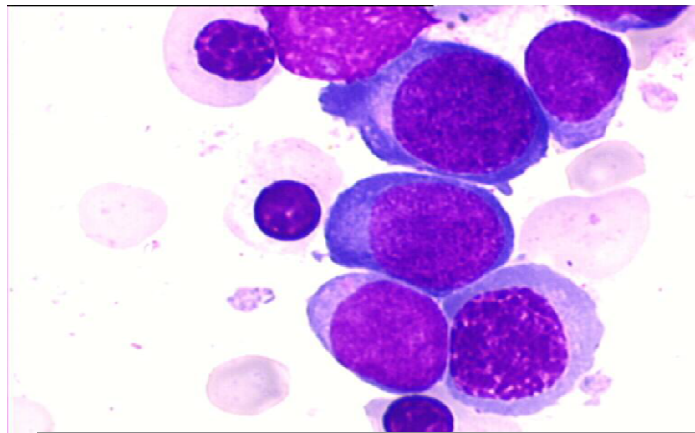


Figure 19 : LAM-M6 « mélange d'éléments de maturation érythroblastiques, dysérythropoïétiques et myéloblastes (Wright-Giemsa, $\times 1000$) » [36].

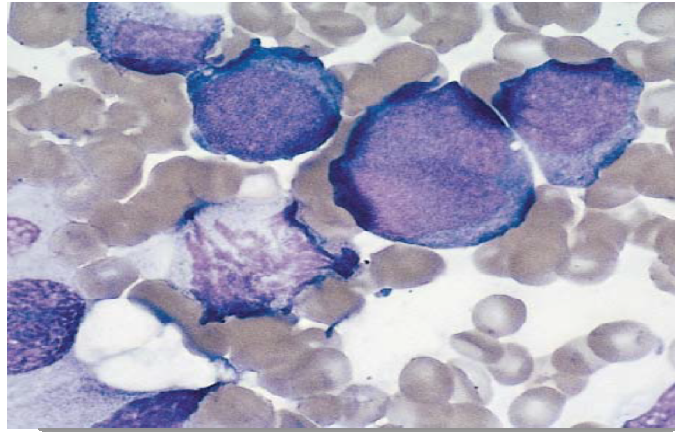


Figure 20: LAM-M7« Les cellules blastiques sont grandes, finement granuleuse, et cytoplasme légèrement basophile (Wright-Giemsa, $\times 1000$) » [36].

1.2. Classification de l'EGIL [37,38]

En **1995**, le groupe de l'EGIL établi aussi une classification dans laquelle les LAM sont définies immunologiquement par l'expression de 2 ou plus des marqueurs myélomonocytaires suivants :

- Anti-MPO (Myéloperoxydase),
- CD13, CD33,
- CDw65
- CD117(c-kit).

Seuls trois sous-types de la classification FAB peuvent être définis de manière non équivoque par l'immunophénotypage (Tableau VII).

1 – Lignée Myélomonocytaire anti-MPO +, CD13 +, CD 33+, CDw65+ et/ou CD 117+
2 – Lignée Erythroïde (érythroïde pure, M6) • Précoce / immature : inclassable par les marqueurs • Tardive / immature : anti-glyophorine A+
3 – Lignée Mégacaryocytaire (M7) CD41+ et/ou CD61+ membranaire ou cytoplasmique
4 – Myéloïde précoce (M0) phénotype comme les autres LAM myélomonocytiques mais marqueurs spécifiques cytochimiques et lymphoïdes : CD3, CD79a, CD22.
5 – TdT + LAM
6 – LAM avec expression d'antigènes lymphoïdes Ly+LAM

Tableau VII : Classification de l'EGIL des LAM [38].

1.3. Classification OMS

En **2001**, l'OMS a revu les classifications précédentes. Donc, Elle a intégré des données cytogénétiques, de biologie moléculaire ainsi que le caractère primaire

ou secondaire de la leucémie (Syndrome myélodysplasique ou à un traitement). La classification des LAM se divise alors en quatre groupes [39].

Depuis 2001, la classification FAB est complétée par celle de l'OMS. Cette classification introduit les données morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et dans le but de définir des entités biologiquement homogènes et cliniquement pertinentes. Les LAM comprennent, dans ce cas, quatre grandes catégories : *les LAM avec anomalies génétiques récurrentes*, *les LAM avec signes de dysplasie* (malformation ou déformation des cellules) *touchant plusieurs lignées*, *les LAM secondaires à des thérapeutiques* et *les LAM qui n'entrent pas dans toutes ces catégories* et pour lesquelles on peut avoir recours à la classification FAB [40].

Cette classification est basée sur un seuil de blastose de 20% pour diagnostiquer une LAM contre 30 % dans la classification FAB. En effet, il a été démontré que le pronostic des patients dont la blastose se situait entre 20 % et 30 % et classé dans la FAB comme syndrome myélodysplasique était similaire à celui des LAM avec taux de blastes supérieur à 30 %. Cette classification se base également sur l'intégration des anomalies génétiques récurrentes, la prise en considération des signes de dysplasie de la maturation myéloïde et les antécédents cliniques [39,41].

L'immunophénotypage puis la biologie moléculaire ont permis de confirmer considérablement la solidité des bases de la classification FAB mais ont progressivement souligné le besoin d'une nouvelle nosologie pour prendre en

compte de façon globale l'ensemble des données biologiques obtenues à l'aide des nouvelles techniques [42]. Ainsi la classification de l'OMS des pathologies hématologiques stratifie les tumeurs primitives selon leur lignée : tumeurs myéloïdes, tumeurs lymphoïdes, etc. Dans chaque catégorie, les maladies distinctes sont définies selon la combinaison des critères suivants :

- la morphologie,
- l'immunophénotypage,
- les caractéristiques génétiques,
- les symptômes cliniques

Ainsi 4 groupes et 17 sous-types de LAM sont reconnus (Tableau VIII) [43].

<u>LAM avec translocations cytogénétiques récurrentes</u> • LAM avec translocation t (8; 21) (q22; q22) ou AML1 (CBF α)/ ETO • LAM avec translocation t (15; 17) (q22 ; q11-12) et variant PML/RAR-alpha ou Leucémie Aiguë Promyélocytique • LAM avec éosinophiles médullaires anormaux: inv(16) (p13q22) ou t (16; 16) (p13;q11), CBF / MYH11X • LAM avec anomalie 11q23 (MLL)
<u>LAM avec dysplasie multilignée</u> • LAM avec syndrome myélodysplasique majeur • LAM sans syndrome myélodysplasique majeur
LAM et syndromes myélodysplasiques induits par agents alkylants ; épipodophyllotoxines ou autre.

LAM non différenciées

- LAM peu différenciées (M0-FAB)
- LAM sans maturation (M1-FAB)
- LAM avec maturation (M2-FAB)
- Leucémie Aiguë Myélomonocytaire (M4-FAB)
- Leucémie Aiguë Monocytaire (M5-FAB)
- Leucémie Aiguë Erythroblastiques (M6-FAB)
- Leucémie Aiguë Mégacaryocytaire (M7-FAB)
- Leucémie Aiguë Basophile
- Leucémie Aiguë Panmyéloïde avec myélofibrose

Tableau VIII: Classification OMS «2001» des LAM [43].

En **2008**, l'OMS a de nouveau modifié la classification. L'objectif était d'ajouter les nouvelles données apparues depuis 2001 et d'harmoniser les critères définissant les pathologies myéloïdes sur le plan international. Un effort particulier a été porté sur la distinction entre les néoplasmes myéloïdes et les LAM. L'OMS précise que certaines entités nouvellement décrites sont encore à confirmer. Cela laisse sous-entendre une évolution possible de la classification actuellement disponible (Tableau IX) [44].

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec t (15:17); PML/RARA (FAB M3)
- LAM avec t (8:21); RUNX1/RUNX1T1
- LAM avec t (16:16) ou inv(16); CBFβ/MYH11
- LAM avec t (9;11); MLLT3/MLL
- LAM avec t (6;9); DEK/NUP214 (Nouveau)
- LAM avec inv(3) ou t (3;3); RPN1/EVI1(Nouveau)
- LAM avec t (1;22); RBM15/MKL1 (Nouveau)
- Entités provisoires:
 - LAM avec mutation NPM1(Nouveau)
 - LAM avec mutation CEBPA (Nouveau)

LAM avec des changements liés à la Myélodysplasie (Renommé)**LAM associées à la thérapie.****LAM NOS (25-30% des LAM)**

- LAM avec différenciation minimal (FAB M0)
- LAM avec mutation (FAB M1)
- LAM avec maturation granulocytaire (FAB M2)
- LA Myélomonocytaire (FAB M4)
- LA Monoblastique /Monocytaire (FAB M5)
- LA érythroïdes (FAB M6)
- LA Mégacaryoblastiques (FAB M7)
- LA panmyelosis avec myélofibrose
- LA basophilique

<u>Sarcome Myéloïde</u>
<u>Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down</u>
-Anomalies myélopoïèse transitoires -Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down
<u>Tumeurs blastique dendritiques plasmacytoïdes cellulaire</u>

Tableau IX: Classification OMS « 2008 » des LAM (7 types et 24 sous-types) [45,46].

2. Leucémies aiguës lymphoblastiques :

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est une affection médullaire caractérisée par une prolifération clonale de lymphoblastes malins. On distingue les LAL de la lignée B et celles de la lignée T [34].

2.1. Classification FAB

En **1976**, le groupe FAB établie aussi une classification pour les LAL basées sur une observation au microscope après coloration de routine [47].

On distingue les formes L1, L2 et L3 en fonction de l'aspect du noyau et des nucléoles, du rapport nucléocytoplasmique, de la basophilie du cytoplasme et de la présence des vacuoles cytoplasmique ; généralement les nucléoles ne sont pas visibles (Tableau X et figures 21, 22 et 23) [48].

LAL	Caractéristiques	Incidence (%)
L1	• Prolifération cellulaire homogène • Blastés de 15 à 25 µm de diamètre • Rapport nucléocytoplasmique élevé (> 80 %) • Noyau arrondi avec 1 ou 2 petites encoches • Chromatine fine avec petit nucléole • Cytoplasme basophile réduit à une fine couronne périnucléaire • Pas de corrélation entre morphologie et immunologie	30
L2	• Prolifération cellulaire hétérogène • Blastés de 20 à 30 µm de diamètre • Rapport nucléocytoplasmique variable (< 80 %) • Noyau à contour régulier • Chromatine fine parfois réticulée 1 à 2 nucléoles bien visibles • Cytoplasme basophile avec parfois de fines granulations peroxydase négative • Pas de corrélation entre morphologie et immunologie.	65

L3 Leucémie de Burkitt	• Prolifération cellulaire hétérogène • Blastes de 20 à 30 µm de diamètre • Noyau arrondi • Chromatine fine parfois perlée 1 à 2 nucléoles bien visibles • Cytoplasme abondant très basophile souvent criblé de vacuoles • Marqueurs immunologiques des proliférations B	5
---	---	----------

Tableau X : Classification FAB des LAL [49,34].

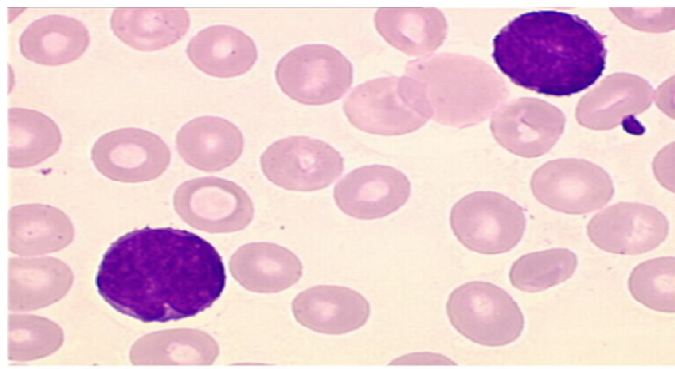


Figure 21 : LAL 1 « le rapport nucléocytoplasmique est très élevé et l'absence de nucléoles» [50].

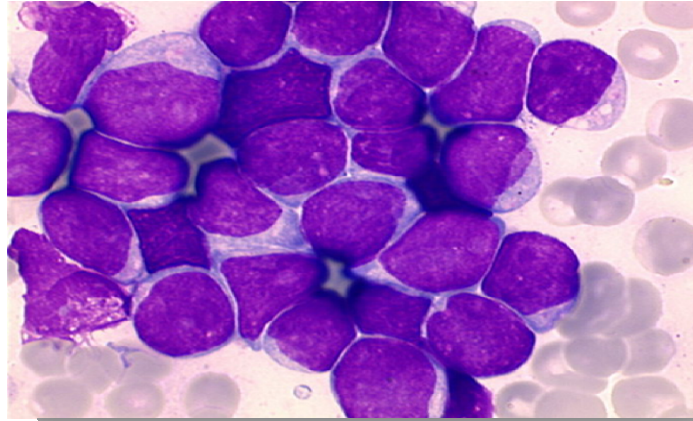


Figure 22 : LAL 2 « présence des nucléoles visible et cytoplasme plus abondant » [50].

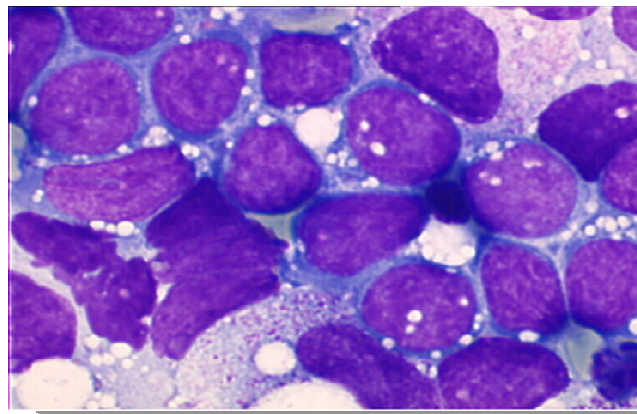


Figure 23 : LAL 3 «Envahissement médullaire par de grandes cellules blastiques à cytoplasme hyperbasophile vacuolaire » [50].

2.2. Classification de l'EGIL

En **1995**, l'EGIL met en place un système de classification des LAL selon leurs marqueurs de surface cela permet à la fois de distinguer le caractère B ou T de la LAL et de définir un stade de maturation codé de I à IV; car la cytologie ne permet pas une bonne distinction entre les différentes formes observées [37].

Les leucémies aiguës lymphoblastiques B ou T, si elles sont toutes développées à partir de cellules immatures, le sont à partir de précurseurs ayant 4 niveaux de différenciation distincts dont les phénotypes immunologiques ont été définis par l'EGIL (Tableau XI) [51].

Ces proliférations sont parfois porteuses d'anomalies cytogénétiques ayant une valeur pronostique importante qui entraîne une prise en charge thérapeutique différente [52].

<u>Lignée B</u> : toujours C19+ et/ou CD79+ et/ou CD22+	
BI (pro-B)	Pas d'autre marqueur B
BII (B commune)	CD10+
BIII (pré-B)	Chaîne μ intracytoplasmique
BIV (B mature)	Chaîne légère Kappa ou Lambda de surface
<u>Lignée T</u> : toujours CD3+ en intracytoplasmique ou en surface	
TI (Pro-T)	CD7+
TII (pré-T)	CD2+ et/ou CD5+ et/ou CD8+
T-III (T cortical)	CD1a+
T-IV (T mature)	CD3+ en surface, CD1a-
a: α/β T	TCR α/β +
b : γ/δ T	TCR γ/δ +

Tableau XI : Classification immunophénotypique des LAL selon l'EGIL [37].

2.3. Classification OMS

La classification des leucémies aiguës (LA) proposée par l'OMS en 2001 (Tableau XII), intègre des données génétiques et cliniques aux données morphologiques et immunophénotypiques déjà utilisées dans les précédentes classifications FAB et de l'EGIL [53].

Classification des leucémies aiguës lymphoïdes sur la présence d'anomalies génétiques récurrentes :

- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes hyperdiploïdes à plus de 50 chromosomes (entre 51 et 64)
 - Fréquence estimée à 20-25 % des LAL chez l'enfant (2 et 10 ans).
 - Il s'agit le plus souvent de LAL communes (BII) non hyperleucocytaires
 - Bon pronostic
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes hyperdiploïdes à moins de 45 chromosomes
 - Fréquence estimée à 5 % environ.
 - Il s'agit habituellement de LAL B communes (BII) mais parfois aussi de LAL T dans 20 % des cas.
 - Mauvais pronostic
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (12;21) (p13;q22)
 - Fréquence dans 25 % des cas de LAL B de l'enfant,
 - Pronostic favorable
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (1;19) (q23;p13.3)
 - 6 % des cas de LAL B chez l'enfant.
 - Pronostic péjoratif
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (9;22) (q34;q11.2)
 - Rares chez l'enfant (3 à 4%)
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec anomalies du gène MLL (11q23)
 - Fréquence chez l'enfant estimée à 2-3 %,
 - Constitue 60 % environ des LAL B de l'enfant de moins de 1 an

❖ Leucémies aiguës lymphoïdes à cellules de Burkitt ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes T avec t (5;14) (q35;q32) - 25 % des LAL T de l'enfant. - Mauvais pronostic
<u>Leucémies aiguës lymphoïdes sans anomalies génétiques significatives.</u> D'autres anomalies cytogénétiques sont mises en évidence dans les LAL, mais elles ne sont pas associées à des entités particulières. Il existe en outre des LAL B ou T pour lesquelles aucune anomalie génétique n'est actuellement détectée.

Tableau XII : classification OMS « 2001 » des LAL [53,54].

En **2008**, l'OMS apporte plusieurs entités spécifiques chez les patients présentant une leucémie aiguë lymphoblastique de type B définies par l'existence d'anomalies chromosomiques associées notamment avec des caractéristiques phénotypiques et pronostique (Tableau XIII). Ils comprennent le t (9;22), t (v;11q23), t (12;21), LAL B avec hyperdiploïdie, LAL B avec hypodiploïdie, t (5;14) et t (1;19). D'autres anomalies chromosomiques, telles que del (6q), del (9p), et del (12p) ne semblent pas affecter l'issue de tous les patients [55].

<u>Précurseur de la leucémie aiguë lymphoblastique B / lymphomes non spécifiés « lymphoma not otherwise specified » (NOS)</u>
<u>Précurseur B de la leucémie aiguë lymphoblastique / lymphome avec anomalies génétiques récurrentes :</u> t (9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL1 t (v;11q23); MLL (réarrangé) t (12;21) (p13;q22); TEL/AML 1 (ETV6-RUNX1) B-ALL avec hyperdiploïdie B-ALL avec hypodiploïdie t (5;14) (q31;q32); IL3-IGH t (1;19) (q23;p13.3); E2A-PBX1 (TCF-PBX1)
<u>Précurseur des cellules T de leucémie aiguë lymphoblastique</u>

Tableau XIII : Modification apportée par classification OMS 2008 [55,56].

Les anomalies de bon pronostic sont l'hyperdiploïdie entre 51 et 65 chromosomes et la translocation (12; 21) (p13; q22) qui juxtapose les gènes TEL et AML-1. Elles sont celles qui sont le plus largement retrouvées puisque présentes dans plus de la moitié des cas. Au contraire, une hypodiploïdie, une translocation (9;22) (q34;q11.2) juxtaposant les gènes BCR et ABL, une translocation (4;11) (q21;q23) responsable de la fusion du gène MLL et du gène AF4 ou une translocation (1;19) (q23; p13.3) juxtaposant les gènes E2A et PBX sont des anomalies de mauvais pronostic. D'autres anomalies peuvent être retrouvées qui sont associées à un pronostic intermédiaire [52].

3. Leucémies aiguës biphénotypiques

Les leucémies aiguës biphénotypiques (biphenotypic acute leukemia : BAL) sont identifiées par la présence sur les mêmes blastes de molécules membranaires ou cytoplasmiques appartenant à au moins deux lignées (lymphoïde B, T ou myéloïde).

Seul l'examen par cytométrie en flux est susceptible d'identifier la leucémie aiguë biphénotypique. La terminologie de la littérature concernant les BAL est néanmoins très confuse, car ces leucémies sont aussi parfois appelées leucémies «mixtes», leucémies «Hybrides», leucémies «My+LAL» ou encore leucémies «Ly+LAM». Elles devraient en réalité être appelées leucémies «chimères » à distinguer cependant des leucémies biclonales ou des leucémies exprimant de façon aberrante un ou plusieurs marqueurs. Les BAL sont observés aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. Comme dans les LAM, certaines BAL peuvent apparaître de novo et d'autres peuvent être secondaires aux traitements en particulier à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie [52].

L'aspect morphologique des BAL est hétérogène; comme dans toutes les LA, il existe dans la moelle plus de 20% de blastes, dont les aspects font évoquer soit des lymphoblastes dans environ 1/3 des cas soit plus fréquemment des myéloblastes. En cas de LAM, un aspect de LAM3, LAM6 ou LAM7 semblerait exceptionnel voire inexistant. La coloration à la MPO est essentielle : elle peut être positive, caractérisant la Ly+ LAM, ou négative et identifiant alors la My+ LAL. Lors de l'immunophénotypage par cytométrie en flux, des marqueurs de

surface sont mis en évidence. Une équivalence en points est attribuée aux marqueurs les plus spécifiques des lignées [57].

En **1995**, l'EGIL a proposé un système de score permettant de déterminer le caractère biphénotypique des LA (Tableau XIV). Ce score correspond au total des points. Alors à partir du moment où ce score est supérieur à 2 pour deux lignées, la leucémie est biphénotypique et déclarée LAL My⁺ (T/My ou B/My) ou LAM Ly⁺ selon les lignées engagées. D'où, une leucémie aiguë avec un score supérieur à 2 dans une lignée et un score plus faible dans une autre ne peut être considérée comme une BAL [52].

Score	Lignée B	Lignée T	Lignée Myéloïde
2 points	CD79a CD22 cyt IgM cyt	CD3 anti-T anti-TCR	anti-MPO
1 point	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CD117 CDW65
0,5 point	TdT CD24	TdT	CD14 CD15 CD64

Tableau XIV: Identification de BAL par détermination du score immunologique de l'EGIL « Valeur en points attribuée à chaque marqueur pour les lignées B, T et Myéloïde. » [52].

Contrairement à l'EGIL, l'OMS en **2008** a décidé de regrouper les BAL et les leucémies aiguës avec la présence de marqueurs aberrants sous le terme de LA phénotypiquement mixtes ou MPAL (Mixed Phenotype Acute Leukemia). Pour inclure les LA dans ce groupe des MPAL, le score de l'EGIL n'était plus approprié et a été remplacé par un ensemble de critères immunologiques ou biochimiques. L'objectif était de conserver uniquement les marqueurs de lignée les plus importants comme le CD3 cytoplasmique pour la lignée T. En associant les données génétiques telles que les translocations chromosomiques et cliniques comme les antécédents de syndrome myélodysplasique, ces nouveaux critères doivent permettre une meilleure classification des MPAL [52].

De plus, l'OMS en 2008 exclut des MPAL les leucémies aiguës avec anomalies cytogénétiques récurrentes: les LA avec t (8;21), t (15;17) ou inv(16) sont classées dans les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes malgré l'expression de marqueurs de lignées non myéloïdes [48].

La classification OMS de 2008 a créé des catégories distinctes pour deux anomalies cytogénétiques, les plus communes décrites dans les MPAL:

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

Ces entités sont corrélées à un mauvais pronostic. L'OMS 2008 classe les MPAL sans anomalie cytogénétique spécifique en :

- ❖ LA de phénotype mixte B et myéloïde, sans autre spécification.
- ❖ LA de phénotype mixte T et myéloïde, sans autre spécification [44].

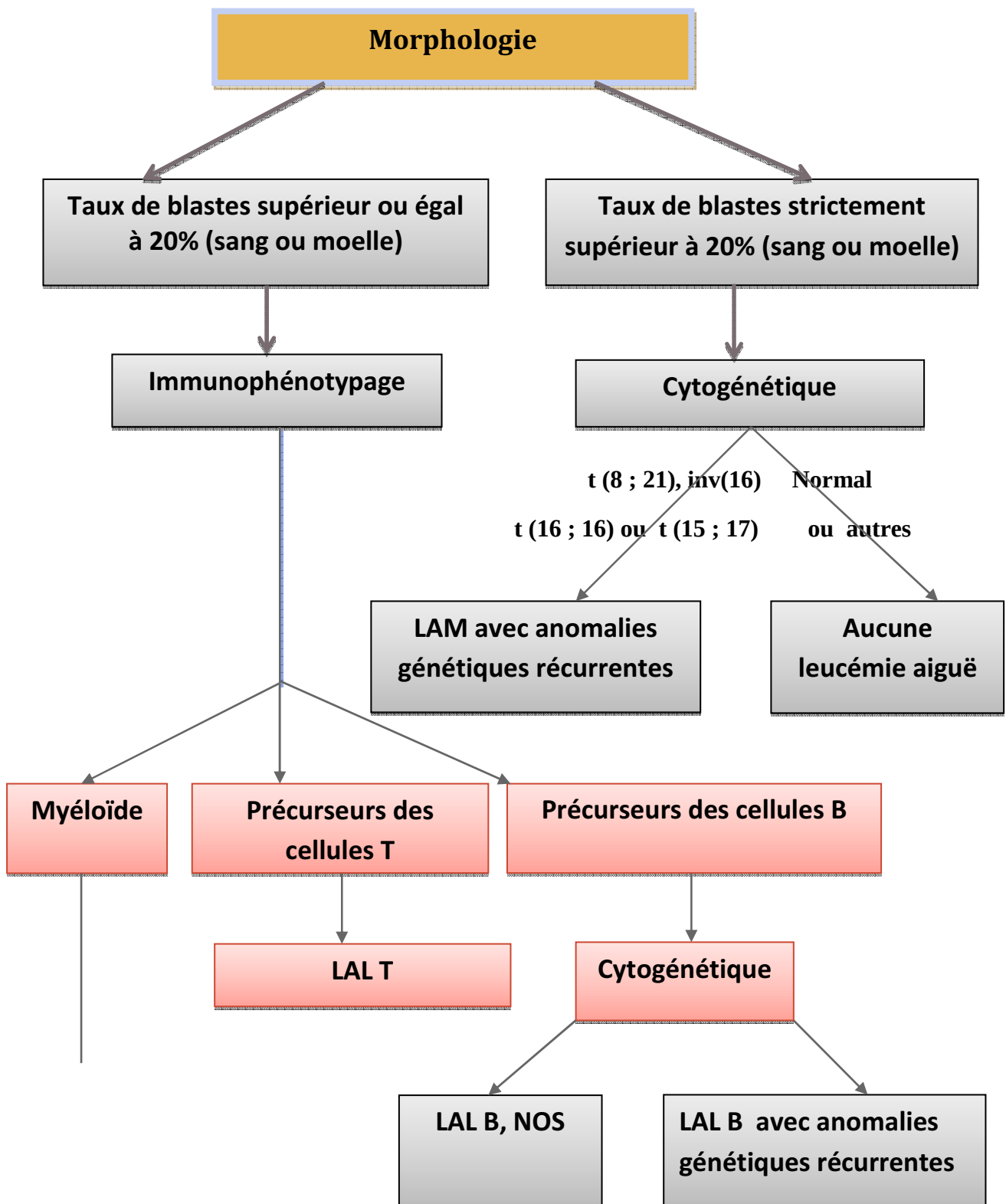
4. La limite des classifications

L'intérêt de classer les LA en groupes et sous-groupes est à la fois scientifique et clinique a pour but de mieux comprendre les mécanismes de ces pathologies ce qui permet une meilleure prise en charge des patients [44].

Toutefois, les progrès technologiques et scientifiques ont montré des limites à ces classifications du fait que loin de pouvoir être figées, elles sont constamment revues et améliorées et malgré ces révisions, certaines leucémies sont « inclassables » car elles présentent des marqueurs à la fois lymphoïdes et myéloïdes. Il peut s'agir d'une seule leucémie dite biphénotypique (BAL) ou de deux pathologies concomitantes [58].

Ces cas, très rares, ont obligé la communauté scientifique et médicale à reconsidérer les classifications jusqu'à présent divisées selon la dichotomie myéloïde/ lymphoïde. A terme, il est à souhaiter que les classifications des leucémies aiguës comme de l'ensemble des hémopathies s'inspirent et évoluent conjointement aux modifications de la compréhension de l'hématopoïèse et de la reconsidération de son schéma classique [59].

5. Approche algorithmique de la classification des leucémies aiguës :



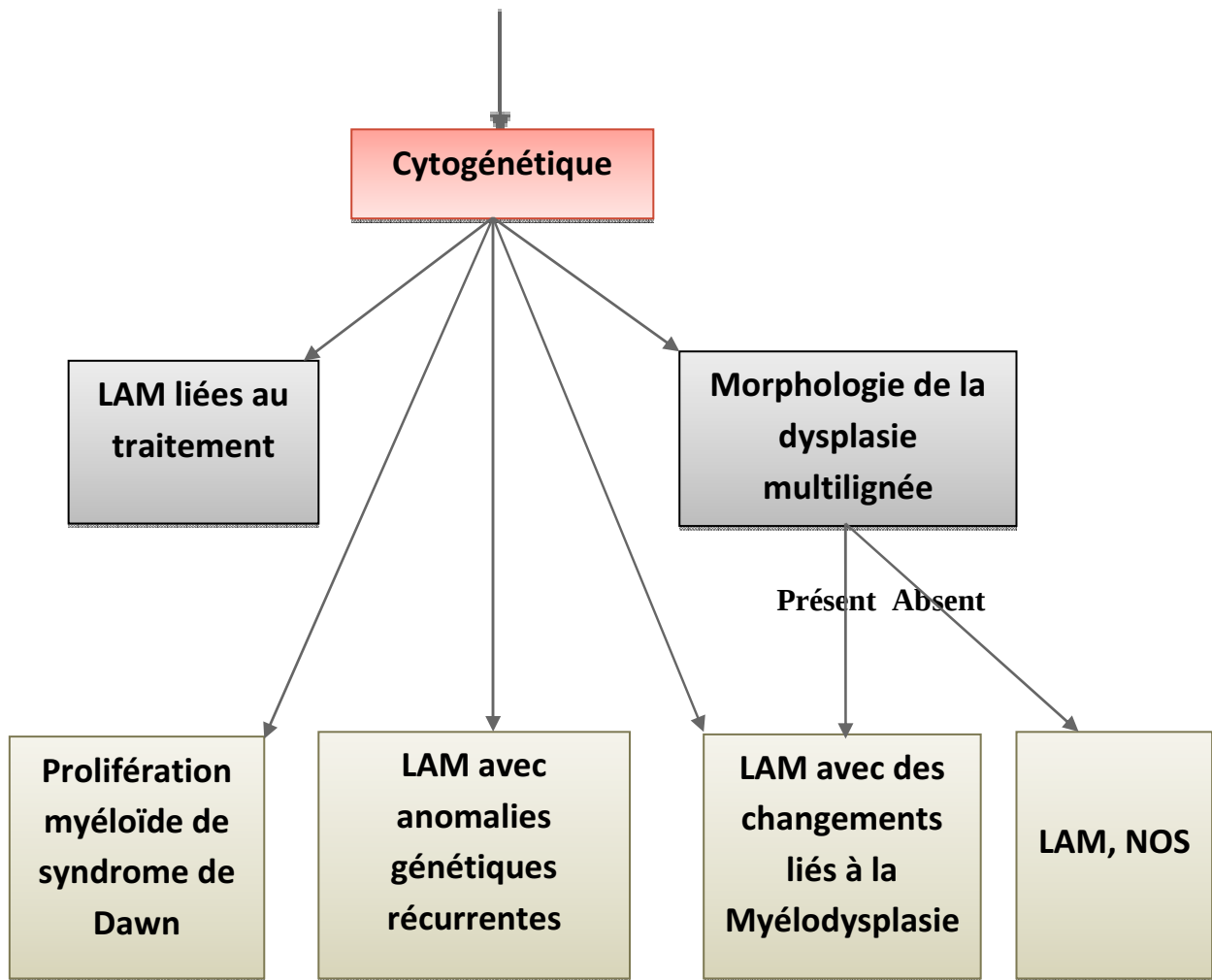


Schéma 2: Approche algorithmique sur la classification des leucémies aiguës [48,60].

C. DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES

1. La clinique :

Le diagnostic initial des leucémies aiguës repose sur l'expression clinique de la maladie qui se résume en deux types de signes: ceux qui sont liés à l'insuffisance médullaire et ceux qui sont liés à la prolifération tumorale [27].

<u>LAM</u>	<u>LAL</u>
Il s'agit le plus souvent d'un tableau clinique d'apparition brutale, la découverte est plus rarement fortuite : numération systématique ou surveillance d'une pathologie considérée comme un facteur de risque (Myélodysplasie, SMP...) • Insuffisance médullaire (<u>Syndrome anémique</u>, <u>Syndrome infectieux</u>, <u>Syndrome hémorragique</u>) • Le syndrome tumoral peut être le premier point d'appel	Elles sont parfois identiques aux LAM • Une insuffisance médullaire (<u>syndrome anémique</u>, <u>syndrome hémorragique</u>, <u>syndrome infectieux</u>). • Un syndrome tumoral modéré (adénopathies, splénomégalie et/ou hépatomégalie est noté souvent dans les LAL que dans les LAM. • Des douleurs osseuses spontanées. • Les atteintes neurologiques • Une atteinte testiculaire

Tableau XV: Tableau clinique des leucémies aiguës [61,62,63].

2. Diagnostic biologique:

2.1. Diagnostic positif :

Il repose généralement sur hémogramme, myélogramme et les autres examens complémentaires : immunophénotypage, caryotype et biologie moléculaire. Ces examens aident à identifier le type de la leucémie aiguë [48].

2.1.1. Hémogramme :

Il est toujours anormal et représente l'examen d'orientation majeur du diagnostic.

a) Prélèvement :

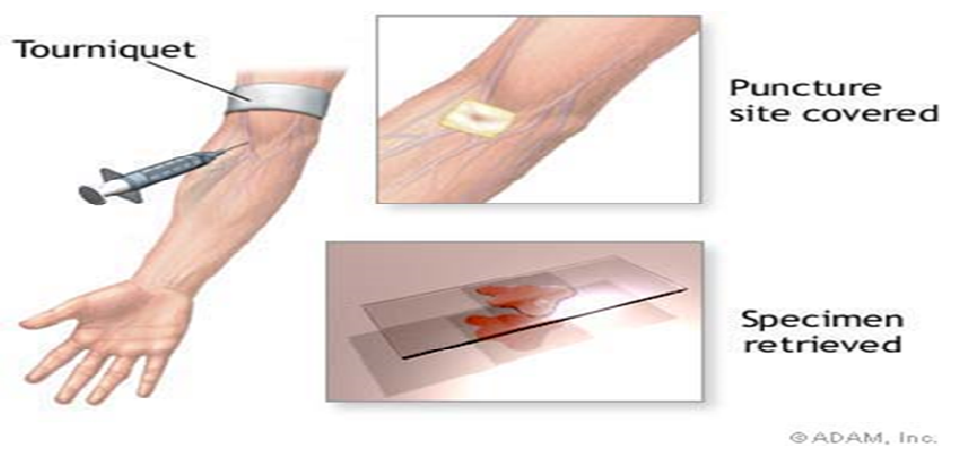


Figure 24: Prélèvement veineux au pli du coude pour la réalisation d'hémogramme [64].

Le sang est prélevé de la veine situé au pli du coude (Figure 24) ou de la veine dorsale de la main, et recueilli dans un tube EDTA. Des frottis sanguins capillaires au bout du doigt peuvent être réalisés.

b) Interprétation : [28,65,66]

La sémiologie complète comporte une pancytopénie : **anémie** (90 à 95 % des cas) **aréogénérative normocytaire**, **neutropénie** et **thrombopénie** (90 % des cas). La pancytopénie est accompagnée le plus souvent d'une **blastose**. Cependant, il existe de nombreuses atypies (+++) qui n'excluent pas le diagnostic de LA. L'anémie et/ou la thrombopénie peuvent être absentes à la phase précoce. Il peut exister une leuco-neutropénie avec de rares blastes circulants. Aussi, on peut avoir une pancytopénie sans blaste circulant.

2.1.2. Myélogramme :

La ponction médullaire permet l'étude morphologique des cellules médullaires sur étalements, après une coloration classique de type May-Grünwald-Giemsa ou Wright [67].

Le myélogramme est indispensable pour affirmer le diagnostic «Examen clé» et doit être réalisé devant toute **pancytopénie** même en l'absence de blastes circulants [68]. Il permet de compléter le bilan pronostique par un caryotype, un immunophénotypage des cellules leucémiques et un examen de biologie moléculaire. Il peut être réalisé quelle que soit la profondeur de la thrombopénie ou en fonction des troubles éventuels de l'hémostase associés à la maladie. Le

myélogramme permet aussi de réaliser une classification cytologique des LA en groupes cytologiques [69].

a) Prélèvement :

La ponction médullaire se pratique à l'aide d'un trocart de Mallarmé (Figure 25) soit par une:

- ✓ Ponction sternale (PS): au niveau du manubrium sternal à côté de la ligne médiane au niveau du premier espace intercostal.
- ✓ Ponction iliaque (PI): au niveau de l'Épine iliaque postéro-supérieure ou au niveau de l'Épine iliaque antéro-supérieure [67].



Figure 25: Réalisation d'un myélogramme [70].

b) Préparation :

L'échantillon de la moelle est déposé et étalé sur 8 à 10 lames de verre dégraissées selon différentes techniques dont les deux principales sont :

- Les frottis : la procédure des frottis médullaires (Figure 26) est similaire à celle des frottis sanguins bien que la viscosité de la moelle soit différente de celle du sang. Les lames sont laissées à l'air, à température ambiante sur un plan horizontal en évitant de les agiter jusqu'à ce qu'elles soient totalement sèches.
- les écrasements de grains de moelle ou « grumeaux » : cette technique consiste à déposer un grain de moelle sur une lame et à l'écraser avec une seconde lame tout en l'étalant [71].

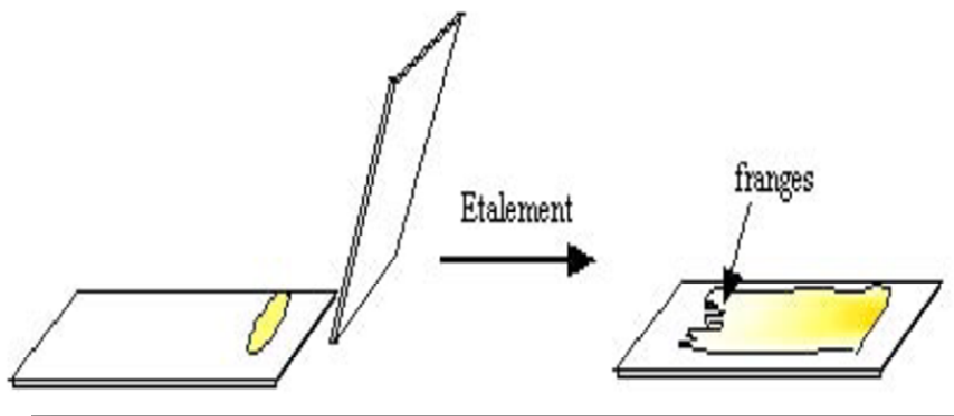


Figure 26 : Frottis médullaire [72].

c) Interprétation :

Le myélogramme montre typiquement : [61]

- ✓ Une moelle en général hypercellulaire avec diminution des lignées cellulaires normales (granuleuse, érythroïde et mégacaryocytaire) ;
- ✓ Un infiltrat blastique souvent élevé (90%). Il faut au moins 20% de blastes pour poser le diagnostic de LA selon la nouvelle classification de l'OMS;
- ✓ Une différenciation résiduelle parfois anormale (polynucléaires, monocytes, mégacaryocytes anormaux) ;
- ✓ Les blastes et les éléments de différenciation peuvent contenir des granulations anormales comme les corps d'Auer :
 - * Rares dans les M1, M4 ou M5; fréquents dans les M2.
 - * Très nombreux, en " fagots ", dans les LA promyélocytaire (M3)

L'aspiration du suc médullaire est parfois impossible en cas de fibrose. Ce cas de figure est fréquent lors de la LAM mégacaryoblastique (LAM7). La réalisation d'une BOM est alors impérative pour permettre d'apprécier l'infiltration blastique et de démontrer la présence d'une myélofibrose [73].

2.1.3. Etude cytochimique :

Les études cytochimiques complètent l'interprétation cytologique, donc, elle a pour but de confirmer la lignée d'appartenance des blastes. L'étude cytochimique est généralement réalisée sur des frottis sanguin ou médullaire. Le principe repose sur la dégradation d'un substrat synthétique par l'enzyme étudiée en un produit insoluble et coloré observable en microscopie optique. Les

colorations de routine concernent essentiellement deux types d'activités enzymatiques : les myéloperoxydase, caractéristiques des LAM, et les estérases qui sont positives sur les cellules granuleuses et monocytaires [74].

✱ *Cytochimie de la Myéloperoxydase:*

La myéloperoxydase caractérise les cellules myéloïdes granulocytaires et à un moindre degré les cellules monocytaires. Elle est absente dans les lymphocytes et les globules rouges (Figure 27 et 28). Dans la LAL, les cellules leucémiques sont négatives pour la réaction aux MPO (la positivité de la réaction des MPO ne peut excéder 3% des blastes) [74].

✱ *Noir soudan B:*

Plusieurs lipides intracellulaires, y compris les phospholipides sont colorés intensément par le noir soudan B. Les polynucléaires neutrophiles et leurs précurseurs montrent une granulation intracellulaire bleue noire. Les monocytes se colorent moins intensément et les lymphocytes ne se colorent pas avec le noir soudan B [74].

✱ *PSA (Periodic Acid-Schiff):*

L'acide périodique Schiff (PAS) met en évidence le glycogène et les mucopolysaccharides neutres intracellulaires [37]. La coloration de PAS est positive dans les blastes de LAL, avec une précipitation en grosses granulations ou en blocs en couronne sur un cytoplasme négatif (Figure 29). L'étude

cytochimique a tendance d'être abandonnée au profit de l'immunophénotypage par la CMF [75].

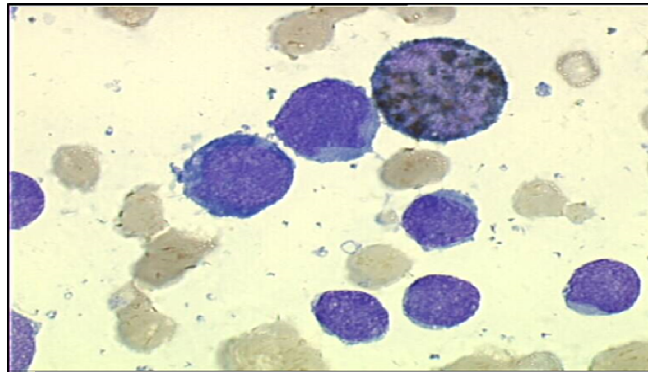


Figure 27: Absence d'activité myéloperoxydasique dans les blastes (LAL) alors qu'un précurseur granulocytaire résiduel apparaît nettement positif [76].

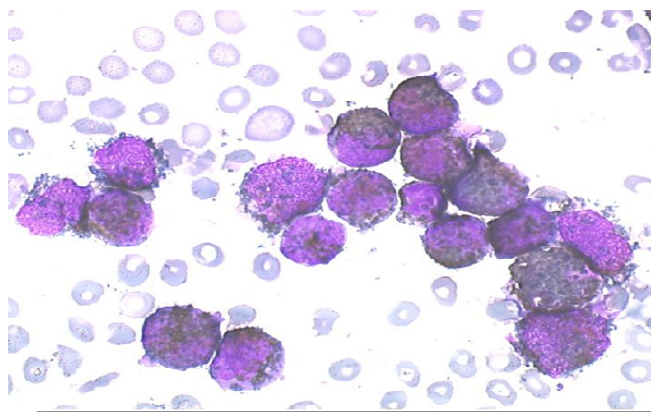


Figure 28 : LAM (LAM3v selon classification de FAB) réaction positif au myéloperoxydase [76].

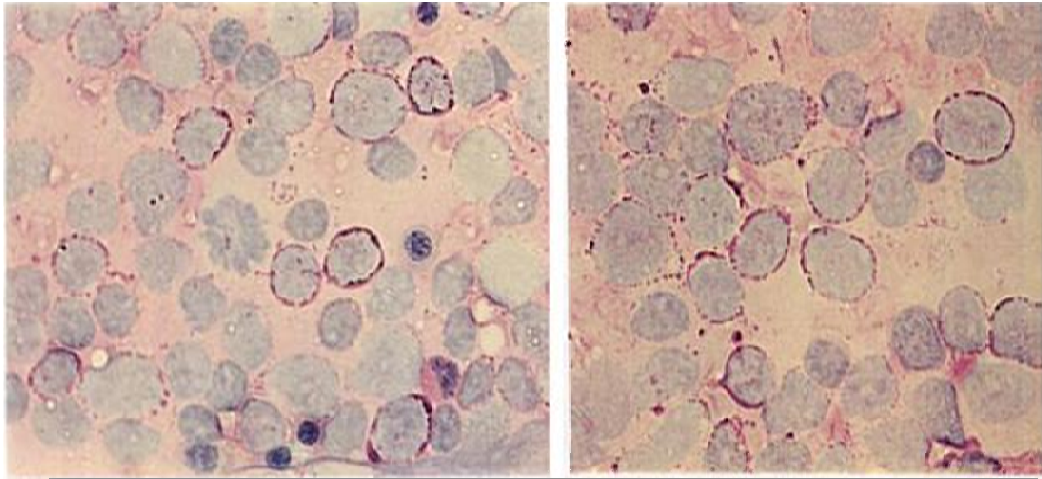


Figure 29 : LAL : réaction cytochimique à l'acide périodique Schiff [75].

2.1.4. Immunophénotypage des blastes :

L'immunophénotypage recherche par cytométrie en flux l'expression de divers antigènes de différenciation membranaires ou intracytoplasmiques pour établir le bon diagnostic et pronostic ainsi de définir la lignée des cellules leucémiques [58]. (Cf. paragraphe D)

- Il permet de déterminer, à l'aide d'AcMo, la classification de LAL, le type de lignée : lignée B ou T, ainsi que le stade de maturation.
- 75 % des LAL de l'adulte sont de la lignée B (pro-B, pré-B et B mature) alors que les LAL T (pré-T et T) ne représentent que 25 % des cas.
- Il permet également de chercher l'existence ou non de marqueurs myéloïdes associés (le CD13, le CD33 et parfois le CD34 un marqueur de progéniteur [45]).

2.1.5. Etude cytogénétique :

L'analyse cytogénétique d'une leucémie aiguë chez un patient suspecté est devenue un élément essentiel du diagnostic [28]. Ses résultats, qui doivent être obtenus tôt, permettent de déterminer, certaines entités pathologiques et d'engager une thérapeutique plus spécifique (Tableau XVI) [77].

Le caryotype révèle toutes les aberrations reconnaissables au microscope qui survienne simultanément dans les cellules leucémiques indépendamment du fait que ces aberrations sont numériques ou structurelles [78].

Bien qu'il s'agisse d'un examen indispensable, le caryotype est parfois mis en défaut, donc, il est avantageusement associé aux techniques de biologie moléculaire (PCR ou FISH) qui se rendent très utiles pour compléter le caryotype conventionnel [79].

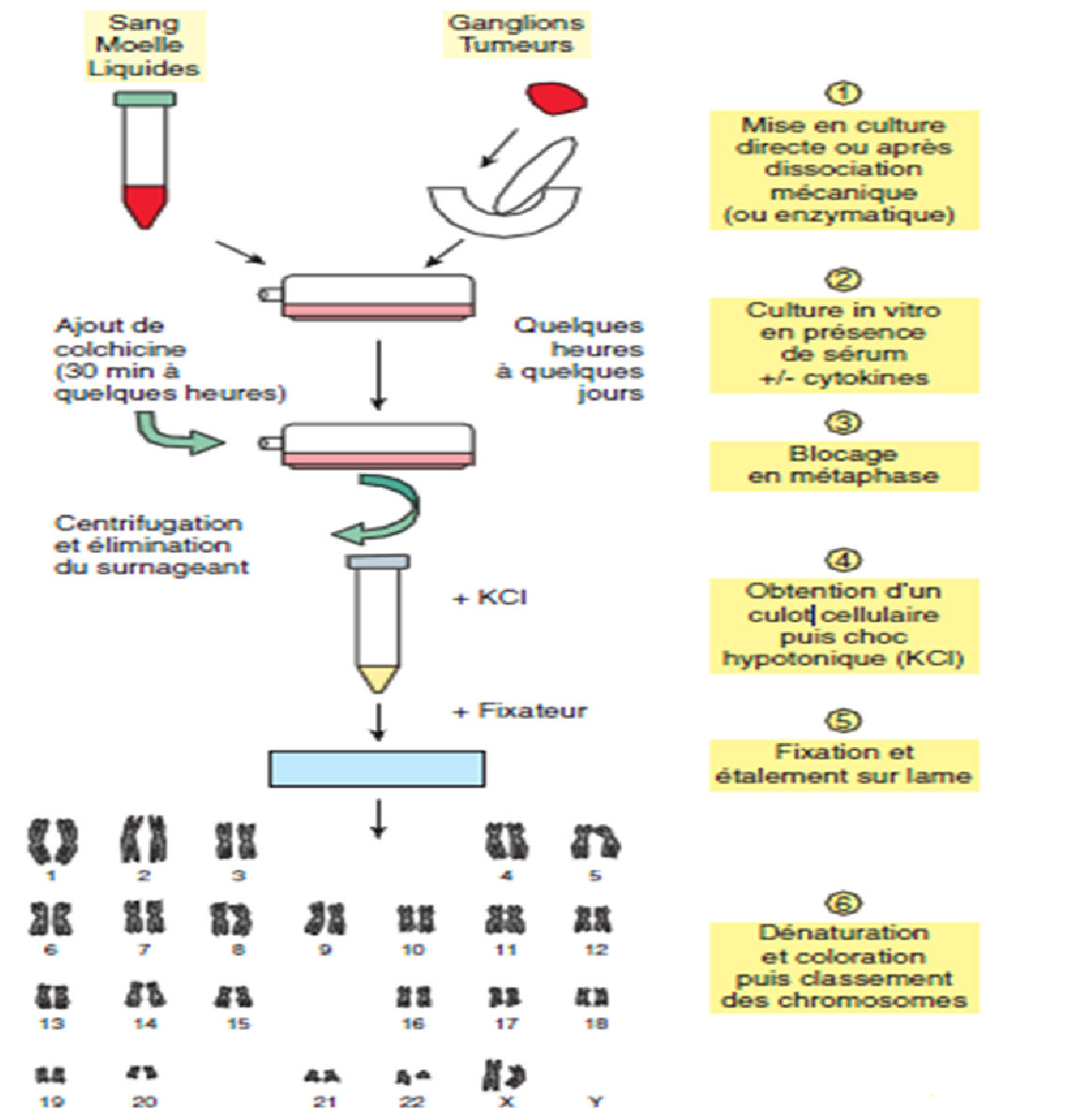


Figure 30: Etapes de l'analyse en cytogénétique [80].

	Caryotypes typiques	Possibles particularités cliniques et/ou connotations pronostiques
<u>LAM</u>		
M0 (2-3%)	inv (3q26) et t (3;3) (1%)	*Mauvais pronostic
M1 (15-20%)		
M2 (25-30%)	t (8;21) (40%)	*Chloromes, bon pronostic
M3 (5-10%)	t (15;17) (98%)	*CIVD, sensibilité à l'ATRA, bon pronostic
M4 (20-30%)	11q23 (20%) et 3q26 (3%)	*Atteintes cutanée, gingivale ou méningée, mauvais pronostic
M4eo (5-10%)	inv (16) et t (16;16) (80%)	*Hyperleucocytose, atteinte méningée, bon pronostic
M5 (10%)	11q23 (20%)	*Hyperleucocytose, atteintes cutanée, gingivale ou méningée, mauvais pronostic
M6 (3-5%)		*Sujets âgés, antécédent de Myélodysplasie, anémie, faible syndrome tumoral, arthropathies et signes dysimmunitaires
M7 (3-12%)	t (1;22) (5%)	*Enfants trisomiques ou antécédent de syndrome myéloprolifératif, mauvais pronostic

<u>LAL</u> LAL B (< 5%)	t (8;14) et variants	*sexe masculin (83 %), jeune âge (66 % < 35 ans), cinétique rapide, adénopathies abdominales, atteinte méningée.
LAL T (10-15%)	t (1;14)	*Hyperleucocytose, sexe masculin, masse médiastinale, atteinte méningée, mauvais pronostic
LAL pré-B	hyperdiploïdie	*Age entre 1 et 10 ans, absence d'hyperleucocytose, bon pronostic
LAL pré-B	t (1;19) (enfants:25%)	*Hyperleucocytose, mauvais pronostic
LAL pro-B	t (9;22) (adultes:20-30%)	*Sujets âgés, hyperleucocytose, mauvais pronostic
LAL pro-B	t (12;21) (enfants 25%)	*Age (1 à 10 ans), rechutes tardives
LAL pro-B	t (4;11)	*Nourrisson, hyperleucocytose, mauvais pronostic

LAM : leucémie aiguë myéloïde ; **LAL** : leucémie aiguë lymphoblastique ;
CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; **ATRA** : acide tout-trans-rétinoïque (Trétinoïne).

Tableau XVI: Quelques entités clinicobiologiques classiques au sein des leucémies aiguës (fréquences respectives entre parenthèses) [28].

2.1.6. Biologie moléculaire :

La biologie moléculaire permet de :

- Mettre en évidence des anomalies (translocations ou mutations) lorsque le caryotype est normal ou en cas d'échec.
- Rechercher de nouveaux facteurs pronostiques moléculaires : mutations ou surexpression d'oncogènes (FLT3, NPM1...) encore dans le cadre d'étude [100].

La biologie moléculaire s'est développée grâce à la disponibilité de sondes moléculaires marquées ou révélées par un ou plusieurs fluorochromes qui s'hybrident sur les séquences homologues dans les chromosomes (FISH sur métaphase) et les noyaux (cytogénétique interphasique). La détection des signaux spécifiques se fait au microscope à fluorescence équipé de filtres spécifiques de chacun des fluorochromes employés et le plus souvent couplé à une caméra CCD et un logiciel d'analyses d'images [79].

La PCR est un test enzymatique qui fournit une méthode plus sensible et rapide permet de détecter les transcrits de fusion au niveau moléculaire lorsqu'il existe une translocation récurrente et/ou le réarrangement des gènes des Ig (LAL B) ou des gènes du récepteur T pour l'Ag (LAL T) spécifiques du clone malin. Elle est quantitative permettant le suivi de la « maladie résiduelle (MRD) ». De même, dans le cadre de LAM elle permet surtout de trouver un marqueur de maladie résiduelle: fusion PML- RARA dans les LAM3, AML1-ETO dans des LAM2, marqueur spécifique de chaque leucémie pour évaluer par des méthodes

quantitatives le nombre de cellules leucémiques persistantes après chaque phase de traitement [83].

2.1.7. Autres examens :

- **Étude du liquide céphalorachidien:** [47]

Le dosage de la protéinorachie et de la glycorachie permet de sensibiliser la recherche de cellules malignes dans le LCR.

- **Bilan d'hémostase** : [47,84]

Le bilan biologique recherche une CIVD (fréquente dans M3 et à moindre degré M4 et M5) : Diminution du TP, allongement du TCA, consommation du fibrinogène, D-dimères (méthode latex) et complexes solubles positifs.

- **Evaluation du syndrome de lyse tumoral** [47,84]

Le bilan biologique recherche :

- * LDH, uricémie : augmentés.
- * Hyperphosphatémie, hypocalcémie.
- * Hyperkaliémie, Acidose métabolique.
- * Créatininémie, urée plasmatique : insuffisance rénale.

- **Bilan du syndrome infectieux** [61]
- **Radiographie pulmonaire** [47]
- **Bilan immunohématologique** [47]
- **Autres** [85]

- Bilan biologique hépatique
- Ionogramme sanguin et le dosage des lysozymes sériques et urinaires
- **Bilan préthérapeutique** [61]

Evaluation de la fonction cardiaque par l'ECG et l'échographie cardiaque

2.2. Diagnostic différentiel :

La présentation initiale de la leucémie aiguë doit être distinguée d'une variété de troubles hématologiques malignes et bénignes, des infections et des maladies rhumatoïdes. Le diagnostic différentiel se pose devant le tableau clinique et biologique [62,86].

Lorsque le tableau associe au premier plan adénopathies, splénomégalie, asthénie, fièvre associées ou non à des anomalies de la formule sanguine, il faut distinguer les infections virales type mononucléose infectieuse (virus d'Epstein-Barr) ou cytomégalovirose d'une LAL et savoir reconnaître une leishmaniose viscérale. En cas d'hépatosplénomégalie et d'hyperleucocytose, les données de l'hémogramme permettent d'éliminer les SMD et lymphoprolifératifs chroniques. Lorsque ce syndrome tumoral est isolé, il ne doit pas être confondu avec une pathologie métabolique (maladie de Gaucher).

Les LA à tableau pancytopénique doivent être différenciées des aplasies médullaires. Le cytologiste averti distingue aisément les métastases médullaires de tumeurs solides (neuroblastome en particulier) d'une LAL. Le syndrome myéloprolifératif néonatal transitoire des trisomiques 21(réaction leucémoïde)

régresse spontanément en quelques semaines ou quelques mois, mais peut déboucher rarement sur une authentique LAM.

Enfin, certains lymphomes malins, en particulier lymphoblastiques ou de type Burkitt avec atteinte médullaire, peuvent être impossibles à distinguer de leurs équivalents leucémiques. Ceci n'est pas gênant étant donné l'absence de réelles différences thérapeutiques en pratique [28].

D. APPORT DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE PAR CMF DANS LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES

L'utilisation systématique de l'anticorps **CD45** a améliorée le repérage des différentes populations cellulaires et notamment des blastes, elle a facilité l'interprétation des histogrammes obtenus. L'immunophénotypage ainsi réalisé est devenu une technique indispensable au diagnostic des leucémies aigues tant lymphoblastiques (LAL) que myéloïdes (LAM) [27].

1. Nature du prélèvement :

Les échantillons de sang ou de la moelle (2 à 5 ml) sont prélevés sur tubes EDTA (Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique-Tripotassique) et sont acheminés immédiatement au laboratoire, ils peuvent être aussi conservés à 4° pendant 24h. Ces échantillons vont servir d'une part pour l'étude cytologique et d'autre part pour l'analyse immunologique [87].

2. Utilisation du CD45

Le CD45, encore appelé **antigène leucocytaire commun**, son intérêt dans le phénotypage des leucémies aiguës réside dans le fait que son expression est d'intensité variable selon le degré de maturation des cellules: elle est faible sur les éléments immatures, blastiques, et forte sur les cellules les plus matures des lignées granulomonocytaire et lymphoïde. L'antigène CD45 n'est pas exprimé par les érythroblastes ni par les plaquettes [27] (Figure 31).

Ainsi, le phénotypage s'est rendu simple, rapide et précis, il consiste à travailler sur la moelle totale sans séparation cellulaire préalable en évitant les pertes cellulaires difficiles à contrôler. Brièvement, la moelle est répartie dans une série de tubes, chaque tube contenant un anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et un anticorps couple à la phycoérythrine (PE), ainsi que l'anticorps CD45 couplé à la cyanine5 (Cy5). Ainsi, les différents anticorps myéloïdes et lymphoïdes sont-ils regroupés deux à deux ce qui permet de mettre en évidence d'éventuelles coexpressions [27].

Les marquages intracytoplasmiques sont effectués de façon similaire avec une étape préalable de perméabilisation des cellules. Le phénotypage sur moelle totale permet également un contrôle de l'expression des anticorps sur les populations normales résiduelles et d'avoir ainsi un contrôle interne positif et négatif. Enfin, dans ces conditions techniques, il est possible d'effectuer un immunophénotypage même si le pourcentage de blastes est faible [27].

Il est nécessaire de tester plus d'un antigène de chaque lignée (lymphoïde B ou T, granulomonocytaire, érythroïde, mégacaryocytaire), car ces différentes molécules ne sont pas réellement spécifiques d'une lignée. Les panels proposés par l'EGIL permettent de classer au moins 98 % des leucémies (Tableau XVII). L'assignement des blastes à une lignée repose sur la positivité aussi bien que sur la négativité des résultats obtenus avec les différents antigènes testés [27].

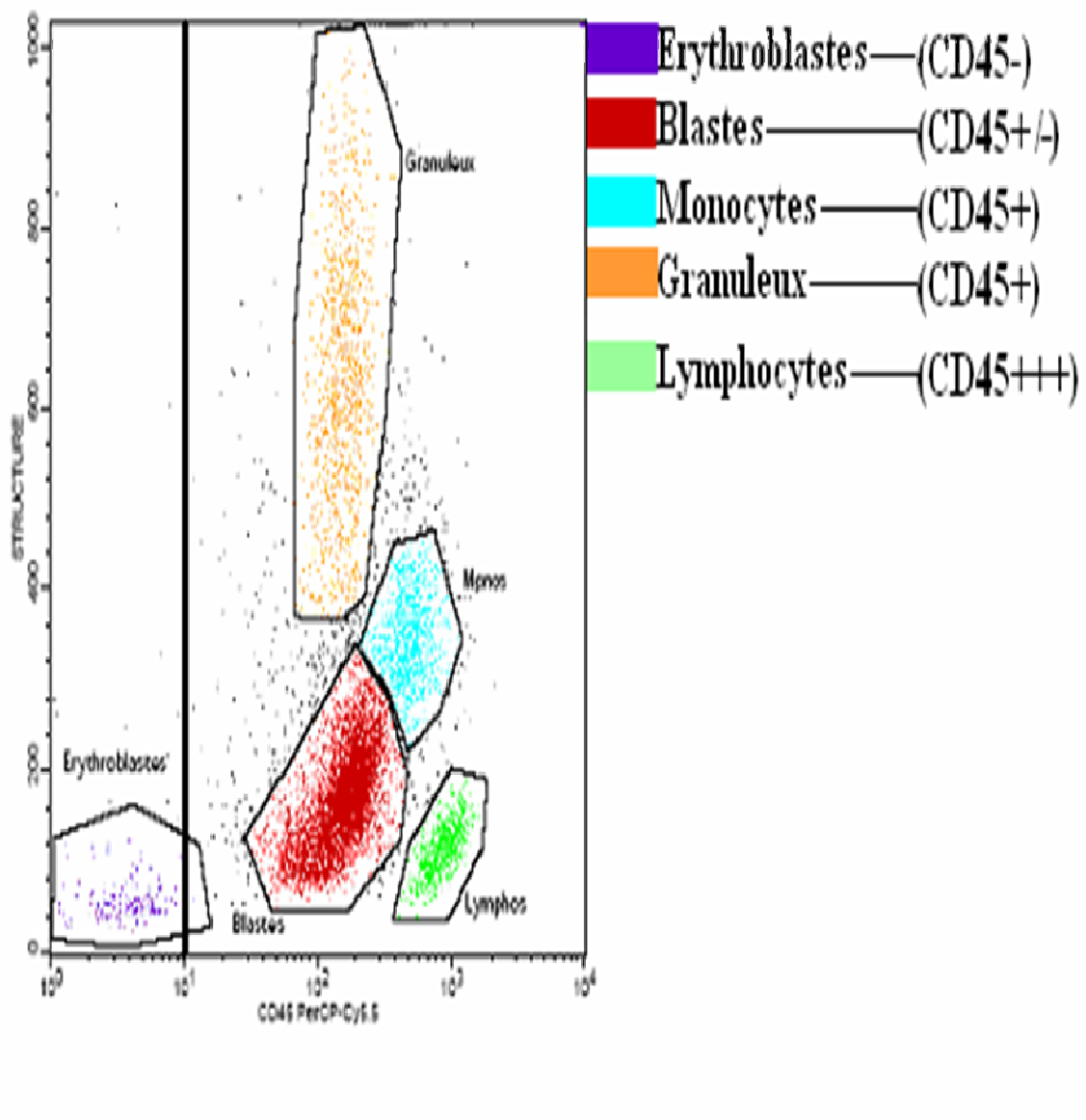


Figure 31: CD45 Gating (exemple de cytogrammes CD45 / Structure) [27].

Antigènes d'immaturité	CD34, HLA-DR
Antigènes associés à la lignée lymphoïde T	CD2, CD3c/s, CD5, CD7, CD1, CD4 et CD8
Antigènes associés à la lignée lymphoïde B	CD19, CD22c/s, CD79a c, CD10, CD20, μ c, Igs
Antigènes associés aux lignées granulomonocytaire	CD117, CD33, CD13, MPO, CD15, CD11 b, CDt 4, CD36
Antigènes associés aux lignées érythroïde et mégacaryocytaire	Anti-glyophorine A, CD61, CD41

CD : classe de différenciation ; **Ig** : immunoglobulines ; **c** : cytoplasmique ; **s** : surface.

Tableau XVII: Panels des anticorps testés pour le phénotypage des leucémies aiguës [27]

3. Principe de marquage : [87,88]

Le typage cellulaire se fait par double marquage : AcMo spécifiques aux antigènes leucocytaires sont couplés à deux types de fluorochromes : soit fluorescéine (FITC) soit la phycoérythrine (PE). Le matériel biologique utilisé est soit un échantillon de moelle ou de sang lysé. Le marquage membranaire est réalisé par l'immunofluorescence directe sur sang total, 10 μ l de chaque anticorps marqués soit par FITC ou PE est ajouté à 100 μ l de suspension cellulaire de sang total ajusté à 5000 cellules /mm³, puis incubé pendant 15 mn à

l'obscurité et à 4°C. Ensuite, 2ml de la solution de lyse constituée par le formaldéhyde (<15%), qui permet une fixation des cellules, et du diéthylène glycol (< 50%), sont rajoutés dans chaque tube puis incubés 10 mn à l'obscurité et à température ambiante. On centrifuge à 2000 t/mn pendant 2 mn et on élimine le surnageant. Les anticorps non fixés sont lavés au PBS (Phosphate Buffer Salin) et après centrifugation repris dans 0.5ml de PNS/Azide (Azide inhibe la chaîne respiratoire et entraîne l'inhibition de l'internalisation des Ac fixés aux cellules), pour être analysé par CMF. Le nombre de cellules à acquérir est de 10⁴ cellules par tube et le débit ne doit pas dépasser 400 événements par seconde. Pour le marquage intracellulaire, l'étape de fixation est précédée par une étape de perméabilisation: les cellules sont solubilisées dans 500µl de la solution associant le formaldéhyde et un perméabilisant puis incubées à l'obscurité à 4°C pendant 10mn, après centrifugation le culot obtenu est repris dans 0.5ml de PBS/Azide et on analyse les cellules par CMF dans les mêmes conditions que le marquage membranaire.

4. Stratégie de l'immunophénotypage [89]

La caractérisation immunophénotypique se composait de deux étapes consécutives (Tableau XVIII). Le premier panel sert à assigner la prolifération cellulaire à la lignée lymphoïde B ou T ou myéloïde. Selon les résultats obtenus à l'examen initial, le deuxième niveau de l'enquête sera évalué. Donc le deuxième panel est conçu pour identifier le stade de différenciation, le pronostic des caractéristiques ou des phénotypes aberrants pour la surveillance maladie résiduelle. L'utilisation du CD45 est recommandée pour différencier entre les

populations cellulaires, il permet de délimiter les contingents cellulaires et mieux cibler les blastes. Un marqueur est considéré comme positif s'il est exprimé par 20% des blastes au minimum. L'analyse des résultats par CMF repose sur l'analyse de l'ensemble des graphes obtenus.

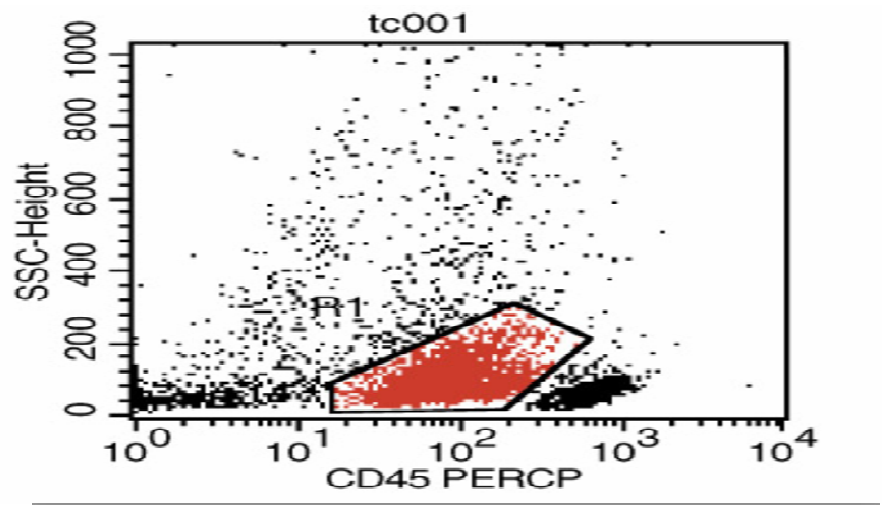
	Marqueurs des cellules B	Marqueurs des cellules T	Marqueurs myéloïdes	Marqueurs non spécifiques
1^{ère} étape	CD79a, CD19, CD22	sCD3, cyCD3, CD7	CD13, CD33, anti-MPO	CD45
2^{ème} étapes	cyt Ig, sIg	CD1a, CD4, CD5, CD8	CD117, CD41, CD61, GlycoA	CD34, DR, TdT, CD10

CD : classe de différenciation ; **Ig** : immunoglobulines ; **c** : cytoplasmique ; **s** : surface

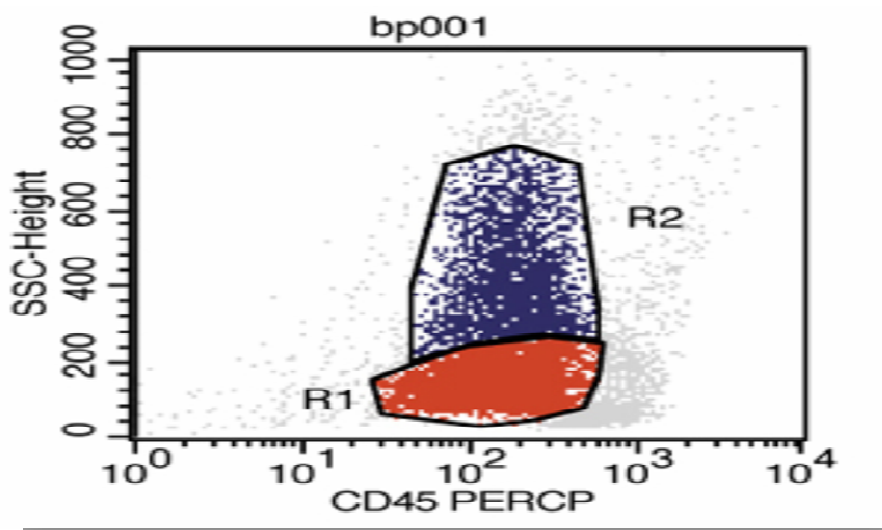
Tableau XVIII: Panels des anticorps utilisés pour chaque étape du phénotypage des leucémies aiguës [89].

« CD45/SSC » Gating : Exemple des leucémies aiguës myéloïdes

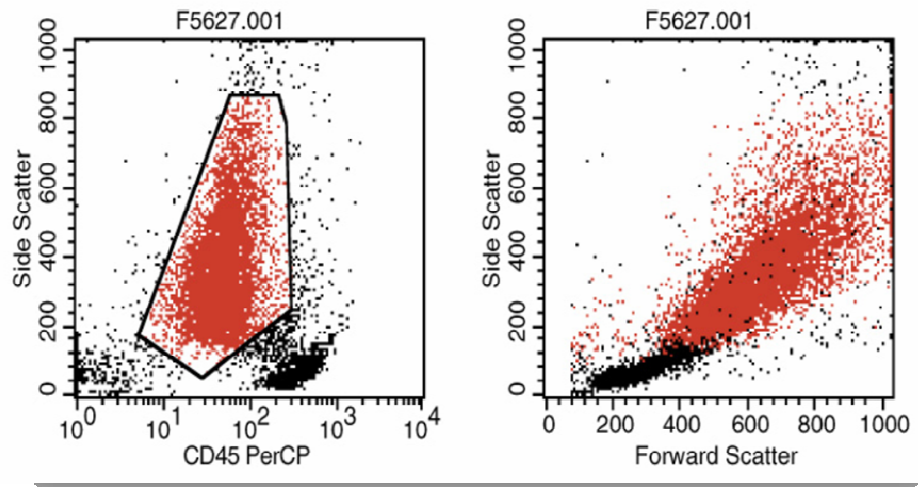
A)



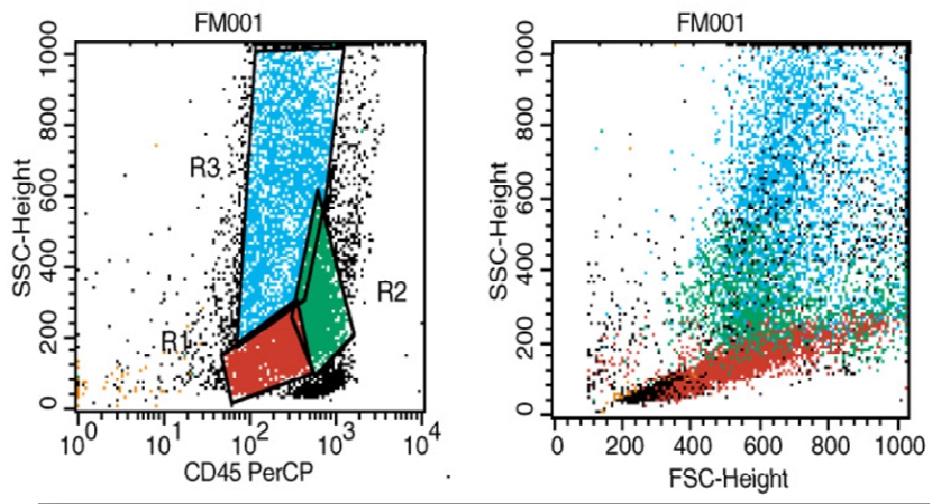
B)



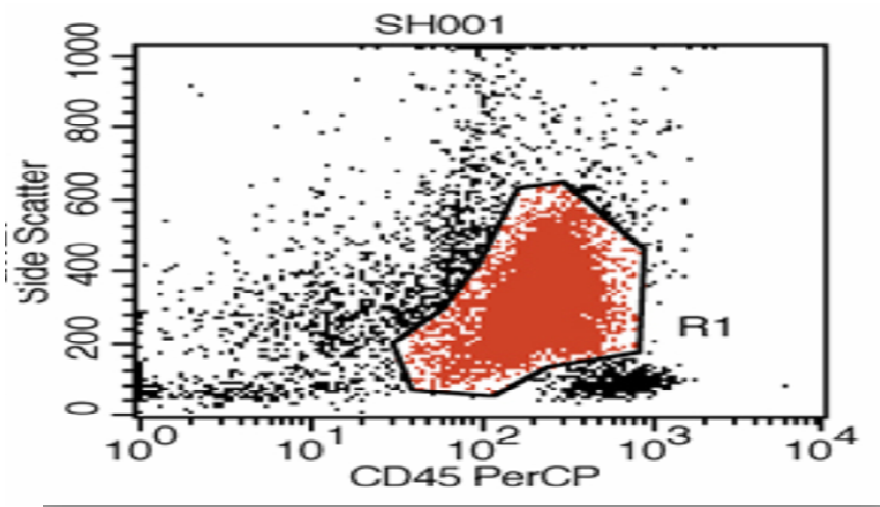
C)



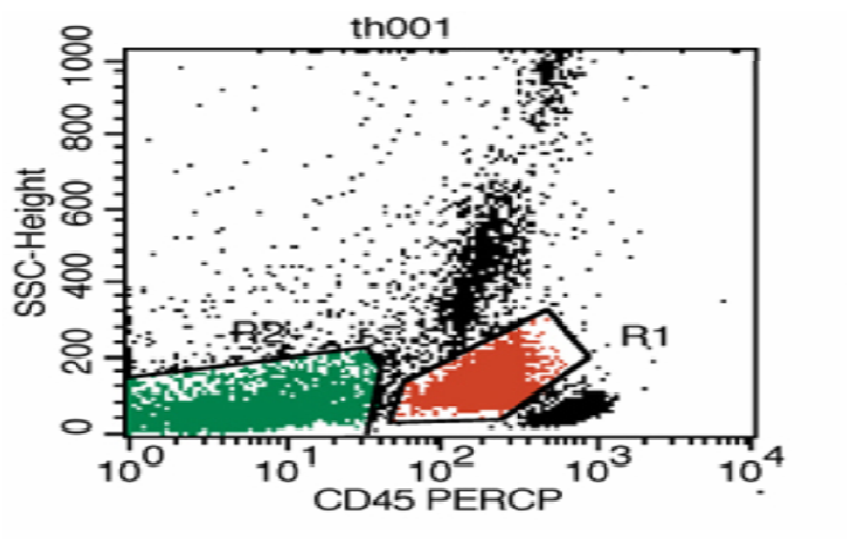
D)



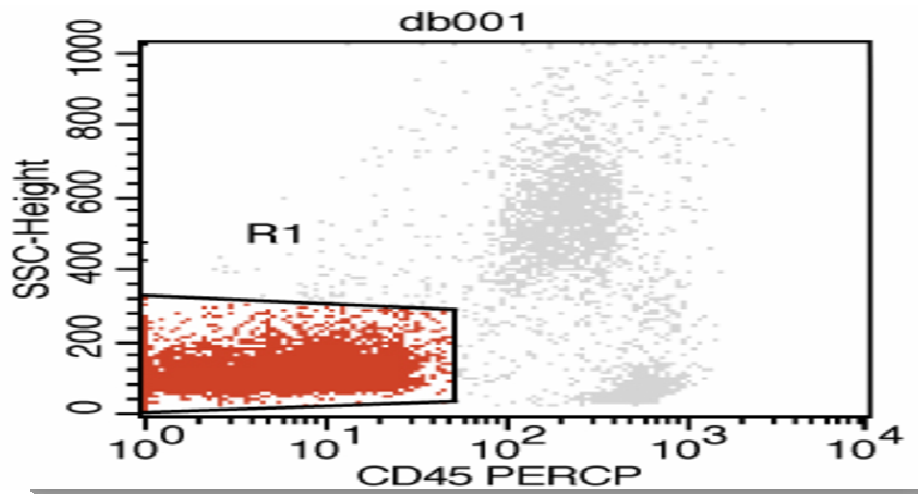
E)



F)



G)



A: LAM1 ; B: LAM2 ; C: LAM3 ; D: LAM4 ; E: LAM5 ; F: LAM6a ;
G: LAM7

Figure 32: Cytogrammes obtenus après « CD45 Gating » des LAM [27].

5. Immunophénotypage des LAL

En présence des blastes sans signes morphologiques de différenciation myéloïde (granulations azurophiles, corps d'Auer, positivité à la MPO.) **l'immunophénotypage est le seul examen** permettant d'affirmer leur caractère lymphoïde ou éventuellement myéloïde et donc de **diagnostiquer** une LAL et d'éliminer certaines LAM très peu différenciées (LAM M0) ou LAM plus rares (érythroïde, mégacaryocytaire) [27].

La classification de l'EGIL propose une stratification des phénotypes obtenus dans les LAL B (tableau XIX) en fonction de la présence ou l'absence du CD10, de la chaîne μ intracytoplasmique, des Ig de surface. Seules les LAL du groupe B IV ou B matures expriment des Ig de surface. Ces cellules, qui expriment fortement le CD45, ont les caractéristiques cytologiques des cellules de Burkitt (type LAL 3 du groupe FAB) [90].

Les LAL de nature T représentent environ un quart des cas de LAL chez l'adulte, un peu moins chez l'enfant. Pour le groupe EGIL, les LAL T sont définies par l'expression cytoplasmique et/ou de surface du CD3 [91].

Les phénotypes observés peuvent être classés en différents groupes reproduisant les étapes de la différenciation normale (tableau XX). Les antigènes CD34 et HLA-DR sont fréquemment exprimés surtout dans les formes les plus immatures décrites comme associées à un mauvais pronostic. De même que les relations entre les phénotypes particuliers et les anomalies cytogénétiques [91].

	LAL Pro-B(BI)	LAL B Commune (BII)	LAL Pré-B (BIII)	LAL B mature (BIV)
CD19	++	++	++	++
cCD79a	++	++	++	++
CD22	++	++	++	++
CD20	-	+	+	+
CD10	-	++	++	++
cIgM (μ)	-	-	++	++
sIg (k ou λ)	-	-	-	++
TdT	++	++	++	-
HLA-DR	++	++	++	++

- : 10% des leucémies sont positives pour le marqueur ; + : 25-75% des leucémies sont positives ; ++ : > 75% des leucémies sont positives

N.B : La positivité d'au moins deux marqueurs B (CD19 / CD22 / cCD79) est nécessaire pour la classification en lignée B et au moins trois des marqueurs T (cCD3, CD2, CD5, CD7, CD8) sont négatifs et au moins trois des marqueurs myéloïdes (CD13, CD33, CD117, MPO) sont négatifs [90].

Tableau XIX : Classification immunologique des LAL B selon le groupe EGIL [92].

Les sous classes de LAL issues de la lignée lymphoïde B sont représentés en fonction des marqueurs immunologiques (CD). En fait, ces classifications

découlent de la connaissance des voies de maturation que suivent normalement les cellules au cours de leur développement dans la moelle osseuse pour les LAL B et le thymus pour les LAL T [90].

	LAL Pro-T (TI)	LAL Pré-T (TII)	LAL cortical (TIII)	LAL T mature (TIV)
CD7	++	++	++	++
cCD3	++	++	++	++
CD2	+	++	++	++
CD5	-	++	++	++
TCR	-	-	+	++
CD1	-	-	++	-
CD4/CD8	-	+/-	+/-	+/-

- : 10% des leucémies sont positives pour le marqueur ; +/- : 10-25% des leucémies sont positives ; + : 25-75% des leucémies sont positives ; ++ : >75% des leucémies sont positives

N.B : La positivité de cCD3 ou sCD3 suffit pour la classification en lignée T et au moins deux des marqueurs B (CD19 / CD22 / cCD79) sont négatifs et au moins trois des marqueurs myéloïdes (CD13, CD33, CD117, MPO) sont négatifs [90].

Tableau XX : Classification immunophénotypique des LAL T selon le groupe EGIL [92].

Dans les LAL la détermination de la lignée B ou T et leur classification en sous-groupe fournies par la CMF, demeurent très importantes dans la prise en charge thérapeutique, malgré le fait que certains précurseurs de LAL B ou T montrent des expressions aberrantes de certains Ag qui ne se retrouvent pas dans la maturation normale des cellules lymphoïdes [92].

6. Immunophénotypage des LAM [91,51]

L'immunophénotypage des LAM **n'est pas aussi indispensable pour le diagnostic** que celui des LAL, puisque les sous types leucémiques définis par le groupe FAB sont les mêmes que les sous-groupes phénotypiques proposés par l'EGIL (Tableau XXI). Cependant la caractérisation immunologique reste déterminante pour la reconnaissance des LAM indifférenciées : LAM0, LAM6, LAM7 ou BAL. L'immunophénotypage par CMF permet aussi de distinguer les LAM4/LAM5 à différenciation monocyttaire des LAM2/LAM3 à différenciation granulocytaire. L'analyse du cytogrammes<<Structure/CD45>> permet de mettre en évidence des blastes, visualiser la différenciation granuleuse ou monocyttaire et associer directement les données morphologiques et celles immunologiques. Certaines LAM ne peuvent être identifiées que par immunophénotypage: c'est le cas des LAM0, de certaines LAM6 et des LAM7.

- Les LAM0, qui représentent moins de 5% des LAM et se rencontrent essentiellement chez l'adulte, expriment un ou plusieurs antigènes myéloïdes, mais les antigènes de maturation comme CD15, CD65, CD14, CD11b sont moins fréquemment exprimés. Les antigènes lymphoïdes

restreints CD3, CD79a, CD22, même cytoplasmiques, sont absents et éliminent une LA biphénotypique. Néanmoins certains antigènes associés aux lignées lymphoïdes comme CD7, CD2 ou CD19 peuvent être exprimés avec une intensité de marquage inférieure à celle observée sur les proliférations lymphoïdes.

- Les LAM6 purement érythroblastiques sont des formes rares de LAM caractérisées par la prolifération de blastes morphologiquement indifférenciés au cytoplasme souvent basophile. **Le phénotypage à l'aide de la CMF rendra compte de leur origine** érythroblastiques en montrant l'expression du CD36, de la glyophorine A, voire de l'hémoglobine A, alors que les autres marqueurs myéloïdes, le HLA-DR, le CD34 et les marqueurs lymphoïdes B et T sont aussi négatifs.

Les antigènes mégacaryocytaires ne sont pas exprimés dans les formes typiques.

- Les LAM7 ont une fréquence non négligeable (3 à 5 %). Elles surviennent chez l'adulte comme chez l'enfant, là encore, **c'est le phénotypage par CMF qui rattachera des blastes de morphologie indifférenciée à une origine mégacaryocytaire** en montrant l'expression des glycoprotéines plaquettaires CD41, CD61, +/- CD42 alors que les antigènes myéloïdes CD13 et CD33 ont une expression variable selon les cas. L'anti-MPO, les antigènes HLA-DR et CD34 sont absents. La recherche des antigènes plaquettaires se fera de préférence en intracytoplasmique pour éliminer une possible fixation non spécifique des plaquettes sur les blastes.

	LAM0/M1/M2	LAM3	LAM4/M5a/M5b	LAM6	LAM7
CD13	+/-/++/++	++	++/++/++	+	++
CD33	+/-/++/++	++	++/++/++	+	+/-
cMPO	-/+ /++	++	++/++/++	+	-
CD14	-/-/-	-	+ /+ /++	-	-
CD36	-/-/-	-	+ /+ /+	++	+
CD117	++/++/++	+	+ /+ /+	+	+
CD41/42/61	-/-/-	-	-/-/-	-	++
CD15	+/-/+ /- /++	+/-	-/-/-	-	-
HLA-DR	++/++/+	-	++/++/++	+	++

- : **10%** des leucémies sont positives pour le marqueur ; +/- : **10-25%** des leucémies sont positives ; + : **25-75%** des leucémies sont positives ; ++ : **>75%** des leucémies sont positives.

N.B : Les cellules blastiques des LAM expriment HLA-DR, CD13, CD33, CD117 et MPO intracytoplasmique, négatif uniquement dans les LAM0, CD14 est spécifique des LAM4 et LAM5, CD36 exprimé fortement dans les LAM6 ainsi que la glyophorine A et les CD41, CD42, CD61 spécifiques des LAM [90].

Tableau XXI: Classification immunologique des LAM, certains marqueurs sont caractéristiques des cellules myéloïdes indifférenciées, myélomonocytaire ou granuleuses [91].

7. Immunophénotypage des BAL

L'utilisation du phénotypage avec un large panel d'AcMo a permis de reconnaître une catégorie de LA pouvant exprimer simultanément des Ag myéloïdes et lymphoïdes : BAL, elles représentent environ 2% des leucémies aiguës [93]. L'incidence des BAL en pédiatrie est de 13,8% pour les LAL exprimant des marqueurs myéloïdes et 11% dans les LAM qui expriment des Ag lymphoïdes [94].

Seul l'examen par CMF est susceptible d'identifier la BAL, grâce au score immunologique de l'EGIL établi pour l'étude immunologique des leucémies, donc, le score doit être supérieur à 2 dans au moins deux lignées (voir exemple ci-dessous). Le score de l'EGIL identifie 8 cas possibles pour les BAL (Tableau XXII).

Les critères de diagnostic doivent être précis :

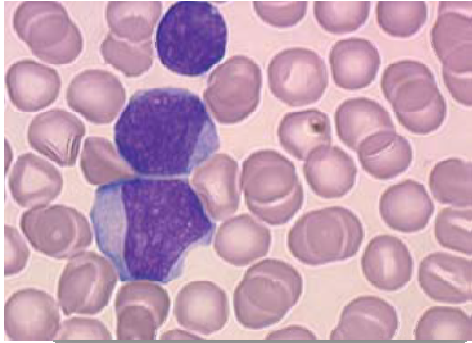
- Ciblage des seuls blastes et exclusion des cellules non leucémiques résiduelles (l'intérêt du fenêtrage des blastes par le CD45 prend ici toute son importance) ;
- Non prise en compte des marquages faibles non spécifiques ;
- Analyse de la spécificité des antigènes exprimés [57].

CAS	TYPE DE BAL	IMMUNOPHENOTYPE
1	BAL (B/M)	CD10/CD13/CD19/CD33/ CD34/CD38/TdT
2	BAL (B/M)	dimCD10/CD13/CD19/dimCD33/CD34/ HLA-DR/TdT
3	BAL (T/M)	CD2/cCD3/CD7/CD13/CD38/CD117/HLA-DR
4	BAL (T/M)	CD2/cCD3/CD7/CD13/dimCD33 /CD34/ CD58/CD117
5	BAL (T/M)	cCD3/CD11c/CD13/CD33/ subsetCD34/ CD38/HLA-DR
6	BAL (B/T)	CD2/cCD3/CD5/CD19/ CD20/ CD38/ cCD79a/ CD117/HLA-DR
7	BAL (T/M)	CD3/CD13/CD56/CD68/CD99/MPO/lysozome/TdT
8	BAL (T/M)	subsetCD2/cCD3/CD7/dimCD13/CD15/dimCD34/CD38/ CD117/subsetHLA-DR/subsetMPO/subsetTdT

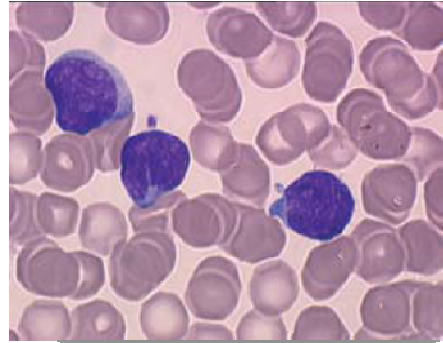
Tableau XXII: les 8 cas possibles pour une BAL [57].

Exemple de calcul du score d'une BAL [52]

1) Examen morphologique :



A)



B)

Figure 33 : A) et B) Présence de blastes sans grains intracytoplasmiques [52].

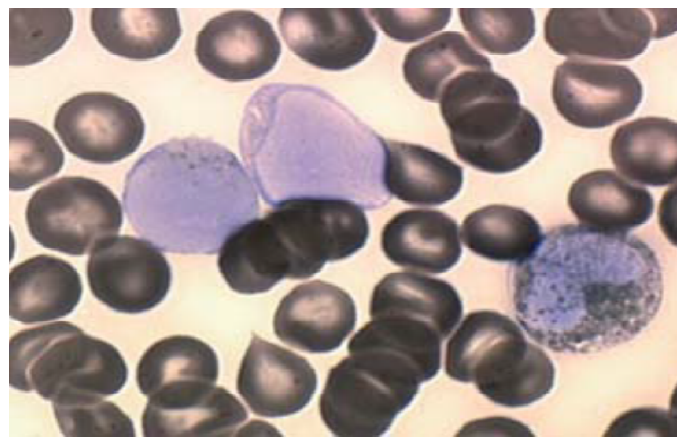


Figure 34: Présence de moins de 3 % de blastes positives à la présence de la myéloperoxydase [52].

2) Cytométrie en flux et calcul du score :

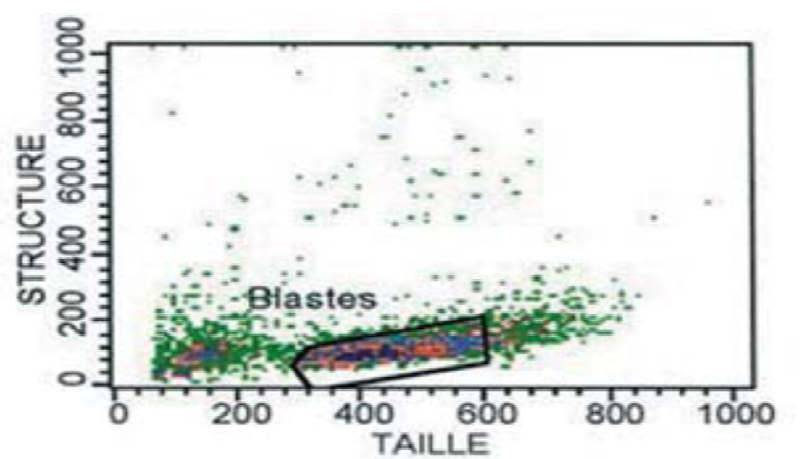


Figure 35 : Analyse taille/structure de la population cellulaire étudiée par cytométrie en flux [52].

CD2	4%	CD19	12%	CD56	0%	MPO	85%
CD3	3%	CD20	1%	CD34	85%	CD13	93%
Surface							
cCD3	58%	sCD22	0%	DR	19%	CD14	44%
CD4	2%	Kappa	0%			CD15	0%
CD5	98%	Lambda	0%			CD33	84%
CD7	98%	CD79a	2%				
CD8	2%	Ig surface	0%				
		CD10	93%				

Tableau XXIII: Synthèse des résultats d'analyse par cytométrie en flux [52].

Lignées et marqueurs			Points attribués		
B	T	My	B	T	My
CD79a CD22cyt IgM cyt	CD3 Anti-TCR($\alpha\beta$) Anti-TCR($\gamma\delta$)	Anti-MPO	0 ND* ND*	2	2
CD19	CD2	CD13			1
CD10	CD5	CD33	0	0	1
	CD8	CD117	0	1	0
CD20		CD65	0	1	0
TdT	TdT	CD14			0
		CD15	ND*	ND*	0
		CD64			ND*

ND* : non déterminé

Tableau XXIV: La détermination des marqueurs exprimés ou non par les lignées B, T et myéloïde permet le calcul du score immunologique de l'EGIL. (Voir le tableau XIV « tableau du score, pour les valeurs en points attribuées à chaque marqueur) [52].

3) Résultat : BAL de type TII-My

8. Algorithme récapitulatif

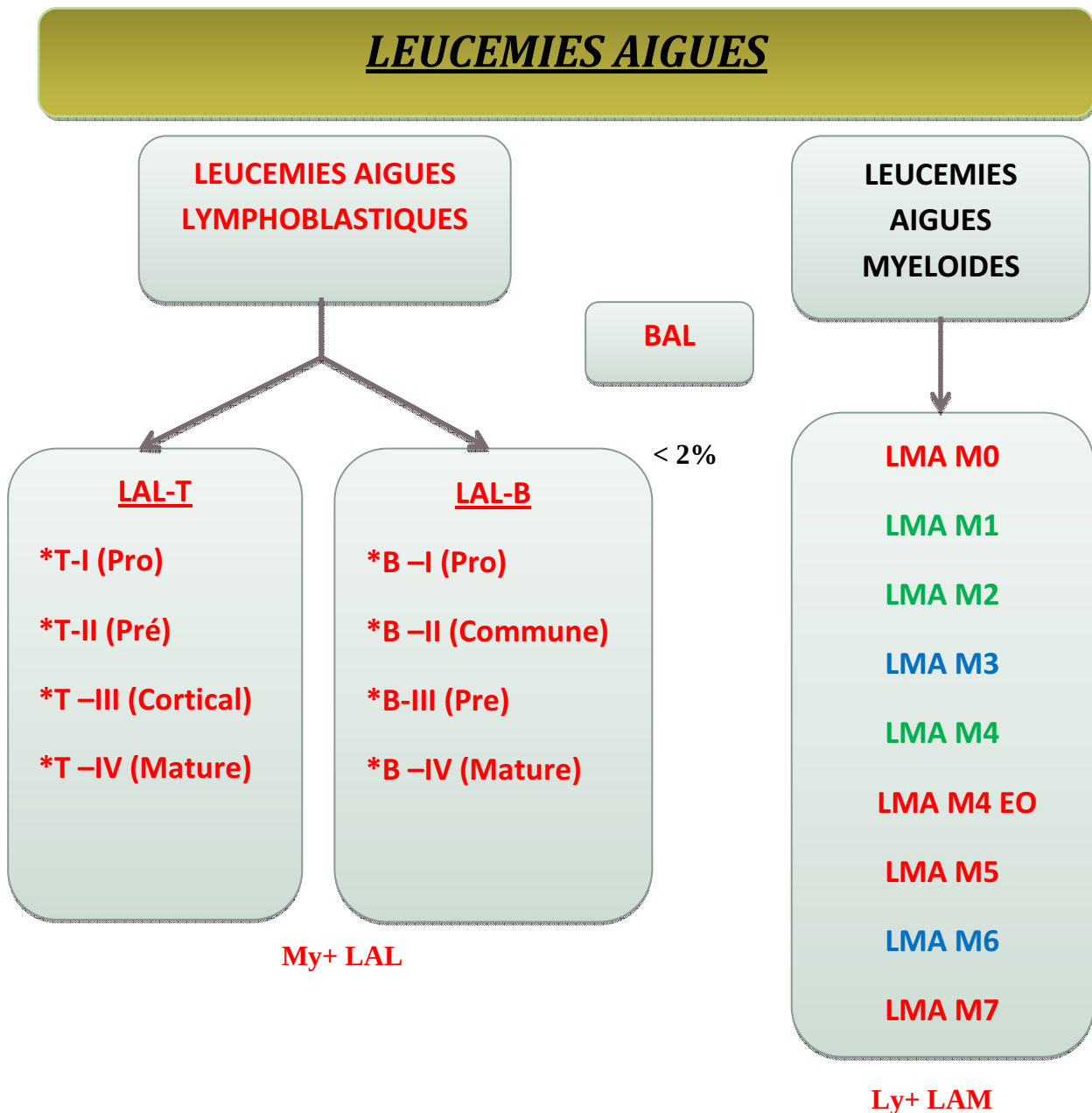


Schéma 3 : L'algorithme reprenant le rôle de la CMF dans le diagnostic des leucémies aiguës [37,79].

Commentaire :

Les entités reprises en **rouge** correspondent à des sous-types de leucémies aiguës pour lesquelles **la cytométrie en flux** est **indispensable** pour arriver à ce diagnostic. Les entités reprises en **vert** correspondent à des sous-types de leucémies pour lesquelles la cytométrie en flux va surtout jouer un rôle de **confirmation** du diagnostic posé à partir des résultats de la cytologie et de la cytochimie. Enfin, les entités reprises en **bleu** correspondent à des sous-groupes de leucémies où la cytométrie **peut aider** à poser un diagnostic comme dans les formes les plus immatures des LAM M6 ou encore les variantes de LAM M3.

E. SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES PAR LA CMF : DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE

1. Introduction

La maladie résiduelle (MRD : minimal residual disease) est définie par la présence d'un contingent de cellules tumorales qui persiste après traitement des leucémies aiguës et explique en grande partie les rechutes par la prolifération de ces clones malins. Ces derniers restent indétectables par les techniques conventionnelles, il est important de pouvoir déterminer de façon sensible cette masse tumorale résiduelle, car l'évolution ultérieure de la maladie est directement dépendante de ce paramètre [91]. Au diagnostic d'une leucémie, le nombre des cellules blastiques est compris entre 10^{11} et 10^{12} , après traitement, un patient est considéré en rémission complète morphologique lorsqu'il persiste moins de 5% d'éléments blastique dans sa moelle, même dans ces conditions, on retrouve encore jusqu'à 10^{10} des cellules tumorales non détectées par l'examen morphologique [96].

La recherche de la MRD est devenue un élément de pronostic important dans les LA, puisqu'elle permet de suivre l'évolution de la masse tumorale et d'apprécier la sensibilité des cellules leucémiques aux traitements en évaluant la qualité de la rémission complète. Elle constitue de ce fait un paramètre de pronostic puissant et permet d'orienter la thérapeutique. La détection de la maladie résiduelle se fait dans la moelle osseuse ou dans le sang des patients atteints de

leucémies. Deux types de méthodes permettent actuellement d'atteindre des niveaux de sensibilité important : 10^{-3} à 10^{-4} cellules (une cellule maligne sur 10^4 leucocytes) et trouvent une place croissante dans la prise en charge des leucémies aiguës, ce sont la biologie moléculaire et la CMF [97,98].

2. Détection de la maladie résiduelle par la CMF

La détection de la MRD est une étape importante dans le suivi des leucémies aiguës. La CMF permet de repérer des populations en très faible quantité avec des sensibilités le plus souvent inférieures à 0.01% [91]. Ce degré de sensibilité ne peut être atteint qu'avec certaines précautions méthodologiques : fenêtrage optimal des blastes, étude multiparamétrique à la recherche de phénotypes aberrants associés aux cellules leucémiques et l'analyse d'un nombre suffisant de cellules [27].

Ces phénotypes aberrants (comme par exemple CD34+ CD56+ ou CD34- CD117+ CD15+ pour des blastes myéloïdes, CD34+ CD22+ CD20- ou CD34+ CD19+ CD13+ pour des blastes lymphoïdes B, CD34+ CD3+ ou TdT+ CD3+ pour des blastes lymphoïdes T) sont très fréquents, aussi bien dans les LAM que dans les LAL et permettent une quantification rapide de la MRD [99,26].

L'avantage de la CMF dans le suivi des leucémies aiguës réside dans le fait qu'elle peut quantifier avec précision les cellules leucémiques résiduelles, de distinguer les cellules apoptotiques et de fournir un aperçu sur l'état des cellules hématopoïétiques normales dans l'échantillon [100].

La stratégie de la détection de la MRD est parfois limitée, certaines LA ne présentant pas la combinaison antigénique spécifique permettant de les différencier d'une sous-population cellulaire normale. De plus, des changements dans le phénotype des cellules leucémiques peuvent apparaître au moment de la rechute, que ce soit dans les LAL, ou plus fréquemment dans les LAM [91].

Les précurseurs lymphoïdes B normaux ou hematogonies, qui peuvent être présents dans la moelle en nombre très variable (de 5 % à presque 50 %) dans diverses circonstances en particulier chez l'enfant, peuvent faire croire à tort à un taux important de maladie résiduelle dans les prélèvements de contrôle après traitement d'une LAM ou d'une LAL (figure 36) [26]. Mais en utilisant des techniques appropriées comme (combinaison optimale d'anticorps, étude multiparamétrique faisant appel à trois ou quatre fluorochromes, quantification antigénique), il est possible de faire le diagnostic différentiel entre cellules leucémiques et hematogonies normales. Ces dernières ne montrent pas d'anomalies de maturation telles qu'on peut les rencontrer dans les LAL (arrêt de maturation, sur/sous expression antigénique, expression asynchrone) [99].

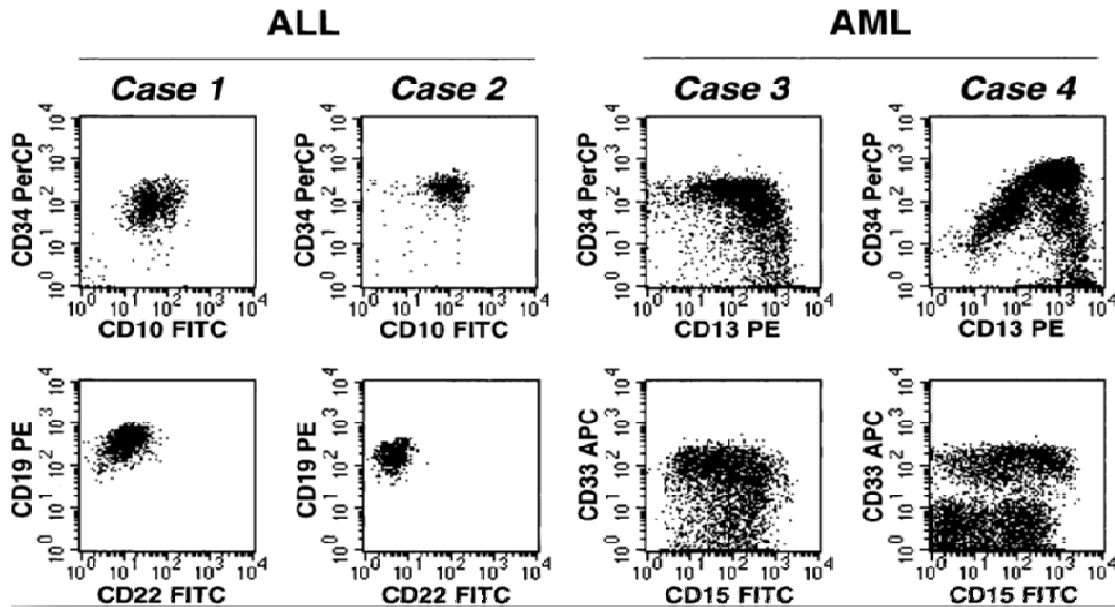


Figure 36: Les différences dans l'expression phénotypique entre LAL et LAM [101].

Commentaire : Les parcelles illustrent l'homogénéité immunophénotypique des lymphoblastes dans les LAL par rapport aux myéloblastes dans les LAM [101].

L'identification des cellules leucémiques résiduelles par CMF repose sur la mise en évidence de leurs caractéristiques phénotypiques, ceci en utilisant des combinaisons immunophénotypiques (voir tableaux XXV et XXVI) [102].

Les cellules leucémiques peuvent exprimer des marqueurs normaux de différenciation ou exprimer des marqueurs aberrants. Ces caractéristiques correspondantes aux profils immunophénotypiques associés aux leucémies ou LAIP (Leukemia associated immunophenotypic patterns) pour suivre la MRD par

la CMF, il suffit de rechercher les cellules présentant un LAIP [103]. Dans les LAM, les cellules présentant un LAIP ont une fréquence de 10^{-4} , qui est compatible avec la sensibilité pour la détection de la MRD [104]. Actuellement, l'utilisation de plusieurs combinaisons d'AC a permis de définir un seuil pronostique de 10^{-3} [105]. Cependant, l'utilisation de la PCR est plus préconisée dans le cas des LAM [104] (Figures 37 et 38).

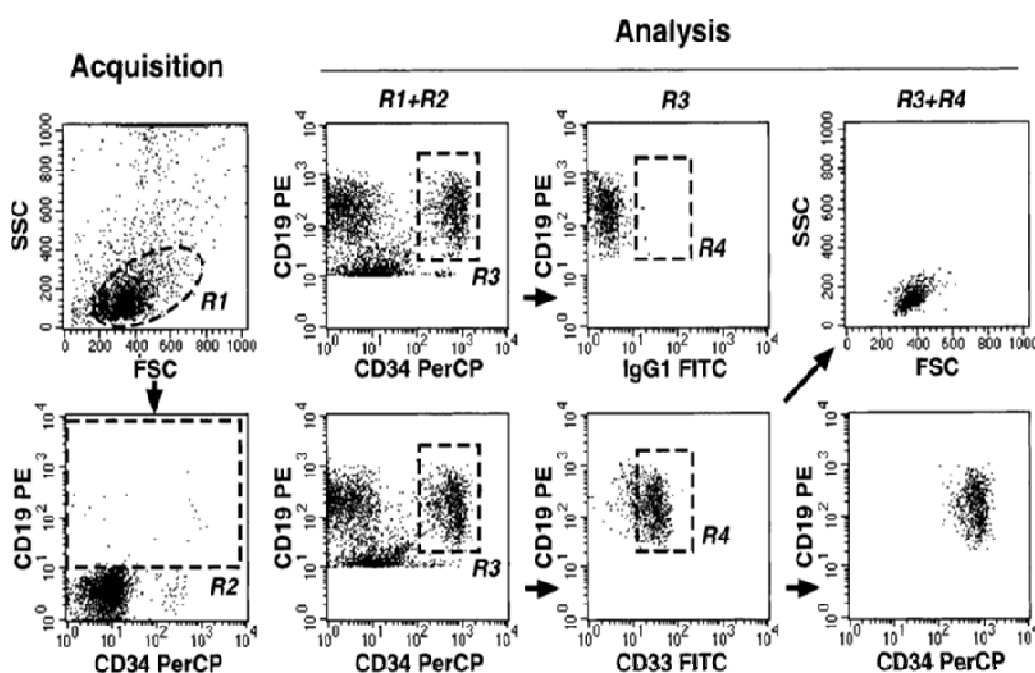


Figure 37 : Protocole pour la détection de la MRD par CMF [101].

Commentaires : Les parcelles illustrent l'étude d'un échantillon de moelle osseuse provenant d'un patient au cours d'une rémission clinique. Les cellules leucémiques au moment du diagnostic expriment CD19, CD34 et CD33. Les

cellules mononuclées de l'échantillon de MO de remise sont marquées avec PE CD19, CD34 Per CP et CD33 FITC. Dans un tube en parallèle, FITC CD33 a été remplacé par contrôle non réactives FITC IgG1. Après avoir analysé 10^3 cellules mononuclées, nous avons dessiné deux portes (panneaux de l'extrême gauche): un inclus des cellules lymphoïdes morphologie (R1) et les autres cellules inclus exprimant CD19 (R2). Nous avons ensuite projeté 450 000 cellules, conservant uniquement les événements électroniques qui remplissaient les critères définis par R1 et R2 (panneaux de centre-gauche) [101]. L'immunphénotype des CD19+ et des cellules CD34+ (R3) a été analysé pour l'expression de CD33 (centre-droit de panneaux): la plupart des cellules ont été CD33+. La lumière de dispersion et les caractéristiques immunophénotypiques des cellules CD19+, CD34+et CD33+ (R3+ R4) correspondaient à celles déterminée au moment du diagnostic (d'extrême-droite des panneaux). Les cellules leucémiques résiduelles composées atteignent 0,14% du nombre total de cellules mononuclées de moelle osseuse [103].

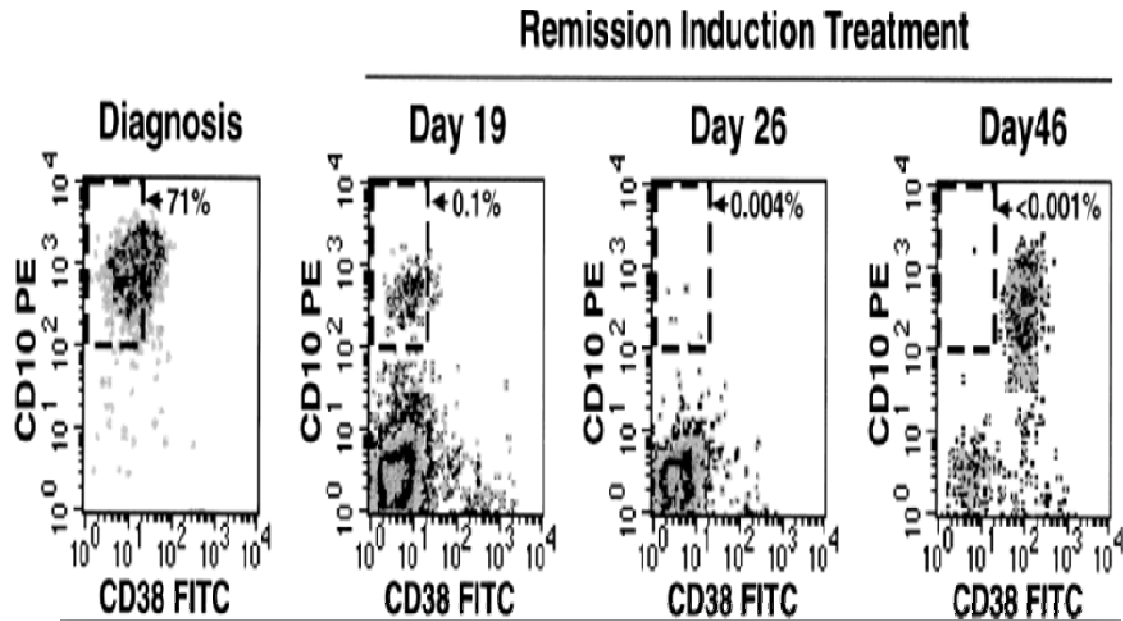


Figure 38 : Suivi de la cinétique de disparition de leucémie aiguë par cytométrie en flux [101].

Dans les LA, la recherche de la maladie résiduelle doit être un examen qui entre dans les stratégies de prise en charge thérapeutique. Le seuil de 10^{-2} cellules malignes constitue un facteur de mauvais pronostic [106].

LAL	Phénotypes	Fréquence (%)
Lignée B	CD19/CD34/CD10/TdT	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD22	20-30
	CD19/CD34/CD10/CD38	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD45	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD13	10-20
	CD19/CD34/CD10/CD15	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD33	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD65	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD21	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD56	5-10
	CD19/CD34/CD10/KORSA3544	10-20
	CD19/CD34/TdT/cytoplasmic μ	10-20
	CD19/7.1	3-5
	CD19/p53	3-5
Lignée T	TdT/CD3	90-95
	CD34/CD3	30-50

Tableau XXV: Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour l'étude de la MRD dans LAL [94].

Phénotypes	Fréquence (%)
CD13/CD33/CD34/CD11b	10-15
CD13/CD33/CD34/CD65	10-20
CD13/CD33/CD34/CD15	10-20
CD13/CD33/CD34/CD56	10-15
CD13/CD33/CD34/CD38	10-15
CD33/CD34/CD117/CD13	20-40
CD33/CD34/CD117/CD15	20-40
CD33/CD34/CD117/HLA-DR	10-15
CD33/CD34/CD117/CD11b	10-20
CD13/CD33/CD34/CD19	5-10
CD13/CD33/CD34/CD2	5-10
CD13/CD33/CD34/CD7	10-20

Tableau XXVI : Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour la détection de la MRD dans les LAM [94].

***ALGORITHMES RECAPITULATIFS DU
DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES
PAR LA CYTOMETRIE EN FLUX***

* LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES

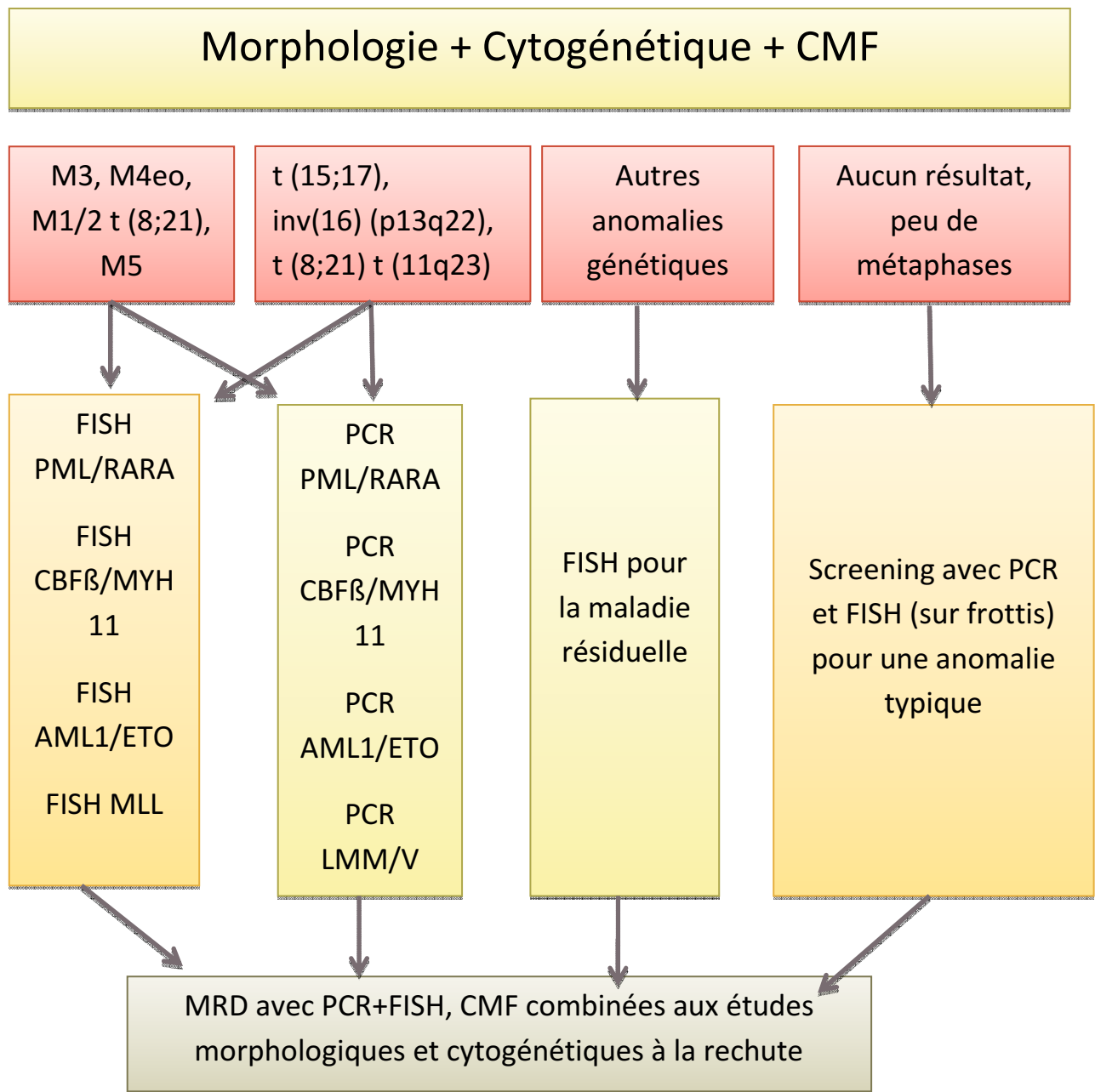


Schéma 4: Algorithme général proposé pour diagnostic et le suivi des LAM [108].

MPO positive et/ou ESTERASE positive



CMF

Marqueurs d'immaturité : CD34, CD117, HLA-DR

Marqueurs myéloïdes : CD13, CD33, MPOcy

Marqueurs de granuleux matures : CD15, CD16

Marqueurs monocytaires : CD14, CD64, CD11a-b-c

Marqueurs érythroïdes : CD235a (AGA)

Marqueurs plaquettaires : CD41a, CD42b, CD61

Marqueurs non spécifiques : CD36, CD71



LAM0 (Cellules souches myéloïdes) :

Pos : CD34, CD117, HLA-DR

POS : CD13, CD33

LAM1(Myéloblastes)

Pos : CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, MPOcy

Pos ou Neg : CD15

LAM3(Promyélocytes)

Pos ou Neg : CD34, CD117. Pos: CD13, CD33, MPOcy, CD15

LAM4 (Myéloblastes)

Pos : CD34, CD117, HLA-DR

Pos : CD13, CD33, MPOcy

LAM4 (Monoblastes)

Pos ou Neg :

CD117, MPOcy, CD114a, CD61

Pos: HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD14, CD64, CD11a/b/c, CD61

LAM5(Monoblastes)

Pos ou Neg : CD34, CD117, MPOcy, CD41a, CD61

Pos: HLA-DR, CD13, CD13, CD33, CD14, CD64, CD11a-b-c, CD36

LAM6 (Erythroblastes)

Pos ou Neg : CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33. Pos: AGA, CD36, CD71

LAM 7 (Mégacaryoblastes)

Pos ou Neg : CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33. Pos: CD41a, CD61, CD36

MPO: myéloperoxydase; **NSE** : estérase non spécifique, **c** : cytoplasmique; **s** : surface, **Pos** : positif; **Neg**: négatif; **LAM** : Leucémie myéloïde aiguë ; **LAL** : leucémie aiguë lymphoblastiques.

Schéma 5: Algorithme de diagnostic des LAM par CMF [88,91]

* LES LEUCEMIES AIGUES LAYMPHOBLASTIQUES

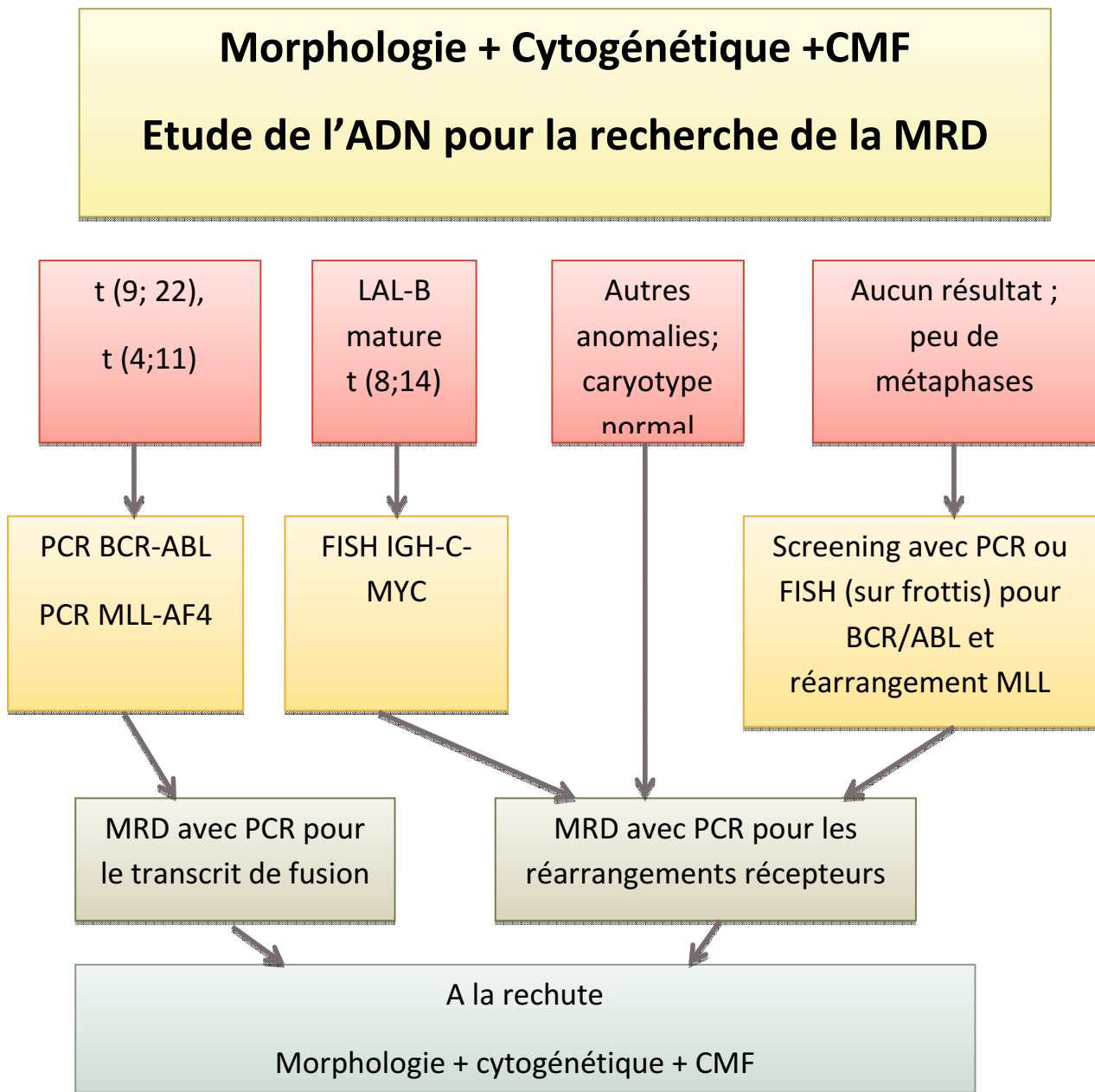


Schéma 6: Algorithme général proposé pour le diagnostic et le suivi des LAL [108].

Blastes MPO/NSE négatives



Général : CD34, HLA-DR, TdT, CD46

Lignée B : CD10, CD19, cCD22, CD20, cCD79A, CD24cμ, slg

Lignée T : CD1a, CD2, slcCD3, CD4, CD5, CD6, CD7

Myéloïde : cMPO, CD117, CD13, CD33, CD11c, CD14, CD15

CMF



Lignée B

Pro-B

Pos: TdT,
CD19/22/79a

Neg: CD10, cμ, slg

Pre-B

Pos: CD19/22/79a,
CD10, cμ

Neg: slg

B Mature:

Pos: CD19/22/79a,
CD10, slg

Neg: TdT

Lignée T

Pro T

Pos : TdT, cCD3

Pos ou Neg : CD2/5/7

T Commune

Pos : TdT, cCD3, CD2/
5/ 7, CD4, CD6, CD1a

T Mature :

Pos : CD3, CD2/5/7,
CD4 ou CD8

Pos ou Neg : TdT

Neg : CD1a

Autres

LAL minimalement différée

1 marqueur myéloïde et < 2
marqueurs B ou T (excepté
CD3/10/19)

LAL avec des marqueurs myéloïdes

CD10 ou CD19 avec < 2
marqueurs myéloïdes, 2
marqueurs des cellules T
avec des marqueurs
myéloïdes.

LAM : (> Ou =) à 2
marqueurs myéloïdes.

Schéma 7 : Algorithme de diagnostic des LAL par CMF [56,109].

CONCLUSION

En raison de son intérêt clinique et des informations déterminantes qu'elle apporte, la CMF a été massivement développée et s'est imposée comme une méthode de diagnostic utilisé en routine hématologique. Le phénotypage par la CMF est devenu un élément indispensable au diagnostic et au suivi des leucémies aiguës. L'introduction du marqueur CD45 a été un progrès assez considérable, notamment dans l'étude des LAM, pour améliorer le repérage des blastes et analyser les éléments myéloïdes plus différenciés. La CMF peut être également utilisé pour suivre l'évolution des patients sous traitement. L'étude de la maladie résiduelle, évaluée sur la présence de blastes au phénotype aberrant, sera un des éléments importants pris en compte dans l'élaboration des futurs protocoles thérapeutiques. Cette revue de la littérature doit être suivie par d'autres études pour prouver le rôle primordial de la CMF dans la classification, pronostic, diagnostic, et le suivi des leucémies aiguës dans notre contexte.

RESUME

Titre : Applications de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës.

Auteur : IBBA Ouafae

Mots clés : Cytométrie en flux- Leucémie aiguë- Diagnostic- Maladie résiduelle

La cytométrie en flux (CMF) est une technique objective, sensible et quantitative. C'est un procédé adapté à l'analyse des populations cellulaires complexes, des événements rares et aux études quantitatives.

A travers notre travail nous rapportons l'intérêt de la CMF dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. Elle est primordiale dans le diagnostic des LAL où elle permet l'identification de la lignée en cause B ou T et souvent une approche très précise du diagnostic. Elle représente la seule technique permettant de définir des entités rares : LAM0, LAM6, LAM7. Aussi, la mise en évidence des leucémies aiguës biphénotypiques n'aurait pas été possible sans l'apport de la CMF ainsi que la mise en évidence des expressions aberrantes de certains marqueurs. La quantification de la maladie résiduelle par CMF apporte aux cliniciens des arguments prédictifs de la rechute ou d'une longue survie.

La CMF est donc un apport certain dans le diagnostic et le monitoring de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës.

SUMMARY

Title: Applications of flow cytometry in acute leukemias.

Author: Ouafae IBBA

Keywords: Flow cytometry -Acute leukemia- Diagnosis- Minimal residual disease.

Flow cytometry (FC) is an objective, sensitive and quantitative technique. It's a suitable method for the analysis of complex cell populations, rare events and quantitative studies.

Through our work we report the benefit of the FC in the diagnosis and monitoring of acute leukemia, which is essential in the diagnosis of ALL and allows the identification of the line's origin B or T and often a very precise approach to the diagnosis. In AML, FC is the only technique to define rare entities: AML0, AML6 and AML7.

The identification of biphenotypic acute leukemia would not have been possible without the contribution of the FC and the identification of aberrant expressions of certain markers. The quantification of residual disease by FC provides to clinicians the arguments and predictors of relapse or a long survival.

Flow cytometry is a real help in the diagnosis and the monitoring of minimal residual disease in acute leukemias.

ملخص

العنوان: تطبيقات التعداد الخلوي المتعاقب في سرطانات الدم الحادة .

إعداد : إبا وفاء

الكلمات الرئيسية: التعداد الخلوي المتعاقب- سرطان الدم الحاد- تشخيص- الأمراض المتبقية.

يعد التعداد الخلوي المتعاقب تقنية موضوعية، حساسة وكمية. إنها وسيلة مناسبة لتحليل الساكنة الخلوية المعقدة، الإجراءات النادرة والدراسات الكمية.

من خلال هذا العمل نبين فائدة هذه التقنية في تشخيص ومتابعة سرطانات الدم الحادة. في الواقع هي وسيلة أساسية للكشف عن سرطانات الدم اللمفاوية حيث إنها تمكن من تحديد أصلها (ب أوت) و تشكل غالبا مقارنة دقيقة في تشخيص المرض.

يمثل التعداد الخلوي المتعاقب التقنية الوحيدة لتعريف كيانات نادرة في سرطانات الدم النخاعية الحادة. كذلك إن إبراز سرطانات الدم الحادة ثنائية المظهر لم يكن ممكنا دون مساهمة التعداد الخلوي المتعاقب.

تمكن هذه التقنية من تحديد كمية المرض المتبقي مما يوفر للمختصين حججا تنبؤية للانتكاس أو لحياة طويلة. وبهذا يعتبر التعداد الخلوي المتعاقب من الوسائل الأساسية في تشخيص ومتابعة الأمراض المتبقية في سرطانات الدم الحادة.

Références bibliographiques

- [1] **Ouzzif Z.** La cytométrie en flux et ses applications en hématologie: Recherches bibliographiques. Thèse de Pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Université Mohammed V, **1992**; n°10: 152p.
- [2] **Valet G.** Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* **2003**; 17:213-22
- [3] **Gane P.** La cytométrie en flux immunohématologie. *Transfusion Clinique et biologique* **2002** ; n°9 : 271–279
- [4] **Rahman M.** Introduction to Flow Cytometry. Serotec Ltd édition **2006**
- [5] **Briers E.** Nouveaux cytomètres en flux de Beckman Coulter, nouvelles opportunités - Focus Diagnostica - **2009**; Volume 17: Nr 3
- [6] **Nunez R.** Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. *Curr Issues Mol. Biol.* **2001**; 3(2): 39-45.
- [7] **ROGER D, RILEY S, EDWIN M, MAHIN J.** Clinical applications of flow cytometry. *ASCP national meeting*, Las Vegas, Nevada, **1988**.
- [8] **F.Z. EL Henati, Iobagiu, Lambert.** La cytométrie et ses applications. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2009**, N° 410, 23-32.

- [9] **V. Debleds, C. Lagarda.** 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* ; **2005** ; 370 : 57-60.
- [10] **LEES O.** Immunophénotypage: apport de la cytométrie en flux à la biologie clinique. *Revue Française des Laboratoires* ; **2000** ; 327 : 91-103
- [11] **ABUAF N ; RAJOELY B ; GAOUAR H ; LEYNADIER F.** Contribution de la cytométrie en flux au diagnostic d'une allergie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **2004** ; 44 : 37-44p.
- [12] **ROBINSON JP, GREGORI G.** Principles of Flow Cytometry: In flow cytometry with plant cells. Dolezel, Greilhuber, Suda (Eds.) **2006**.
- [13] **S. Wulff.** Guide to flow cytometry/ 2nd Edition Dako **2006**.
- [14] **Michael N, Dworzak E, Panzer-Grümayer R.** Flow Cytometric Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia, *Leukemia & Lymphoma*, **2003**; 44:1445– 1455.
- [15] **La cytométrie en flux** [en ligne]
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>/consulté 03/11/2011
- [16] **Les anticorps monoclonaux** [en ligne]
« <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prowguide/45277084.html>. Protein reviews on the web, CD molecules » consulté le 11/10/2011
- [17] **Marti G, Stetler-Stevenson M, Bleesing J.** Introduction to flow cytometry: *Semin Hematol*; **2001**; 38: 93-9p.

[18] Moalic V; Mercier B; Ferec C. Technologie lumineuse TM : principe, application et perspectives. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée* **2004** ; 19 : 181-187p.

[19] Watson JV. Flow Cytometry **2001**; 43: 55-68p.

[20] Merle-Béral H, Graff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux (Elsevier Masson SAS, Paris), *Hématologie* **2008**, 13-000-L-10.

[21] Graham L. Flow cytometry a basic guide: Institute of Medical Biology, University of Southern Denmark; **2006**.

[22] Lakomya D, Olsson NO. Apport du multiplexage en pratique du diagnostic immunologique ; *Rev Fran Lab.* **2008** ; 404 : 59-66.

[23] Kueviakoe I, Fernandez E, Plonquet A. Les difficultés d'interprétation de l'immunophénotypage des populations lymphoïdes des sangs. *Revue française des laboratoires* **2006**; 287:59-64.

[24] Kallel C, Masy E, Duthilleul P. Détection par cytométrie en flux des sous populations lymphocytaires T sécrétrices d'IL-2 et IFN: optimisation de la technique et établissement des valeurs de références. *Pathologie Biologie* **2006** : 8p.

[25] Lizard G et al. Microbilles, nanobilles et cytométrie : application à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire. *Pathologie Biologie* **2003**; 51: 418-427.

[26] Nam Koh K, Park M, Kim BK, Joon Im H, Park C.J, Jang S, Sook Chi H, Seo JJ. Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow Cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatric* **2010**; 53(11):957-964

[27] Helene Jouault. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires* (Elsevier Paris), juin **2002**, N° 344.

[28] Wartenberg D, Groves F, Adelman A. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Hematologic Malignancies: Acute Leukemias* (New York: Springer) **2008**. P: 77-93.

[29] Boissel N. Thérapeutiques ciblées dans les leucémies aiguës. *Réanimation* **2006**; 15: 278-284.

[30] Trebucq A ; Lefrere F. Brochure sur les leucémies ; BRK0 : **octobre 2009** disponible sur www.ligue-cancer.net consulté le 12/09/2011

[31] Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie C.M. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp. Cell Res* **2008**: 314, 1937-1944.

[32] Gisselbrecht S. Oncogènes et leucémies: historique et perspectives ; **février 2003** : Volume 19, numéro 2, p. 201-210

[33] **Michel G.** Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant et de l'adolescent : clinique et traitement, (Elsevier Masson SAS, Paris) : Pédiatrie **2008**, 4-080-D-10.

[34] **Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galto DA, Gralnick H, Sultan C.** Proposals for the classification of the acute leukemia's. French - American - British (FAB): Cooperative Group. *Br J Haematol* **1976**; 33, 451-8.

[35] **Delain M.** Leucémies Aiguës Mésoblastiques (LAM); C2004 [en ligne] <http://www.univtours.fr/fmc/Pages/Hemato/LA/LA.html> consulté le 25/11/2011

[36] **Krause D S, Van Etten R.** Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends Mol Med* **2007**: 13, 470-481.

[37] **Bene M, Castoldi G , Knapp W , Ludwig WD, Matutes E, Orfao A.** Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* **1995**; 9(10): 1783-6.

[38] **Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F.** The reliability and specificity of c kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. *Blood* **1998**: 92(2): 596-599.

[39] **Vardiman J, Harris N L, Brunning R D.** The World Health Organization (WHO): classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **2002**: 100, 2292-2302.

[40] **F. Valensi.** Classification des leucémies aiguës, nouvelles proposition de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). *Revue française des laboratoires*, juin **2002** n°344.

[41] Klepin HD, Balducci L. Acute myelogenous leukemia in older adults. *Oncologist*.**2011**; V n°1; 14:222-232. Disponible sur www.nccn.org

[42] Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G. The immunophénotypage of 117 adults with acute myeloid Leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* **2000**; 96(3): 870-7.

[43] Leymarie V, Galois AC, Falkenrodt A, Lessard M. Diagnostic des hémopathies malignes myéloïdes : apports de la classification OMS 2001. *Ann Bio Clin* **2004**; 62(5): 513-20).

[44] Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau M, Hellström-Lindberg E, Tefferi A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **2009**; 114, 937-951.

[45] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. In: eds. Lyon: IARC Presss, **2008**.

[46] Döhner H. Génomique des leucémies aiguës de l'adulte. *Hématologie* **2010**; 116 (n° special 2): 9-15.

[47] Hourigan M, Goldstone A. Acute Lymphoblastic Leukemia Epidemiology. In: Anjali A S, Lazarus H M, éd. *Adult Acute Lymphocytic Leukemia: biology and treatment*. New York: Springer; **2011**: 77-87.

[48] James W. Vardiman, Juergen Thiele, Daniel A. Arber, Richard D. Brunning, Michael J. Borowitz , Anna Porwit, Nancy Lee Harris, Michelle

M. Le Beau, Eva Hellstrom-Lindberg, Ayalew Tefferi, and Clara D. Bloomfield. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 30 JULY **2009**: V 114, N°5.

[49] Schiffer A. Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Encyclopedia of Cancer **2002**, 2nd Edition Volume 1(Elsevier Science USA).

[50] Michel G. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant et de l'adolescent clinique et traitement, (Elsevier Masson SAS, Paris) Pédiatrie 2008, 4-080-D-10.

[51] Vincenot A, Abarah W, Frayfer J, Mahfouz I, Andre-Kerneis E. Leucémie aiguë myéloïde avec érythroblastose médullaire : à propos d'un cas illustrant .la nouvelle classification OMS (2008). Ann Biol Clin **2011** ; 69 (3) : 343-7.

[52] Troussard X, Maarouf N. Leucémies biphénotypiques (BAL) : mythe, réalité, perspectives SPECTRA BIOLOGIE mai **2006** : n° 152.

[53] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Classification of Tumors: Tumours of Haematopoietic and lymphoid Tissues (WHO): Patholy and Genetics, **2001** - 351 p. Disponible sur: press@iarc.fr www.iarc.fr

[54] Frankfurt O, Petersen L, Tallman MS. Acute Lymphocytic Leukemia – Clinical Features and Making the Diagnosis (New York: Springer); **2011**:9-24.

[55] Zerbini MC, Soares FA, Velloso RP, F. Chauffaille, Paes RP. World Health Organization Classification of tumors of Haematopoietic and lymphoid

tissues, 4th edition, 2008 – major changes from the 3rd edition, 2001. Rev Assoc Med Bras **2011**; 57(1):66-73

[56] Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, Kantarjian HM. Adult acute Lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. Cancer: **2010**; 116(5):1165- 1176.

[57] Ivana Gojo X, York T, Ning Y, Baer M R. Diagnosis of biphenotypic acute leukemia: a paradigmatic approach. Int J Clin Exp Pathol **2010**; 3(1):75-86

[58] Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia: Lancet **2008**; 371: 1030-1043.

[59] Hoelzer D, Gokbuget N. Acute lymphocytic leukemia in adults. In: Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, (Elsevier) **2005**:1175-1194.

[60]Satake N, Yoon JM. Acute Lymphoblastic Leukaemia. E medicine Pediatric **2009**; 12:1-26.

[61]Boissel N. Les leucémies aiguës. La collection d'Hippocrate. Hématologie mise à jour **2009**; 1-10-162. Disponible sur« www.laconferencehippocrate.com»

[62] Fielding A. The treatment of adults with acute lymphoblastic anemia: In Hematology 2008: *American Society of Hematology Education Program Book*. **2008**: 381-389. Disponible sur:

<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/full/2008/1/457>

[63] Simon H. Acute Lymphocytic Leukemia (ALL): The New York Times. Disponible sur:

<http://health.nytimes.com/health/guides/disease/acute-lymphocytic-leukemia-all/diagnosis.html>. Consulté le 26/10/2011

[64] Bauduer F. Aspects cliniques des leucémies aiguës. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (Elsevier Paris) **2002**: 13-018-G-10, 8 p.

[65] Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2004**; 50: 223-261

[66] Sainty D. Lignée lymphoïde et sa pathologie: Leucémies aiguës lymphoïdes. In: Sebahoun G, 2ème éd. *Hématologie Clinique et Biologique*: Arnette; **2006**. p: 277-284.

[67] Letestu R, Valensi F. La ponction aspiration médullaire à visée diagnostique. *Annales de Biologie Clinique* **2003**; 61(6): 655-665.

[68] Estey E, Faderl S, Kantarjian M. Hematologic Malignancies: Acute Leukemias **2008**: ISBN 978-3-540-72302-8

[69] Maillard N, Buzyn A. 2eme partie « leucémies aiguës lymphoblastiques » la revue du praticien **2006** : I-10-Q162 : 56 ; 303-308 p.

[70] Binet C, Blanchecotte F, Brémond JL, Colombat PH, Petit A. Les Anémies [en ligne].

http://fmc.med.univ_tours.fr/Media/JS2000/JS00binetdia06.gif. Consulté le 18/11/2011.

[71] **Riccardo S. Cosimo G. Gianluca B. Stefania V. Luigi Z. Sisto.** **Musculoskeletal** Manifestations in Pediatric Acute Leukemia. *J Pediatr Orthop* **2008**; 28:20Y28

[72] Hémogramme et Myélogramme [en ligne]:

<http://facmed.univrennes1.fr/resped//s/semio/semiomyelo/semiohemo.meylo.html>. Consulté le 7/10/2011.

[73] **Zhioua R, Boussen I, Malek I, Ouertani A.** Leucémie aiguë lymphoblastique et atteinte vitréenne: À propos d'un cas. *Journal Français d'Ophtalmologie* **2001**; 24(2): 180-182.

[74] **Itakura H, Coutre SE.** Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al. 12ème éd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2009**. P: 1821-1842.

[75] **Larizza P, Martelli MF, Grignani F.** Leucémies: Leucémie aiguë lymphoblastique. In: Larizza P, Martelli MF, Grignani F. *Diagnostic des maladies du sang* : Italie: PICCIN, **1990**. p: 258-284.

[76] Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Morphologie générale des blastes au cours des LAM et des LAL, et principales réactions cytochimiques utiles au diagnostic [en ligne] :

http://www.med.univangers.fr/discipline/lab_hema/PATHOL2007/LEUCO/morphoimmunogenela.html#images. Consultée le 23/09/2011

[77] **Lafage-Pochitaloff M, Charrin C.** Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. *Pathologie Biologie* **2003**; 51: 329-336

[78] Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia: Hematology / Oncology Clinics of North America **2009**; 23: 991-1010.

[79] Lafage-Pochitaloff M. Notions de base en cytogénétique conventionnelle et moléculaire : application au diagnostic des hémopathies malignes. Pathologie Biologie **2003**; 51: 307–311.

[80] Lodé L, Avet-Loiseau H. Anomalies chromosomiques et géniques dans les hémopathies malignes. Encyclopédie Médico-chirurgicale (Elsevier, Paris), Hématologie **2007**; 13-000-K-10 ; 13p

[81] Michael A. Seekers, Matt E. Kalaycio, Brian J. Bolwell. The acute lymphoblastic leukemia Clinical malignant hematology **2007**: chapter 2-9p

[82] Llopis L. Molecular biology and prognostic value in acute myeloid leukemia: Hematology, **2009**. 15(6): 426-43.

[83] Maillard N, Buzyn A. Leucémies aiguës: 2e partie -Leucémies aiguës lymphoblastiques: diagnostic, évolution. La revue du praticien **2006**; 56:303 308

[84] Thomas X. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. Encyclopédie Médico-chirurgicale (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie **2007**; 13-018-G-40; 13p

[85] Poole C, Greenland S, Luetters C, Kelsey J, Mezei G.

Socio-economic status and childhood leukemia - a review: international journal of epidemiology **2006**; 35: 370–384.

[86] Lewis B, Silverman MD. Acute Lymphoblastic Leukemia in Infancy

Pediatr Blood Cancer **2007**; 49:1070–1073

[87] El-sayed A, El-borai MH, Bahnassy AA.

Flow cytometric immunophenotyping (FCI) of lymphoma: correlation with histopathology and immunohistochemistry. Diagnostic Pathology, **2008**, 3:43

[88] Dakka N. Profil immunologique des Leucémies Aigues Lymphoblastiques chez les Enfants au Maroc : Corrélation avec les Aspects Biologiques, Cliniques et Pronostiques : Thèse de doctorat d'état en biologie, Faculté des Sciences – Université Med V Rabat- Agdal-**2009**- N°2476 ,143p

[89] Khattab M, Nassereddine I, Zafad S, El Aouad R .Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Moroccan Children , International Journal of Pediatrics **2009**, Article ID 674801, 7p.

[90] Han X, Bueso-Ramos CE. Advances in the pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia: Annals of Diagnostic Pathology **2005**; 9: 239-257.

[91] Omar Abdelkader M, Matar M, Meabed M. Expression of the C-KIT Molecule in Acute Myeloid Leukemias: Implications of the Immunophenotypes CD117 and CD15 in the Detection of minimal Residual Disease. Journal of the Egyptian Nat.Cancer Inst.**2001**: Vol.13, No.3: 191-201p

[92]Laboratoire Pasteur Cerba. Guide des analyses spécialisées, 5ème édition. (Elsevier Masson) **2007**. P: 616.

[93] Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartg P, Senburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, **2006**, 1, 265-276.

[94] Unal S, Cetin M. The prognostic impact of myeloid antigen expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients: *Turk J pediatric* **2011**: 50 (6):533-6

[95] Bernard H. Immunophénotypage des hémopathies malignes : Journées de formation en cytométrie organisées par l'ABC-BVC : Cliniques Universitaires de Mont – Godinne 15 et 16 mai **2002**.

[96] Venditti A, Maurillo L. « Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* **2003**: 17 (11) - 2178-82.

[97] Malecki M, Sanchez-Irizarry C. « leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes » *Mol Cell Biol* **2006**: 26(12):4642-51.

[98] Gokbuget N, Hoelzer D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology* **2009**, Vol 46, No 1, pp. 64–75

[99] Michalek J, Smarda J Acute Myeloid Leukemia: Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, Octobre **2000**: 73 (4): 223–228.

[100] Elaine DS; Smith C, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D. Minimal Residual Disease Quantification in Acute Myeloid Leukemia: Clin Lymphoma Myeloma. **2009**; 9(Suppl 3): S281–S285.

[101] Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Semin Hematol **2009**; 46(1): 100-106.

[102] Bene MC. Immunophenotyping of acute leukemias: Immunol Lett **2005**; 98 (1): 9-21.

[103] Obro NF, Ryder LP, Madsen HO, Andersen MK, Lausen B, Hasle H, Schmiegelow K, Marquart HV. Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia-verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods: Haematol. **2011**/ 10.3324

[104] Campana D. Status of Minimal Residual Disease Testing in Childhood Hematological Malignancies: Br J Hematol **2008**; 143(4):481-9

[105] Perea G, Lasa A. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t (8; 11) and inv (16)]: Leukemia **2006**; 20(1): 87-94.

[106] Pui C, Boyett J. Long-term results of total therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St JUDE Children's research hospital. Leukemia **2000**; 14(12):2286-94.

[107] Campana D. Minimal Residual Disease Studies in Acute Leukemia: Am J Clin Pathol **2004**; 122(Suppl 1):S47-S57.

[108] Haferlach T , Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias . Critical Reviews in Oncology/Hematology **2005**: 56; 223–234

[109] Schwonzen M, Diehl V, Dellanna M, Staib P. Immunophenotyping of surface antigens in acute myeloid leukemia by flow cytometry after red blood cell lysis. Leukemia Research **2007**: 31,113–116.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je*



- أن أراقب الله في مهنتي.
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوماً وفياً لتعاليمهم.
- أن أزاوّل مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحصى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.
- "والله على ما أقول شهيد"

تطبيقات التعداد الخلوي المتعاقب

في سرطانات الدم الحادة

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم.....

من طرف

الآنسة : إيا وفاء

المزدادة في : 01 غشت 1986 بالناظور

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية : التعداد الخلوي المتعاقب- سرطان الدم الحاد – تشخيص- المرض المتبقي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة :

رئيس

السيد : عبد القادر بلمكي
أستاذ في علم الدم

مشرف

السيد : عز العرب مسرار
أستاذ مبرز في علم الدم البيولوجي

أعضاء

السيدة : نزهة مسعودي
أستاذة مبرزة في علم الدم البيولوجي

السيدة : منى نزيه
أستاذة مبرزة في علم الدم