



Faculté de Médecine  
Département de Pharmacie

**THESE DE DOCTORAT DES SCIENCES MEDICALES**

**ETUDE IMMUNOPHENOTYPIQUE DES CAS DE  
LEUCEMIES AIGUËS DE « NOVO » PAR  
CYTOMETRIE EN FLUX (CMF) DANS LA  
REGION DE TIZI OUZOU : APPLICATION  
DANS LE DIAGNOSTIC ET LE PRONOSTIC**

Présentée et soutenue publiquement

Par :

Dr. KESSAL Fatma épouse BOUCHNI  
Maitre assistante en Hémobiologie et Transfusion Sanguine

10 Novembre 2021

**JURY :**

<b>Pr. Hamrioui Boussad</b>	Professeur	Faculté de Médecine Université d'Alger	Président
<b>Pr. Aireche Hadi</b>	Professeur	Faculté de Médecine Université de Tizi Ouzou	Directeur de thèse
<b>Pr. Benhalima Malika</b>	Professeur	Faculté de Médecine Université d'Alger	Examinatrice
<b>Pr. Boukhelal Houria</b>	Professeur	Faculté de Médecine Université d'Alger	Examinatrice
<b>Pr. Nekhla Ahmed</b>	Professeur	Faculté de Médecine Université de Tizi Ouzou	Examineur

**Année: 2020-2021**

## Remerciements

La mise en place de la technique de Cytométrie en Flux au Laboratoire d'Hémobiologie du CHU de Tizi Ouzou unité NEDDIR Mohamed, est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui je tiens à dire profondément et sincèrement merci.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur AIRECHE Hadi,

Professeur d'Hémobiologie Faculté de Médecine de Tizi Ouzou

Ancien Chef de service du Laboratoire d'Hémobiologie du CHU de Tizi Ouzou unité NEDDIR Mohamed. Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail et de me faire confiance. Merci de m'avoir soutenu dès le départ et d'avoir accepté d'endosser la charge de promoteur. Votre gentillesse, vos compétences m'ont rendu la réalisation de ce travail très agréable. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Je remercie tous les membres du jury pour avoir bien voulu donner de leur temps pour lire ce travail. Qu'ils en soient particulièrement remerciés :

Monsieur le Président du jury de thèse,

Monsieur le Professeur HAMRIOUI Boussad : Professeur de Parasitologie Mycologie à la Faculté de Médecine d'Alger. Ancien Chef de service du Laboratoire de Parasitologie Mycologie au CHU Mustapha d'Alger. Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je vous remercie de votre confiance et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail et vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

A Mesdames et Monsieur les membres du Jury.

Madame le Professeur BENHALIMA Malika Professeur d'immunologie Faculté de Médecine d'Alger Ancien Chef de Service du Laboratoire d'immunologie au CHU Mustapha d'Alger. Je tiens à vous dire un « Merci » sincère pour votre soutien, votre enseignement et vos conseils tout au long de ces années qui viennent de s'écouler.

Madame le Professeur BOUKHELAL Houria : Professeur en pédiatrie spécialiste en onco-pédiatrie Faculté de Médecine d'Alger, Ancien Chef de Service de l'oncologie pédiatrique au CHU Mustapha d'Alger. Vous me faites honneur de bien vouloir évaluer ce travail.

Monsieur le Professeur NEKHLA Ahmed : Professeur de Chirurgie Thoracique Faculté de Médecine de Tizi Ouzou et Chef de Service de la Chirurgie Cardiovasculaire au CHU de Tizi Ouzou unité Sanatorium. Merci pour vos encouragements et votre appui pour que je puisse mener à terme ce travail.

Je tiens à remercier mes collaborateurs scientifiques :

Madame le Professeur ALLOUDA Malika Maître de Conférence A en Hématologie à la Faculté de Médecine de Tizi Ouzou : je vous remercie pour votre gentillesse, votre aide dans la consultation des dossiers des patients au Service d'Hématologie adulte. Encore merci à vous pour vos précieux conseils lors de l'élaboration de la fiche de renseignement.

Madame le Professeur CHIKHI Malika Professeur en Pédiatrie Faculté de Médecine de Tizi Ouzou Chef de Service de Pédiatrie et d'oncologie pédiatrique au CHU de Tizi Ouzou Unité Neddar Mohamed : Merci de m'avoir donné l'accès aux dossiers des patients de l'unité oncologie pédiatrique et merci pour votre soutien.

Monsieur le Professeur CHERIFI Mohamed Professeur en Biochimie Faculté de Médecine d'Alger et Chef de Service du Laboratoire central de Bouloghine à Alger : Merci pour vos conseils précieux pour l'étude statistique et vos encouragements pendant la réalisation de cette thèse.

## *Dédicaces*

*A la mémoire de ma chère grande mère « TAOUS » ;*

*A ma famille ;*

*A tous ceux qui me sont chers ;*

*Une pensée positive à toutes les personnes atteintes du cancer.*

## Table des matières

Liste des figures .....	xi
Liste des tableaux .....	xv
Abréviations .....	xix
Introduction .....	22

### Partie 1 : Revue bibliographique

#### I-Généralités sur la leucémie aigue

I.1. Historique.....	24
I.2. Définition .....	25
I.3. Incidence et survie des leucémies aiguës.....	25
I.3.1. Leucémie Aigüe Myéloblastique (LAM).....	25
I.3.1.1. Incidence.....	25
I.3.1.2. La survie .....	25
I.3.2. Leucémie Aigue Lymphoblastique (LAL).....	26
I.3.2.1. Incidence.....	26
I.3.2.2. La survie .....	26
I.3.3. Leucémies aiguës de lignée ambiguë.....	27
I.4. Physiopathologie.....	27
I.4.1. Leucémogénèse : concepts généraux .....	27
I.4.2. Processus de leucémogénèse.....	27
I.5. Classification des leucémies aiguës .....	28
I.5.1. Classification des LAM.....	29
I.5.1.1. Selon la classification cytologique FRENCH AMERICAN BRITISH (FAB).....	29
I.5.1.2. Selon la classification immunologique EGIL.....	33
I.5.1.3. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).....	36
I.5.2. Classification des LAL.....	40
I.5.2.1. Selon la classification morphologique FAB.....	40
I.5.2.2. Selon la classification immunologique de l'EGIL .....	43
I.5.2.3. Selon la classification OMS .....	44
I.5.2.4. Leucémies aiguës de lignée ambiguë .....	45
I.6. Diagnostic des leucémies aiguës.....	48
I.6.1. Circonstances de découverte.....	48

I.6.2. Démarche diagnostique .....	48
I.6.2.1. Signes d'insuffisance médullaire .....	49
I.6.2.2. Signes de prolifération tumorale.....	49
I.6.3. Confirmation du diagnostic.....	50
I.6.3.1. Hémogramme ou Numération Formule Sanguine.....	50
I.6.3.2. L'examen du frottis sanguin .....	51
I.6.3.3. Le myélogramme.....	52
I.6.4. Examens complémentaires permettant la classification des leucémies aigues .....	54
I.6.4.1. Etude cytoenzymatique.....	54
I.6.4.2. L'étude immunophénotypique par CMF .....	56
I.6.5. Examens biologiques à visée pronostic.....	59
I.6.5.1. L'étude cytogénétique .....	59
I.6.5.2. L'étude moléculaire .....	60
I.7. Les facteurs pronostiques des LA de Novo .....	60
I.7.1. Facteurs pronostiques des LAM.....	60
I.7.2. Facteurs pronostiques des LAL.....	62

## **II. Apport de la CMF au diagnostic de la leucémie aigue**

II.1. Définition.....	64
II.2. Historique .....	64
II.3. Composition d'un cytomètre: .....	65
II.3.1. Le système fluide.....	66
II.3.2. Le système optique .....	69
II.3.2.1. La source d'énergie .....	69
II.3.2.2. Canaux optiques .....	70
II.3.2.3. La détection du signal .....	73
II.3.3. Le système électronique et traitement du signal .....	73
II.4. Fluorescence et Fluorochromes .....	76
II.4.1. Principe de la Fluorescence .....	76
II.4.2. Les contraintes liées à l'émission des fluorochromes.....	78
II.5. L'immunophénotypage dans les leucémies aigues.....	79
II.6. L'expression des molécules de surface en fonction des stades de différenciation des cellules myéloïdes et lymphoïdes.....	80

II.6.1. L'expression des antigènes de la lignée lymphoïde B en fonction des stades de différenciation.....	80
II.6.2. L'expression des antigènes de la lignée lymphoïde T en fonction des stades de différenciation.....	82
II.6.3. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules myéloïdes.....	84
II.6.3.1. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée granuleuse.....	84
II.6.3.2. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire .....	85
II.6.3.3. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée érythroïde.....	86
II.6.3.4. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée plaquettaire .....	86
II.7. Identification des marqueurs immunophénotypiques présents sur les cellules leucémiques et absents sur les cellules normales .....	87

## **Problématique**

### **Objectifs**

## **Partie 2 : Travail pratique**

### **I. Matériels et méthodes**

1. Matériels.....	91
1.1. Type de l'étude .....	91
1.2. Population étudiée .....	91
1.3. Critères d'inclusion.....	91
1.4. Critères d'exclusion.....	91
1.5. Période de l'étude .....	92
1.6. Lieux de l'étude .....	92
1.7. Taille échantillonnale .....	92
2. Méthode de travail.....	93
2.1. Phase pré analytique .....	93
2.2. Phase analytique .....	94
2.2.1. Etude cyto hématologique.....	94
2.2.2. Etude cytochimique : Réaction au noir soudan.....	96

2.2.3. Calcul de l'indice de pureté de la moelle.....	98
2.2.4. Etude immunologique par cytométrie en flux.....	99
2.2.5. Choix des anticorps et panel utilisé.....	104
2.2.6. Technique d'immunomarquage .....	106
2.2.7. Acquisition des données .....	107
2.2.8. Interprétation des données d'acquisition .....	107
3. Analyse statistique des résultats.....	110

## **II. Résultats**

### **II.1. Résultats adultes**

1. Description des résultats des patients adultes .....	114
1.1. Aspects épidémiologiques .....	114
1.1.1. Répartition des patients selon le sexe .....	114
1.1.2. Répartition des patients selon les tranches d'âge.....	114
1.1.3. Répartition des patients selon l'âge et le sexe.....	116
1.2. Aspects épidémiologiques cliniques et biologiques selon le type de la LA.....	116
1.2.1. Leucémies aiguës myéloblastiques .....	116
1.2.2. Leucémies aiguës lymphoblastiques.....	131
1.2.3. Fréquence d'expression des antigènes de différenciation leucocytaire dans les LAL B et T.....	137
1.2.4. Co-expression d'antigènes aberrants dans les LAL.....	139
1.3. Etude de la survie globale en fonction des facteurs pronostiques .....	141
1.3.1. Fréquence des facteurs pronostiques liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL.....	142
1.3.2. Survie globale en fonction des facteurs pronostiques liés à la LA .....	142
1.3.3. Valeur pronostique des différents marqueurs immunologiques exprimés dans les LA au diagnostic .....	150

### **II.2. Résultats enfants**

2. Description des résultats des patients enfants .....	161
2.1. Aspects épidémiologiques.....	161
2.1.1. Répartition des patients selon le sexe.....	161
2.1.2. Répartition des patients selon les tranches d'âge .....	161
2.1.3. Répartition des patients selon l'âge et le sexe .....	162
2.2. Aspects épidémiologiques cliniques et biologiques selon le type de la LA.....	163

2.2.1. Leucémies aiguës lymphoblastiques .....	163
2.2.1.1. Répartition des LAL selon le sexe .....	163
2.2.1.2. Répartition des LAL selon les tranches d'âge .....	163
2.2.1.3. Répartition des LAL selon l'âge et le sexe .....	164
2.2.1.4. Répartition des LAL selon la classification morphologique FAB.....	164
2.2.1.5. Répartition des LAL selon les sous types immunologiques .....	164
2.2.1.6. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des sous types immunologiques des LAL.....	165
2.2.1.7. Caractéristiques hématologiques biologiques des sous types immunologiques des LAL.....	166
2.2.1.8. Circonstances de découvertes des LAL .....	168
2.2.1.9. Fréquence d'expression des antigènes de différenciation leucocytaire dans les LALB et LALT .....	169
2.2.1.10. Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAL .....	171
2.2.2. Leucémies aiguës myéloblastiques.....	172
2.2.2.1. Répartition des LAM selon le sexe .....	172
2.2.2.2. Répartition des LAM selon les tranches d'âge .....	172
2.2.2.3. Caractéristiques cliniques des LAM .....	172
2.2.2.4. Circonstances de découverte des LAM.....	174
2.2.2.5. Analyse des données hématologiques biologiques des LAM.....	174
2.2.2.6. Classification cytologique FAB des sous types de LAM .....	175
2.2.2.7. Profil immunophénotypique des LAM .....	176
2.2.2.8. Exemples de cas discordants entre le diagnostic cytologique du FAB et l'immunophénotypage des LAM .....	179
2.3. Leucémies aiguës biphénotypiques.....	180
2.3. Etude de la survie globale en fonction des facteurs pronostiques.....	181
2.3.1. Fréquence des facteurs pronostiques liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL .....	181
2.3.2. Survie globale en fonction des facteurs pronostiques liés à la LA.....	181
2.3.2.1. Survie globale en fonction du type de la LA .....	181
2.3.2.2. Probabilité de survie globale en fonction du type immunologique des LAL ..	182
2.3.2.3. Probabilité de survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic.....	183
2.3.3. Valeur pronostique des différents marqueurs immunologiques exprimés dans les LA .....	190

2.3.3.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques dans les LAL .....	190
2.3.4. Survie globale des LALB avec expression des antigènes myéloïdes associées (LAL/My+) et sans expression d'antigènes myéloïdes (LAL B /My-) .....	196
2.3.4.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface dans les LAM.....	196

### **II.3. Etude de la concordance entre le typage FAB et immunologique des leucémies aiguës**

3. Description cytologique FAB et immunologique des LA .....	139
3.1. Classification des sous types de LAM selon les critères cytomorphologiques du FAB.....	200
3.2. Etude cytomorphologique du frottis de sang périphérique des sous types de LAM selon la classification FAB .....	200
3.3. Etude cytomorphologique au frottis médullaire des sous types de LAM selon la classification FAB .....	201
3.4. Répartition des cas de LAM selon le degré de positivité de la coloration cytochimique au noir soudan .....	202
3.5. Classification immunophénotypique des cas de LAM difficiles à classer et redressement diagnostique .....	203
3.6. Fréquence d'expression des marqueurs antigéniques en fonction des sous types de LAM .....	204
3.6.1. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM0.....	204
3.6.2. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM1 .....	204
3.6.3. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM2.....	204
3.6.4. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM3.....	205
3.6.5. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM4.....	206
3.6.6. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM5.....	206
3.6.7. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM7.....	207
3.7. Etude de la concordance entre la classification cytologique FAB et immunologique des LAM selon EGIL .....	207
3.8. Taux de concordance entre l'immunophénotypage selon EGIL et la classification cytologique FAB des sous types de LAM.....	208
3.9. Confrontation entre le typage cytologique FAB et immunophénotypique dans le diagnostic des LAB versus LAL et LAM .....	209

### **Partie 3 : Discussion**

- Données cliniques et cytologiques de l'adulte .....	210
- Données cliniques et cytologiques de l'enfant.....	211
- Les LA biphénotypiques .....	213
- Analyse du profil immunophénotypique des LAM.....	213
- Analyse du profil immunophénotypique des LAL.....	215
- Expression d'antigènes aberrants .....	218
- Impact des facteurs pronostiques sur la survie globale.....	221
- Fréquence d'expression des marqueurs de surface dans les sous types FAB de LAM et la concordance entre la classification cytologique FAB et l' immunophénotype des LA .....	225
<b>Recommandations</b> .....	231
<b>Conclusion</b> .....	234
<b>Bibliographie</b> .....	238
<b>Annexes</b> .....	255
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'hypothèse du « Tow- Hit Model » et la leucémogénèse selon Gilliland et Griffin.....	28
<b>Figure 2:</b> Leucémie aigue à cellules blastiques dendritiques plasmacytoïdes.....	34
<b>Figure 3:</b> LAL2 selon FAB .....	42
<b>Figure 4:</b> LAL1 selon FAB .....	42
<b>Figure 5:</b> LAL3 selon FAB. ....	42
<b>Figure 6:</b> Myéloblastes .....	52
<b>Figure 7:</b> Myéloblastes et batonnets d'Auer.....	52
<b>Figure 8:</b> Myéloblastes montrant des corps d'Auer organisés en fagots.....	53
<b>Figure 9:</b> Leucémie aiguë monoblastique, LAM5a.....	53
<b>Figure 10:</b> Blastes évocateurs de Mégacaryoblastes : LAM7. ....	54
<b>Figure 11:</b> Blastes évocateurs des proérythroblastes.....	54
<b>Figure 12:</b> Myéloblastes positivité focale de la MPO (cas d'une LAM2). ....	55
<b>Figure 13:</b> Cytochimie des estérases. L'activité enzymatique est présente dans les cellules de la lignée monocytaire et révélée sous la forme d'un précipité brun rouge d'autant plus intense que les cellules sont matures. ....	56
<b>Figure 14:</b> Histogrammes: CD45/SSC .....	58
<b>Figure 15:</b> Composants majeurs d'un cytomètre en flux. ....	66
<b>Figure 16:</b> Principe de l'hydro focalisation.....	68
<b>Figure 17:</b> Influence de la concentration et de la pression sur la précision de la mesure. ....	68
<b>Figure 18:</b> Les différents types de filtres utilisés en cytométrie.....	71
<b>Figure 19:</b> Diffusion de la lumière aux petits angles et aux grands angles. ....	72
<b>Figure 20:</b> Vision globale du système optique d'un cytomètre de flux. ....	73
<b>Figure 21:</b> Différents modes de représentation des données obtenues en CMF.....	75
<b>Figure 22:</b> Diagramme de Jablonski .....	76
<b>Figure 23:</b> Spectres d'excitation et d'émission du FITC dans l'eau à pH 7.....	78
<b>Figure 24:</b> Chevauchement des spectres de fluorescence des différents fluorochromes.....	78
<b>Figure 25:</b> Différents stades de maturation du lymphocyte B.....	81
<b>Figure 26:</b> Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation lymphocytaire B.....	82

<b>Figure 27:</b> Différents stades de maturation du lymphocyte T.....	83
<b>Figure 28:</b> Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation de la lignée granuleuse.....	85
<b>Figure 29:</b> Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation monocyttaire .....	86
<b>Figure 30:</b> Réaction du noir Soudan (nettement positive au cours d'une LAM2).....	98
<b>Figure 31:</b> Compensation de la population en FL1 .....	102
<b>Figure 32:</b> Compensation de la population en FL2 .....	103
<b>Figure 33:</b> Elimination des débris et sélection des différentes populations cellulaires.....	108
<b>Figure 34 :</b> Graphiques CD/SSC .....	109
<b>Figure 35:</b> Représentation graphique des données à recueillir pour le calcul des durées de survie .....	111
<b>Figure 36:</b> Répartition graphique des LA de l'adulte selon le sexe .....	114
<b>Figure 37:</b> Répartition graphique des LA de l'adulte selon les tranches d'âge.....	115
<b>Figure 38 :</b> La pyramide des âges des LA de l'adulte en fonction du sexe.....	116
<b>Figure 39:</b> Représentation graphique des circonstances de découverte des LAM.....	120
<b>Figure 40:</b> Expression des marqueurs myéloïdes et d'immaturation dans les LAM.....	123
<b>Figure 41:</b> Co-expression d'antigènes aberrants dans les LAM.....	128
<b>Figure 42:</b> Fréquence des sous types immunologiques LAL B et LAL T .....	133
<b>Figure 43:</b> Circonstances de découvertes des LALB .....	136
<b>Figure 44:</b> Circonstances de découvertes des LALT.....	136
<b>Figure 45:</b> Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL B.....	138
<b>Figure 46:</b> Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL T.....	139
<b>Figure 47:</b> Courbe de survie globale en fonction du type de la LA : LAM/LAL.....	143
<b>Figure 48:</b> Survie globale en fonction du type immunologique des LAL : LALB/LALT...	144
<b>Figure 49:</b> LAM adultes - Survie globale en fonction de l'âge.....	146
<b>Figure 50:</b> LAM adultes - Survie globale en fonction du taux de globules blancs .....	147
<b>Figure 51:</b> LAL adultes - Survie globale en fonction du taux de globules blancs .....	149
<b>Figure 52:</b> LAL adultes - Survie globale en fonction du sexe.....	149
<b>Figure 53:</b> Courbes de survie globale selon l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface dans les LAM.....	153
<b>Figure 54:</b> Courbes de survie globale selon l'expression ou non des Ag aberrants.....	154
<b>Figure 55:</b> Courbe de survie globale selon l'expression ou non des antigènes aberrants myéloïdes dans les LAL.....	157

<b>Figure 56:</b> Courbes de survie globale selon l'expression ou non des antigènes leucocytaires de surface dans les LAL T .....	160
<b>Figure 57:</b> Répartition graphique des leucémies aiguës selon les tranches d'âge.....	162
<b>Figure 58:</b> Pyramide des âges des cas de leucémies aiguës en fonction du sexe.....	162
<b>Figure 59:</b> Répartition des LAL selon l'âge et le sexe .....	164
<b>Figure 60:</b> Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL B.....	170
<b>Figure 61:</b> Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL T.....	171
<b>Figure 62:</b> Expression des marqueurs myéloïdes et d'immaturité dans les LAM.....	178
<b>Figure 63:</b> Courbe de survie globale en fonction du type de la LA : LAM/LAL .....	182
<b>Figure 64:</b> Courbe de survie globale en fonction du type immunologique des LAL : LALB /LALT.....	183
<b>Figure 65:</b> LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction de l'âge .....	184
<b>Figure 66:</b> LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction du sexe.....	185
<b>Figure 67:</b> LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction de la présence ou non du syndrome tumoral.....	186
<b>Figure 68 :</b> LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction du taux de globules blancs.....	187
<b>Figure 69:</b> LAM de l'enfant- Courbe de survie globale en fonction du taux de globules blancs.....	189
<b>Figure 70:</b> LAL T de l'enfant - Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface .....	192
<b>Figure 71:</b> Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmique dans les LALB.....	195
<b>Figure 72:</b> Courbe de survie globale des LAL B de l'enfant en fonction de l'expression ou non des Ag myéloïdes (LALB /My+ / LAL B /My-).....	196
<b>Figure 73 :</b> LAM de l'enfant- Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface .....	199
<b>Figure 74:</b> Répartition des sous type de LAM selon FAB .....	200
<b>Figure 75:</b> Equilibre leucocytaire sur frottis de sang périphérique selon les sous types de LAM .....	201
<b>Figure 76:</b> Répartition des éléments médullaires selon les sous types de LAM .....	202
<b>Figure 77:</b> Degré de positivité du noir soudan dans les LAM.....	203
<b>Figure 78:</b> Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM0.....	204
<b>Figure 79:</b> Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM1 .....	204

<b>Figure 80</b> : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM2 .....	205
<b>Figure 81</b> : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM3 .....	205
<b>Figure 82</b> : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM4 .....	206
<b>Figure 83</b> : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM5 .....	206
<b>Figure 84</b> : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM7 .....	207

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Système de score de l'EGIL pour les Leucémies aiguës .....	34
<b>Tableau 2:</b> Principaux marqueurs exprimés dans les sous-types de LAM selon la classification FAB. ....	36
<b>Tableau 3:</b> Représentation synthétique de la correspondance morphologique OMS 2008 et FAB .....	38
<b>Tableau 4 :</b> Système de cotation des LAL1 et LAL 2 selon les critères morphologiques de la classification FAB .....	40
<b>Tableau 5:</b> Description cytomorphologique des LAL selon FAB .....	41
<b>Tableau 6:</b> Classification immunophénotypique des LAL B selon EGIL. ....	43
<b>Tableau 7:</b> Classification immunophénotypiques des LALT selon EGIL.....	43
<b>Tableau 8:</b> Les critères d'assignation de lignée pour le diagnostic des MPAL selon l'OMS 2008 révisé en 2016 .....	47
<b>Tableau 9:</b> Les marqueurs les plus spécifiques pour déterminer l'appartenance d'une cellule a une lignée cellulaire selon EGIL. ....	58
<b>Tableau 10:</b> Contrôle des compensations .....	104
<b>Tableau 11:</b> Panel d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic et la classification des LA par CMF à 4 couleurs .....	105
<b>Tableau 12 :</b> Echelle de Landis et Koch 1977.....	113
<b>Tableau 13:</b> Répartition des LA selon les tranches d'âges .....	115
<b>Tableau 14:</b> Répartition des patients LAM selon les tranches d'âge.....	117
<b>Tableau 15:</b> Caractéristiques cliniques des LAM .....	118
<b>Tableau 16:</b> Circonstances de découverte des LAM.....	120
<b>Tableau 17:</b> Données de la numération des globules blancs, plaquettes et d'hémoglobine dans les LAM.....	121
<b>Tableau 18:</b> Caractéristiques hémato biologiques des LAM .....	122
<b>Tableau 19:</b> Classification cytologique des LAM selon les critères du groupe FAB. ....	123
<b>Tableau 20 :</b> Fréquence de positivité des anticorps monoclonaux testés avec les cellules myéloblastiques.....	124
<b>Tableau 21:</b> Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAM .....	127
<b>Tableau 22:</b> Diagnostic final des cas discordants .....	128
<b>Tableau 23:</b> Caractéristiques cliniques et biologiques des LA biphénotypiques.....	130
<b>Tableau 24:</b> Caractéristiques immunophénotypiques des LA biphénotypiques .....	130

<b>Tableau 25:</b> Fréquence des LAL selon les tranches d'âges .....	131
<b>Tableau 26:</b> Fréquence des sous types immunologiques des LAL .....	132
<b>Tableau 27:</b> LAL de l'adulte - Corrélation entre le phénotype des LAL et les caractéristiques cliniques.....	134
<b>Tableau 28:</b> Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LAL B .....	137
<b>Tableau 29:</b> Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LALT.....	138
<b>Tableau 30:</b> Expression d'antigènes aberrants selon la classification immunologique des LAL T et B .....	140
<b>Tableau 31:</b> Fréquence des facteurs pronostiques liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL .....	142
<b>Tableau 32:</b> Survie globale en fonction du type de la LA.....	142
<b>Tableau 33:</b> Survie globale en fonction du type immunologique des LAL .....	143
<b>Tableau 34:</b> Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAM .....	145
<b>Tableau 35:</b> Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAL.....	147
<b>Tableau 36:</b> LAM adultes - Survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface .....	150
<b>Tableau 37:</b> LAM adultes- Statistiques et délais moyens de survie en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.....	151
<b>Tableau 38:</b> LAM adultes- Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag aberrants .....	153
<b>Tableau 39:</b> LALT de l'adulte- Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.....	155
<b>Tableau 40:</b> LAL T adultes - Délai moyen et taux de survie en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface .....	156
<b>Tableau 41:</b> Répartition des leucémies aiguës selon les tranches d'âges.....	161
<b>Tableau 42:</b> Fréquence des LAL selon les tranches d'âge.....	163
<b>Tableau 43:</b> Fréquence des sous types immunologiques des LAL B et T.....	165
<b>Tableau 44 :</b> LAL de l'enfant - Corrélation entre le phénotype des LAL et les caractéristiques cliniques positifs.....	165
<b>Tableau 45:</b> Statistiques des cas de LAL B .....	166
<b>Tableau 46:</b> Statistiques des cas de LAL T.....	167
<b>Tableau 47:</b> Circonstances de découvertes des LALB .....	168

<b>Tableau 48:</b> Circonstances de découvertes des LALT.....	169
<b>Tableau 49:</b> Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LAL B.....	169
<b>Tableau 50:</b> Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LALT.....	170
<b>Tableau 51:</b> LAM de l'enfant et tranches d'âge.....	172
<b>Tableau 52 :</b> Caractéristiques cliniques des LAM.....	173
<b>Tableau 53 :</b> Circonstances de découverte des LAM.....	174
<b>Tableau 54:</b> Statistiques des données hémato biologique des LAM.....	174
<b>Tableau 55:</b> Caractéristiques hémato biologiques des LAM.....	175
<b>Tableau 56:</b> Classification cytologique des LAM selon les critères du groupe FAB.....	176
<b>Tableau 57:</b> Fréquence de positivité des anticorps monoclonaux testés avec les cellules myéloblastiques.....	177
<b>Tableau 58:</b> Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAM.....	179
<b>Tableau 59 :</b> Diagnostic final des cas discordants.....	179
<b>Tableau 60 :</b> Caractéristiques cliniques et biologiques des LA biphénotypiques.....	180
<b>Tableau 61:</b> Caractéristiques immunophénotypiques des LA biphénotypiques.....	180
<b>Tableau 62:</b> Fréquence des facteurs pronostique liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL.....	181
<b>Tableau 63:</b> Survie globale en fonction du type de la LA.....	181
<b>Tableau 64:</b> Survie globale en fonction du type immunologique des LAL.....	182
<b>Tableau 65 :</b> Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAL.....	183
<b>Tableau 66:</b> Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAM.....	188
<b>Tableau 67:</b> LAL T de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.....	190
<b>Tableau 68:</b> LAL T enfants – Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.....	191
<b>Tableau 69:</b> LAL B de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmiques.....	193
<b>Tableau 70 :</b> LAL B de l'enfant – Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmiques.....	194
<b>Tableau 71:</b> Survie globale des LALB de l'enfant avec expression des antigènes myéloïdes associées (LALB/My+) et sans expression d'antigènes myéloïdes(LAL B /My-). .....	196

<b>Tableau 72:</b> LAM de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.....	196
<b>Tableau 73 :</b> LAM enfants- Délai moyen de survie globale en fonction l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface .....	197
<b>Tableau 74:</b> Répartition des sous type de LAM selon FAB.....	200
<b>Tableau 75:</b> Equilibre leucocytaire sur frottis de sang périphérique selon les sous types de LAM .....	201
<b>Tableau 76:</b> Fréquence des éléments médullaires selon les sous types de LAM.....	201
<b>Tableau 77:</b> Classification finale des sous types de LAM après immunophénotypage...	203
<b>Tableau 78:</b> Tableau croisé entre la classification cytomorphologique du FAB et immunophénotypique des LAM.....	207
<b>Tableau 79:</b> Taux de concordance entre l'immunophénotypage et la classification cytologique FAB des sous types de LAM.....	208
<b>Tableau 80:</b> Comparaison des résultats de la classification des sous type de LAM : FAB versus immunophénotypage .....	209
<b>Tableau 81:</b> Tableaux croisés : cytologie FAB versus immunophénotypage pour le typage des LAB .....	209

## Abréviations

<b>ABL</b>	Abelson
<b>Ac M</b>	Anticorps Monoclonaux
<b>ADP</b>	Adénopathies
<b>AFC</b>	Association Française de Cytométrie
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>APC</b>	AlloPhyco Cyanine
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>ATRA</b>	All-Trans Retinoic Acid
<b>LAI</b>	LA indifférenciée
<b>BCR</b>	Break point Cluster Région
<b>cyt</b>	cytoplasmique ou intracytoplasmique
<b>CBF <math>\alpha</math></b>	Core Binding Factor Alpha
<b>CBF <math>\beta</math></b>	Core Binding Factor Beta
<b>CCS</b>	Clinical <i>Cytometry</i> Society : Société Clinique de Cytométrie
<b>CCMH</b>	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
<b>CD</b>	Cluster de Différenciation
<b>CEBPA</b>	CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha
<b>CFU-G</b>	Colony Forming Unit of Granulocyt
<b>CFU-M</b>	Colony Forming Unit of Monocyt
<b>CFU-GEMM</b>	Colony Forming Unit of Granulocyt, Erythroid, Monocyt and megacaryocyt
<b>CMF</b>	Cytométrie en Flux
<b>CHU</b>	Centre Hospitalo Universitaire
<b>CIVD</b>	Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
<b>CSH</b>	Cellule Souche Hématopoïétique
<b>Cy5</b>	Cyanine 5
<b>EBP<math>\alpha</math></b>	Enhancer-Binding Protein alpha
<b>ECD</b>	R- Phycoérythrine Texas Red - X
<b>EDTA</b>	Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
<b>EGIL</b>	European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
<b>EBV</b>	Epstein Barr Virus
<b>ELAMO</b>	European Organization for the Treatment of AML: Organisation européenne pour le traitement des LAM
<b>ELN</b>	European Leukemia Net
<b>EORTC</b>	European Organization for Research and Treatment of Cancer : Organisation Européenne pour la recherche et le traitement du cancer
<b>Epo</b>	Erythropoïétine
<b>F</b>	Femme
<b>FAB</b>	Franch-Américan- British
<b>FCS</b>	Flow Cytometry Software
<b>FITC</b>	Fluorescéine de l'isothiocyanate
<b>FLT3</b>	FMS-like Tyrosine Kinase 3
<b>FSC</b>	Forward Scatter cell (Taille cellulaire)

<b>ESCCA</b>	European Society of Clinical Cytometry: Société Européenne de Cytométrie Clinique
<b>FSH</b>	Facteurs stimulants l'hématopoïèse
<b>FT</b>	Facteurs de Transcription
<b>G/L</b>	Giga par Litre
<b>g/dl</b>	gramme par décilitre
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>GB</b>	Globules blanc
<b>GGT</b>	Gamma Glutamyl Transpeptidase
<b>GR</b>	Globule Rouge
<b>G</b>	Garçon
<b>H</b>	Homme
<b>Hab</b>	Habitants
<b>Hb</b>	Hémoglobine
<b>H2O2</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HCV</b>	Hépatite C Virus
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HPMG</b>	Hépatomégalie
<b>HTLV-1</b>	Virus T-Lymphotrope Humain 1
<b>IC</b>	Intervalle de Confiance
<b>IP</b>	Immunophénotypage
<b>IL-3</b>	Interleukine 3
<b>IL-5</b>	Interleukine 5
<b>inv</b>	inversion
<b>LA</b>	Leucémie Aigue
<b>LAB</b>	Leucémie Aigue Biphénotypique
<b>LAL</b>	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
<b>LAM</b>	Leucémie Aiguë Myéloïde
<b>LAMDC</b>	Leucémie aigue myéloïde difficile à classer
<b>LCR</b>	Liquide Céphalorachidien
<b>LDH</b>	Lactate Déshydrogénase
<b>Ly</b>	Lymphocyte
<b>LpDC</b>	Leucémie Plasmacytoïde à Cellules Dendritiques
<b>ISAC</b>	International Society of Analysis and Cytology : Société Internationale d'analyse et de cytologie
<b>M-CSF</b>	Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>MIP 1</b>	Macrophage Inflammatory Protein 1
<b>MLL</b>	Mixed-Lineage Leukemia
<b>mm<sup>3</sup></b>	Millimeter cube
<b>MGG</b>	May Grunwald Giemsa
<b>MO</b>	Moelle Osseuse
<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>MIF</b>	Intensité Moyenne de Fluorescence
<b>Mo</b>	Monocyte
<b>MPAL</b>	Mixed-Phenotype Acute Leukemia : Leucémie Aigue à Phénotype Mixte
<b>MDRI</b>	Multi Drug Resistance I
<b>MRD</b>	Maladie Résiduelle
<b>NPM 1</b>	Nucleophosmine 1

<b>NFS</b>	Numération Formule Sanguine
<b>NS</b>	Noir Soudan
<b>NASDA</b>	Naphtol ASD Acétate
<b>NaF</b>	Fluorure de Sodium
<b>NK</b>	Naturel Killer
<b>NT</b>	Non Testé
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de Santé
<b>OS</b>	Overall Survival : survie globale
<b>PBS</b>	Phosphate Bis Sulphate
<b>PC5</b>	R- Phycoerythrine Cyanine 5
<b>PE</b>	R-Phycoérythrine
<b>PML</b>	Pro Myelocytic Leukemia
<b>PNN</b>	Polynucléaire Neutrophile
<b>PPR</b>	Poor Prednisone Responder
<b>P-gp</b>	P-glycoprotéine
<b>RAA</b>	Rhumatisme Articulaires Aiguë
<b>RARA</b>	Récepteur Alpha de l'Acide Rétinoïque
<b>RBC</b>	Red Blood Cell ou Globules rouges
<b>RC</b>	Rémission Complète
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>RUNX1</b>	Runtrelated transcription factor 1
<b>RQ-PCR</b>	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>s</b>	surface
<b>SCL</b>	Stem Cell Leukemia
<b>SG</b>	Survie Globale
<b>sIg</b>	Immunoglobuline de surface
<b>sIgM</b>	Immunoglobuline M de surface
<b>SPMG</b>	Splénomégalie
<b>t</b>	translocation
<b>T/L</b>	Tera par Litre
<b>TCA</b>	Temps de Céphaline Activée
<b>TCL1</b>	T-cell leukemia
<b>TCMH</b>	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
<b>TC</b>	T cell receptor
<b>TdT</b>	Terminal Desoxyribonucleotidyl Transferase
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TP</b>	Taux de Prothrombine
<b>Tpo</b>	Thrombopoïétine
<b>TQ</b>	Temps de Quick
<b>TX Red</b>	Texas Red
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelium Growth Factor
<b>VGM</b>	Volume Globulaire Moyen
<b>VIH</b>	<i>Human Immuno Deficiency Virus</i>
<b>VN</b>	Valeur Normal
<b>VS</b>	Versus
<b>WT-1</b>	Wilms' Tumor gene 1

# **Introduction**

## Introduction

---

Les leucémies aiguës (LA) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par une prolifération clonale et incontrôlée dans la moelle osseuse (MO) de précurseurs hématopoïétiques immatures bloqués à un stade précoce de différenciation et ayant ainsi perdu toute capacité de maturation terminale. Ces cellules immatures, nommées blastes, peuvent être présentes dans le sang périphérique [1].

Les leucémies aiguës sont des affections rares. Elles représentent entre 10 et 15% des hémopathies malignes avec un taux d'incidence standardisé à la population mondiale inférieur à 6/100 000 habitants (hab)/an [2]. En Algérie les différentes approches épidémiologiques effectuées entre 1994 et 2010 placent les LA de l'adulte au premier rang des hémopathies malignes avec une incidence de 1.28 /100.000 /hab en 2010 [3].

On distingue selon l'origine du précurseur impliqué deux grands types : les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), dont la fréquence augmente avec l'âge et les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) qui est le cancer le plus fréquent chez les enfants et représente environ un quart de tous les cancers chez les sujets de moins de 15 ans [1, 2].

Le diagnostic d'une leucémie aiguë est évoqué lors de la mise en évidence de cellules blastiques à l'examen morphologique d'un frottis de sang ou de moelle, dans un contexte d'hyperleucocytose ou au contraire de cytopénie périphérique, avec ou sans syndrome tumoral ou autres manifestations cliniques évocatrices.

Pour parler de leucémie aiguë (LA), le taux requis de blastes dans la moelle osseuse est de 20% selon les recommandations de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2001) [4]. La nouvelle définition de l'OMS (2008) des LA n'est pas seulement médullaire, la présence de 20% ou plus de blastes circulants fait également partie des critères du diagnostic des LA.

Le diagnostic de LAL ou LAM est fait sur des critères cytologiques et immunologiques des blastes de la moelle osseuse [1, 5]. L'apport de l'immunophénotypage puis de la cytogénétique et enfin de la biologie moléculaire ont permis de décrire de plus en plus d'entités [1, 5]. Etant donné que ces méthodes spécifiques sont coûteuses et non disponibles dans nos centres hospitaliers, la cytologie garde sa place dans le diagnostic de LA [6].

## Introduction

---

Cependant, depuis quelques années, l'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) des cellules blastiques est devenu un examen biologique incontournable dans le diagnostic et la classification de la LA. Il permet d'affiner ou même de modifier le résultat de l'étude morphologique [7, 8, 9]. De plus, la CMF reste le seul examen qui permet, d'une part de classer les LAL selon leur phénotype B ou T et d'autre part de mettre en évidence des entités rares de LA dite de lignée ambiguë [10, 11]. C'est la technique de choix pour confirmer la lignée hématopoïétique en cause, d'identifier le stade de maturation des blastes, de caractériser des marqueurs pronostiques (HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD117) [12, 13] ou des cibles thérapeutiques et de préciser les anomalies utiles ultérieurement pour le suivi de la maladie [14].

L'introduction de l'immunophénotypage des LA par CMF en 2013 était une première au CHU de Tizi Ouzou. Son utilisation en pratique courante constitue un des examens clés dans la classification des leucémies aiguës. Cela, nous a permis dans notre étude de déterminer le profil immunophénotypique des cas de LAL et LAM nouvellement diagnostiqués dans la région de Tizi Ouzou chez l'enfant et l'adulte, d'évaluer la fréquence des marqueurs aberrants et de corréler certaines expressions antigéniques au pronostic des patients.

Cette étude devrait aboutir à un diagnostic et à une classification plus précise des LA, nous permettre de reconnaître les formes de bon et de mauvais pronostic selon les expressions antigéniques et de comparer nos résultats aux données de la littérature.

**Partie 1**

**Revue**

**Bibliographique**

# I

## **Généralités sur la leucémie aigue**

## I.1. Historique

**1827** l'anatomiste français Alfred **DONNE (1795 – 1867)** a publié un premier cas de leucémie à la suite de l'examen du cadavre d'un homme âgé de 63 ans décédé suite à une maladie qui a duré 2 ans.

**1845 BENNET** (Ecoissais) a publié deux cas associant adénopathies, splénomégalie avec présence de « **pus** » dans le sang, et pour désigner la maladie il proposa le nom de « **leucocytémie** ».

**1821 – 1902 Virchow** (Allemand) a proposé le nom de « leucémie » devant un tableau d'adénopathies et de splénomégalie et conclue en **1856** que la maladie était due à un excès de production de globules blancs [15].

**1869 Ernst Neumann** découvre la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse ce qui a conduit au concept de leucémie myélogène et à une classification en trois formes: myélogène pure, splénique ou lymphatique.

**1889, Wilhelm Epstein** a différencié la « leucémie aiguë » de la leucémie chronique.

**1898, Otto Naegeli** a identifié les « myéloblastes » qu'il a distingués des «lymphocytes » et a décrits la « leucémie myéloblastique » une entité qui se substituait naturellement au diagnostic du mélange de deux leucémies.

**1976,** Un groupe de travail constitué de chercheurs Franco-Américano-britanniques propose la classification dite « **FAB** », fondée sur l'examen cytomorphologique et cytochimique des frottis médullaires, et qui a permis de dissocier les leucémies myéloïdes des leucémies non myéloïdes « Lymphoblastiques » [16].

**1995,** L'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias La classification (EGIL) propose la classification immunophénotypique qui a permis de standardiser les critères de définition d'une leucémie myéloïde, lymphoïde de lignée T ou B et biphénotypique[17].

**2001,** l'**OMS** a proposé une classification qui a regroupé les critères de la classification FAB et EGIL en ajoutant des données cytogénétiques et moléculaires [4]. Cette

classification a été modifiée en 2008 et en 2016 donnant lieu à la classification **OMS de 2008 et de 2016 des LA** [1, 18].

## **I.2. Définition**

Les leucémies aiguës (LA) constituent un groupe d'hémopathies malignes, caractérisées par l'accumulation d'un grand nombre de précurseurs médullaires clonaux (blastes) des lignées sanguines avec blocage de différenciation. Les précurseurs concernés par la transformation maligne peuvent être lymphoïdes [leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)] ou myéloïdes [leucémies aiguës myéloïdes (LAM)]. Les cellules blastiques sont retrouvées dans la moelle, le sang et parfois d'autres tissus. En parallèle, il existe un déficit de production de cellules sanguines matures aboutissant à des cytopénies et à des conséquences cliniques. [19]

## **I.3. Incidence et survie des leucémies aiguës**

### **I.3.1. Leucémie Aigüe Myéloblastique (LAM)**

La LAM est une expansion clonale de blastes myéloïdes. Elle est plus fréquente que la LAL (70% des cas de LA sont myéloïdes) et qui touche surtout les adultes. Elle représente 75 % à 80 % des cas de LA chez l'adulte et de 15% à 20 % chez l'enfant [20].

#### **I.3.1.1. Incidence**

En Europe, selon une étude réalisée dans 27 pays européens sur 162 millions d'habitants a estimé à 18 376 le nombre de nouveaux cas de LAM diagnostiqués en 2008 avec un taux d'incidence brute de 3,69/100 000 hab/an [21]. Aux Etats Unis, le taux d'incidence est de 4,06 en 2011 (4,08 chez l'homme et 3,4 chez la femme). [22].

En Algérie, les LAM sont les plus fréquentes chez l'adulte. Le récent rapport du groupe Algérien de travail sur les LAM portant sur une période de 7ans (2011-2017), montre que l'incidence annuelle globale des LAM chez les patients de plus de 15 ans est de 1.2/100 000 hab/an (1.2 chez l'homme et 1.07 chez la femme). Le sex ratio est de 1.1, l'âge médian au diagnostic est de 46.5 ans (16-92 ans). [23].

#### **I.3.1.2. La survie**

En Europe, la survie des LAM est voisine de 15 % [3, 24]. Alors que la survie relative à 5 ans des Leucémies Aigües Promyélocyaires (LAP) ou LAM.M3 est de 62 %.

Cependant, aux Etats Unis, la survie à 5 ans des LAM est toutefois légèrement meilleure elle est de 25 % [25].

En Algérie, selon l'étude régionale multicentrique à l'ouest Algérien [26] sur la période allant de 2007 à 2017, la survie globale (SG) à 2 ans des patients atteints de LAM (LAM.M3 exclue) à la phase d'induction et âgés entre 16 et 60 ans est de 40% avec une RC à 69% et un taux de décès à 12 % .

### **I.3.2. Leucémie Aigue Lymphoblastique (LAL)**

Les LAL sont des proliférations malignes clonales aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de cellules immatures de la lignée lymphoïde, bloquées au stade lymphoblastique [15].

#### **I.3.2.1. Incidence**

La leucémie aigue lymphoblastique se rencontre plus fréquemment chez l'enfant. Elle représente 40% des cancers de l'enfant, 80% des leucémies aigues de l'enfant et 20% des LA de l'adulte [22,27]. En Europe, le taux d'incidence brut des LAL (1998-2002) est de 1,45/100 000 h/an [28]. Sur la période la plus récente, il n'est que de 1,28 (2000-2002) [29]. Aux Etats Unis, le taux d'incidence entre 2000 et 2011 est 1,6/100 000 h/an, ce qui montre la grande homogénéité dans les pays occidentaux [25]. La prédominance masculine est retrouvée partout. Cependant, en Algérie d'après les derniers résultats de l'enquête nationale du groupe Algérien d'étude des LAL sur une période de 4 ans (2010-2013), l'incidence de la maladie chez les patients de plus de 18 ans est de 0.47/100000 hab. L'âge médian au diagnostic est de 31 ans (18-87 ans) [30]. Dans une étude multicentrique sur la population pédiatrique en Algérie en 2012 et sur une période de 10 ans, on retrouve un pic de LAL vers l'âge de 2 à 5 ans [31].

#### **I.3.2.2. La survie**

En Europe, à 5 ans, la survie nette des LAL est de 41 % [32]. De même, aux Etats Unis la survie nette est sensiblement identique, plus de 32 % [25]. Il est à savoir que la survie dans ces pathologies est extrêmement variable selon l'âge : elle est de très bonne chez l'enfant où elle est de 90 % , de 67 % chez les adolescents et jeunes adultes (15-24 ans) alors qu'elle est de 30 % entre 45 et 55 ans et tombe à 16 % au-delà de 75 ans [33]. La survie est aussi dépendante du type de LAL, ainsi une étude américaine montre que la survie à 5 ans des LAL B est meilleure que celle des LAL T, quel que soit l'âge [34].

En Algérie, selon une étude nationale multicentrique de 2015, sur l'évaluation du protocole LINKER dans les LAL de l'adulte, la rémission complète (RC) a été obtenue chez 174/251 patients (63.3%), la survie globale est de 34.4% à 5 ans pour une médiane de survie de 17 mois (13 – 21 mois). Une différence significative a été retrouvée dans la SG à 5 ans selon l'âge : < 30 ans 42% (33% – 51 %) ; entre 30 et 45 ans 25% (13% – 36 %) et > 45 ans 19.6% (6% – 33.5%),  $P < 0.0001$  [35].

### **I.3.3. Leucémies aiguës de lignée ambiguë**

Les données épidémiologiques concernant les leucémies aiguës de lignée ambiguë sont rares. Les LA biphénotypiques sont estimées entre 3 à 4 % des LA. Elles sont observées aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant [36, 37].

## **I.4. Physiopathologie**

### **I.4.1. Leucémogénèse : concepts généraux**

La leucémogénèse est l'ensemble des mécanismes responsables d'une prolifération cellulaire avec blocage de la maturation. Le processus leucémique est donc l'apparition d'un clone cellulaire provenant d'une cellule immature à un moment quelconque de sa différenciation. Le type de leucémie aiguë est ainsi déterminé par l'origine de la lignée cellulaire dont provient le clone et par le degré de différenciation atteint au moment de la transformation maligne [38, 39]. Ces cellules malignes envahissent la moelle osseuse et peuvent passer dans le sang. Elles sont bloquées dans leur différenciation, à la différence des clones cellulaires des syndromes myéloprolifératifs et des syndromes myélodysplasiques, et ne peuvent aboutir à une hématopoïèse normale et efficace. Parallèlement, la diminution de l'hématopoïèse résiduelle définit l'insuffisance médullaire et les cytopénies périphériques.

### **I.4.2. Processus de leucémogénèse**

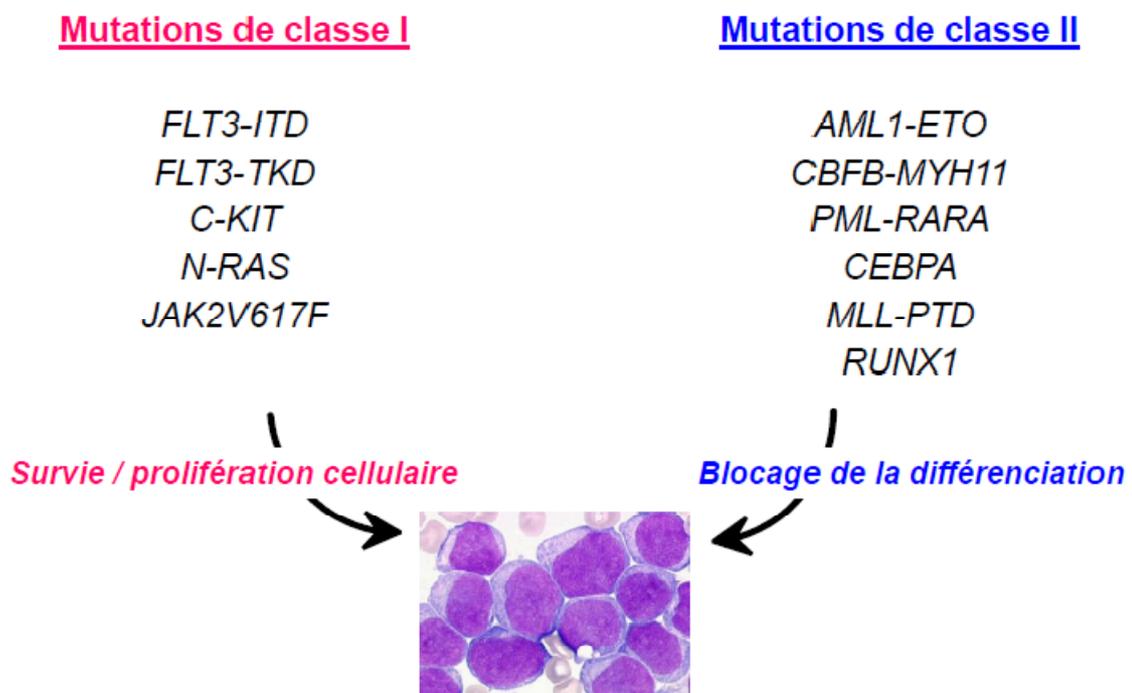
Actuellement, les processus de leucémogénèse mis en jeu restent incertains mais l'implication d'une cellule souche leucémique présentant une capacité d'auto renouvellement ou d'un progéniteur ayant acquis cette capacité par l'accumulation de mutations génétiques, restent des modèles de référence [40, 41]. Selon l'hypothèse du «Two-hit model» de Gilliland et Griffin [42], les événements oncogéniques clés qui vont conduire au processus leucémique essentiellement lors d'une LAM, sont divisés en deux classes d'anomalies génétiques :

- Mutations de classe I conférant un avantage prolifératif et/ou une résistance à l'apoptose du clone malin. Les gènes mutés dans cette catégorie, sont des acteurs clés des

voies de signalisation intracellulaire (récepteurs de tyrosine kinase *FLT3*, *RAS*, *c-KIT*). Ces anomalies ont conduit à la mise en évidence d'anomalies de la transduction du signal intracellulaire des cellules leucémiques.

- Mutations de classe II induisant un blocage de différenciation cellulaire impliquant principalement des facteurs de transcription, mutés ou le plus souvent impliqués dans des translocations chromosomiques récurrentes (*AML1-ETO*, *PML-RARa...*) [43, 41].

Les évènements oncogéniques clés qui conduisent à la leucémie aigue sont résumés dans la **figure 1** :



**Figure 1:** L'hypothèse du « Two-Hit Model » et la leucémogénèse selon Gilliland et Griffin [42].

Ces mutations génétiques sont souvent insuffisantes à elles seules pour induire une leucémie aiguë. Dans la plupart des cas, de nombreux facteurs variés peuvent être mis en cause dans la survenue d'une leucémie aiguë.

### **I.5. Classification des leucémies aiguës**

De nombreuses classifications ont été proposées par des groupes de travail pour affiner le diagnostic :

- La classification morphologique et cytochimique, tel que proposé par le groupe (FAB) en 1976 [2] (LAL : LAL1 à 3 et LAM : LAM0 à LAM6).
- La classification du groupe de travail MIC (Morphologie, Immunophénotypage, Cytogénétique) en 1986 et en 1991, associant à l'étude morphologique des LA, l'étude immunophénotypique et cytogénétiques pour une meilleur précision dans le typage de la LA (*typage LAM0 et LAM7*) [42].
- La classification EGIL proposée par European Group for the Immunological Characterization of Leukemias en 1995[17], basée sur l'étude immunophénotypique seul.
- La classification OMS en 2001 [4] qui a regroupé les critères de la classification FAB et EGIL en ajoutant des données cytogénétiques et moléculaires. Cette classification à été modifiée en 2008 donnant lieu à la classification OMS 2008 des LA.
- L'édition 2016 de la classification des tumeurs hématologiques, il s'agit d'une révision de la classification OMS 2008 plutôt qu'une nouvelle classification, et son but est d'intégrer les informations récentes concernant la clinique, le pronostic, la morphologie, l'immunophénotypage et la génétique [1, 19].

### **I.5.1. Classification des LAM**

#### **I.5.1.1. Selon la classification cytologique FRENCH AMERICAN BRITISH (FAB)**

L'étude cytologique est fondée sur l'aspect morphologique des blastes sur les frottis médullaires colorés et sur les résultats des colorations cytochimiques qui sont indispensables pour documenter l'origine myéloïde de la prolifération blastique. Il s'agit de la réaction des myéloperoxydases (MPO) ou du Noir Soudan (NS) et des estérases spécifiques monocytaires utilisant le : Naphtol-ASD-Acétate (NASDA) comme substrat [16].

Le diagnostic de leucémie aigue myéloïde est porté lorsque le pourcentage de blastes médullaires est supérieur ou égale à 30% des cellules nucléés. Ce taux a été modifié à 20% suite à la classification OMS 2001.

La classification FAB 1976 [16] a divisé les LAM en 6 catégories de M1 à M6, selon leur différenciation cytologique vers une lignée ou plusieurs lignées et le degré de maturation des cellules. La classification FAB des LAM a été revue par le groupe de travail MIC (Morphologie, Immunophénotypage, Cytogénétique) en 1986 et en 1991, associant à

l'étude morphologique des LA, l'étude immunophénotypique et cytogénétique [44]. Ainsi, deux types de LAM ont été confirmés : LAM à différenciation minimale (LAM0) et la LAM mégacaryoblastique (LAM7). Leurs caractéristiques font appel à des techniques complémentaires telles que l'immunophénotypage et éventuellement l'étude ultra structurale avec cytochimie [45, 46, 47].

- **Leucémie aiguë myéloïde peu différenciée (LAM0)**

Elle représente 5% des cas de LAM et survient le plus souvent chez l'adulte. C'est une LA sans signe morphologique de différenciation myéloïde (absence de granulations ou de corps d'Auer) ou cytochimique (peroxydases négatives). La nature myéloïde des blastes est démontrée par l'étude immunophénotypique, avec expression de marqueurs myéloïdes sans expression de marqueurs lymphoïdes. Le taux de blastes médullaires est supérieur à 90 % des cellules nucléées [48, 49].

- **Leucémie aiguë myéloïde sans maturation (LAM1)**

Plus de 90 % des cellules de la moelle sont des blastes. La maturation granuleuse (promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes ou neutrophiles) représente moins de 10 %. Elle représente 10% des cas de LAM. Les signes d'insuffisance médullaire dominent le tableau clinique, le taux de blastes circulants est très variable. La blastose médullaire est élevée ( $\geq 90\%$  des cellules non érythroblastiques), sans évidence de maturation myéloïde ( $< 10\%$ ) à partir du promyélocyte et au-delà. Les blastes ont souvent des granulations cytoplasmiques ou des corps d'Auer. Dans les formes plus indifférenciées, la mise en évidence de la myéloperoxydase (MPO) (par cytochimie ou par cytométrie de flux) permet d'affirmer la nature myéloïde des blastes [49].

- **Leucémie aiguë myéloïde avec maturation (LAM2)**

Elle représente de 30% à 40% des LAM et survient à tous les âges. Elle est caractérisée par une blastose supérieure ou égale à 20% associée à une maturation granuleuse ( $> 10\%$ ) montrant à des degrés divers des signes de dysplasie. La monocytose peut être présente, mais elle est modérée ( $< 20\%$ ). Les érythroblastes et les mégacaryocytes sont peu dystrophiques [16, 49].

- **Leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3)**

Plus de 20% des cellules nucléées de la moelle sont des promyélocytes morphologiquement anormaux. Ils présentent de nombreuses granulations volumineuses et atypiques, de teinte variant du rouge clair au rouge pourpre, cachant parfois les contours nucléaires. Par ailleurs, quelques blastes peuvent contenir plusieurs bâtonnets d'Auer. Certaines cellules sont appelées cellules en oursin par le regroupement de corps d'Auer en fagots (voir figure 8). Les peroxydases sont intensément positives.

Ce sous-type de LAM a pour autre caractéristique d'être presque constamment associé à un syndrome de défibrination et constitue de ce fait une urgence diagnostique [50].

A côté de la forme classique il existe une forme "variante" ou LAM3v, dont les blastes sont soit dépourvus de granulation, soit présentant quelques fins grains azurophiles.

Les blastes peuvent prendre des aspects monocytoïdes voire bilobés, multilobés ou réniformes. Cette forme microgranulaire contient de très rares cellules avec fagots de corps d'Auer. Ce variant est souvent hyperleucocytaire [16].

- **Leucémie aiguë myélomonocytaire (LAM4)**

Elle représente de 15% à 25% des cas de LAM, et survient chez l'adulte et l'enfant. C'est une prolifération des lignées granuleuse et monocytaire avec une blastose supérieure ou égale à 20% (blastes, myéloblastes et monoblastes). La composante monocytaire (monocytes et précurseurs monocytaires) doit être supérieure ou égale à 20 % [49 ; 16].

Il existe une variante LAM4 appelée la LAM4 à éosinophiles (LAM4eo), présente dans la moelle, un excès d'éosinophiles anormaux supérieur à 5% : présence de grosses granulations violettes atypiques dispersées dans le cytoplasme au niveau des précurseurs avec anomalies de segmentation et de condensation chromatinienne dans les granulocytes.

Ces LAM 4 avec éosinophiles anormaux sont associées à une anomalie chromosomique typique, l'inversion du chromosome 16 (p13;q22) (p13;q22) ou son équivalent, la translocation t (16;16) (p13;q22) souvent de bon pronostic [51].

- **Leucémie aiguë monoblastique et monocytaire (LAM5 a et b)**

Les LAM impliquant la lignée monocytaire représentent de 8% à 15% des cas de LAM. La prolifération de cellules monocytaires (supérieure ou égale à 80 %) est composée

de monoblastes, promonocytes et monocytes. Une composante granuleuse minoritaire peut être présente. Les LA monoblastiques et monocytaires se distinguent par les proportions relatives dans la moelle des monocytes, majoritaires dans la forme différenciée monocyttaire (M5b), et des monoblastes, exclusivement présents dans la forme indifférenciée monoblastique (M5a) (voir figure 9). Dans cette forme, lorsque le diagnostic morphologique est incertain, la réaction cytochimique des estérases et surtout l'étude des marqueurs cellulaires par cytométrie de flux permettent d'affirmer le diagnostic [49].

La distinction de ces deux formes a peu d'intérêt pour le clinicien car le pronostic est identique.

La MPO est faiblement positive en nombreux grains fins dispersés ou négative, et les estérases monocytaires spécifiques sont positives et inhibées par le fluorure de sodium (NaF) [52].

#### **- Leucémie aiguë érythroïde (LAM 6)**

C'est une prolifération qui implique la lignée érythroblastique.

On en distingue deux types :

- L'érythroleucémie (LAM6): définie par la présence dans la moelle osseuse de plus de 50% des précurseurs érythroïdes de l'ensemble des cellules médullaires, et de plus de 20% de myéloblastes de l'ensemble des cellules médullaires non érythrocytaires.

- Leucémie érythroïde pure: elle présente une prolifération néoplasique faite de plus de 80% de cellules érythrocytaires sans présence évidente du contingent myéloblastique [49].

L'érythroleucémie est une maladie rare, elle représente 3 à 4% des cas de leucémies aiguës myéloïdes et est prédominante chez le sujet âgé. Quant à la leucémie érythroïde pure, elle est exceptionnelle et peut concerner tous les âges y compris les enfants [53].

Le diagnostic différentiel entre M6 et syndrome myélodysplasique se pose lorsque le taux d'érythroblastés médullaires est supérieur à 50 % :

- Si le taux de blastés est supérieur ou égale à 20 % des cellules non érythroblastiques, il s'agit d'une M6 ;

- Si le taux de blastés est inférieur à 20 % des cellules non érythroblastiques, il s'agit d'un syndrome myélodysplasique [16].

- **Leucémie aiguë mégacaryoblastique (LAM7)**

Elle représente de 3% à 5% des cas de LAM et survient chez l'enfant et l'adulte. C'est une prolifération qui comprend 50% ou plus de blastes de la lignée mégacaryocytaire [49].

Les mégacaryoblastes présentent un noyau ovale, nucléolé, à cytoplasme basophile avec souvent des expansions cytoplasmiques très évocatrices de la lignée (voir figure 10).

Ces blastes sont peu différenciés et négatifs pour la myéloperoxydase, ils peuvent facilement être confondus avec des lymphoblastes [16].

Cette leucémie est souvent associée à une fibrose médullaire, ce qui peut empêcher l'aspiration médullaire et donc l'étude morphologique rendant le diagnostic encore plus difficile.

**I.5.1.2. Selon la classification immunologique EGIL**

Si la classification FAB reste un examen de base pour le diagnostic des LAM, l'étude du phénotype immunologique est un complément indispensable au diagnostic. Il permet de conforter la classification en sous-groupes et d'affiner le diagnostic ou même de le modifier [54].

La classification immunologique est basée sur un système de score du groupe EGIL [11], consistant à affecter, à chaque marqueur immunologique, une valeur basée sur sa spécificité. Un score utilisé pour déterminer l'appartenance des cellules blastiques à une lignée ; ainsi il faut au moins un score de 02 dans une lignée pour affirmer l'appartenance à cette lignée.

Cette valeur va de 2 points pour les marqueurs les plus spécifiques d'une lignée à 0.5 points pour les marqueurs les moins spécifiques (voir tableau 1).

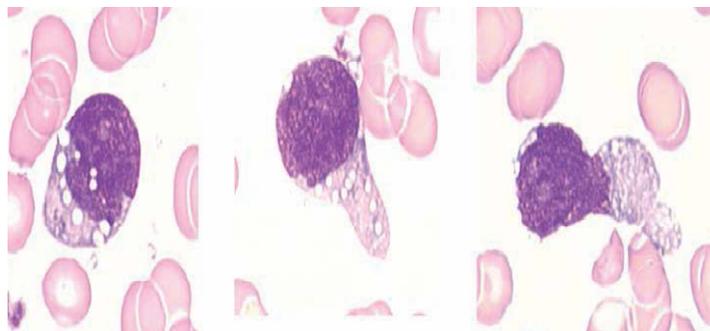
Les LAM sont définies immunologiquement par l'expression de 2 ou plus des marqueurs myélomonocytaires : anti-MPO, CD13, CD33, CD117. L'anti- MPO est le marqueur le plus spécifique de la lignée myéloïde [55].

**Tableau 1:** Système de score de l'EGIL pour les Leucémies aigues [17]

Score	Marqueurs B	Marqueurs T	Marqueurs myéloïdes
2	CD79acyt cytIgM cytCD22	CD3 TCR	Anti-MPO (lysozyme)
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CD65 CD117
0,5	TdT CD24	TdT CD1a CD7	CD14 CD15 CD64

**TdT** : Terminal Desoxyribonucleotidyl Transferase, **c**: intra cytoplasmique ; **s**: surface

A chaque sous - type de LAM, défini par le groupe FAB, correspond le plus souvent un profil immunophénotypique particulier mais pas très spécifique (voir tableau 2). Cependant, les trois sous- types de LAM : M0, M6 et M7 sont définis sans équivoque par l'immunophénotypage. Aussi, la caractérisation d'une forme rare de leucémie aiguë, la leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes, la cytologie est parfois évocatrice (voir figure 2), mais la présence des marqueurs caractéristiques des cellules dendritiques : CD4, CD56, CD123 ainsi que TCL1 sera indispensable pour confirmer le diagnostic.

**Figure 2:** Leucémie aigue à cellules blastiques dendritiques plasmacytoïdes. [56]

Blastes de taille moyenne, au noyau parfois irrégulier, à la chromatine déliée, nucléolés, avec un cytoplasme modérément basophile contenant des vacuoles, parfois disposées « en collier de perles », et parfois une expansion cytoplasmique formant un pseudopode.

**- LAM0 ou LAM indifférenciées**

La caractérisation immunologique des cellules blastiques a un intérêt majeur puisqu'il s'agit de cellules indifférenciées, peroxydase et noir soudan négatifs, et pour lesquelles l'étude cytologique et cytochimique aboutit la plupart du temps au diagnostic de LAL. La détection à la surface de ces cellules des antigènes appartenant à la lignée myéloïde (CD33 et le CD13), associées au marqueur des cellules souches, le CD34, à l'absence de marqueurs de maturité (CD15, CD16), et surtout à l'absence de marqueur de la lignée lymphoïde aboutit au diagnostic de LAM. Avant l'avènement des marqueurs immunologiques, seul la détection de la MPO au microscope électronique aurait permis le diagnostic formel.

**- LAM6 ou LAM érythroblastiques**

Les érythroblastes sont caractérisés par l'absence d'expression de CD45 et la présence membranaire due CD36, le CD71 ou récepteur pour la transferrine, qui est un marqueur de prolifération retrouvé sur n'importe quel type cellulaire, mais qui est également présent sur toute la lignée érythroblastique, et enfin, la Glycophorine A ou le CD235a, cette molécule est spécifique de la lignée érythroïde. Les stades les plus précoces expriment le CD34 et le CD117, qui disparaissent avec la perte de CD45 [16, 17].

**- LAM7 ou LAM Mégacaryoblastiques**

Le diagnostic cytologique est difficile, car les blastes sont le plus souvent indifférenciés et peroxydase négative. Les LAM7 seront affirmées par la présence d'un nombre de blastes supérieur à 20%, dont au moins la moitié appartient à la lignée mégacaryocytaire, définie par la présence de marqueurs spécifiques en cytométrie de flux CD41 (GP IIb), CD42 (Gp Ib) et CD61 (GPIIIa), associées à CD36 [16, 17].

**Tableau 2:** Principaux marqueurs exprimés dans les sous-types de LAM selon la classification FAB [17].

<b>EGIL</b>	<b>M0</b>	<b>M1/M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>MPO</b>	-	+	+	+	-/+	+	-
<b>CD2</b>	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
<b>CD4</b>	-	-	-	+/-	+/-	-	-
<b>CD7</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
<b>CD11c</b>	-	-/+	+/-	+/-	+	-	-
<b>CD13</b>	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
<b>CD14</b>	-	-	-	+/-	+/-	-	-
<b>CD15</b>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
<b>CD19</b>	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
<b>CD33</b>	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
<b>CD34</b>	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
<b>CD36</b>	-	-	-	+	+	+	+
<b>CD56</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
<b>CD61</b>	-	-	-	-	-	-	+
<b>CD64</b>	-	-	+/-	+	+	-	-
<b>CD71</b>	+	+	+	+	+	+++	+/-
<b>CD117</b>	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-
<b>Glyco A</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>HLADR</b>	++	+	-	+	+	+/-	-/+

### **I.5.1.3. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)**

Le développement des méthodes de cytogénétiques, de l'immunophénotypage puis de la biologie moléculaire a mis en évidence l'existence d'anomalies récurrentes d'importance pronostique majeure.

L'OMS a souhaité intégrer ces anomalies récurrentes dans une nouvelle classification en 2001, révisée en 2008 [18] et en 2016 [19].

Les nouvelles propositions de l’OMS pour la classification des LAM sont fondées sur:

- L’intégration des anomalies génétiques récurrentes ;
- La prise en considération de la dysmyélopoïèse ou des antécédents de syndrome myélodysplasique (SMD) ;
- La prise en considération des antécédents thérapeutiques (chimiothérapie ou radiothérapie). Ceci permet d’insister sur le caractère pronostique défavorable des LAM secondaires par rapport aux LAM de « novo ».

Quatre groupes principaux sont ainsi reconnus :

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes,
- LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies,
- LAM post-chimiothérapie quel que soit le traitement,
- LAM sans spécificité particulière : LAM de la classification FAB.

Dans l’édition de la classification OMS 2016 des leucémies aigues, il ya eu la disparition de la leucémie aigue érythroïde pure. On parle de LAM avec composante érythroblastique prédominante.

Le tableau 3, montre la correspondance entre la classification OMS et morphologique FAB des LAM

**Tableau 3:** Représentation synthétique de la correspondance morphologique OMS 2008 et FAB [1, 16].

<b><u>OMS 2008</u></b>	<b><u>FAB</u></b>
<b><u>Groupe avec anomalies cytogénétiques récurrentes</u></b>	
LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1	LAM avec maturation (LAM2 – FAB)
LAM avec t (15;17) (q22;q12) ; PML-RARA	LA à promyélocytes (LAM3 – FAB)
LAM avec inv (16) (p13.1q22) ou t (16 ;16)(p13.1q22) ; CBFβ-MYH11	LA Myélomonocytaire aiguë avec éosinophiles anormaux (LAM4eo – FAB)
LAM avec t (9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL	LA Monoblastique (LAM5 – FAB)
LAM avec t (6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214	LAM avec maturation et excès de basophiles (LAM2 – FAB)
LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1	LA mégacaryoblastique (LAM7 – FAB)
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1	Divers types de LAM (souvent LA sans maturation, myélomonocytaires ou monoblastiques)
<b><u>Entités provisoires :</u></b>	
LAM avec mutation NPM1	Divers types morphologiques : souvent LAM sans ou avec maturation, ou LA myélomonocytaires
LAM avec mutation CEBPA	Divers types morphologiques : souvent LAM sans ou avec maturation ou LA myélomonocytaires.

<b><u>OMS 2008</u></b>	<b><u>FAB</u></b>
<p><b><u>Groupe avec anomalies associées aux myélodysplasies</u></b></p> <p>Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique</p> <p>- Ou présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des myélodysplasies</p> <p>- Ou présentant une dysplasie sur &gt; 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes</p>	
<p><b><u>Groupe des LAM post chimiothérapie</u></b></p> <p>Une seule entité quel que soit le traitement.</p>	
<p><b><u>Groupe des LAM sans spécification particulière</u></b></p> <p>LAM avec différenciation minimale</p> <p>LAM sans maturation</p> <p>LAM avec maturation</p> <p>LA myélomonocytaire</p> <p>LA monoblastique / monocytaire</p> <p>LAM à composante érythroblastique</p> <p>LA mégacaryoblastique</p> <p>LAM à composante basophile</p> <p>LA (Panmyélose aiguë) avec myélofibrose</p>	<p>LAM 0 – FAB</p> <p>LAM 1 – FAB</p> <p>LAM 2 – FAB</p> <p>LAM 4 – FAB</p> <p>LAM 5 – FAB</p> <p>LAM 6 – FAB (LAM érythroïde)</p> <p>LAM 7 – FAB</p>

## I.5.2. Classification des LAL

### I.5.2.1. Selon la classification morphologique FAB

Les LAL sont des proliférations malignes clonales aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de cellules immatures de la lignée lymphoïde, bloquées au stade lymphoblastique. Le diagnostic des LAL a été longtemps fondé sur la simple morphologie des blastes et la négativité de la cytochimie de la myéloperoxydase.

La classification FAB distinguait trois groupes : LAL1, LAL2 et LAL3. La LAL3 étant la LAL à cellules de Burkitt.

La classification cytomorphologique des LAL1 et LAL2 reposait sur quatre critères : le rapport nucléocytoplasmique, le contour du noyau, la présence de nucléoles et la taille cellulaire [2] (voir figure 3 et figure 4).

Afin de mieux apprécier ces différents critères, un système de cotation (voir tableau 4) a été proposé par le groupe FAB basé sur :

- Le rapport nucléocytoplasmique (N/C) : défini comme élevé lorsque le cytoplasme occupe moins de 20 % de la cellule et considéré comme faible lorsque le cytoplasme occupe 20% ou plus de la cellule,
- La présence et le nombre de nucléoles,
- La régularité de la membrane nucléaire : elle est dite régulière si son contour est bien délimité, sans distorsion de sa continuité, même lorsqu'il existe de petites encoches ou indentations. La membrane nucléaire est dite irrégulière si elle est réniforme, indentée et/ou encochée,
- La taille des cellules : les cellules de grande taille ont un diamètre supérieur ou double de celui d'un lymphocyte.

**Tableau 4** : Système de cotation des LAL1 et LAL 2 selon les critères morphologiques de la classification FAB

Critères morphologiques de cotation des LAL1 et LAL 2	Score
Rapport nucléocytoplasmique N/C élevé dans 75 % des cellules	+1
Rapport nucléocytoplasmique N/C diminué dans 25 % des cellules	-1
Nucléole absent ou 1 petit dans 75% des cellules	+1

Nucléole net : 1 ou plusieurs dans 25 % des cellules	-1
Contour nucléaire irrégulier dans 25 % des cellules	-1
Plus de 50 % des cellules sont de grande taille	-1

L'addition de ces différents scores permet de distinguer les LAL1 des LAL2.

- Score 0 à +2 : LAL1,
- Score négatif de -1 à -4 : LAL 2.

Cette cotation, valable seulement pour les LAL1 et LAL2, n'est fiable que sur des frottis bien étalés, bien colorés.

Toute fois la distinction entre LAL1 et LAL2 semble de peu d'intérêt pronostique, comparée à d'autres facteurs de risque tels que l'âge, le taux de globules blancs, les données immunologiques et le caryotype.

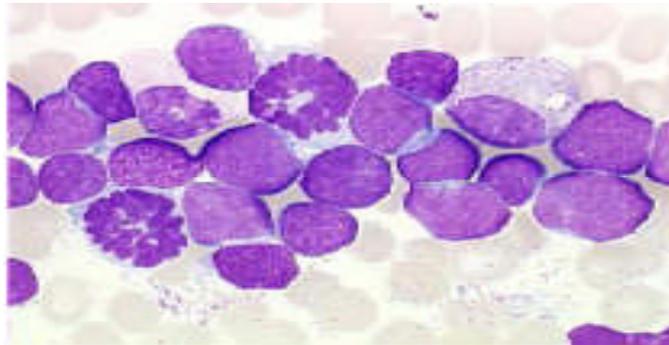
La LAL 3 ou LAL de type Burkitt est homogène pour tous les caractères précédemment décrits (voir figure 5). Les blastes sont des cellules de grande taille, régulières, le noyau est rond ou ovale, la chromatine est dense, avec un ou plusieurs nucléoles bien visibles dans la majorité des cellules. Le cytoplasme est modérément abondant et entoure complètement le noyau avec une basophilie intense. De nombreuses vacuoles cytoplasmiques sont souvent présentes dans la majorité des cellules blastiques.

Les principaux caractères cytologiques des différentes LAL sont résumés dans le tableau 5. Le diagnostic des LAL1 et LAL 3 est facile à porter sur l'aspect morphologique des blastes. Par contre, le diagnostic des LAL2 est difficile à distinguer de celui des LAM1 et LAM0, car aucun critère morphologique et cytochimique ne les séparent d'où l'importance des méthodes immunologiques.

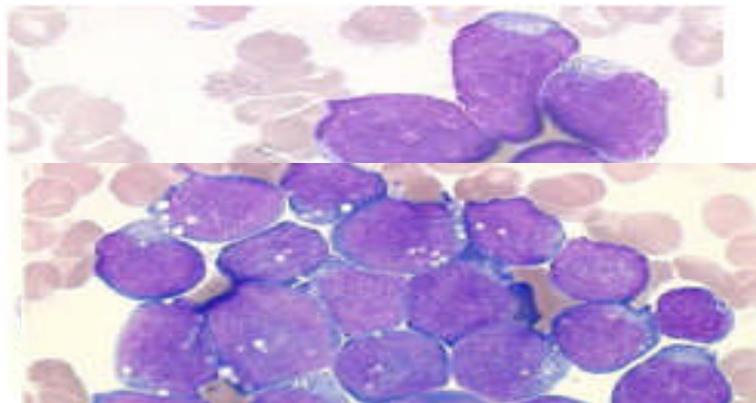
**Tableau 5:** Description cytomorphologique des LAL selon FAB [16].

	<b>LAL1</b>	<b>LAL2</b>	<b>LAL3</b>
<b>Taille cellulaire</b>	Petite et Homogène (12-15 u)	Moyenne à grande (hétérogène)	Grande (hétérogène)
<b>Rapport nucléocytoplasmique (N/C)</b>	> 0.9	<0.8	0.8-0.9

<b>Chromatine</b>	Homogène et réticulée	Fine ou mottée	Homogène (finement condensée)
<b>Forme du noyau</b>	Régulière	Irrégulière, souvent encoché	Régulière
<b>Nucléole</b>	Rare et petit	Presque toujours grand	Nombreux
<b>Basophilie du cytoplasme</b>	Modérée	Moyenne	Très intense
<b>Vacuoles cytoplasmique</b>	Rares	Rares	Très fréquent >5/Cellule



**Figure 4:** LAL1 selon FAB : la morphologie correspond à celle de petits lymphoblastes (petite taille, rapport N/C très élevé, chromatine fine, pas de nucléole visible) [16].



**Figure 3:** LAL2 selon FAB : blastes avec une taille variable, un noyau de contour souvent irrégulier avec une chromatine claire, et un cytoplasme réduit sans granulations visibles [16].

**Figure 5:** LAL3 selon FAB : grands blastes à chromatine hétérogène, plusieurs nucléoles, cytoplasme intensément basophile et multiples petites vacuoles [16].

**I.5.2.2. Selon la classification immunologique de l'EGIL**

La mise en évidence par CMF de marqueurs cellulaires membranaires et intracytoplasmiques a permis d'affirmer la nature lymphoïde des blastes, de distinguer les LAL à précurseurs B ; LAL-B (voir tableau 6) et les LAL à précurseurs T ; LAL-T (voir tableau 7) puis d'individualiser différents sous-groupes à partir des différents stades physiologiques de la maturation des cellules lymphoïdes.

**Tableau 6:** Classification immunophénotypique des LAL B selon EGIL [17].

EGIL		Marqueurs communs	Autres marqueurs
B-I	Pro B	CD19+, cytCD79a+, CD22+ (s ou cyt) (au moins 2 des 3 marqueurs), DR+	TdT+ CD10- cytIgM- sIg-( $\kappa$ ou $\lambda$ )
B-II	Commune		TdT+ CD10+ cytIgM- sIg-( $\kappa$ ou $\lambda$ )
B-III	Pré B		TdT+ CD10+ cytIgM+ sIg-( $\kappa$ ou $\lambda$ )
B-IV	B mature		TdT- CD10+/- cytIgM+ sIg+ ( $\kappa$ ou $\lambda$ )

cyt : intracytoplasmique ; s : surface

**Tableau 7:** Classification immunophénotypiques des LALT selon EGIL [17].

EGIL		Marqueurs communs	Autres marqueurs
T-I	Pro T	cytCD3+, CD7+, *TdT+, DR+	Aucun
T-II	Pré T		CD2+ CD5+/- sCD3- CD1a-
T-III	Cortical		CD2+ CD5+ CD4+ CD8+ CD1a+ sCD3-
T-IV	T mature		T-IVa : CD2+ CD5+ sCD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD4+ ou CD8+ T-IVb : CD5+ sCD3+ **TCR $\gamma/\delta$ + CD2- CD4- CD8-

\*TdT : Terminal Desoxyribonucleotidyl Transferase, \*\*TCR: T-Cell Receptor

### **I.5.2.3. Selon la classification OMS**

Le terme leucémie ou lymphome selon l'OMS peut être employé indifféremment, selon la présentation initiale de la maladie. Cependant, dans les deux situations c'est le même type de blastes qui est en cause. Ainsi, la LAL de type Burkitt (LAL3 - FAB) correspond au lymphome de Burkitt leucémisé et est incluse parmi les tumeurs à cellules B matures (OMS 2001 et 2008) [4, 1].

La notion d'envahissement primaire d'un site ganglionnaire ou extra nodulaire est ajoutée par l'OMS en introduisant le terme de lymphome/leucémie lymphoblastique à type de : Leucémie aiguës / lymphomes lymphoblastiques B et de la leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique T.

Lorsqu'un patient présente une masse nodulaire et des lymphoblastes dans la moelle osseuse, la distinction entre une leucémie et un lymphome est arbitraire.

#### **▪ Cas des leucémies aiguës / lymphomes lymphoblastiques B**

La classification OMS 2008 / 2016 [1, 18] des néoplasies à précurseurs lymphoïdes B inclue :

La leucémie aiguë/lymphome lymphoblastique B (sans autre précision) et la leucémie aiguë/lymphome lymphoblastique B avec anomalies cytogénétiques essentiellement :

- t (9;22) (q34;q11.2) avec le transcrit moléculaire BCR-ABL

- t (v;11q23) avec le réarrangement du gène MLL

- t (12;21)(p13;q22) avec le transcrit moléculaire *TEL-AML1*

- t (5;14)(q31;q32) avec le transcrit moléculaire *IL3-IGH*

- t (1;19)(q23;p13.3) avec le transcrit moléculaire *E2A-PBX1*

- Hyperdiploïdie

- Hypodiploïdie

#### **▪ Cas des leucémies aiguës / lymphomes lymphoblastiques T**

Dans cette catégorie deux entités provisoires sont listées :

### **1- Leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs T précoces (early -T)**

Les lymphoblastes expriment les CD2, CD3 intracytoplasmique et le CD7 mais pas les CD1a et CD8, le CD5 est souvent négatif. Les lymphoblastes sont positifs pour au moins un des antigènes des cellules souches : CD34, HLADR [18].

### **2- Leucémie aiguë/lymphome lymphoblastique à cellules Naturel Killer (NK)**

Il s'agit d'une entité très rare, qui exprime le CD56. En pratique, devant une LA avec cellules blastiques exprimant le CD56, il faut penser à exclure une LA à cellules plasmacytoïdes dendritiques, parfois une LAM de phénotype myéloïde/ NK qui pourrait correspondre à l'expansion d'un précurseur NK, parfois une LA avec expression d'antigènes T, notamment les antigènes : CD7, CD2, CD5 et CD3 cytoplasmique [56].

#### **I.5.2.4. Leucémies aiguës de lignée ambiguë**

Dans environ 4 % des cas de LA, le phénotype des blastes ne permet pas de distinguer l'origine myéloïde ou lymphoïde des précurseurs. Ces LA sont classées en LA de lignée ambiguë [57,58]. Dans la classification OMS 2001, il a été distingué les LA indifférenciées des LA biphénotypiques, et dans la classification OMS de 2008, de nouveaux critères dans la classification des LA de lignée ambiguë, ont été proposés. Le groupe des leucémies aiguës de phénotype mixte ou Mixed-Phenotype Acute Leukemia (MPAL) a été mis en place.

##### **a) Leucémies aiguës indifférenciées (LAI)**

Les blastes ne présentent pas de différenciation morphologique myéloïde, sont négatifs pour les cytochimies MPO et estérase, et n'expriment aucun antigène lymphoïde B, T, ou myéloïde, NK ou dendritique. Il s'agit de LA rarissimes. Les cellules blastiques sont généralement : HLA-DR+ CD34+CD38+ et parfois TdT+ et CD7+ [59].

L'expression isolée de CD34 en l'absence de tout autre marqueur est considérée caractéristique des leucémies à cellules souches.

##### **b) Leucémies aiguës biphénotypiques (LAB)**

Les leucémies aiguës biphénotypiques sont identifiées par la présence sur les mêmes blastes de molécules membranaires ou cytoplasmiques appartenant à au moins deux lignées (lymphoïde B, lymphoïde T ou myéloïde). 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 [17].

Seul l'examen par CMF est susceptible d'identifier la BAL en mettant en évidence un «score immunologique » de l'EGIL supérieur à 2 dans au moins deux lignées (voir tableau1). Ce score identifie plusieurs sous-groupes de LAB. Le premier groupe correspond à une co-expression de marqueurs lymphoïdes et de marqueurs myéloïdes (L+M). Ces LAB sont les plus fréquentes et l'expression des marqueurs myéloïdes est par ordre de fréquence le CD33, CD13 et le CD11b. En fonction de l'expression de la MPO, il est habituel de distinguer les LAB L+M MPO+ et les BAL avec marqueurs myéloïde et lymphoïde (M+L) MPO +. Les LAB avec marqueurs lymphoïde B et T (B+T) sont plus rares comme les BAL avec marqueurs lymphoïde B+T et marqueurs myéloïdes (B+T+M) [17].

### **c) Leucémies aigues à phénotype mixte (MPAL)**

La leucémie aiguë à phénotype mixte (MPAL) est une catégorie hétérogène qui comprend la LA avec un mélange discret d'une population blastique myéloïdes et lymphoïdes («Bilinéale») ou avec une coexpression de marqueurs lymphoïdes et myéloïdes dans une seule population blastique «biphénotypique» [60].

Les critères diagnostiques des MPAL, sont résumés dans la classification OMS 2008 révisé en 2016 qui évoque ses caractéristiques biologiques, cliniques et les pièges diagnostiques courants de ces leucémies inhabituelles.

De nouveaux critères de consensus pour MPAL ont été publiés dans la 4e édition de la classification de l'Organisation mondiale de la santé des «Tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes » (voir tableau 8) et restent essentiellement inchangés dans la mise à jour de 2016 [18].

Contrairement à l'approche EGIL , qui consiste à scorer un immunophénotype blastique avec de nombreux marqueurs, les critères de l'OMS soulignent quelques marqueurs clés définissant la lignée avec un accent particulier sur le CD19 pour la lignée B, CD3 pour la lignée T et la myéloperoxydase (MPO) pour la lignée myéloïde. L'approche de l'OMS est plus simple et repose fortement sur la sensibilité et la spécificité de quelques marqueurs [61, 62].

La classification OMS 2008 a créé d'une part, deux catégories distinctes de MPAL avec deux anomalies cytogénétiques corrélées à un mauvais pronostic :

- LA de phénotype mixte avec t (9;22) (q34;q11.2) avec BCR-ABL1 réarrangé
- LA de phénotype mixte avec t (v;11q23) avec MLL réarrangé

D'autre part, l'OMS 2008 classe les MPAL sans anomalies cytogénétiques spécifiques en :

- LA de phénotype mixte B et myéloïde, sans autres spécifications
- LA de phénotype mixte T et myéloïde, sans autres spécifications

Nous résumons dans le Tableau 8 les critères d'assignation de lignée pour le diagnostic des MPAL selon l'OMS 2008 et 2016.

**Tableau 8:** Les critères d'assignation de lignée pour le diagnostic des MPAL selon l'OMS 2008 révisé en 2016 [1,61, 18].

<b>Lignée</b>	<b>Marqueurs</b>
<b>Myéloïde</b>	MPO positive <b>OU</b> différenciation monocyttaire (avec au moins 2 des suivants marqueurs sont positifs) : Estérases non spécifiques, CD11c, CD14, CD64, lysozymes)
<b>Lignées T</b>	Forte positivité du cCD3 <b>OU</b> du sCD3
<b>Lignées B</b>	CD19 fortement positive et au moins 1 des marqueurs suivants avec expression forte : CD79a, cCD22 ou CD10 <b>OU</b> CD19 faible et au moins 2 des marqueurs suivants avec expression forte : CD79a, cCD22 ou CD10

## I.6. Diagnostic des leucémies aigues

### I.6.1. Circonstances de découverte

Il n'existe pas de signe spécifique de LA. Le diagnostic est suspecté lors d'une complication clinique d'une ou des cytopénies (altération de l'état général, syndrome anémique, syndrome hémorragique, état infectieux) et/ou devant un hémogramme faisant suspecter une atteinte médullaire (pancytopénie, blastose...).

Deux situations peuvent se présenter :

- Généralement, le patient présente peu de symptômes et c'est l'hémogramme qui fait évoquer le diagnostic ;
- Moins fréquemment, le tableau clinique initial est grave, avec des complications potentiellement vitales qui nécessitent que le patient soit hospitalisé en urgence en milieu spécialisé.

Le mode de révélation initial est représenté par un spectre pouvant aller du bilan d'une asthénie à un tableau beaucoup plus grave d'insuffisance médullaire profonde (infections, anémie, hémorragies) et d'infiltrats tissulaires (hyperleucocytoses) [56].

### I.6.2. Démarche diagnostique

☞ *L'interrogatoire* : permet de détailler la nature des antécédents onco-hématologiques (syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, hémopathies lymphoïdes, tumeurs solides) et de leurs traitements (radiothérapie, chimiothérapie). Il faut également noter les résultats d'hémogrammes antérieurs, la notion d'exposition à des toxiques ou des rayonnements ionisants (maladie professionnelle) et des antécédents familiaux de cancers ou d'hémopathies [63].

#### ☞ *Examen clinique*

L'examen clinique a pour but de rechercher les manifestations cliniques qui comprennent :

- Des signes d'insuffisance médullaire,
- Des signes de prolifération tumorale,
- Des complications métaboliques et le syndrome de leucostase.

### **I.6.2.1. Signes d'insuffisance médullaire**

C'est le résultat de l'insuffisance de production d'éléments sanguins normaux par la moelle osseuse. On décrit :

- **Un syndrome anémique** : dans 90 à 95% des cas, avec asthénie, pâleur, dyspnée, tachycardie; ces signes sont d'autant plus importants que l'anémie est profonde.
- **Un syndrome infectieux** : avec notamment des infections bactériennes traînantes ou des infections fongiques, dont la gravité est liée au taux bas des polynucléaires neutrophiles.
- **Un syndrome hémorragique** : présent dans 90% des leucémies aiguës ; il se manifeste par des hémorragies cutanées (pétéchies, hématomes, purpura), muqueuses (gingivorragies, épistaxis) particulières par leur caractère spontané ou déclenché par un traumatisme minime.

### **I.6.2.2. Signes de prolifération tumorale**

La LA se développe en règle dans la moelle osseuse, mais peut également s'étendre au sang (d'où la présence des blastes circulants dans certaines leucémies) ou à d'autres organes hématopoïétiques (rate, ganglion et foie) et non hématopoïétiques (peau, gencives, système nerveux central...) ce qui est responsable du syndrome tumoral.

Le syndrome tumoral est plus fréquent dans les LAL (quasi-constant) que dans la LAM (50% des cas), et il est la conséquence de la masse tumorale leucémique. Dans les LAM il est présent surtout dans les formes myélomonocytaires LAM4, et monoblastiques LAM5, il est habituellement absent dans les formes promyélocytaire [64].

#### **a. Adénopathies**

Les adénopathies superficielles (cervicales, inguinales, axillaires...) sont d'avantage observées dans les LAL (80 % des cas). Les adénopathies profondes (médiastinales, abdominales responsables de douleur) sont très évocatrices de LAL de type T et peuvent occasionner un syndrome compressif.

Les LAL3 s'accompagnent fréquemment d'une masse ganglionnaire abdominale de croissance rapide.

#### **b. Splénomégalie**

C'est un élément commun au cours des LAL (75 % des cas), et des LAM (50 %) dans les formes monocytaires, elle est souvent palpable, parfois très volumineuse atteignant ou dépassant l'ombilic.

**c. Hépatomégalie**

Une hépatomégalie associée peut se voir dans 50 % des LAL et moins souvent dans les LAM types M4 et M5 [65].

**d. Atteintes osseuses**

C'est un élément relativement fréquent dans les LAL et beaucoup plus rare dans les LAM. Elle se traduit par des douleurs localisées aux os longs ou plus diffuses, spontanées ou provoquées (ex : pression du sternum).

**e. Atteinte cutané-muqueuse**

L'atteinte cutanée est spécifique, fréquente dans les LAM notamment dans la forme monoblastique M5. Il s'agit de nodules violacés ou placards fermes enchâssés dans le derme, indolores.

**f. Atteinte neuroméningée**

L'atteinte du liquide céphalorachidien (LCR) s'observe plus spécialement dans tous les types de LAL (et à des fréquences extrêmes dans la LAL3), les LAM à composante monocyttaire (LAM4, LAM4 à éosinophiles, LAM5) et de façon générale en cas d'hyperleucocytose.

**g) Atteinte gonadique :** classiquement décrites au cours des LAL de l'enfant [66].

**I.6.3. Confirmation du diagnostic**

**I.6.3.1. Hémogramme ou Numération Formule Sanguine**

Il est anormal dans la très grande majorité des cas et permet souvent à lui seul d'évoquer le diagnostic. L'hémogramme met en évidence : [56,65]

- L'anémie est habituellement retrouvée dans 90 à 95% des cas, d'importance variable définie par un taux d'Hb inférieure aux valeurs physiologiques selon l'âge, et peut atteindre des valeurs inférieures à 5 g/dl. Elle est arégénérative : taux de réticulocytes < 120 G/L, normochrome normocytaire, sans anomalies morphologiques des hématies le plus souvent.

- Une numération leucocytaire très variable. On peut observer tous les cas de figure, de la leucopénie franche (< 1G/L) sans blastes circulants, jusqu'à l'hyperleucocytose majeure

(100-500 G/L), constituée essentiellement de cellules tumorales et imposant une prise en charge diagnostique et thérapeutique en urgence.

- Une thrombopénie très fréquente, parfois majeure (< 10 G/L). Elle peut être liée à une insuffisance de production et/ou à une consommation excessive par un mécanisme de CIVD, imposant la réalisation d'un bilan d'hémostase. Le nombre de plaquettes peut être normal voire augmenté mais le syndrome hémorragique reste possible suite à une thrombopathie associée).

### **I.6.3.2. L'examen du frottis sanguin [67]**

L'examen du frottis sanguin est au centre du diagnostic, il comporte le classique décompte des populations leucocytaires mais requiert également un balayage attentif de la lame, notamment le long des bords, car les cellules anormales ne sont pas toujours réparties de façon homogène.

L'étude du frottis sanguin permet de :

- ☞ **Détecter des blastes** : les cellules blastiques peuvent avoir de multiples aspects cytologiques, notamment une taille variable, un noyau régulier ou irrégulier, une chromatine de densité variable, pouvant renfermer un ou plusieurs nucléoles, et un cytoplasme d'abondance et de basophilie variable, pouvant renfermer des granulations.

- ☞ **Porter un diagnostic de leucémie aiguë** : selon l'OMS 2001, un pourcentage de blaste médullaire supérieur ou égal à 20% évoque d'emblée une leucémie aiguë.

- ☞ **Préciser la nature des blastes**

Il est nécessaire de rechercher des signes de différenciation cytologique : la présence de granulations fait suspecter une origine myéloblastique, celle de corps d'Auer signe à la fois le caractère malin des blastes et leur nature myéloïde. Quant à la présence de corps d'Auer en fagots, associée à l'aspect bilobé des blastes, elle caractérise la leucémie aiguë promyélocytaire.

- ☞ **Détecter des signes de dysmyélopoïèse associés**

Il est indispensable de rechercher une dysgranulopoïèse morphologique, avec anomalies superposables à celles des syndromes myélodysplasiques (hyposégmentation nucléaire, hypo granulation).

**Les principales caractéristiques de la formule leucocytaire au diagnostic de la leucémie aigue sont :**

- Présence d'une neutropénie liée à un défaut de production, avec parfois agranulocytose ( $< 0.5$  G/L) nécessitant une prise en charge en urgence.
- Un excès de granulocytes basophiles ou une hyper éosinophilie sont possibles, dans le cadre des variants morphologiques.
- Une hypermonocytose est observée dans les LAM à composante monocytaire.
- Les lymphocytes sont en nombre habituellement normal en fonction de l'âge.

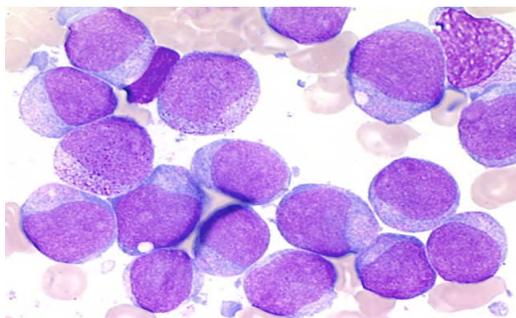
### **I.6.3.3. Le myélogramme**

Il est systématiquement demandé, que ce soit pour confirmer un diagnostic évoqué devant l'hémogramme et préciser le type cytologique ou pour y parvenir devant une pancytopenie sans cellules leucémiques circulantes.

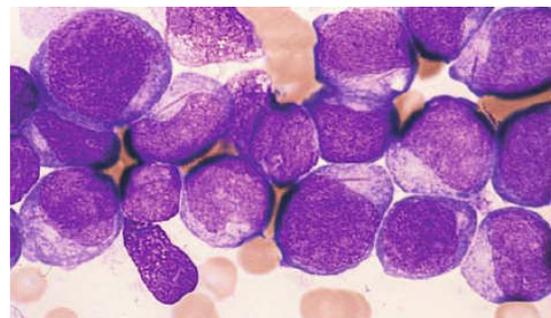
L'examen microscopique de frottis médullaires colorés au MGG pose le diagnostic de la leucémie aigue en montrant une infiltration médullaire avec un pourcentage de blaste supérieur à 20% [63]

La morphologie du noyau cellulaire est le point le plus critique dans l'identification des cellules blastiques, aussi les caractéristiques cytoplasmiques sont très utiles dans la détermination de la lignée : les myéloblastes présentent de fines granulations cytoplasmiques peu abondantes. Les différents aspects cytologiques observés en tenant compte de la classification FAB sont :

- **Les myéloblastes** : cellules de taille moyenne à grande, à faible rapport nucléocytoplasmique. Elles présentent un noyau excentré à chromatine lâche et peut montrer un ou plusieurs nucléoles proéminents. Leur cytoplasme est basophile et peut contenir des granulations azurophiles et/ou des batonnets ou corps d'Auer (voir figure 6 et figure 7).

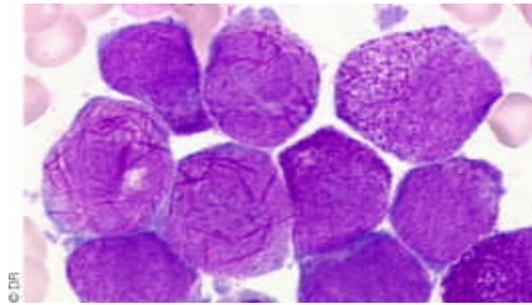


**Figure 6:** Myéloblastes [68,27]



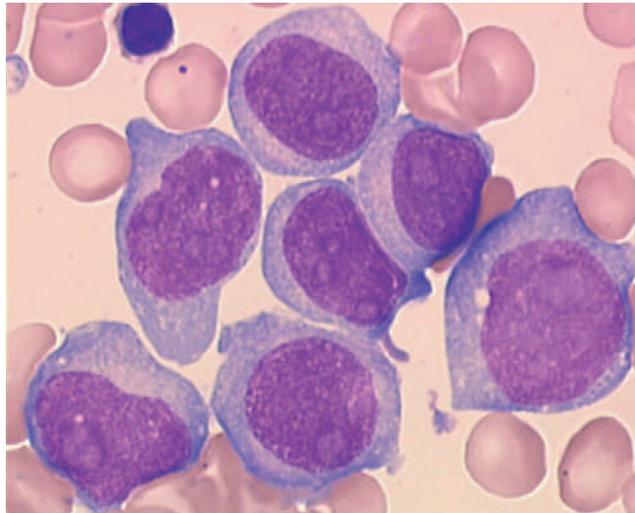
**Figure 7:** Myéloblastes et batonnets d'Auer [68]

– Dans la LAM3 classique, les blastes présentent un noyau caractéristique bilobé ou réniforme. Le cytoplasme est rempli de granules azurophiles, parfois coalescentes. La caractéristique est que quelques cellules contiennent de très nombreux corps d'Auer, organisés en fagots ; (voir figure 8). En pratique plus la leucocytose est importante plus les cellules sont hypo granuleuses.



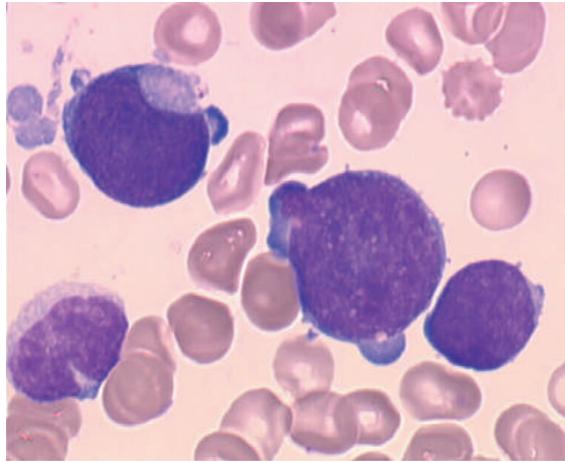
**Figure 8:** Myéloblastes montrant des corps d'Auer organisés en fagots [68].

– **Les monoblastes** : cellules de grande taille avec un noyau central rond ou oblong et un cytoplasme abondant. Il peut exister un nucléole proéminent. Le cytoplasme est basophile ou gris-bleu et peut présenter des bourgeonnements. Il peut exister de fines granulations cytoplasmiques ; (voir figure 9).



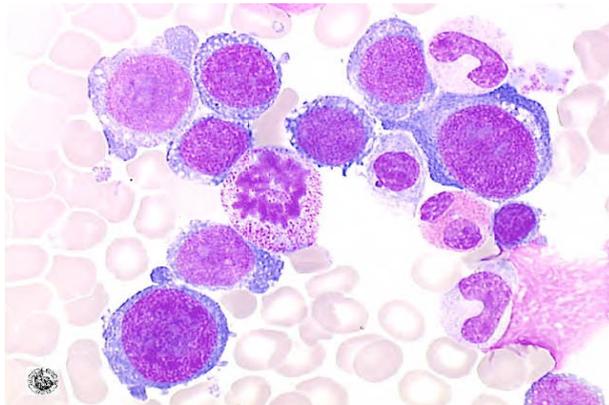
**Figure 9:** Leucémie aigüe monoblastique, LAM5a [68].

– **Les mégacaryoblastes** : cellules de taille réduite à moyenne avec un rapport nucléocytoplasmique élevé. Le cytoplasme est basophile, souvent dépourvu de granulations, et peut montrer des bourgeons ou pseudopodes ; (voir figure 10).



**Figure 10:** Blastas évocateurs de Mégacaryoblastes : LAM7 [68].

– **Les proérythroblastas** sont parfois morphologiquement indifférenciés, et seules les techniques immunophénotypiques précisent le caractère érythroïde (voir figure11).



**Figure 11:** Blastas évocateurs des proérythroblastas [68]

#### **I.6.4. Examens complémentaires permettant la classification des leucémies aigues**

##### **I.6.4.1. Etude cytoenzymatique**

###### **▪ Myéloperoxydase (MPO)**

###### **Principe :**

Repose sur la révélation de la myéloperoxydase leucocytaire en présence de la benzidine qui est oxydée par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pour donner un composé de couleur bleu verte, qui s'oxyde rapidement donnant une coloration brune.

###### **Interprétation :**

– Si le pourcentage des cellules blastiques contenant des grains colorés en bleu vert est  $\geq 3\%$  on parle de réaction positive.

– Si le pourcentage des cellules blastiques contenant des grains colorés en bleu vert est  $< 3\%$  on parle de réaction négative.

Dans les LAM la réaction est souvent positive  $\geq 3\%$

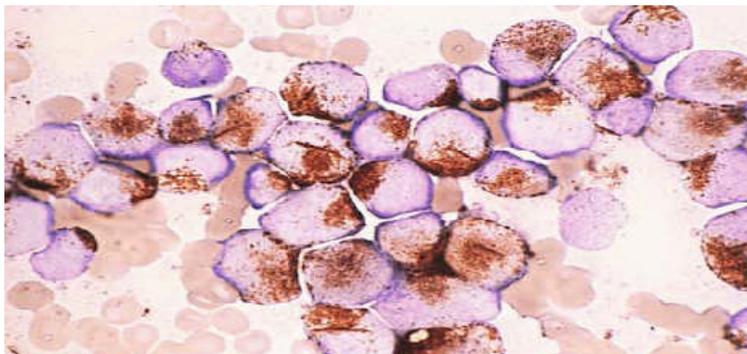
Dans les LAL la réaction est souvent négative  $< 3\%$

Les aspects de la positivité de la réaction de la MPO sont les suivants :

- Myéloblastes : positivité focale (uniquement à un pôle de la cellule) cas de la LAM2 (voir figure 12), ou au contraire positivité majeure et dans toute les cellules cas des LAM3,

- Monoblastes : positivité en petits grains dispersés ou absence de positivité LAM5a indifférenciée.

La réaction est négative dans la LAM0, LAM5a, LAM6, LAM7 et les LAL.



**Figure 12:** Myéloblastes positivité focale de la MPO (cas d'une LAM2) [68].

#### ▪ Les estérases non spécifiques

##### Principe :

Cette réaction permet la mise en évidence des estérases « enzymes qui catalysent l'hydrolyses des esters ». Le substrat utilisé est le Naphtol ASD acétate (NASDA) avec ou sans fluorure de sodium (NaF) qui est positif dans toutes les lignées granuleuses et monocytaires et apparaît sous forme de granulations rouges ou bleues [69, 70].

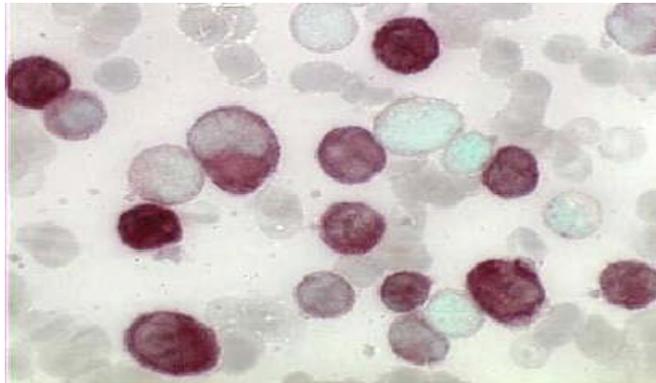
##### Interprétation :

La réaction des estérases non spécifiques est positive dans les LAM et inhibée par l'action du NaF dans les LAM à composante monocyttaire. Le seuil de positivité est de : 3%, les NASDA sont négatives dans les LAL et positives dans les LAM.

NASDA+ NAF : inhibition de la réaction dans les monoblastes

NASDA+ NAF : non inhibition de la réaction dans les myéloblastes

La figure 13 illustre une réaction positive des estérases non spécifiques.



**Figure 13:** Cytochimie des estérases. L'activité enzymatique est présente dans les cellules de la lignée monocyttaire et révélée sous la forme d'un précipité brun rouge d'autant plus intense que les cellules sont matures [69].

De nombreuses colorations cytochimiques existent, il s'agit de techniques manuelles, rapides et peu chères, depuis longtemps utilisées dans le diagnostic des leucémies aigues [71], mais présentent comme principaux inconvénients l'absence de contrôle, la dégradation des réactifs et la variabilité inter-opérateurs [72].

#### **I.6.4.2. L'étude immunophénotypique par CMF**

A l'heure actuelle, l'analyse des données fournies par la CMF a permis de montrer que les cellules leucémiques présentent un profil différent des cellules normales en cours de maturation. On peut distinguer trois grands types d'anomalies :

- Absence d'expression de marqueurs présent normalement à un stade de maturation donné pour la lignée dont est issue la cellule leucémique,

- Le niveau d'expression anormal (hypo ou hyper expression) d'un marqueur présent pour un stade de maturation donné,
- Expression de marqueurs d'autres lignées non exprimés normalement par les cellules de la lignée dont sont issues les cellules leucémiques.

***a) Démarche suivie pour caractériser les leucémies aiguës***

L'expression de l'antigène panleucocytaire le **CD45** va persister sur les leucocytes tout au long de leur vie à l'exception des plasmocytes tandis que les érythrocytes et les plaquettes perdent l'expression de ce marqueur au cours de leur différenciation.

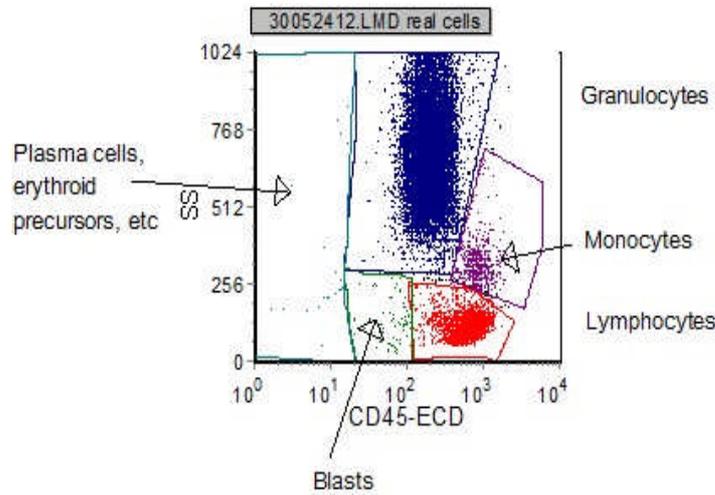
En regardant le niveau d'expression du **CD45** en association avec le *Side Scatter Cell (SSC) ou structure (CD45/SSC)*, on peut identifier les différentes lignées cellulaires [73] ; (voir figure 14) :

- Les lymphocytes sont caractérisés par l'intensité la plus forte du CD45 et le signal le plus faible en SSC.
- La lignée érythrocytaire est caractérisée par la négativité du CD45 et un faible signal en SSC.
- Les monocytes montrent une expression du CD45 un peu plus faible que celle des lymphocytes et des caractéristiques intermédiaires en SSC entre les lymphocytes et les cellules myéloïdes.
- Les blastes montrent une expression faible du CD45 avec des caractéristiques de SSC variables, proche de celles des lymphocytes ou des monocytes.
- Les cellules granuleuses sont caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45.

Comme les cellules blastiques ont une plus faible expression de CD45 que les cellules hématopoïétiques normales, l'identification des blastes peut se faire grâce à l'histogramme CD45/SSC [74].

L'utilisation combinée du SSC et d'un marquage par CD45, pour ses caractéristiques d'antigène panleucocytaire, permet de dresser ce qui est communément appelé la « cartographie » des leucocytes médullaires. Les progéniteurs médullaires, de faible SSC et exprimant le CD45 avec une intensité intermédiaire, sont présents dans une région grossièrement triangulaire, entre les granuleux (SSC plus élevé), les monocytes (SSC intermédiaire et CD45 plus intense) et les lymphocytes (SSC faible et CD45 fort), parfois appelée « Bermudes » ou se positionnent les cellules immatures tel que les

blastés (voir figure 14). En cas de leucémie aigue, cette région est hypertrophiée et s'il existe des cytopénies associées, les autres compartiments sont diminués ou absents [75].



**Figure 14:** Histogrammes: CD45/SSC [76]

***b. Détermination de la lignée des blastés***

Selon l'EGIL (voir tableau 9), la mise en évidence de certains marqueurs par les cellules leucémiques va permettre de les assigner à la lignée dont elles sont issues. En combinant une série de marquages multiples, il devient ainsi possible non seulement d'identifier la lignée à laquelle appartient chaque cellule mais aussi son stade de maturation au sein d'une lignée donnée.

**Tableau 9:** Les marqueurs les plus spécifiques pour déterminer l'appartenance d'une cellule a une lignée cellulaire selon EGIL [17].

CD34, HLA-DR	Marqueurs d'Immaturité
cytCD79, CD19, cytCD22	Lignée lymphocytaire B
cytCD3	Lignée lymphocytaire T
cytMPO, CD13, CD33, CD117	Lignée myéloïde
CD41, CD42, CD61	Lignée plaquettaire
Glycophorine A, CD36	Lignée érythrocytaire

Ainsi, une cellule leucémique appartient à la **lignée myéloïde** si :

- Elle exprime au moins deux marqueurs myéloïdes : CD13 / CD33 / CD117 /cytMPO
- Elle n’exprime pas plus de deux marqueurs lymphoïdes B ou T :
  - ☞ Marqueurs lymphoïdes B : CD19 / CD22 / cytCD79a
  - ☞ Marqueurs lymphoïdes T : cytCD3 / CD2 / CD5 / CD7 / CD8

Une cellule leucémique appartient à la **lignée lymphoïde B** si :

- La **positivité** d’au moins deux marqueurs B : CD19/CD22/cytCD79a
- Et **négativité** d’au moins trois des marqueurs T: cytCD3/CD2/CD5/CD7/CD8
- Et la **négativité** d’au moins trois des marqueurs myéloïdes : CD13/CD33/CD117/cytMPO

Une cellule leucémique appartient à la **lignée lymphoïde T** si :

- La **positivité** de cytCD3 ou CD3 membranaire
- La **négativité** d’au moins deux marqueurs B : CD19/CD22/cytCD79a
- Et la **négativité** d’au moins trois des marqueurs myéloïdes : CD13/CD33/CD117/cytMPO

### **I.6.5. Examens biologiques à visée pronostic**

#### **I.6.5.1. L’étude cytogénétique [77, 78]**

La cytogénétique inclut le caryotype conventionnel qui examine l’ensemble des chromosomes obtenus à partir de cellules leucémiques en métaphase [79].

Les anomalies chromosomiques contribuent à définir le type de leucémie et présentent aussi l’intérêt d’être des facteurs pronostiques indépendants, essentiels pour les choix thérapeutiques. Il s’agit d’anomalies de nombre ou de structure (délétions, translocations).

Les principales entités sont :

☞ Pour les LAL, l’hyperdiploïdie confère un bon pronostic. À l’inverse, la t (9;22) ou chromosome Philadelphie (Phi) est un élément de pronostic très péjoratif. Sa fréquence augmente avec l’âge et 1/4 des LAM de l’adulte ont une t (9;22).

☞ Pour les LAM, la présence des anomalies récurrentes t (15;17), t (8;21), inv(16), ou la t (16;16) permettent à elles seules d'affirmer le diagnostic de LAM et de classer des sous-types de LAM au sein de la classification OMS 2008 [1].

Il s'agit d'anomalies clonales acquises et certaines parmi elles sont spécifiques du type de LAM :

- La t (8;21) se retrouve typiquement dans les LAM2,
- La t (15;17) se retrouve presque toujours dans les LAM3,
- L'inversion du chromosome 16 est associée aux LAM4 à éosinophiles.

### **I.6.5.2. L'étude moléculaire**

L'étude cytologique, immunologique et cytogénétique des blastes leucémiques révèle l'importante hétérogénéité des leucémies aigues d'un malade à l'autre. Un des intérêts principaux des études de biologie moléculaire est d'affiner encore la caractérisation des leucémies en mettant à jour les anomalies génétiques qui en sont à l'origine.

La présence de certaines translocations est étroitement associée au pronostic de la maladie. Ainsi, une fusion BCR-ABL ou un réarrangement de MLL constituent les facteurs de mauvais pronostic les plus puissants identifiés à ce jour dans les LAL. Leur mise en évidence amène à intensifier le traitement, et à entreprendre une greffe de moelle osseuse en première rémission complète [80].

A l'heure actuelle, dans les LAM, la recherche des mutations *FLT3-ITD* (Mutations du récepteur *FMS-like tyrosinekinase 3 (FLT3)*, *NPM1* (Mutations du gène de la nucleophosmine (*NPM1*), *CEBPA* (Mutations du *CCAAT/enhancer bindingprotein (CEBPA)* par RT-PCR est réalisée en routine dans des laboratoires hospitaliers hautement spécialisés. Elles permettent de mieux évaluer le pronostic des patients [81,82].

## **I.7. Les facteurs pronostiques des LA de Novo**

### **I.7.1. Facteurs pronostiques des LAM**

#### ***a) Cytogénétique***

Il s'agit du facteur pronostique le plus discriminant, prédictif des chances d'obtention d'une RC mais aussi du risque de rechute [83]. Les anomalies clonales acquises détectées dans les cellules blastiques comportent des pertes ou des gains de chromosomes, des

translocations chromosomiques, des délétions (del) ou une inactivation fonctionnelle de gènes suppresseurs de tumeur. Trois groupes sont dégagés :

- Groupe de pronostic favorable (20 % des cas chez les 15-60 ans) incluant : t(8;21) ; t(15;17) ; inv(16) ou t(16;16). Ce type d'anomalies est plus fréquent chez les sujets jeunes, les taux de RC sont élevés (> 85 %). La guérison semble pouvoir dépasser 2/3 des cas voire plus (environ 75 % en cas de LAP).

- Groupe de pronostic défavorable (30 % des cas chez les 15-60 ans) incluant : Caryotypes complexes (trois anomalies différentes associées ou plus), monosomies 5 ou 7, délétion 5 q, anomalies en 3q ; t (6;9) ; t (9;22) ; anomalies en 17p. Les taux de survie à cinq ans sont inférieurs à 20 %.

- Groupe de pronostic intermédiaire (50 % des cas chez les 15-60 ans) : caryotypes normaux et anomalies à l'exclusion de celles précitées. Les taux de survie à cinq ans sont de l'ordre de 40 à 50 %.

### ***b) Hyperleucocytose***

Les patients avec hyperleucocytose ont un risque élevé de rechute.

### ***c) Résistance multidrogue (MDR1)***

Codée par le gène *mdr1*, la Gp 170 (ou P-glycoprotéine [PGP]) est une protéine transmembranaire qui fonctionne comme une pompe à efflux ATP-dépendante. Elle diminue la concentration intracellulaire des agents anticancéreux réduisant ainsi leur activité anti tumorale.

La résistance conférée par l'expression de la PGP est dite multi drogue car elle concerne différentes classes d'agents anticancéreux.

La présence de blastes de phénotype MDR est corrélée à des taux de RC significativement inférieurs et à un risque de rechute significativement supérieur.

### ***d) Âge***

L'âge est un pronostic défavorable. Les LAM des sujets âgés sont souvent associées à des caractéristiques clinico-biologiques péjoratives : expression du gène *MDR1* et caryotypes défavorables (anomalies des chromosomes 5 et/ou 7 et caryotypes complexes). Au total, les patients âgés de plus de 65 ans ont des taux de survie à cinq ans inférieurs à 10 % [82].

*e) Réponse au traitement*

La nécessité de plus d'une cure lors de la 1ère phase du traitement dite induction, pour obtenir une RC est de pronostic très péjoratif et indique une allogreffe. L'utilisation de la PCR, s'il existe un transcrite de fusion (cas des translocations t(8;21) ; t(15;17) ; inv(16) ou t(16;16), permet de suivre de façon plus sensible l'évolution de la maladie résiduelle.

**I.7.2. Facteurs pronostiques des LAL [80 ; 84]**

*a) Âge*

L'âge (> 60 ans) est un facteur péjoratif avec des taux de RC de 60 à 75 % et des taux de survie à trois ans de 10- 20 %. Les plus jeunes (< 30 ans) ont les taux de RC les plus hauts (90 à 95 %) avec des taux de survie à trois ans d'environ 60 %.

*b) Cytogénétique*

Les anomalies clonales acquises sont retrouvées dans 60 à 75 % des cas. Les LAL avec t(9;22) représentent 25 % des LAL de l'adulte et l'incidence augmente avec l'âge, plus de 40 % après 40 ans.

*c) Taux de leucocytes initial*

Les patients avec taux initial de GB supérieur à 30 000/ mm<sup>3</sup> ont une durée de RC significativement inférieure.

*d) Autres facteurs mineurs*

Certaines présentations sont associées à un pronostic plus défavorable tel que l'atteintes du système nerveux central; fort pourcentage de blastes médullaires et/ou circulants, des LDH élevées.

*e) Réponse au traitement*

Lors de la 1ère phase du traitement dite d'induction, une corticorésistance et/ou l'obtention d'une RC en plus de 4 à 6 semaines sont péjoratifs.

Chez les patients présentant un marqueur clonal (réarrangement des gènes du TCR  $\gamma$  et  $\delta$  et/ou réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines), l'évaluation de la maladie résiduelle par PCR est un nouveau facteur pronostique. Une maladie résiduelle

avec PCR montrant un taux supérieur à 1 % (sur 200 000 cellules mononuclées médullaires) en fin d'induction, prédit une rechute.

# **II**

## **Apport de la CMF au diagnostic de la leucémie aigue**

## II.1. Définition

La cytométrie en flux (CMF) est une technique qui permet la mesure (métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse constituée, le plus souvent, par un laser. Elle permet de compter une à une des cellules en suspension, dans un liquide, qui circulent l'une derrière l'autre, de les trier en fonction de leurs propriétés électriques, optiques, géométriques spécifiques, et leur regroupement en sous populations homogènes [85, 86].

Actuellement, les applications de la CMF couvrent des disciplines aussi diverses que : l'hématologie, l'immunologie, la microbiologie, la pharmacologie anticancéreuse, l'étude des microorganismes marins, la biologie végétale etc... et les champs des applications ne cesse de s'élargir avec le développement de nouveaux réactifs et de nouvelles techniques [87, 88].

## II.2. Historique

La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang [89, 90].

- En 1934, la technique de la CMF est pour la première fois évoquée dans un article scientifique par Moldavan, considéré comme le fondateur de la CMF. Il introduit le concept de comptage de cellules par mesure d'extinction des signaux lors de leurs passages dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique [91].
- En 1950, Coons et Kaplan décrivent le premier couplage d'anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La découverte de ce couplage est loin d'être banale puisque le FITC est un fluorochrome encore largement utilisé de nos jours [92].
- En 1969, la publication d'un premier article décrivant le tri de cellules par CMF chez les mammifères par (HERZENBERG à Stanford), puis en 1973, la publication d'un article sur les applications du 1<sup>er</sup> cytomètre : le FAC Scan à trois couleurs et utilise du laser bleu à 488 nm. Au cours de la même année, à l'initiative de Van Dilla [93] il ya eu l'utilisation du laser comme source de lumière (respectivement 633 et 488 nm),

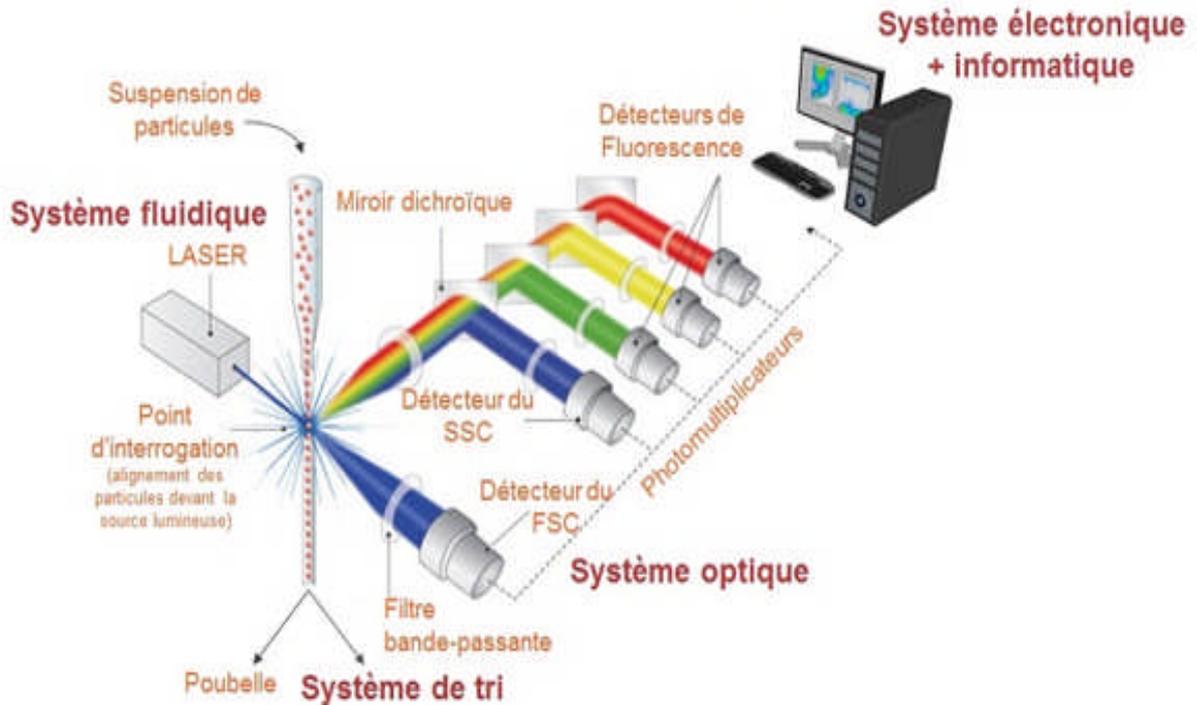
- Les années 70 sont connues par l'invention de multiples cytomètres : l'équipe de Herzenberg développa en 1972 un nouvel appareil, le « Fluorescence Activated Cell Sorter » (FACS), équipé d'un laser argon. En 1974, la société Becton-Dickinson (BD) commercialise une version de cet instrument sous l'acronyme FACS-II.
- En 1976, Shapiro imagine des appareils de CMF pourvus de multiples sources lasers. Cette ingénieuse idée permettra, plus tard, l'analyse simultanée de nombreuses fluorescences [94]. En 1978, Schlossman débute la production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes de cellules lymphoïdes sanguines [95]. En cette même année la société Becton-Dickinson, développe la série des appareils Epics dotés d'un laser argon [96].
- L'année 1981 a vu l'apparition des cytomètres à flux avec un banc optique fixe et l'association du cytomètre à un ordinateur pour le traitement des données. Deux décennies plus tard, en 2002, est né le premier trieur de cellules avec un banc optique fixe : le FACS Aria (BD Biosciences). Les analyseurs de cellules permettant les mesures polychromatiques ont vu le jour durant les années 1980 (trois couleurs en 1985 et quatre couleurs en 1986). Depuis une quinzaine d'années, d'importants progrès ont été réalisés dans le développement d'appareils de plus en plus performants.
- En 2001, BD Biosciences met sur le marché le LSR II, un analyseur de cellules permettant la mesure de quatorze couleurs [97].
- En 2016, mise en place d'analyseurs permettant l'analyse de 20 paramètres par cellule.
- Ces dernières années, il a été créé des sociétés de cytométrie qui permettent à tous les utilisateurs de cette technologie de s'échanger des informations et du savoir faire tel que : AFC : Association Française de Cytométrie, ESCCA : Société Européenne de Cytométrie Clinique, CCS : Société Internationale de Cytométrie Clinique, ISAC : Société Internationale d'avancement en cytométrie .

### II.3. Composition d'un cytomètre:

Pour fonctionner ; un cytomètre de flux nécessite une combinaison de plusieurs systèmes :

- **Fluidique** pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser;

- **Optique** qui se compose du ou des lasers et d'un système de filtres pour exciter, récupérer et amplifier les différents signaux émis ;
- **Electronique** pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.



**Figure 15:** Composants majeurs d'un cytomètre en flux [98].

à préciser que le point d'interrogation (voir figure 15) est l'élément principal du système de CMF. En effet, c'est là que les cellules traversent le ou les lasers et que le système optique collecte la lumière diffractée et la fluorescence émise par la cellule. Le passage des cellules les unes derrière les autres, réalisée par le principe de centrage hydrodynamique est primordial pour une analyse précise des signaux optiques.

### II.3.1. Le système fluide

Il y a 2 composants fluidiques principaux : le liquide de gaine (qui forme le manteau à l'intérieur duquel les cellules circulent) et l'échantillon contenant des cellules en suspension. Trois paramètres permettent d'expliquer la focalisation hydrodynamique : la pression, la vitesse et la densité [97, 99].

### ✓ Principe de l'hydro focalisation et le centrage hydrodynamique

La CMF est une technique qui permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées. Les cellules doivent être dissociées les unes des autres, circulant l'une derrière l'autre, dans une suspension liquide pour être analysées individuellement. Cela est possible grâce au principe de mécanique des fluides d'hydrofocalisation schématisé sur la figure 16 [100].

Le sang et la moelle, constituent des tissus de choix pour une analyse par CMF, car les cellules sont déjà en suspension.

L'échantillon est injecté avec une certaine pression au milieu d'une buse, à l'intérieur de laquelle le liquide de gaine (ou Sheath) est lui aussi amené avec une certaine pression. C'est la pression du liquide de gaine qui définit la vitesse du flux cellulaire, et donc la vitesse d'analyse des cellules. La sortie de la buse étant un petit orifice, le liquide de gaine sera accéléré à la sortie de la buse. La structure de la buse et de l'orifice permettent d'obtenir un flux laminaire à l'intérieur duquel les cellules sont attirées et sont forcées de circuler les unes derrière les autres, permettant ainsi une analyse individuelle [97, 99].

La création d'un flux nécessite :

- Une pression appliquée sur le liquide de gaine et sur l'échantillon ;
- L'application d'une pression plus grande sur le liquide de gaine que sur la suspension cellulaire.

Si le différentiel de pression était négatif, le liquide de gaine serait refoulé vers l'injecteur et donc vers l'échantillon également. En cas de pression identique sur le liquide de gaine et sur l'échantillon, ce dernier n'aurait pas la possibilité de s'insérer dans le flux.

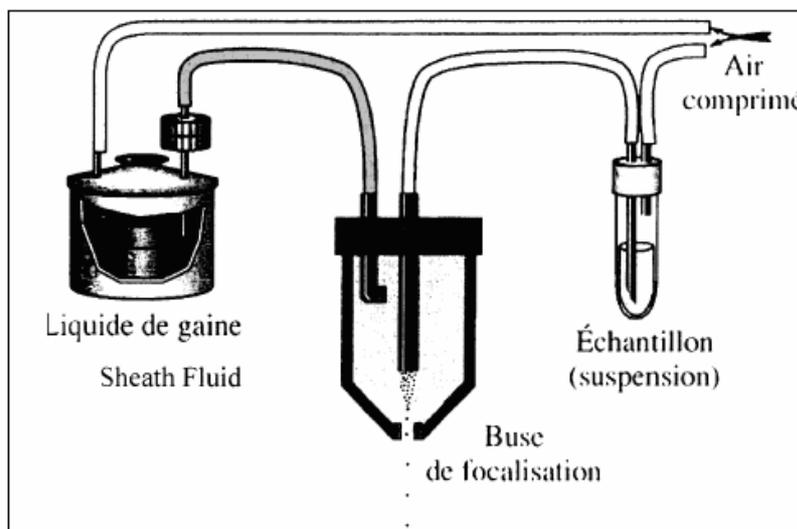
Cependant, nous avons expliqué que la pression du liquide de gaine influence la vitesse de défilement cellulaire, mais il y a aussi la pression de l'échantillon qui influence le flux.

L'utilisateur a la possibilité de changer la pression différentielle appliquée sur l'échantillon et donc de modifier la vitesse de défilement des cellules. Cependant, en augmentant le différentiel de pression, la vitesse est accélérée mais le diamètre du jet cellulaire est lui aussi agrandi. Cette dernière modification entraîne une influence négative sur

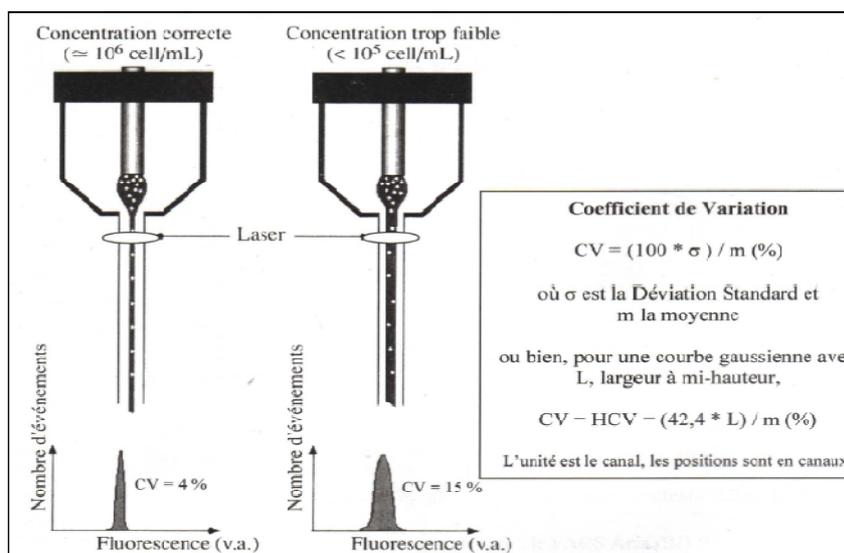
la précision de l'analyse. En effet, le diamètre étant élargi, la vitesse de défilement augmente mais le centrage des cellules dans le flux diminue et pèjore la qualité de l'analyse.

Lorsque les cellules ne passent pas toutes au même endroit devant le laser, il se crée alors des variations entre les cellules. La fluorescence des cellules n'est alors pas le reflet exact de leur charge en fluorescence, et les résultats sont moins précis [97, 99].

La figure 17, montre les profils de distributions de la fluorescence dans les cas de concentrations différentes entraînant une dispersion plus importante, autour de la moyenne, augmentant ainsi les coefficients de variation (CV). En effet, si les cellules ne passent pas toutes exactement au même endroit par rapport au faisceau laser, le signal émis par chacune d'elle n'est pas strictement le reflet de sa charge en fluorochromes.



**Figure 16:** Principe de l'hydro focalisation [97].



**Figure 17:** Influence de la concentration et de la pression sur la précision de la mesure [97].

Ainsi, il convient d'ajuster au mieux la concentration de l'échantillon à la vitesse d'analyse offerte par la gaine porteuse, qui est une caractéristique propre à l'appareil utilisé. Ceci permet de conserver une vitesse d'analyse optimale sans être obligé d'augmenter le diamètre de la veine échantillon. En général, des concentrations de  $10^6$  et  $10^7$  cellules/ml sont jugées parfaitement adaptées pour des vitesses d'analyse de 1000 à 2000 cellules/sec et 30000 cellules/sec respectivement [97].

De nombreuses recherches sur l'injection et le centrage des cellules dans la gaine liquide ont permis d'optimiser la focalisation et sa stabilité et de multiplier par 10 à 30 la vitesse d'analyse des cellules, avec une meilleure précision des mesures [101].

En ce qui concerne la densité, c'est aussi un élément important de la focalisation hydrodynamique. Il est préférable de choisir les liquides de gaine ayant une densité inférieure ou identique à celle de l'échantillon, afin de prévenir les effets de réflexion qui peuvent entraîner une perte du signal [97, 99].

### **II.3.2. Le système optique**

Le système optique d'un appareil de CMF se compose de plusieurs éléments :

- Une ou plusieurs sources lumineuses : le(s) laser(s) ;
- Les canaux optiques : une succession de filtres et miroirs ;
- Des détecteurs.

#### **II.3.2.1. La source d'énergie**

La source d'excitation lumineuse utilisée doit permettre l'excitation des fluorochromes à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption.

Le laser est le plus fréquemment employé, car il assure puissance, stabilité du chromatisme et finesse du faisceau, ce qui permet de focaliser le rayon lumineux sur une seule cellule à la fois.

Chaque laser permet d'émettre une lumière monochromatique (un seul type de photons). Il présente une forme elliptique après focalisation avec un faisceau d'éclairement très concentré (très bonne discrimination des doublets), capable d'exciter une série de fluorochromes. Les lasers ont des spectres d'émission discontinus.

Au début des années 1980, les lasers utilisés avaient des longueurs d'onde d'excitation limités, et surtout avaient besoin d'un système de refroidissement par eau, du fait de leur puissance. Aujourd'hui, les lasers sont beaucoup plus petits, ne requièrent plus de système de refroidissement, et ils fournissent une excitation stable à diverses longueurs d'onde [102].

Les 3 lasers les plus couramment utilisés aujourd'hui sont le bleu (488nm), le violet (405nm) et le rouge (633nm). Le laser vert à 532nm fournit plus de sensibilité, comparé au laser bleu, pour les fluorochromes PE [103]. Le laser UV (350nm) permet la mesure des colorants Hoechst, pour la mesure de l'ADN, et reste en grande partie réservé à cette application. Enfin, récemment le laser jaune (560nm) et orange (610nm) viennent combler le « trou » entre le vert (532nm) et le rouge (633nm) et permettent de couvrir tout le champ d'excitation de la lumière visible [104].

### II.3.2.2. Canaux optiques

Un canal optique est un chemin que la lumière peut suivre depuis le point d'interrogation (particule) jusqu'à un détecteur. Des éléments optiques (filtres et miroirs dichroïques) réalisent la séparation des canaux et la sélection des longueurs d'onde.

Pour être mesurés par les photomultiplicateurs (PMT) ou photodiodes, les signaux lumineux (photons) émis par chaque cellule sont focalisés puis séparés par une alternance de miroirs dichroïques et de filtres.

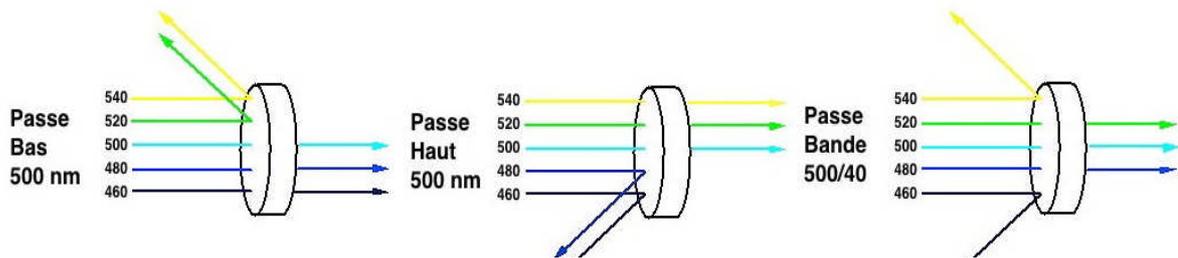
**a) Les miroirs dichroïques** : sont des diviseurs optiques, dont le rôle est de canaliser chaque signal optique vers son détecteur. L'efficacité d'un miroir dichroïque est mesurée au travers du pourcentage de transmission et de la longueur d'onde limite transmise qui peuvent changer suivant l'angle d'interception du faisceau incident. C'est pourquoi les miroirs dichroïques sont fabriqués pour travailler sous différents angles (45°, 14°, 11°,...) pour atteindre des possibilités différentes avec un seul miroir en changeant son orientation.

Cependant, il faut que le miroir soit bien stable et bien fixé. Il faut préciser si la transmission a lieu au dessous ou au dessus :

- Un **miroir dichroïque passe-bas (short-pass)** de 560 transmet les longueurs d'onde inférieures à 560 nm et réfléchit celles dont les longueurs d'onde sont supérieures à 560 nm.

- Un **miroir dichroïque passe-haut (long-pass)** agira dans le sens inverse, en transmettant les longueurs d'onde supérieures à une certaine valeur, et en réfléchissant celles inférieures à cette même valeur [105].

**b) Les filtres :** doivent avoir une bande passante restreinte et une capacité de transmission maximale. En fonction du traitement de surface reçu, on dispose de quatre types de miroirs : passe-haut, passe-bas, passe-bande et bloque bande, qui seront choisis afin de sélectionner le maximum de lumière émise par chaque fluorochrome utilisé (voir figure 18).



**Figure 18:** Les différents types de filtres utilisés en cytométrie [106].

- **L**
- **Les filtres passe-haut :** stoppent la lumière inférieure à une certaine longueur d'onde, à l'inverse.
- **Les filtres passe-bas :** stoppent la lumière supérieure à une certaine longueur d'onde.
- **Les filtres passe-bande :** laissent passer la lumière se trouvant entre deux longueurs d'ondes. Ce type de filtres est le plus largement utilisé. Placés juste devant un détecteur. Les filtres passe-bande permettent d'assurer que le détecteur reçoit uniquement les longueurs d'ondes qui lui sont appropriées.

Ces filtres doivent permettre la meilleure collection possible des diverses fluorescences, et doivent donc se caractériser par une excellente transmission dans la bande de sélection. Il y a lieu de noter que l'efficacité de transmission diminue avec l'âge des filtres, qui doivent par conséquent être régulièrement contrôlés et éventuellement remplacés si nécessaire.

### c) Paramètres récoltés par le cytomètre

Chaque événement passant devant le faisceau laser va diffracter la lumière laser, la lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule (Voir figure 18) :

- **Diffusion sous un petit angle (Forward Scatter Cell, FSC)**

Il s'agit de la lumière collectée dans l'axe du faisceau du laser (angle inférieur à 10°) et correspondant d'un point de vue physique à la diffraction. Son intensité varie avec la taille de la cellule et donne une indication sur la taille des particules analysées [107].

D'autre part, les cellules dont la membrane est endommagée, ont un indice de réfraction inférieur à celui des autres cellules et produisent un signal de diffusion aux petits angles de plus faible intensité, alors que leur taille n'a subi aucun changement.

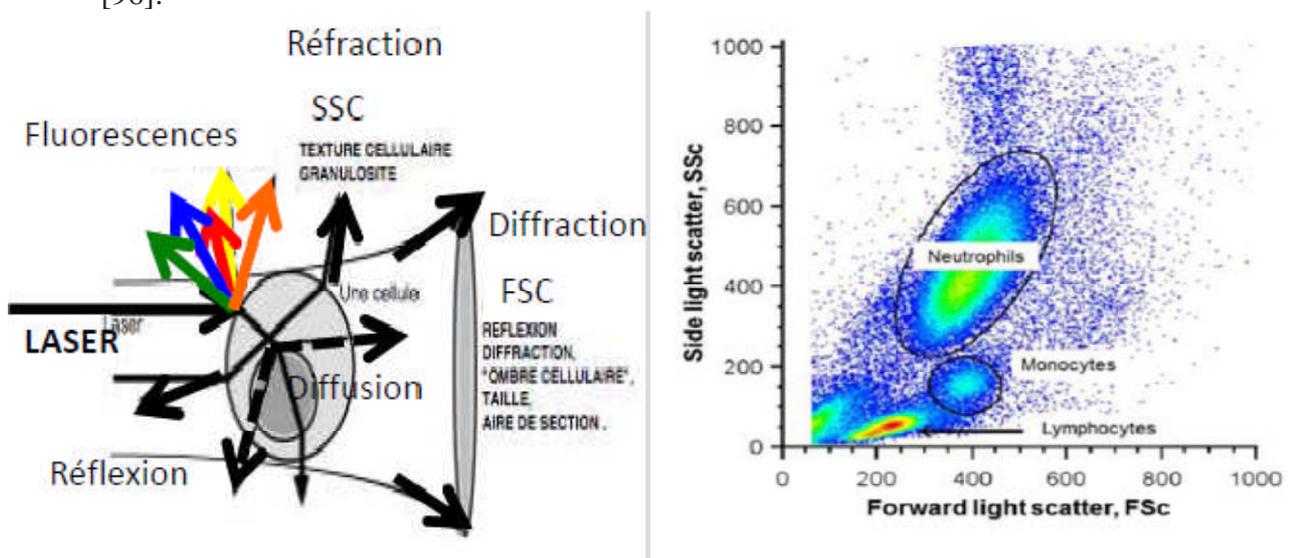
- **Diffusion sous un angle plus grand (Side Scatter Cell, SSC) :**

Il s'agit de la lumière collectée à 90° par rapport à l'axe du faisceau lumineux, qui est un mélange de lumière réfractée et réfléchi (voir figure19).

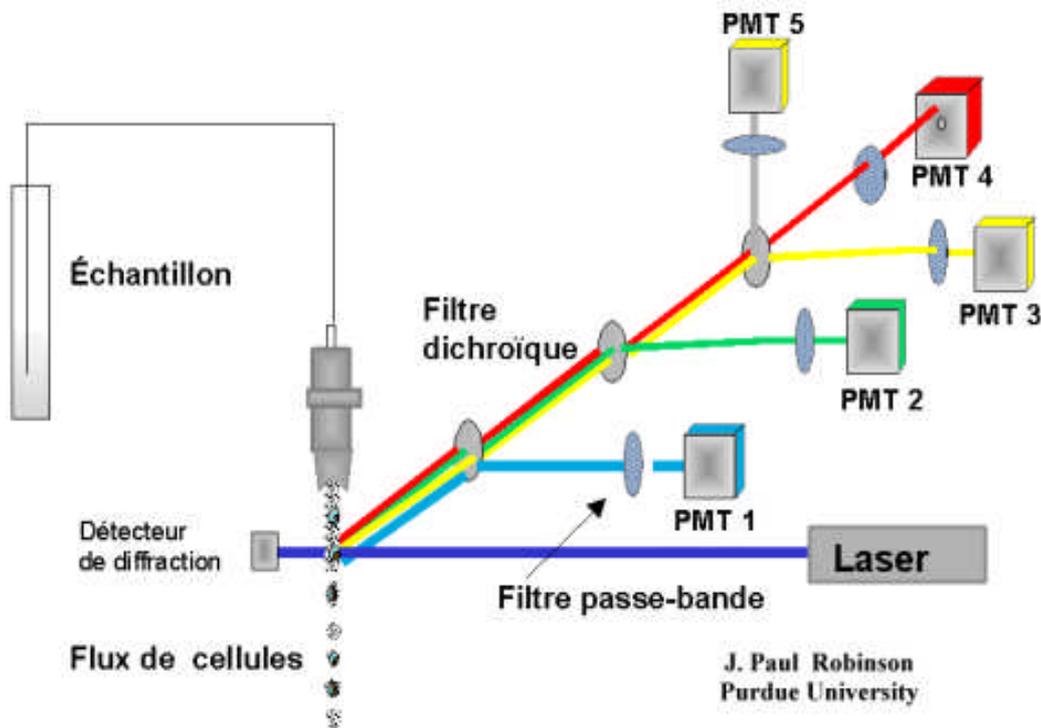
L'intensité de la réflexion et de la réfraction dépendent des propriétés intrinsèques de la cellule et donnent, donc, des indications sur la structure interne des cellules telles que la réfringence du cytoplasme, la granularité et le rapport nucléocytoplasmique. Ce signal est faible pour les lymphocytes, légèrement plus fort pour les monocytes et très élevé pour les granulocytes. Ainsi, différents types cellulaires peuvent être caractérisés, sans aucun marquage des cellules, tels que les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires.

- **La fluorescence est collectée à 90° :**

Par rapport à l'axe du faisceau lumineux. Elle peut être une auto fluorescence ou résulter, comme c'est le cas le plus souvent, d'un marquage par un ou plusieurs fluorochromes spécifiques de constituants cellulaires ou associés à un immunomarquage [96].



**Figure 19:** Diffusion de la lumière aux petits angles et aux grands angles [108].



**Figure 20:** Vision globale du système optique d'un cytomètre de flux [109].

Ainsi, il existe trois types de canaux :

- Canal « taille » (FSC « Foward Scatter Channel ») : diffusion de la lumière dans l'axe,
- Canal « structure » (SSC « Side Scatter Channel ») : réfraction de la lumière à 90°,
- Canal « fluorescence » (FL1, FL2, FL3, FL4...): mesure l'intensité de fluorescence relative émise à 90°.

### II.3.2.3. La détection du signal

Bien qu'ils fassent partie intégrante de la partie optique d'un appareil de CMF, les détecteurs seront traités dans la partie : **système électronique.**

### II.3.3. Le système électronique et traitement du signal

L'analyse des données en cytométrie revient à traiter les signaux lumineux émis par les cellules et à les convertir en signaux électriques par les photodétecteurs.

La conversion des photons en courant électrique (photoélectrons) est réalisée par les détecteurs qui sont de deux types : les photodiodes (PD) et les photomultiplicateurs (PMT).

### **a) Les photodiodes (PD)**

Les PD, particulièrement efficaces pour transformer les photons en photons-électrons, sont généralement utilisés pour détecter des signaux d'intensité élevée. On les utilise notamment pour la détection du signal du FSC.

### **b) Les photomultiplicateurs (PMT)**

Les PMT sont habituellement utilisés pour détecter des signaux de plus faible intensité comme le Side Scatter. On les utilise également pour la détection de la fluorescence des éléments marqués. Les PMT possèdent un enchaînement d'électrodes (les dynodes) dont le rôle est d'augmenter le signal électrique. Cette possibilité d'amplification du signal fait que les PMT sont des photodétecteurs particulièrement sensibles [97].

### **c) Traitement du signal**

A ce stade du traitement du signal, les photons émis ont été transformés en un voltage.

L'ensemble du signal électrique issu de l'émission de fluorescence d'une cellule lors de son passage devant un laser est appelé impulsion (pulse). Il a une amplitude comprise entre 0 et 10 V et la durée de cette impulsion (quelques microsecondes) est appelé : « temps de vol ou largeur de l'impulsion ».

L'intensité de fluorescence de cellules fortement marquées peut être, mille fois (ou plus), supérieure à celle de cellules faiblement marquées. Dans un tel cas, un amplificateur logarithmique permet d'obtenir un signal de sortie proportionnel au logarithme du signal d'entrée.

### **d) Traitement de l'impulsion et digitalisation du signal**

Il s'agit de la Conversion Analogique (volts) Digitale (canaux) (ADC). Le signal provenant de chaque détecteur est transformé en un signal informatique et traité par un circuit de compensation de fluorescence réalisé par soustraction analogique. Il est digitalisé 10 millions de fois par seconde (10 MHz) sur une échelle de 262 128 intervalles ou canaux pour la mesure de l'aire de l'impulsion. Cette technologie mise en place par la société BD Biosciences permet de répartir les données obtenues sur une échelle logarithmique à 5 décades ou en représentation bi exponentielle qui permet de mieux visualiser les populations dont le marquage est de faible intensité [110].

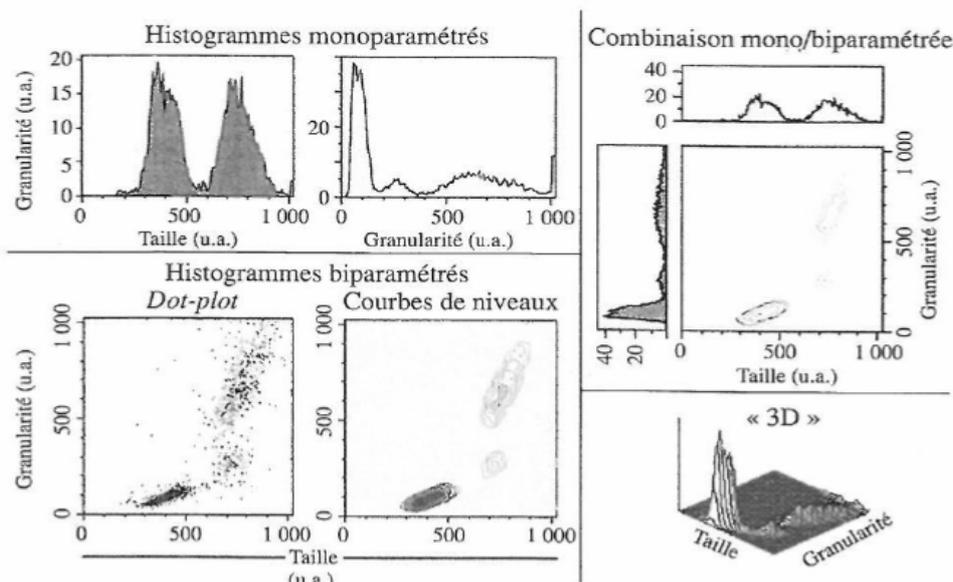
A cet effet, chaque tension (signal en volt) est convertie en numéro de canal. A chaque valeur numérique correspond un canal dont le compteur est incrémenté du nombre d'évènements. Le tracé du nombre d'évènements par canal est appelé : **Histogramme mono paramétrique**. Les valeurs linéaires de canaux sont transformées en valeurs logarithmiques (Log). L'échelle logarithmique est fortement conseillée, car plus discriminante pour les faibles intensités de fluorescence que l'échelle linéaire [111, 112].

**e) Affichage et stockage du signal**

Une fois que les signaux optiques sont convertis de façon proportionnelle en signaux électroniques puis en chiffres, les données sont stockées dans l'ordinateur sous forme de fichier FCS (Flow Cytometry Standard). Le fichier représente une liste de valeurs numérique de chaque paramètre étudié pour chaque cellule analysée.

Les données concernant les cellules, bruits de fond, etc,... sont conservées en **Listmode (LMD)**, apparenté à un grand tableau comprenant toutes les valeurs paramétriques de chaque objet, qui peuvent être retraitées, en cas de besoin, en modifiant les gates, les associations bi ou multi-paramétrées.

Les résultats peuvent se présenter sous la forme d'histogrammes mono paramétrés, c'est-à-dire avec un paramètre en abscisses, l'ordonnée correspondant au nombre d'évènements par canal ou sous forme d'histogrammes biparamétrés ou cytogramme où il y a un paramètre en abscisse et un en ordonnée (voir figure 21). Dans ce dernier type de représentation, le nombre d'évènements correspond à un axe Z pouvant être représenté par la densité de nuage de points ou par des courbes de niveau [97].



**Figure 21:** Différents modes de représentation des données obtenues en CMF [113].

## II.4. Fluorescence et Fluorochromes

La fluorescence est une forme de luminescence se produisant suite à l'absorption de photons par une molécule de type fluorophore ou *fluorochrome* [114].

### II.4.1. Principe de la Fluorescence

L'énergie  $E$  d'un photon fait passer un électron d'un état basal à un état excité.

Il perd un peu d'énergie sous différentes formes (radiation, conversion interne,...) avant de retrouver son état de repos en libérant l'énergie restante sous-forme d'un photon.

Ainsi, le photon libéré est moins énergétique que le photon incident. D'après la loi de Planck, la longueur d'onde est inversement proportionnelle à l'énergie. Le photon émis a une plus grande longueur d'onde que le photon incident [115, 116].

Selon le diagramme de Jablonski (voir figure 22), les électrons ne sont pas tous issus des mêmes sous-couches électroniques et ne seront pas non plus sur la même couche ou sous-couche électronique une fois excités. De même ils ne seront pas sur la même sous-couche électronique après leur relaxation. Il n'existe donc pas une valeur, mais une gamme de valeurs d'énergie ou longueur d'onde qui sera absorbée ou émise par un fluorochrome.

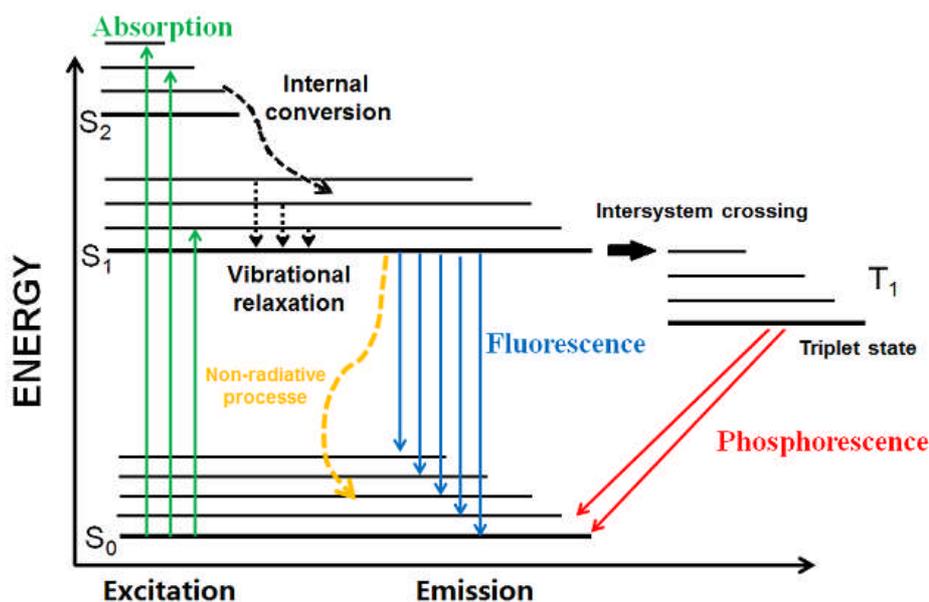


Figure 22: Diagramme de Jablonski [117].

En 1935, Alexandre Jablonski, physicien polonais, explique le mécanisme de fluorescence à travers un diagramme devenu célèbre : le diagramme de Jablonski. Une molécule fluorescente est capable d'absorber de l'énergie lumineuse et de rapidement réémettre cette énergie sous forme de fluorescence. L'émission de fluorescence se produit à partir du minimum d'énergie vibrationnelle de l'état S1, vers l'état S0 (voir figure 22) [117].

Pour chaque fluorochrome on peut établir un spectre de longueur d'onde capable de l'exciter ( $\lambda$  *excitation*), et un spectre de longueur d'onde de fluorescence ( $\lambda$  *émission*).

Ces spectres sont définis par plusieurs caractéristiques : [118, 119]

- Une longueur d'onde d'absorption (excitation) et une longueur d'onde d'émission (fluorescence) maximale, spécifique pour chaque fluorochrome ;
- La longueur d'onde d'excitation est plus faible que la longueur d'onde de fluorescence;
- Une symétrie des spectres d'excitation et d'émission ;
- Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption ;
- L'écart de Stokes (ou *Stokes Shift*) = écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission. Si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. En pratique, pour pouvoir séparer efficacement, à l'aide de miroirs dichroïques, la forte lumière incidente ( $\lambda_1$ ) de la faible fluorescence émise ( $\lambda_2$ ), ce déplacement doit être  $>20$  nm.

Éventuellement, un déplacement de Stokes important (Iodure de Propidium, Red 670) facilitera la réalisation de marquages multiples en conjonction avec des fluorochromes ayant des déplacements de Stokes plus faibles (l'isothiocyanate de fluorescéine FITC, Texas Red).

Si on prend l'exemple de la fluorescence du FITC (voir figure 23), son spectre d'émission étant approximativement *l'image miroir décalée* vers le rouge de la bande d'absorption située vers les plus courtes longueurs d'onde.

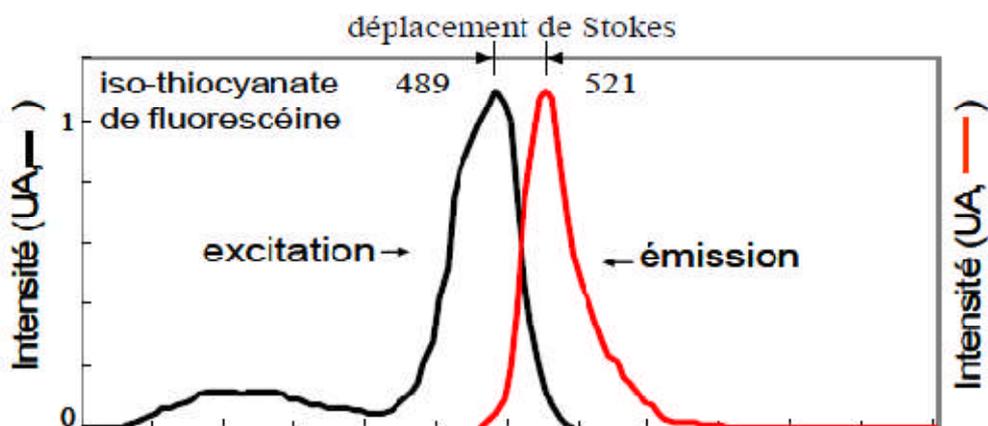


Figure 23: Spectres d'excitation et d'émission du FITC dans l'eau à pH 7 [120].

#### II.4.2. Les contraintes liées à l'émission des fluorochromes

En présence de plusieurs fluorochromes, des fuites optiques à travers des filtres d'analyse respectifs peuvent néanmoins apparaître à cause du recouvrement de leurs spectres d'émission. On cherche à contourner le problème par le choix des fluorochromes ayant des spectres d'émission éloignés et se chevauchant le moins possibles (voir figure 24).

La gamme des Cyanines et surtout la gamme Alexa Fluor, donnent d'excellents résultats. La Cyanine 5.18 (« Cy5 »), excitée par les raies 633 ou 647 nm de certains lasers, émet loin dans le rouge (émission : 667 nm) et évite ainsi le « cross-talk ».

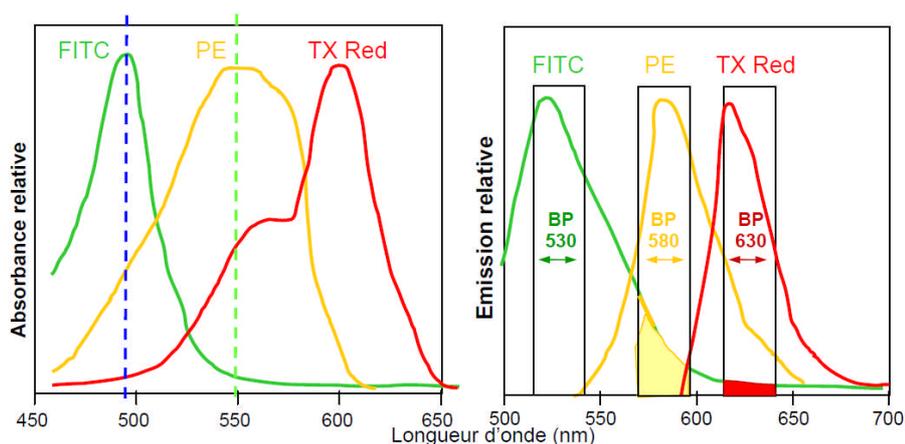


Figure 24: Chevauchement des spectres de fluorescence des différents fluorochromes [121].

La figure 24 montre des spectres normalisés d'absorbance (A) et d'émission (E) de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), de la phycoérythrine (PE) et du Texas Red (TX Red).

En cytométrie en flux, on a vite adopté des phycobiliprotéines telle que la phycoérythrine (PE) pour une double quantification avec le FITC à partir d'une seule excitation à 488 nm. De plus, ces grands pigments naturels, de par leur absorptivité molaire 50 à 100 fois celle de la fluorescéine ou de la rhodamine, offrent un gain de sensibilité, mais au prix de leur taille et d'un encombrement stérique important.

Les années 1990 ont vu l'arrivée des *fluorochromes tandem*, des molécules de cyanines ou Alexa fluors couplées avec PE ou APC qui leur fournissent l'énergie d'excitation.

Un Tandem est constitué de 2 molécules fluorescentes couplées par une liaison chimique :

- Une 1<sup>ère</sup> molécule, excitable par le laser 488 nm, joue le rôle de donneuse d'énergie. Le transfert d'énergie s'effectue via la liaison chimique liant les deux fluorochromes;

- Une 2<sup>ème</sup> molécule acceptrice reçoit l'énergie uniquement via la liaison chimique car elle n'est pas excitable à 488 nm. Elle réémet un signal à une longueur d'onde supérieure à celle de la molécule donneuse [121].

Pour constituer des panels multi-couleurs il est conseillé de suivre la stratégie suivante :

- Utiliser les fluorochromes les plus brillants sur les marqueurs les plus faiblement exprimés : PE > PC7 > APC > PC5.5 ;
- Réserver les autres fluorochromes moins brillants sur les marqueurs fortement exprimés ou en marqueurs de Gating (CD45, CD3) : ECD > FITC ;
- Pour du 5 ou 6 couleur et plus, utiliser des fluorochromes dont les spectres ne se chevauchent pas trop pour limiter les réglages de compensations à effectuer.

### II.5. L'immunophénotypage dans les leucémies aiguës

Dans les leucémies aiguës (lymphoblastique ou myéloblastique), l'immunophénotypage par cytométrie en flux, permet de déterminer l'appartenance des cellules blastiques à une lignée cellulaire [122] , de préciser le niveau de différenciation

pour identifier et/ou préciser le diagnostic des diverses types et sous types de leucémies aigues. Il s'agit de la seule technique qui permet de détecter les leucémies aigues à phénotype mixte (MPAL) exprimant à la fois des marqueurs de lignées myéloïdes et lymphoïdes B ou T. L'immunophénotypage des leucémies aigues, présente un rôle pronostique par la mise en évidence d'un phénotype corrélé à des anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires,[123 , 124 , 125]. Aussi, il permet de détecter le profil antigénique aberrant des blastes pouvant se révéler utile pour le suivi de la maladie résiduelle [126].

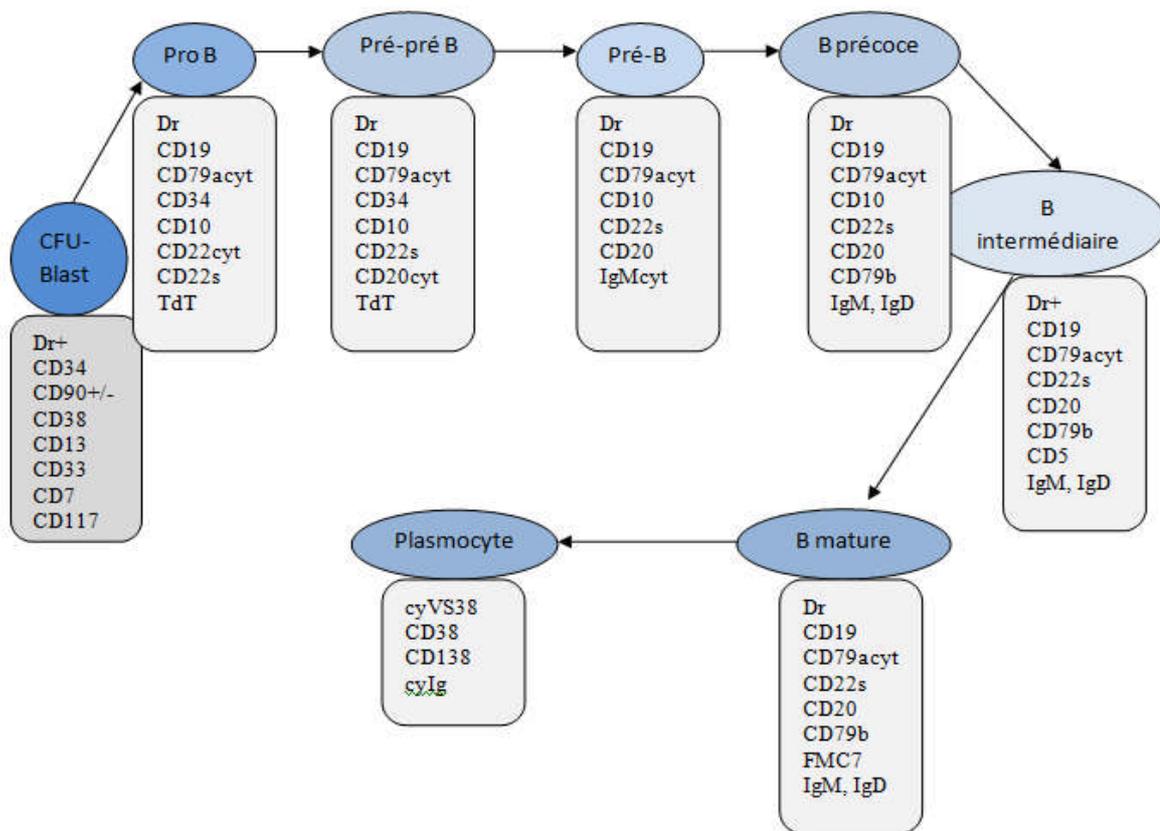
La connaissance de l'évolution de l'expression des marqueurs de différenciation et de maturation des cellules des différentes lignées hématopoïétiques joue un rôle capital pour poser le diagnostic le plus précis possible dans le cadre des leucémies aiguës par immunophénotypage.

L'analyse des images issues d'un histogramme biparamétrique SSC/CD45 à l'étude immunophénotypique d'une leucémie aigue, donne une information quant au type de leucémie à laquelle pourront être rattachées les cellules blastiques. Ainsi, lorsque les cellules leucémiques sont de grande taille et donnant un signal peu intense en SSC, on peut s'attendre à être confronté à une leucémie aiguë touchant une des lignées lymphoïde ou encore des cellules peu différenciées de la lignée myéloïde (LAM0, M1 ou M2). Par contre, lorsque les cellules montrent des signaux plus intenses en SSC, on peut envisager une leucémie promyélocytaire (LAM3) ou encore une leucémie monocytaire (LAM5) ou à participation monocytaire (LAM4) [127].

### **II.6. L'expression des molécules de surface en fonction des stades de différenciation des cellules myéloïdes et lymphoïdes**

#### **II.6.1. L'expression des antigènes de la lignée lymphoïde B en fonction des stades de différenciation**

La figure 25 illustre les différents stades de maturation du lymphocyte B.

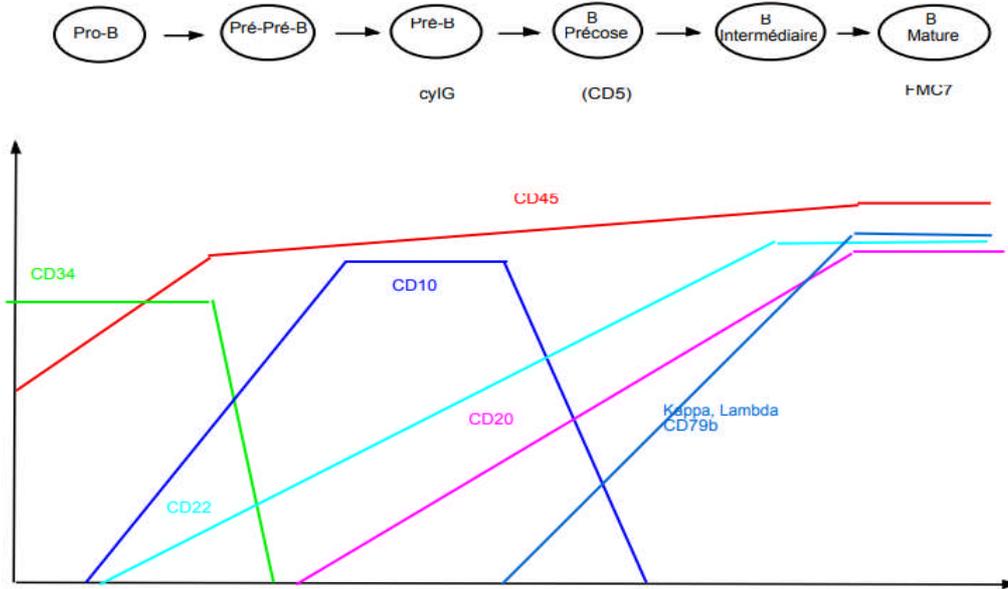


**Figure 25:** Différents stades de maturation du lymphocyte B [128].

À chacun de ces stades peut être associé un phénotype bien précis. Il est à noter que le CD19, le cytCD79a et le HLADR vont être exprimés par toutes les cellules durant le processus de maturation pour ne disparaître qu'au stade de plasmocyte.

- Au stade Pro-B, le CD34 est exprimé plus fortement que le CD10, le CD22 est exprimé principalement dans le cytoplasme et très faiblement en surface.
- Le passage au stade Pré-Pré-B est caractérisé par une diminution de la densité d'expression du CD34 s'accompagnant d'une augmentation de la densité d'expression du CD10 et du sCD22.
- Au stade Pré-B, les cellules perdent l'expression du CD34, de la TdT et montrent une expression maximale du CD10. L'expression du CD22 continue d'augmenter en surface alors que des chaînes légères « mu » d'Ig apparaissent dans le cytoplasme de ces cellules.
- Le passage au stade B précoce va être caractérisé par la disparition progressive du CD10, l'augmentation de l'expression du sCD22, l'apparition du CD20, des chaînes Ig D et Ig M en surface. L'apparition des chaînes d'Ig s'accompagne de l'expression du CD79b.

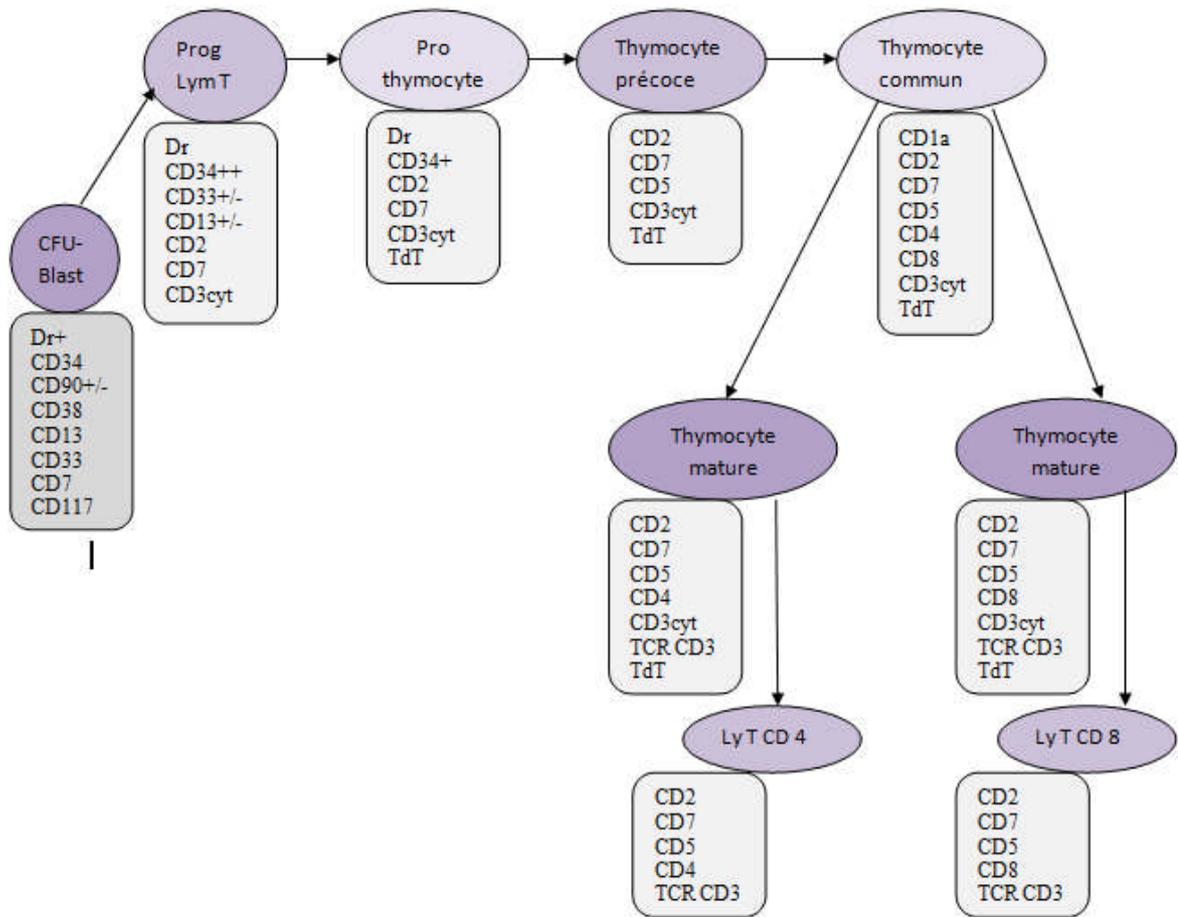
- Du stade B précoce jusqu'au stade B mature, on observe une augmentation progressive de la densité d'expression du CD20, du sCD22, des chaînes légères et lourdes d'Ig ainsi que du CD79b. Leur densité maximale d'expression est atteinte au stade de lymphocyte B mature (voir figure 26).



**Figure 26:** Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation lymphocytaire B [128].

### II.6.2. L'expression des antigènes de la lignée lymphoïde T en fonction des stades de différenciation

Les progéniteurs de la lignée lymphoïde T quitte rapidement le compartiment médullaire pour poursuivre leur maturation au niveau du thymus. La figure 27 résume les stades de différenciation permettant d'aboutir au lymphocyte T mature.



**Figure 27:** Différents stades de maturation du lymphocyte T [128].

Les cellules progénitrices de la lignée lymphoïde T sont issues du CFU- L (Colony Forming Unit lymphoïde) à aspect blastique (immature). Elles sont caractérisées par l’expression du HLADR, du CD34, de la TdT et montrent une positivité pour le CD2 et le CD7. Il est à noter qu’une petite proportion de ces cellules peut montrer une expression faible du CD13, du CD33 ainsi que du cytCD3 dans leur cytoplasme. Ces cellules vont gagner le thymus pour y poursuivre leur maturation.

- Au stade de Pro Thymocyte, les cellules T montrent une expression du cyCD3, du CD34, du HLADR, du CD2, du CD7 et de la TdT.
- Par la suite, ces cellules perdront l’expression du HLADR, du CD34 et acquerront l’expression du CD5. On parle alors de Thymocyte précoce.
- Au stade du Thymocyte commun, les cellules T exprimeront le CD1a, le CD2, le cytCD3, le CD5, le CD7, le CD4 et le CD8. Elles restent positives pour la TdT et

commencent à exprimer avec une faible densité du CD3 en surface. Une certaine proportion de ces cellules T montre une positivité pour le CD10.

- Au stade final de maturation, ces cellules T perdront l'expression du TdT et montreront une expression du sCD3 (CD3 de surface) ainsi que du CD4 ou du CD8 selon le type de cellules T matures auxquelles elles vont donner naissance. On parle alors de « Thymocyte mature ». Ces cellules T quitteront le thymus pour circuler dans l'organisme sous forme de lymphocytes T matures.

### **II.6.3. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules myéloïdes**

#### **II.6.3.1. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée granuleuse**

Les CFU-G (Colony Forming Unit of Granulocyte) vont donner naissance aux myéloblastes (voir annexe 1) qui vont être caractérisés par la diminution de l'expression du CD34, du CD13, du HLADR et une augmentation de la proportion de cellules exprimant le CD11c. Ces cellules commencent à exprimer le CD15 avec une expression faible et montrent une expression maximale du CD33.

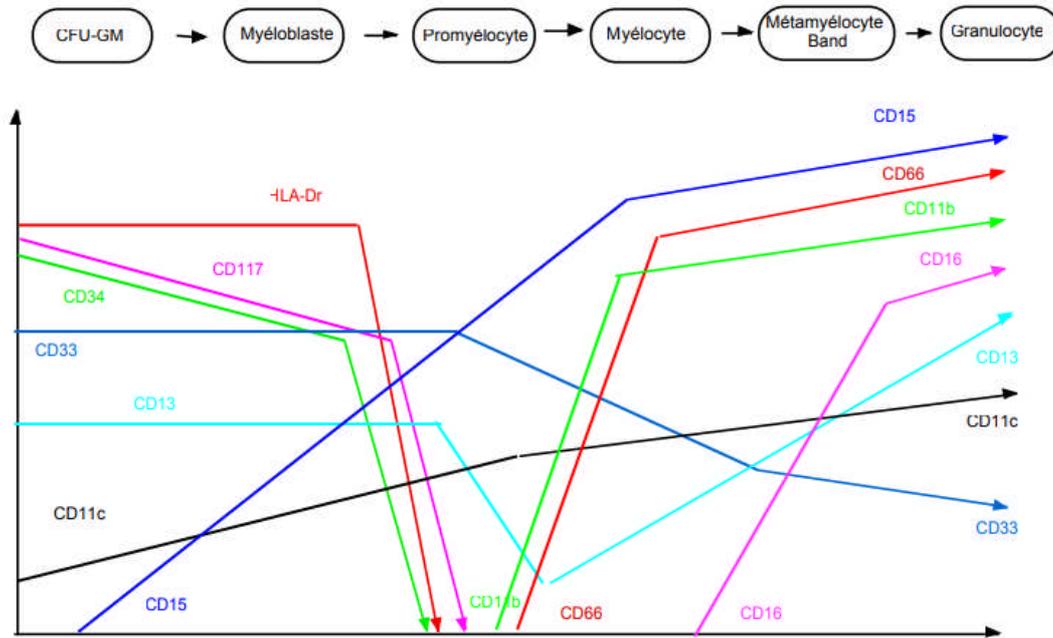
- Au stade de promyélocyte, les cellules perdent l'expression du CD34 et du HLADR. L'expression du CD11c augmente faiblement, le CD15 est exprimé par la majorité de ces cellules. Le CD117 n'est plus exprimé que par une petite proportion de ces cellules.

- Une diminution de l'expression du CD13 et une augmentation importante des caractéristiques structurales signalent le passage du promyélocyte vers le myélocyte. Les myélocytes sont caractérisés par une expression faible du CD13 et montrent une augmentation de la densité d'expression du CD15, du CD11c. L'expression du CD33 commence à diminuer.

- Le passage du myélocyte au métamyélocyte est caractérisé par l'augmentation de la densité d'expression du CD11b, du CD11c, du CD13 et du CD15. Ce stade est caractérisé par une faible apparition du CD16 avec la diminution d'expression du CD33.

- Enfin, la densité d'expression du CD11b, du CD13 et du CD16 continuera d'augmenter pour atteindre un maximum d'expression au stade de granulocyte mature.

La figure 28 résume les variations de la densité d'expression des différents marqueurs impliqués dans le processus de maturation des cellules de la lignée granuleuse.

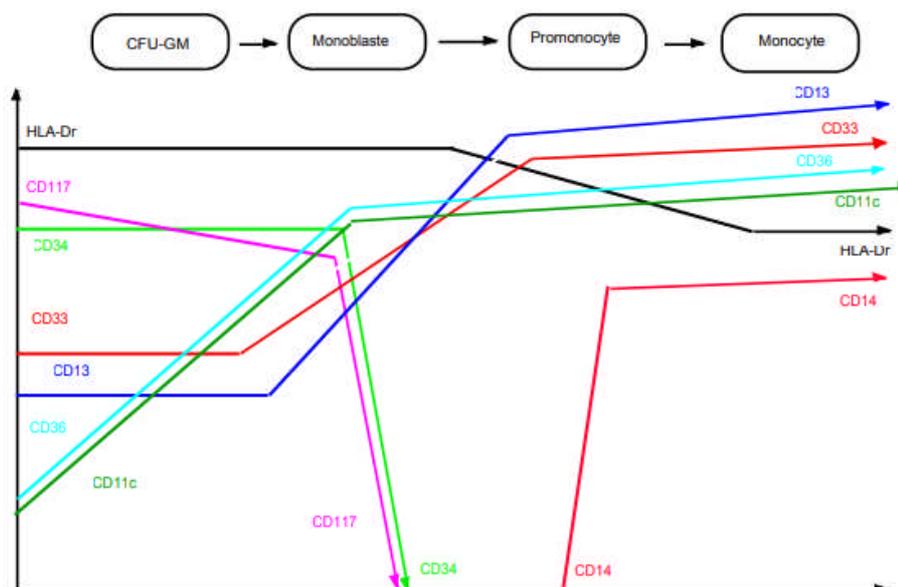


**Figure 28:** Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation de la lignée granuleuse [128].

### II.6.3.2. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire [52]

Le CFU-M (Colony Forming Unit of Monocyt) donnera naissance au monoblaste (**voir annexe1**) caractérisé par une diminution de l'expression du CD34 qui devient rapidement négative. Tout au cours du processus de maturation, on va observer une augmentation de la densité d'expression du CD13, du CD33, du CD11c, du CD36 ainsi que du CD11b qui devient maximale au stade de monocyte mature. Le passage du promonocyte au monocyte est caractérisé par l'apparition de l'expression du CD14.

Il est à noter que les cellules de la lignée monocyttaire garderont l'expression du HLADR tout au long du processus de maturation. On observe une légère diminution du niveau d'expression de cette molécule jusqu'au stade de monocyte mature et une élévation marquée de l'expression du CD45 depuis le monoblaste jusqu'au monocyte mature. Le CD15 est exprimé par les cellules de cette lignée mais avec une plus faible densité d'expression que les granulocytes. La figure 29 montre les variations d'expression des antigènes de surface au cours de la maturation des cellules monocyttaire.



**Figure 29:** Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de la différenciation monocyttaire [128].

### II.6.3.3. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée érythroïde [17]

Au stade de CFU-GEMM (Colony Forming Unit of Granulocyt, Erythroid, Monocyt and megacaryocyt) (**voir annexe 1**), on peut observer des cellules montrant une expression du CD34, du CD117, du CD13, du CD33, du CD36 et du CD11c. Les cellules qui s'engagent dans la lignée érythroïde perdent l'expression du CD11c et montrent une augmentation de l'expression du CD36 avec la diminution de l'expression du CD45, du CD34 puis du CD117. Les proérythroblastes peuvent être caractérisés par une expression faible du CD45, du CD34, du CD117 et une positivité du CD36 et du CD71.

Avec la maturation, on observe une augmentation de la densité d'expression du CD36, du CD71 et toutes les cellules deviennent positives pour la Glycophorine A. Le CD45 n'est plus exprimé au stade d'érythroblaste. En fin de maturation, les cellules érythroïdes ne sont plus positives que pour la Glycophorine A.

### II.6.3.4. L'expression des molécules de surface au cours de la différenciation des cellules de la lignée plaquettaire [17,45]

Du stade de CFU-GEMM (Colony Forming Unit of Granulocyt, Erythroid, Monocyt and megacaryocyt) (**voir annexe 1**), les cellules qui vont s'engager vers la lignée plaquettaire exprimeront faiblement le CD61 et le CD36. Au stade de mégacaryoblaste, les cellules vont perdre l'expression du CD45, du CD34, du CD33 et voir une augmentation de l'expression

du CD36 et du CD61. Elles vont acquérir l'expression du CD41 et du CD42 au stade de mégacaryocyte. Les plaquettes présentent une positivité pour le CD41, le CD42 et le CD61.

## **II .7. Identification des marqueurs immunophénotypiques présents sur les cellules leucémiques et absents sur les cellules normales**

Contrairement à la cytologie, la CMF va donc permettre de différencier les blastes leucémiques des hématogones et des lymphocytes activés. Cependant, depuis de nombreuses années il a été remarqué que les cellules leucémiques expriment de façon aberrante certains marqueurs, créant ainsi un immunophénotype aberrant spécifique du clone leucémique. Ces immunophénotypes aberrants sont retrouvés dans la littérature sous le terme de « Leukemia-associated aberrant immunophénotypes » ou LAIP [129].

On distingue 4 catégories de LAIP :

- **Les LAIP de type surexpression antigénique :** comme pour les CD10, CD123 et CD58 dans les LAL-B, les CD99, CD7, et l'association CD4/CD8 dans les LAL-T.
- **Les LAIP de type diminution d'expression d'antigènes :** comme pour les CD45, CD81, CD38 ans les LAL-B, et le CD2 et le CD45 dans les LAL-T.
- **Les LAIP de type asynchronisme:** certains marqueurs ne sont exprimés qu'à un stade de différenciation pendant le développement cellulaire normal. Par exemple les marqueurs de cellules immatures de la lignée T ne sont normalement retrouvés que sur les thymocytes qui ne sont jamais présents dans la moelle ou le sang. De plus, la co-expression d'antigènes spécifiques de cellules immatures comme le CD3 intracytoplasmique avec des antigènes de cellules matures de la même lignée comme le CD5, alors que le CD3 de surface est absent, est évocatrice de leucémie (CD5+/cytCD3+/sCD3-).
- **Les LAIP de type infidélité de lignée:** co-expression aberrante d'antigènes de lignées cellulaires différentes. Par exemple, co-expression de marqueurs de lignée B et T (CD4 et CD19), expression d'antigènes myéloïdes sur des lymphoblastes.

# Problématique

En Algérie, les travaux publiés [130], [33], [131] semblent indiquer que l'incidence de la leucémie aigue est en augmentation permanente et pose d'énormes difficultés tant diagnostiques que thérapeutiques.

Cependant, le diagnostic des LA repose depuis de nombreuses années sur l'analyse des données cytologiques et cytochimiques de frottis sanguins et médullaires, qui sont à la base de la classification proposée par le groupe coopératif FAB. Des avancées toutefois insuffisantes ont été constatées. Les colorations cytochimiques simples particulièrement le noir soudan, ne sont pas pratiquées systématiquement. La CMF, quant à elle n'est réalisée que dans 30% des cas en moyenne, c'est le seul examen qui permet d'individualiser les différents sous-groupes de LA surtout quand le diagnostic n'a pas pu être porté par les études cytologiques et cytochimiques (27 sur 73 cas) [132].

La CMF reste le seul examen qui permet, d'une part de classer les LAL selon leur phénotype B ou T et d'autre part de mettre en évidence une entité rare : la leucémie aigüe biphénotypique retrouvée dans 10, 2% des cas [132], une entité actuellement classée comme LA de phénotype mixte entrant dans le groupe des leucémies aigües de lignée ambiguë [61], [11].

Selon les résultats des différentes études nationales et internationales sur le profil immunophénotypique des LA de « novo » on a constaté des spécificités et des caractéristiques phénotypiques.

Une étude nationale [133] sur l'immunophénotypage par CMF des LA non lymphoblastiques, retrouve une prédominance du profil immunophénotypique de la LAM5, ce qui n'est pas fréquent selon les données de la littérature [134], [135]. Dans le typage immunologique des LAL, une divergence des résultats a été observée, un taux de LAL T élevé 49% [136] versus 15 % [137]. Ce taux élevé des LALT a été rapporté dans d'autres publications [135], [138].

Concernant l'utilisation des combinaisons antigéniques il à été constaté que l'association de : CD13/CD33/CD117 et MPO a permis de classer 100% des leucémies aigües en LAM [139].

Cependant, très peu d'études nationales portants sur le diagnostic des LA biphénotypique ou MPAL existent, et celles retrouvées [136] sont difficiles à comparer aux données de la littérature [140] vu la faible taille de l'échantillon.

L'immunophénotypage permet de palier aux insuffisances de la classification FAB et de mieux caractériser le clone leucémique, par la mise en évidence de certains antigènes de surface des cellules blastiques dont l'expression peut influencer le pronostic [8,141].

L'étude de la valeur pronostique de l'immunophénotypage inclus les expressions antigéniques telles que l'HLA-DR, CD34, CD117, CD33, CD7, CD2, CD4, CD15, dont l'impact pronostique en termes de rémission complète (RC) et de survie globale (OS) a été rapporté dans la littérature [12], [13].

En Algérie, le diagnostic des LA à reposé longtemps sur l'étude cytomorphologique du groupe FAB, ceci à posé d'énormes difficultés dans le diagnostic et la classification des LA.

A cet effet, nous avons procédé en 2012 à la mise en place de la technique de CMF pour le diagnostic et la classification des LA au laboratoire d'hémobiologie du CHU de Tizi Ouzou.

La CMF est le seul examen qui permet de déterminer l'appartenance de la LA à une lignée cellulaire lymphoïde T, B ou myéloïde, de préciser le niveau de différenciation de la lignée, d'identifier le stade de maturation des LAL T et B (TI, TII, TIII, TIV – BI, BII, BIII, BIV), de mettre en évidence des entités rares LA (LA biphénotypique, MPAL, LAM0, LA cellules dendritiques, ...etc), de mettre en évidence des Ag à la surface des blastes dont l'expression peut influencer le pronostic en terme de OS, l'HLADR, CD34, CD117, CD13, CD33, CD7, CD2, CD15.

Enfin, la CMF palie aux insuffisances de la classification FAB, permet de mieux caractériser le clone leucémique, ce qui permet un diagnostic et une classification plus fine des LA, ainsi une prise en charge précoce et un traitement adéquat.

C'est pourquoi nous proposons dans ce travail, d'étudier le profil immunophénotypique des LA de « novo » chez l'enfant et l'adulte dans la région de Tizi Ouzou dans le cadre d'une étude transversale, prospective afin de comparer nos résultats à ceux obtenus dans les études nationales et internationales, ce qui nous permettra un diagnostic et une classification plus juste des LA.

# Objectifs

## Objectifs

---

Nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

### **Objectif principal**

Déterminer le profil immunophénotypique des cas de leucémies aiguës de « novo » par cytométrie en flux chez l'enfant et l'adulte dans la région de Tizi Ouzou.

### **Objectifs secondaires**

- Décrire le profil épidémiologique de notre population d'étude ;
- Déterminer les différents sous types de leucémies aiguës de « novo » selon la classification cytologique de FAB ;
- Etudier l'association du pronostic aux différentes expressions antigéniques ;
- Rechercher d'éventuels phénotypes aberrants et leurs significations pronostiques ;
- Etudier la concordance entre la classification immunophénotypique des leucémies aiguës de « novo » selon E.G.I.L et la classification cytologique du groupe FAB.

**Partie 2**

**Travail  
Pratique**

**I**

**Matériels et  
méthodes**

### 1. Matériels

#### 1.1. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive. La procédure de l'étude est observationnelle avec une chronologie prospective.

La date de diagnostic choisie est celle qui se rapproche le plus de la date de réalisation du myélogramme et de la cytométrie en flux.

#### 1.2. Population étudiée

L'étude a concerné tous les nouveaux cas de leucémies aiguës pris en charge dans le service d'Hématologie adulte et de l'unité d'Onco-hématologie pédiatrique du CHU de Tizi Ouzou, et répondants aux critères d'inclusion.

#### 1.3. Critères d'inclusion

- Patients de tous les âges (enfants et adultes),
- Tous les nouveaux cas de leucémies aiguës hospitalisés pour la 1<sup>ère</sup> fois au CHU de Tizi Ouzou.

#### 1.4. Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'étude les patients :

- Avec antécédents de leucémies aiguës ;
- En rechute de leucémies aiguës ;
- Avec antécédents de cancers solides ;
- Avec antécédents de traitement antinéoplasique (chimiothérapie, radiothérapie) ;
- Avec antécédents de syndromes myélodysplasiques ;
- Participants en même temps à une autre étude clinique ou à des phases d'essais cliniques ;
- Sans médullogramme ;
- Présentent une sérologie HIV positive, hépatite B chronique active ou hépatite C ;
- Non suivis au CHU de Tizi Ouzou.

### 1.5. Période de l'étude

Le recrutement des patients s'est étalé sur une période de 6 ans soit 72 mois allant de janvier 2013 au 31 décembre 2018. Pour l'étude du délai de survie globale, ou la probabilité de survie, nous avons fixé la date limite au 30 novembre 2019.

### 1.6. Lieux de l'étude

- Laboratoire d'Hémobiologie du CHU Tizi-Ouzou: réception des prélèvements au niveau de l'unité de cytologie et leur traitement (étude cytomorphologique et immunophénotypique pour un diagnostic de leucémies aiguës selon les modalités définies dans la partie méthodologie.
- Service d'Hématologie adulte et unité Onco-hématologie pédiatrique du CHU Tizi-Ouzou : consultation des dossiers et fiches de consultations des patients sélectionnés pour compléments de renseignements clinico-biologiques et thérapeutiques.

### 1.7. Taille échantillonnale

La taille échantillonnale a été calculée sur la base de la prévalence européenne des leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes chez l'enfant et l'adulte à partir des données du groupe de travail européen sur le cancer RARECARE [142], faites de données nationale.

Le calcul de la taille échantillonnale a été effectué par la formule suivante :

$$n = t^2 \times p \times (1-p) / m^2$$

**n** : Taille d'échantillon minimale pour l'obtention de résultats significatifs pour un événement et un niveau de risque fixé ;

**t** : Niveau de confiance (la valeur type du niveau de confiance de 95 % sera 1,96) ;

**p** : proportion estimée de la population qui présente la maladie. La prévalence mondiale est entre 10 à 15 % des cas de LA sur l'ensemble des hémopathies malignes[142] ; elle représente aussi moins de 3% sur l'ensemble des cancers [143].

**m** : Marge d'erreur (généralement fixée à 5 %).

$$n = 1,96^2 \times 0,1 \times 0,9 / 0,05^2 = 138$$

**Soit un effectif de 138 au minimum si p=10%**

Ainsi, le nombre de LA nouvellement diagnostiqué et répondants à nos critères d'inclusions était de **234 cas**, sur un pool total de **340 patients** hospitalisés pour leucémies aiguës quelque soit le critère de survenue.

## 2. Méthode de travail

Au cours de cette étude nous avons adopté la démarche suivante :

### 2.1. Phase pré analytique

Pour chaque patient, devant une suspicion d'une LA, le service clinique nous adresse :

- Un prélèvement sanguin sur tube en plastique avec anticoagulants EDTA (4ml) pour effectuer un hémogramme ;
- Un prélèvement médullaire constitué d'environ 0,5 à 1 ml d'une aspiration de moelle osseuse collectée dans un tube en plastique avec anticoagulant EDTA, pour confectionner des frottis médullaires et effectuer un immunomarquage par CMF. Brooimans et al [144] définissent à 2 ml obtenus en une seule ponction par une seule aspiration de moelle, le volume maximal prélevé pour obtenir un prélèvement représentatif de la richesse médullaire.
- Des lames de frottis médullaire effectués par la technique d'écrasement de grain.

Pour le suivi des patients dans notre étude, les données ont été recueillies à partir des dossiers de patients disponibles dans le service d'Hématologie adultes et l'unité Onco-hématologie de pédiatrie, que nous avons consulté de manière individuelle et anonyme.

Dans le cadre de l'optimisation de l'exploitation des dossiers et en vue de les standardiser nous avons établi une fiche de renseignements (**voir annexe 2**) qui comprend trois volets :

- a-** Volet identification du patient et antécédents ;
- b-** Volet clinique et biologique ;
- c-** Volet thérapeutique.

### 2.2. Phase analytique

Nous avons réalisé pour chaque patient :

- Un hémogramme ;
- Un frottis sanguin pour déterminer l'équilibre leucocytaire et un éventuel taux de blastes.
- Confection de frottis médullaires et coloration, puis lecture afin de déterminer le nombre de mégacaryocytes, pourcentage de blastes, pourcentage de la lignée granuleuse, pourcentage de la lignée érythrocytaire, pourcentage des mononuclées, et rechercher d'éventuels signes de myélodysplasie. (Voir volet biologique de **l'annexe 2**) ;
  
- Coloration cytochimique au Noir Soudan (NS) sur frottis médullaire : pour la distinction entre la lignée lymphoïde et myéloïde des éléments blastiques. (Le noir soudan a été réalisé de façon systématique, quelque soit le sous-type FAB ;
  
- L'immunophénotypage par CMF sur prélèvement sanguin ou médullaire, dans les 6 heures.

#### 2.2.1. Etude cyto hématologique

##### 2.2.1.1. Hémogramme

- L'hémogramme a été réalisé sur les analyseurs d'hématologie : Advia 2120 (Siemens) et l'XT-1800 (Sysmex).

L'hémogramme doit contenir au minimum les éléments suivants :

- Numération Globulaire : leucocytes, globules rouges, numération plaquettaire
  - Les constantes hématimétriques : Hématocrite, VGM, CCMH, TCMH,
  - Formule Leucocytaire : Granulocytes neutrophiles, Granulocytes éosinophiles, Granulocytes basophiles, Lymphocytes, Monocytes, Autres types cellulaires.
- 
- Les frottis sanguins et médullaires effectués pour tous les patients sont colorés au Wright.

### 2.2.1.2. Frottis sanguins et médullaires : principe de coloration

La coloration de Wright des frottis médullaires et sanguins a été réalisée par l'automate Hématek 2000 de Bayer. La coloration de Wright permet la réalisation de l'équilibre sanguin et médullaire. Le colorant de Wright est un mélange de Bleu de méthylène, d'éosine et d'azur de méthylène. Il fixe le frottis par son alcool méthylique et comme tous les colorants neutres en solution alcoolique, il ne libère son activité colorante qu'après additions d'eau tamponnée.

#### ☞ Réactifs nécessaires

- Colorant de Wright en solution à 0.3%, tamponnée à un pH = 6.8 dans du méthanol ;
- Tampon en solution pour Wright : un mélange de phosphate et de sodium et de phosphate de potassium 0.0083 Molaire, pH = 7.2

#### ☞ Protocole de coloration au Wright sur automate fermé « l'Hématek 2000 de Bayer »

Une fois les lames placées au niveau de l'automate, rapidement sont couvertes avec 1mL de colorant de Wright en solution pendant 1 min ; puis rincés dans deux bains de tampon en solution pour Wright pendant 1 min chacun.

#### ☞ Critères de lecture

- Noyaux : violet tirant sur le bleu foncé,
- Globules rouges : rose, gris rose, gris « chamois »,
- Cytoplasmes basophiles : bleu ciel à bleu foncé,
- Cytoplasmes acidophiles : rouge clair ou rosé,
- Cytoplasme des cellules monocytaires : gris clair à gris bleuté,
- Granulations des polynucléaires neutrophiles : marron, rose sale,
- Granulations des polynucléaires éosinophiles : orangées,
- Granulations basophiles et des mastocytes : violet foncé à rouge pourpre.

#### ☞ L'observation à la microscopie optique

Le faible grossissement (Objx10) : permet de contrôler la qualité du frottis sanguin et d'apprécier la richesse cellulaire.

Le fort grossissement (Obj x100 à immersion) ; permet :

- D'observer la morphologie des cellules sanguines, de déterminer les pourcentages et les valeurs absolues de diverses sous-populations leucocytaires, le comptage se fait sur 100 globules blancs (*l'équilibre leucocytaire*) ;
- La détection des éventuelles anomalies dans les 3 lignées sanguines en l'occurrence la recherche et la description des cellules blastiques ;
- Réalisation du décompte en % sur 100 éléments cellulaires nucléés pour le frottis médullaire.

La classification FAB des sous-groupes de LA est basée sur l'appréciation du pourcentage et de l'aspect cytomorphologique des blastes dans la moelle. Le diagnostic de LA a été porté dès qu'il y avait plus de **20 % de blastes** dans la moelle osseuse et ou le sang.

### 2.2.2. Etude cytochimique : Réaction au noir soudan

#### 2.2.2.1. Principe

Le noir soudan possède une forte affinité pour les lipides et donne une coloration intense. La réaction est basée sur la propriété des graisses d'être solvants de certains colorants et de les déplacer de leurs solutions alcooliques. Les lipides sont présents dans le cytoplasme des granuleux et des monocytes.

#### 2.2.2.2. Mode opératoire

##### *Réactifs*

1. Formol (vapeurs)
2. Solution de coloration :
  - Sol A = Noir soudan .....0.30g  
Ethanol absolu .....100ml
  - Sol B = Phénol cristallisé.....16g,  
Ethanol absolu.....30ml,  
Eau distillée.....100ml,  
Phosphate disodique.....0.30g.
  - Sol C = Sol A ..... 60ml,  
Sol B.....40 ml = solution du travail.
3. Ethanol à 70% : 70 ml d'éthanol absolu pour 30 ml d'eau distillée

4. Solution de GIEMSA à 10% dans l'eau tamponnée à 7 :

- GIEMSA.....7ml
- Eau distillée.....qsp.....100ml

### *Technique*

- Effectuer les frottis sur les lames parfaitement dégraissées, sécher à l'air,
- Immerger les lames pendant 1h à température ambiante dans la solution filtrée dans un bac de coloration,
- Rincer dans l'éthanol 70% plusieurs fois,
- Rincer à l'eau distillée,
- Sécher et contre colorer 30mins dans la solution de GIEMSA à 10%,
- Rincer à l'eau distillée et sécher à l'air.

### *Interprétation*

La réaction positive au noir soudan se traduit par la présence de grains bruns foncés. Elle est considérée comme positive si le taux de blastes positifs au NS est  $\geq 3\%$  des cellules blastiques.

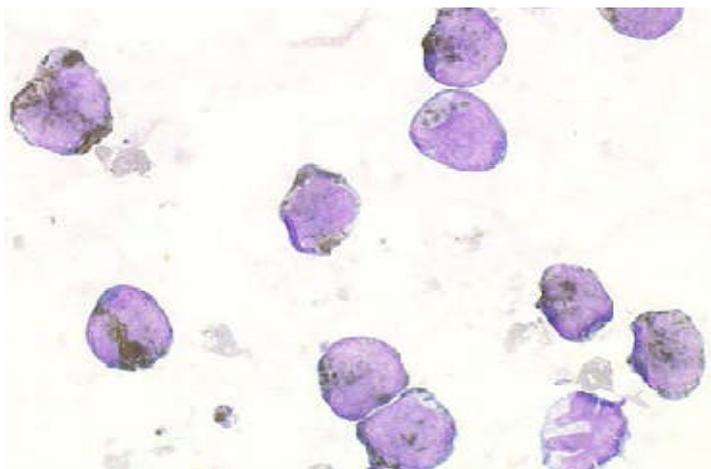
- Si le pourcentage des cellules blastiques contenant des grains colorés en brun foncé est  $\geq 3\%$  on parle de réaction positive ;
- Si le pourcentage des cellules blastiques contenant des grains colorés en brun foncé est  $< 3\%$  on parle de réaction négative.

Dans les LAM la réaction est souvent positive  $\geq 3\%$

Dans les LAL la réaction est souvent négative  $< 3\%$

Les aspects de la positivité de la réaction du noir soudan sont les suivants :

- Myéloblastes : positivité focale (uniquement à un pôle de la cellule) cas de la LAM2 (voir figure 30) ou au contraire positivité majeure et dans toute les cellules cas des LAM3,
- Monoblastes : positivité en petits grains dispersés ou absence de positivité LAM5,
- La réaction est négative dans la LAM0 et la LAM7.



**Figure 30:** Réaction du noir Soudan (nettement positive au cours d'une LAM2) [64].

### 2.2.3. Calcul de l'indice de pureté de la moelle

Les microtraumatismes engendrés lors du geste de prélèvement médullaire peuvent provoquer des ruptures des vaisseaux capillaires, les cellules sanguines ainsi libérées, peuvent facilement être aspirées, contaminant le prélèvement de moelle, c'est ce qu'on appelle l'hémomodilution. Lors de toute analyse de moelle osseuse en CMF, il est primordial de savoir si l'échantillon sur lequel nous travaillons est de bonne qualité, c'est à dire représentatif du tissu médullaire (moelle osseuse peu diluée). Nous avons évalué l'hémomodilution de deux façons :

#### 2.2.3.1. Par la méthode d'Holdrinet [145]

L'indice de pureté est calculé selon la formule décrite par Holdrinet :

$$\text{Indice de pureté (\%)} = 1 - \frac{\text{[Hémoglobine]}}{\text{[Hémoglobine] + [Hématocrite]}} \times 100$$

Si le prélèvements de moelle est suffisant, on réalise une dilution au 1/10<sup>ème</sup> du suc médullaire dans du tampon Phosphate Bis Sulfate (PBS) avant d'être passés sur un automate de cytologie, SYSMEX XT-1800, pour qu'une numération soit effectuée.

Le prélèvement sanguin datant du même jour que celui de la moelle est passé sur l'automate de cytologie hématologique SYSMEX XT-1800 afin qu'une numération des globules rouges et leucocytes du sang soit aussi effectuée.

On parle de moelles très pures si l'indice de pureté est  $\geq 70\%$ , moelles de pureté intermédiaire si  $50\% \leq$  Indice de pureté  $< 70\%$ , moelles diluées si l'indice de pureté est  $< 50\%$ . Nous avons exclus de notre étude les moelles diluées.

### **2.2.3.2. Par l'étude cytologique d'un frottis effectué à partir de la suspension cellulaire du prélèvement de moelle osseuse**

Quelque soit la quantité du prélèvement de moelle adressée, nous avons estimé pour chaque échantillon la richesse de la moelle en éléments blastiques, que nous cherchons à phénotyper, ainsi qu'en d'autres cellules sanguines.

### **2.2.4. Etude immunologique par cytométrie en flux**

#### **2.2.4.1. Réglage du cytomètre de flux**

Nous avons utilisé le cytomètre type EPICS-XL-MCL, de chez Beckman Coulter, de 4 couleurs munie d'un laser bleu avec une longueur d'onde d'excitation de 488nm pour les quatre détecteurs : FL1,FL2,FL3,FL4.

Suite à la panne du Cytomètre EPICS-XL en 2017, nous avons utilisé un deuxième cytomètre type « BD- ACCURI 6C de chez Beckton Dickinson » à 4 couleurs et munie de deux lasers : un laser bleu avec une longueur d'onde d'excitation de 488nm pour les trois détecteurs : FL1,FL2,FL3 et un laser rouge avec une longueur d'onde d'excitation de 640 nm pour le détecteur : FL4. Cependant, le principe de fonctionnement des deux cytomètres est identique.

Avant de pouvoir utiliser le cytomètre, il est important de faire plusieurs réglages sur l'appareil.

#### **2.2.4.2. Contrôle de l'alignement du laser**

La qualité des résultats, en termes de sensibilité et de discrimination, dépend de l'optimisation de l'alignement du laser qui constitue l'étape essentielle lors de la préparation d'un cytomètre à flux. Il s'agit d'optimiser l'intersection entre le flux de cellules et le faisceau laser, que l'on effectue le plus souvent en utilisant des billes calibrées « c'est le réactif *Flow Chek* de Beckman Coulter », le meilleur réglage est atteint lorsque l'analyse donne un maximum de fluorescence avec un pic très étroit  $CV \leq 1\%$  [146].

Avec le cytomètre type « *BD- ACCURI 6C* », une fois ce réglage effectué nous avons passé des billes de contrôle appelées : *Flow Set* de chez Beckton-Dickinson, pour fixer les valeurs cibles de sensibilité correspondant au réglage du laser avec une précision dans la fluorescence si le CV est  $< 3\%$  [147].

Cependant, les réglages nécessaires à l'acquisition des données sont de deux types :

- Les réglages de l'amplification du signal capté par les PMT, et la compensation ;
- Les réglages d'analyse, qui permettent d'interpréter les résultats.

### 2.2.4.3. Réglage des PMT

Nous avons travaillé avec une sensibilité constante des cytomètres. Pour cela nous avons dans un premier temps effectué un premier réglage de sensibilité de la manière suivante :

- Le réglage des photomultiplicateurs a été réalisé sur un mélange de cellules normales et blastiques mono marquées par 04 types d'anticorps portant chacun un type de fluorochrome.
- Le voltage de chaque photomultiplicateur a été ajusté pour que 95% des évènements négatifs apparaissent dans la première décade de l'histogramme biparamétrique.
- Aussi, pour vérifier la qualité de la fluorescence nous avons utilisé des billes fluorescentes dont le coefficient de variation (CV) des billes les plus brillantes doit être  $\leq 1\%$  dans le cytomètre EPIX-XL et  $< 5\%$  dans le cytomètre BD- ACCURI 6C.

### 2.2.4.4. Détermination du seuil (threshold) et du déclencheur (trigger)

Il s'agit de vérifier l'obtention d'une séparation visible entre les cellules positives et les cellules négatives.

*Le déclencheur (trigger) et le seuil (threshold) ou discriminateur* sont deux composants fondamentaux dans la chaîne de traitement du signal. Le déclencheur correspond au paramètre que l'opérateur choisit pour que l'appareil effectue une mesure sur une particule. Pour le réglage du seuil (*threshold*) est très important car s'il est trop élevé, les particules les plus petites (lymphocytes par exemple) ne seront pas analysées et les résultats seront biaisés. A l'inverse, si le seuil est trop bas, un grand nombre de débris est analysé et

risque de nuire à la qualité et la précision des résultats. Il faut donc bien ajuster le seuil pour éliminer les débris et les bruits électroniques tout en conservant les plus petites cellules.

Les contrôles négatifs sont des cellules non marquées ou non fluorescente qui sont employées pour déterminer le seuil de positivité et de négativité de la population d'étude.

### 2.2.4.5. Compensations des fluorescences

Les spectres d'émission des différents fluorochromes peuvent se chevaucher.

Le signal émis par un fluorochrome sera donc détecté par le photomultiplicateur (PMT) qui lui est dédié, mais également par le PMT voisin vers lequel il « fuit ». Si cette « fuite » n'est pas prise en compte dans l'analyse, elle faussera donc le résultat de MFI (moyenne d'intensité de fluorescence). Au niveau de chaque PMT, la compensation est une transformation mathématique consistant à soustraire les signaux non spécifiques provenant des autres fluorochromes.

Le problème posé est donc : un signal fort dans un PMT1 peut provoquer un signal dans un PMT2 sans qu'aucun événement ne soit positif pour la couleur destinée au PMT2.

Ceci produit parfois une fausse réponse positive. Il est donc indispensable de retrancher électroniquement un certain pourcentage de la fluorescence parasite : *c'est la compensation*.

Actuellement, sont intégrés aux cytomètres des applications logicielles spécifiques (matrice de compensation), permettant le réglage automatique des compensations et de vérifier la stabilité du laser dans le temps. Ceci a permis de gagner du temps et d'éviter les erreurs du réglage manuel.

La solution informatique est simple en théorie : pour corriger l'intensité lumineuse émise par un fluorochrome, perçue en trop par un PMT, on soustrait à ce signal une proportion du signal produit par le PMT destiné à ce fluorochrome.

En pratique, on obtient une matrice de compensation, puisque le signal de chaque PMT doit être compensé pour les signaux de chacun des autres.

Lors de la compensation, il faut prendre en considération les points suivants :

- Ne jamais retoucher les voltages après avoir réglé les compensations car ces dernières dépendent des intensités de fluorescence analysées,
- Dans les cas de l'utilisation de tandems (PE-Cy5, PE-Cy7, APC-Cy7...), il y a des variations entre les lots et leurs propriétés spectrales se voient modifiées dans le temps. C'est pourquoi chaque tandem doit être utilisé pour sa propre compensation.

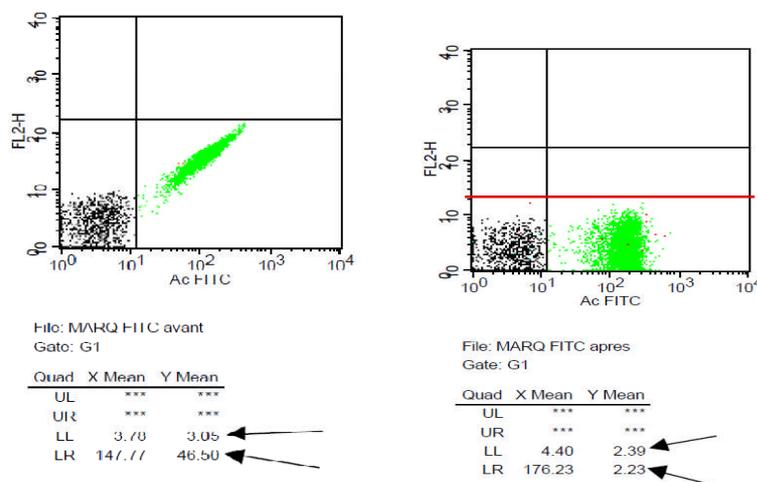
### 2.2.4.6. Les étapes de compensation en pratique

La compensation correcte est obtenue quand la médiane de la population positive à compenser devient la même que celle de la population négative c'est la méthode des médianes.

- ✓ **Marquage FITC (FL1) :** passage du tube avec un mono marquage FITC

Ajuster la compensation par la formule : **Signal out = FL2 - % FL1.**

La médiane (Mean) de la population **FITC** doit être inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL2**.



**Figure 31:** Compensation de la population en FL1

- ✓ **Marquage PE :** passage du tube marqué PE (2<sup>ème</sup> fluorescence)

Ajuster la compensation **FL1 - % FL2**, et le Mean de la population PE doit être inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL1**.

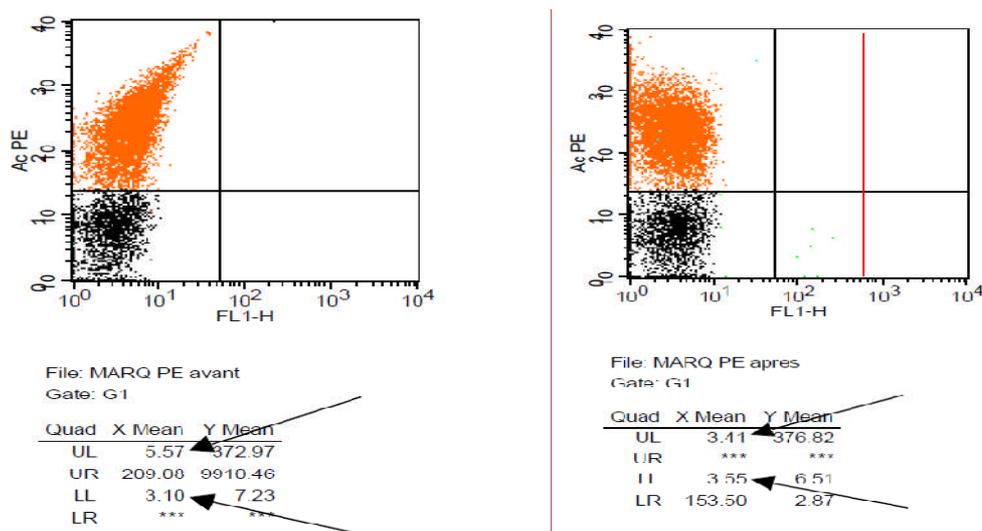


Figure 32: Compensation de la population en FL2

Aussi, il faut ajuster la compensation **FL3 - % FL2**, le principe est que, le Mean de la population marquée en **PE** doit être inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL3**.

✓ Pour le marquage en **FL3** et **FL4**, le réajustement de l'auto fluorescence s'effectue ainsi :

- **Marquage FL3** : passage du tube marqué par la 3<sup>ème</sup> fluorescence

Ce n'est pas nécessaire d'ajuster la compensation **FL2 - % FL3**, le Mean de la population en **FL3** est déjà inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL4**. Ajuster la compensation **FL4 - % FL3**, le Mean de la population en **FL3** doit être inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL4**.

- **Marquage FL4** : passage du tube marqué par la 4<sup>ème</sup> fluorescence

Ajuster la compensation **FL3 - % FL4**, le Mean de la population en **FL4** doit être inférieur ou égal à celui de la population négative sur l'axe de **FL3**.

Le contrôle du réglage des compensations a été effectué par des mono-marquages comme il est recommandé par plusieurs auteurs [148, 149]. C'est ce qui est représenté dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Contrôle des compensations [149]

<b>Tube</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Intérêt</b>
<b>1</b>	<i>Blanc</i>	Réglage des voltages (FS, SS, FL1, FL2, FL3, FL4)
<b>2</b>	CD3-FITC	Réglage des compensations du FITC par rapport à FL2, FL3 et FL4
<b>3</b>	CD8-PE	Réglage des compensations du PE par rapport à FL1, FL3 et FL4
<b>4</b>	CD45-ECD ou PerCPcy5.5	Réglage des compensations de l'ECD ou du PerCPcy5.5 par rapport à FL1, FL2 et FL4
<b>5</b>	CD4-PC5	Réglage des compensations du PC5 par rapport à FL1, FL2 et FL3
<b>6</b>	<b>CD3 FITC</b> <b>CD8 PE</b> <b>CD45 ECD</b> <b>CD4 PC5</b>	<b>Contrôle qualité de tout le réglage</b>

### **2.2.5. Choix des anticorps et panel utilisé**

L'immunomarquage des cellules blastiques est effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux de Beckman Coulter couplés à 04 fluorochromes différents (FITC, PE, ECD, PC5) compatibles avec le cytomètre type Beckman-Coulter EPICS- XL-MCL

Avec le cytomètre « ACCURI -6C », le seul changement est le fluorochrome qui marque l'anticorps monoclonal dirigé contre l'Ag pan leucocytaire : le CD45, à la place de L'ECD nous avons utilisé le PerCP Cy5.5 de Beckton Dickinson de Biosciences.

Le panel utilisé, en cas d'une suspicion d'une leucémie aigue est large, inspiré des recommandations des groupes de travail sur la CMF à savoir : le groupe EGIL, l'OMS 2008 (recommandations pour le diagnostic des entités rares de LA) et le groupe de travail brésilien sur la cytométrie en flux (GBCFLUX) [150].

Notre panel était composé de deux tubes, une combinaison de marqueurs exclusivement membranaires et une combinaison comprenant également des marqueurs intracytoplasmiques. Ce panel est résumé dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Panel d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic et la classification des LA par CMF à 4 couleurs

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD ou PerCPcy5.5</b>	<b>PC5</b>
<b>Tube 1</b>	<b>CD13</b>	<b>CD15</b>	<b>CD45</b>	<b>CD117</b>
<b>Tube 2</b>	<b>CD36</b>	<b>CD14</b>	<b>CD45</b>	<b>CD64</b>
<b>Tube 3</b>	<b>CD42b</b>	<b>CD41a</b>	<b>CD45</b>	/
<b>Tube 4</b>	<b>CD71</b>	<b>CD61</b>	<b>CD45</b>	/
<b>Tube 5</b>	/	<b>Glyco A</b>	<b>CD45</b>	/
<b>Tube 6</b>	<b>HLADR</b>	<b>CD13</b>	<b>CD45</b>	<b>CD34</b>
<b>Tube 7</b>	<b>CD19</b>	<b>CD10</b>	<b>CD45</b>	<b>CD20</b>
<b>Tube 8</b>	<b>CD33</b>	<b>CD7</b>	<b>CD45</b>	<b>CD2</b>
<b>Tube 9</b>	<b>CD3s</b>	<b>CD8</b>	<b>CD45</b>	<b>CD4</b>
<b>Tube10</b>	<b>CD4</b>	<b>CD16</b>	<b>CD45</b>	<b>CD56</b>
<b>Tube11</b>	<b>CD3s</b>	<b>CD1a</b>	<b>CD45</b>	<b>CD5</b>
<b>Tube12</b>	<b>Tdt</b>	<b>TCR <math>\alpha/\beta</math></b>	<b>CD45</b>	/
<b>Tube13</b>	<b>Igs</b>	<b>CD38</b>	<b>CD45</b>	<b>CD20</b>
<b>Tube14</b>	<b>CD19</b>	<b>CD22s</b>	<b>CD45</b>	<b>CD117</b>
<b>Tube15</b>	/	<b>CD38</b>	<b>CD45</b>	<b>CD34</b>
<b>Marquage intracytoplasmique</b>				
<b>Tube16</b>	<b>CD3cyt</b>	<b>MPO cyt</b>	<b>CD45</b>	<b>CD79a cyt</b>
<b>Tube17</b>	<b>Ch u cyt</b>	<b>CD22cyt</b>	<b>CD45</b>	/

(Si Ig s + à rechercher la monotypie Kappa ou lambda)

Pour choisir les anticorps qui allaient composer notre panel, il a fallu réfléchir à plusieurs contingences :

- Ils devaient nous permettre de différencier les cellules normales des cellules leucémiques. Le panel devait donc comprendre des anticorps dirigés contre des antigènes de cellules matures normales, contre des antigènes spécifiques d'immatrité et contre des marqueurs aberrants évoquant un LAIP,
- Il fallait que dans chaque tube on retrouve à la fois des marqueurs matures et des marqueurs immatures ou aberrants évocateurs de LAIP pour pouvoir différencier correctement les cellules normales des cellules leucémiques,

- Nous devons pouvoir classer les LA selon la classification EGIL.
- Les caractéristiques des différents anticorps sont présentées en **annexe 3**.

### 2.2.6. Technique d'immunomarquage

Pour tout immunomarquage sur prélèvement sanguin ou médullaire la technique de lyse sans lavage était utilisée :

Sur un prélèvement frais de moins de 24 h, 1ml qui est l'équivalent de 10 millions de cellules/millilitres (soit 10Giga/L) étaient prélevées et remises en suspension dans 500µl de tampon (PBS) afin d'obtenir une suspension à 20 millions de cellules par millilitres (soit 20Giga/L).

L'étude immunophénotypique des leucémies aiguës implique un double marquage : membranaire et intracytoplasmique.

#### 2.2.6.1. Marquage membranaire

- Dans des tubes Falcon, 50µl de cette suspension (soit 1 million de cellules) étaient incubés avec les anticorps marquant les antigènes de surface. L'incubation durait 15 minutes dans l'obscurité,
- Lavage des cellules avec un grand volume de la solution PBS par centrifugation, pendant 5 minutes à 1500 tours afin d'éliminer l'excès d'anticorps non fixés,
- Ajouter 2 ml de la Versa Lyse® dans chaque tube pour lyser les globules rouge et vortexer immédiatement,
- Incuber 10 mn à T° ambiante et à l'abri de la lumière,
- Centrifuger à 1500 tours pendant 5 mn et vider par retournement pour éliminer le surnageant puis resuspendre le culot dans 500 µl de PBS et lecture immédiat au cytomètre.

#### 2.2.6.2. Marquage intra cytoplasmique

- Distribuer de l'anti - CD 45 dans des tubes à Falcon puis ajouter 50µl de la suspension cellulaire
- Vortexer doucement tube à tube
- Incuber 15 mn à T° ambiante et à l'abri de la lumière
- Ajouter 200 µl du perméabilisant (réactif 1) dans chaque tube
- Vortexer énergiquement, immédiatement après chaque addition

- Incuber 15 mn à T° ambiante et à l'abri de la lumière
- Ajouter 4 ml de PBS dans chaque tube
- Centrifuger à 300 g (1100 trs) pendant 5 mn à T° ambiante
- Eliminer le surnageant par aspiration
- Ajouter 200 µl du fixateur (réactif 2) dans les tubes

Ne pas Vortexer, laisser le réactif 2 diffuser naturellement dans le culot

- Incuber 5 mn à T° ambiante
- Agiter doucement à la main pendant 2 à 3 secondes (à la main ou au vortexe)
- Ajouter dans les tubes les anticorps monoclonaux spécifiques d'Ag intra cytoplasmiques
- Vortexer doucement tube à tube
- Incuber 15 mn à T° ambiante et à l'abri de la lumière
- Ajouter 4 ml de PBS dans chaque tube
- Centrifuger à 300 g (1100 trs) pendant 5 mn à T° ambiante
- Eliminer le surnageant par aspiration, resuspendre le culot dans 500µl de PBS et passage immédiat au cytomètre en flux.

### 2.2.7. Acquisition des données

L'acquisition est conditionnée sur les cellules blastiques. Le nombre d'événements acquis est compris entre 10000 et 20000. Une population étant définie par un cluster d'au moins 20 points, 20 000 événements acquis au minimum, garantissent ainsi une sensibilité de  $10^{-4}$  (20/20 000).

Les fichiers de données « List Mode Data » ou (LMD) sont enregistrés dans un répertoire désigné par le nom du malade et la date d'acquisition.

### 2.2.8. Interprétation des données d'acquisition

L'analyse des résultats est faite au moyen des logiciels : *WinMDI 2.9®* et le *C Flow®*  
*Plus.*

Dans un premier temps, sur un graphique taille/ structure (FS/SS) nous sélectionnons une région appelée « cell » qui exclue de l'analyse les débris cellulaires (voir figure 33).

- Conditionné sur cette fenêtre « cell » nous réalisons un graphique CD45/SS sur lequel nous pouvons sélectionner nos différentes populations leucocytaires : monocytes,

lymphocytes, granuleux et blastes (qui expriment plus faiblement le CD45 que les lymphocytes et monocytes).

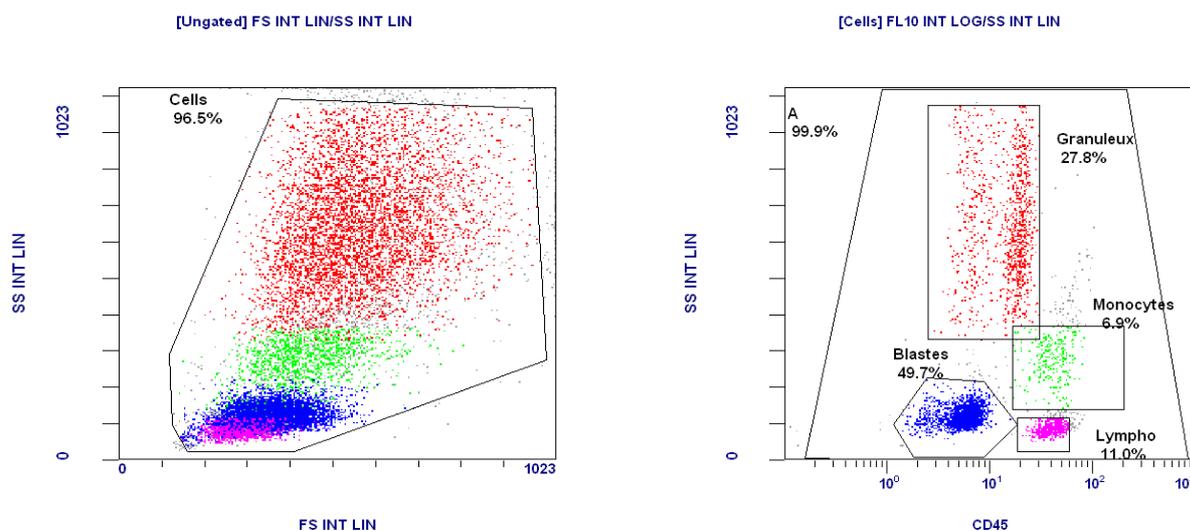
- L'emplacement des blastes se trouve dans une zone appelée l'aire "Bermudes" comprend les cellules hématopoïétiques immatures et la population blastique de la majorité des LA.

- Pour chaque anticorps de la combinaison, un graphique CD/SSC est réalisé afin de voir avec quelle intensité la population blastique exprime le marqueur par rapport aux cellules normales. Ces graphiques nous permettent également de vérifier que tous les anticorps de la combinaison ont bien été distribués (présence de cellules positives pour le marqueur).

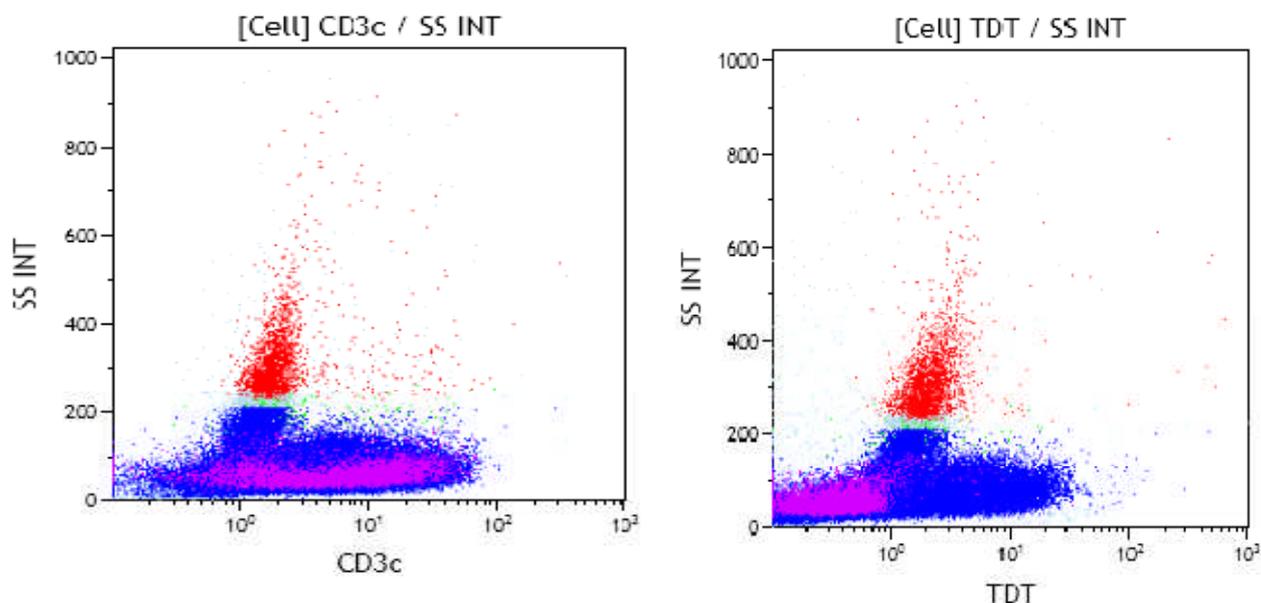
- L'identification de la lignée des blastes et le sous type de la leucémie aigue, obéit aux critères du score EGIL.

- Les résultats pour chaque antigène sont exprimés en pourcentage de cellules positives à l'intérieure de la population cible.

- Une première analyse va être réalisée sur une fenêtre englobant les cellules mononuclées pour déterminer les marqueurs de notre panel qui sont exprimés par les cellules leucémiques. Les lymphocytes normaux résiduels présents dans cette fenêtre nous permettent de définir le niveau d'expression des marqueurs exprimés par les cellules leucémiques.



**Figure 33:** Elimination des débris et sélection des différentes populations cellulaires



**Figure 34 :** Graphiques CD/SSC

*Pour chaque anticorps de la combinaison, un graphique CD/SSC (l'exemple de la figure 32 est le CD3c/SS et TDT/SS) est réalisé afin de voir avec quelle intensité la population blastique exprime le marqueur par rapport aux cellules normales.*

Un marqueur membranaire est considéré positif s'il est exprimé par **20%** ou plus des cellules analysées (CD34, HLA-DR, CD7, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD65, CD117, CD4, CD10, CD19, CD16, CD56, CD64, CD38). Le seuil de positivité est de **10%** dans le cas des marqueurs cytoplasmiques (CD79acyt, CD3cyt et MPOcyt) [9].

L'analyse des images issues de l'histogramme biparamétrique CD45/SSC va déjà nous donner une information quant au type de leucose aiguë à laquelle pourront être rattachées les cellules leucémiques.

Ainsi, lorsque les cellules leucémiques sont des cellules de grande taille et donnant un signal peu intense en SSC, on peut s'attendre à être confronté à une leucémie aiguë touchant une des lignées lymphoïde ou encore des cellules peu différenciées de la lignée myéloïde (LAM M0, M1 ou M2). Par contre, lorsque les cellules montrent des signaux plus intenses en SSC, on peut envisager une LAM type M3 ou encore une leucémie monocyttaire (LAM type M5) ou à participation monocyttaire (LAM type M4), (**voir annexe 4**).

Des profils immunophénotypiques des cas de LA appartenant au laboratoire d'hémobiologie du CHU de Tizi Ouzou sont illustrées à partir de **l'annexe 5**.

### 3. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été saisis et analysés avec les logiciels : « IBM SPSS Statistics version 20 », et le « Microsoft Excel 2007 ». Les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de moyennes ou de médianes ; avec l'intervalle interquartiles (IQ) [25% et 75% de la population] ; et sous forme d'effectifs et de pourcentages pour les variables qualitatives.

Les tests statistiques utilisés sont :

3.1. La comparaison des variables continues sur échantillons indépendants a été réalisée par le test paramétrique « *t* » de Student si l'échantillonnage est  $> 30$  ou le test de Fisher Exact pour un échantillon  $< 30$  ;

3.2. Les variables qualitatives ont été comparées par le test d'indépendance, le *Chi-2 de Pearson*, ou de *Mc Nemar* en fonction du type de comparaison ou de corrélation ;

3.3. Nous avons appliqué la *correction de continuité de Yates* dans la comparaison de deux groupes de variables qualitatives dont le nombre d'au moins une variable est  $< 5$  ;

3.4. L'étude du lien entre l'expression des antigènes leucocytaires spécifiques de lignée et le sous type FAB dans les LAM a été réalisé par la *corrélation de Pearson* ;

3.5. Nous avons comparé la distribution des variables entre les groupes à l'aide des *test non paramétriques sur échantillons indépendants* : *test de Kruskal Wallis* pour  $k$  échantillons et *test de Kolmogorov-Smirnov* pour 2 échantillons ;

3.6. Pour tous les tests, une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative

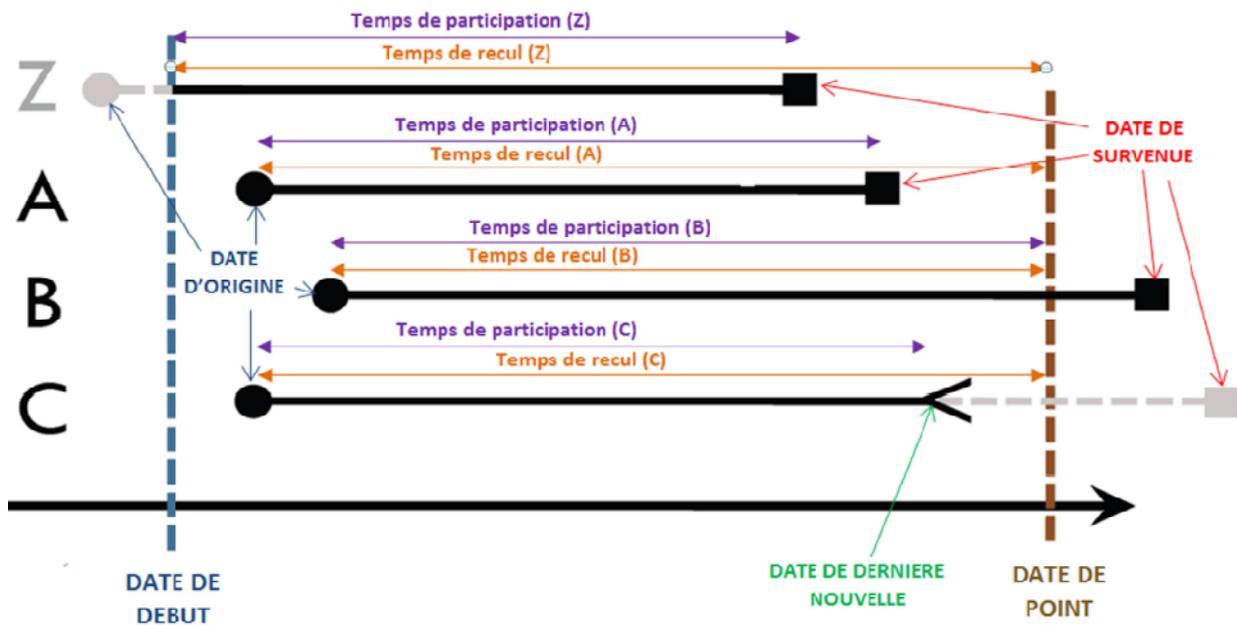
3.7. Les *tableaux croisés 2 x 2* ont été utilisés pour la comparaison de 4 variables qualitatives (fréquences) ;

3.8. Pour l'estimation de la *survie globale*, nous avons utilisés :

a- La méthode de *Kaplan-Meier*, qui permet d'estimer la survie médiane et le taux moyen de survie à un temps donné, d'expliquer la survenue d'un événement qualitatif au cours du temps  $t$  (comme le décès). Utilisée lorsque les échantillons sont  $< 200$  sujets.

b- *Le test du log-rank*, pour comparer dans chaque groupe, le nombre observé et le nombre attendu d'événements si la survie était identique dans les deux groupes, sur l'ensemble de la période étudiée. Le calcul est basé sur le test de Khi-2 à 1 degré de liberté (1 ddl) au risque de 5% et en analyse uni variée.

3.9. Les données indispensables à l'estimation de la survie globale sont résumées dans la figure 35 et définis ci dessous :



**Figure 35:** Représentation graphique des données à recueillir pour le calcul des durées de survie

**a- Survie Globale (SG) ou (Overall Survival, OS) :** L'analyse de la survie est l'estimation de la probabilité de survenue d'un événement dans le temps en fonction de facteurs pronostiques, calculée de la date d'inclusion du patient à la date de décès ou des dernières nouvelles. *Par convention, on nomme l'événement attendu : « décès ».*

**b- Date d'origine (DO) :** C'est la date correspondant au point de départ de l'étude. Dans certains cas la date d'origine peut être antérieure à l'inclusion dans l'étude, on parle de cohorte historique ;

**c- Date des dernières nouvelles (DDN) :** C'est la date la plus récente à laquelle on a recueilli des informations sur le patient, notamment la survenue ou non de l'événement d'intérêt (vivant/décédé) ;

**d- Date de Point (DP) :** C'est la date choisie pour faire le bilan ou le point, appelée aussi date d'analyse de la survie du dernier patient inclus ;

**e- Perdu de vue :** Un sujet est perdu de vue lorsque sa surveillance est interrompue avant la date de point et que l'événement d'intérêt ne s'est pas produit ;

**f-Censure :** Une durée de survie d'un individu est dite censurée lorsque l'événement d'intérêt n'a pas été observé. Elle concerne : les sujets perdus de vue (C) et ceux vivant à la date de point (B) ;

**g- Temps de Recul :** Délai entre date d'origine et la date de point. Situé le patient dans le temps par rapport à la date de l'analyse. (Recul = DP-DO). Les patients qui ont un recul identique ont la même date d'origine ;

Dans notre étude la date d'origine est le 1<sup>er</sup> janvier 2013, la date de point est le 30 novembre 2019 ce qui fait un recul maximale (DP-DO) de 71 mois soit 5ans et 11 mois.

**h- Temps de Participation (TP) :** Délai qui correspond à toute la durée de la surveillance, utilisé pour établir la courbe de survie ;

Si  $DDN < \text{date de point}$  :  $TP = DDN - DO$  ; Si  $DDN \geq \text{date de point}$  :  $TP = DP - DO$

**i- Calcul de la probabilité de survie globale en % = (a-b)/a**

a = Vivants au début de l'étude et b = Décédés

La figure 35 montre :

- Le **patient A** est suivi entièrement durant la période de l'étude ;
- Le **patient B** est encore vivant après la date de point. Son décès surviendra peut-être plus tard, mais HORS la période d'étude ;
- Le **patient C** n'est pas suivi durant toute la période d'étude. Il était vivant jusqu'au moment où on l'a perdu de vue (date de dernière nouvelle) ;
- Le **patient Z**, sa maladie est apparue avant la date de début d'étude (cohorte historique).

3.10. L'analyse de la concordance entre la cytologie et la CMF testée en utilisant le *coefficient de concordance kappa* décrit par Cohen en 1960 [151] ;

Le coefficient kappa de Cohen mesure le degré de concordance entre deux méthodes de diagnostic utilisées sur un même échantillon. Il permet d'apprécier la similitude entre les résultats apportés.

## Matériels et méthodes

---

Kappa peut prendre toutes les valeurs entre -1 et +1. La concordance est meilleure lorsque le coefficient kappa est proche de +1.

Landis et Koch [152] ont proposé une classification hiérarchique du coefficient kappa. Ainsi si deux méthodes sont parfaitement concordantes, elles peuvent se substituer l'une à l'autre (voir tableau 12).

**Tableau 12 :** Echelle de Landis et Koch 1977 [152]

Valeur de Kappa	Degrés d'accord
<0.20	Mauvais
0.21-0.40	Médiocre
0,41 – 0,60	Modéré
0,61 – 0,80	Fort
0,81 – 1,00	Très Fort

3.11. La précision des estimations pronostiques est fournie par l'intervalle de confiance (IC à 95%).

# **II**

# **Résultats**

# **II.1**

# **Résultats adultes**

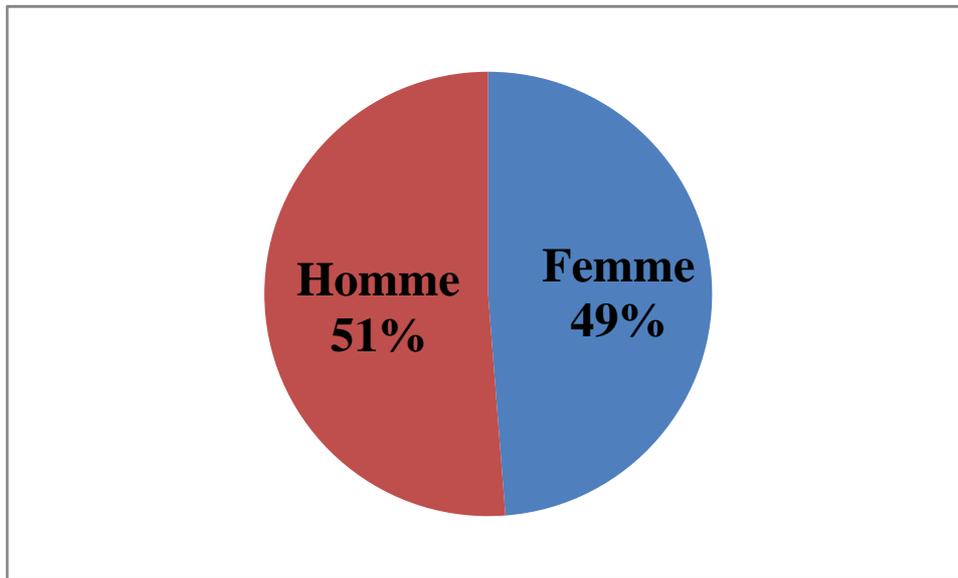
## 1. Description des résultats des patients adultes

### 1.1. Aspects épidémiologiques

#### 1.1.1. Répartition des patients selon le sexe

Sur l'ensemble des cas, on note 84(51,2%) patients de sexe masculin et 80 (48,8%) patients de sexe féminin (voir figure 36).

Le sex-ratio Hommes (H) / Femmes (F) :  $H/F = 1,05$ .



**Figure 36:** Répartition graphique des LA de l'adulte selon le sexe

#### 1.1.2. Répartition des patients selon les tranches d'âge

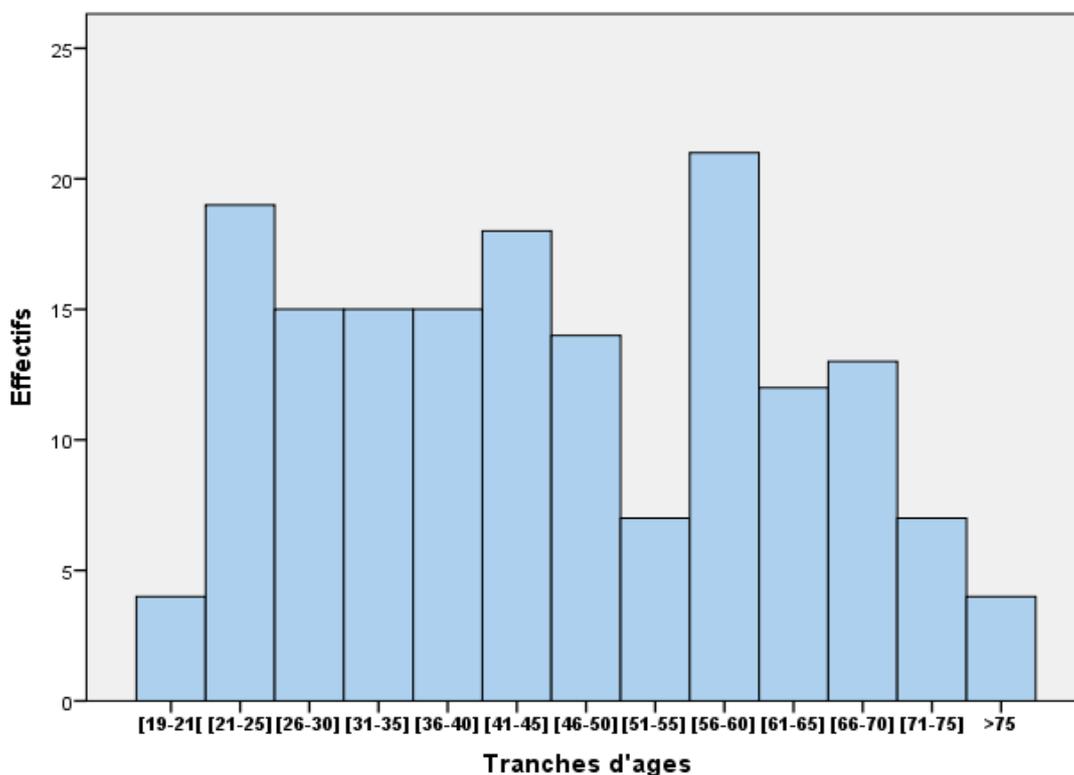
L'âge moyen est de : **45 ans ± 16,25** (Moyenne ± Ecart type) avec des âges extrêmes allant de 19 ans à 78 ans. L'intervalle interquartile IQ = [31-58,7 ans].

## Résultats adultes

**Tableau 13:** Répartition des LA selon les tranches d'âges

Tranches d'âge/ans	Effectifs	Fréquence %
[19-21[	<b>4</b>	<b>2,4</b>
[21-25]	<b>19</b>	<b>11,6</b>
[26-30]	<b>15</b>	<b>9,1</b>
[31-35]	<b>15</b>	<b>9,1</b>
[36-40]	<b>15</b>	<b>9,1</b>
[41-45]	<b>18</b>	<b>11,0</b>
[46-50]	<b>14</b>	<b>8,5</b>
[51-55]	<b>7</b>	<b>4,3</b>
[56-60]	<b>21</b>	<b>12,8</b>
[61-65]	<b>12</b>	<b>7,3</b>
[66-70]	<b>13</b>	<b>7,9</b>
[71-75]	<b>7</b>	<b>4,3</b>
>75	<b>4</b>	<b>2,4</b>
<b>Total</b>	<b>164</b>	<b>100,0</b>

Dans notre série adultes, les patients dont l'âge est < 60ans sont majoritaires 70% versus 30% des patients dont l'âge est > 60 ans (voir tableau 13 et figure 37).



**Figure 37:** Répartition graphique des LA de l'adulte selon les tranches d'âge

### 1.1.3. Répartition des patients selon l'âge et le sexe

On note une fréquence des cas de leucémie aigue de novo à la tranche d'âge de [21-25]ans chez les hommes et aux tranches d'âge [41-45] ans et [56-60] ans chez les femmes (voir figure 38).

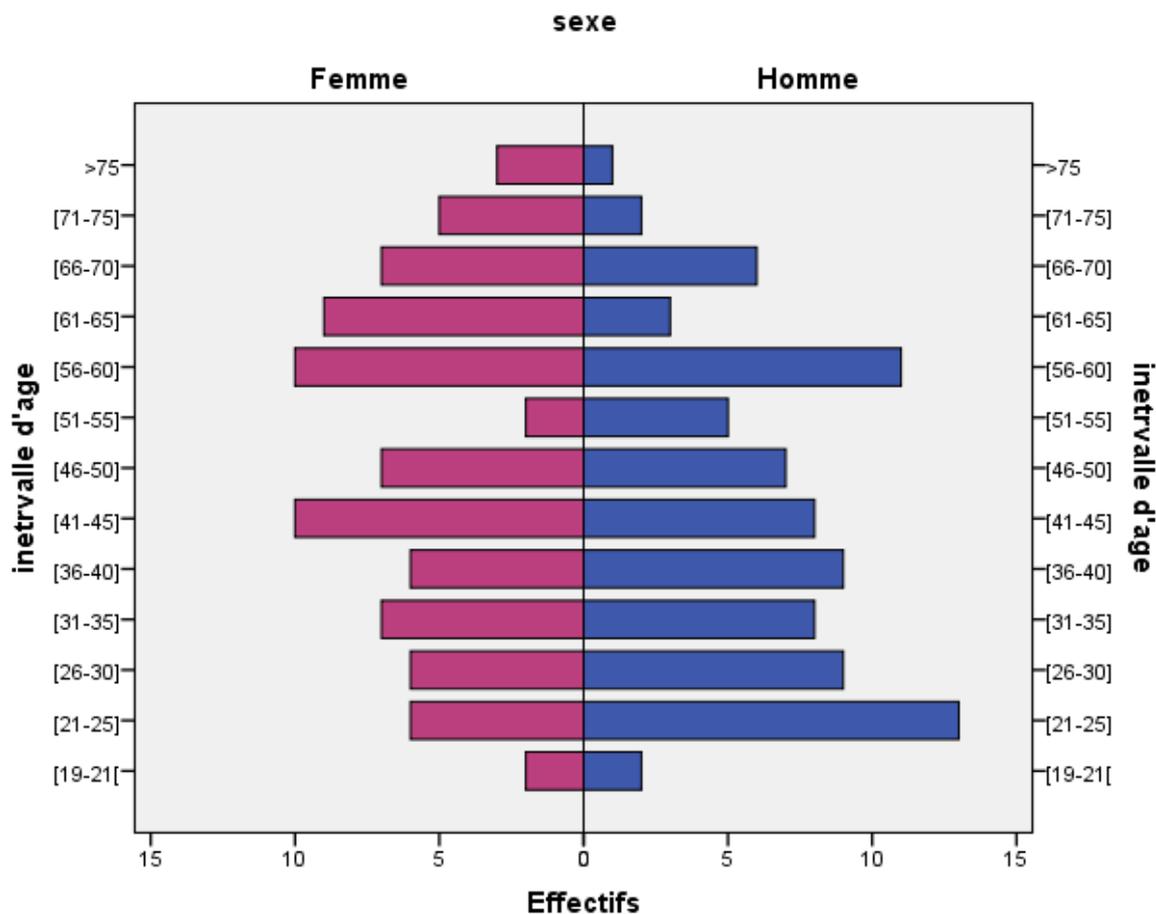


Figure 38 : La pyramide des âges des LA de l'adulte en fonction du sexe

Le test de la médiane à échantillons indépendants test de Chi-2 montre que les médianes des âges sont identiques pour les catégories de sexe. (Chi-2=1,54.P=0,2).

## 1.2. Aspects épidémiologiques cliniques et biologiques selon le type de la LA

### 1.2.1. Leucémies aigues myeloblastiques

121/164 (73,78%) patients avec un diagnostic de LAM qui est inclus dans notre étude. La moyenne d'âge est de  $47,5 \pm 16,42$ (moyenne  $\pm$  Ecart type) avec des extrêmes de 20 ans à 78 ans.

## Résultats adultes

### 1.2.1.1. Répartition des LAM selon le sexe

64 (52,9 %) patients sont de sexe féminin et 57(47,1%) sont de sexe masculin, avec un sexe ratio H/F = 0,89. Le test de la médiane à échantillons indépendants montre que les médianes des âges sont identiques pour les catégories de sexe ; (Chi-2=0,2. P=0,6).

### 1.2.1.2. Répartition des LAM selon les tranches d'âge

**Tableau 14:** Répartition des patients LAM selon les tranches d'âge

Tranches d'âge	Effectifs	Fréquence %
[19-21[	2	1,7
[21-25]	11	9,1
[26-30]	11	9,1
[31-35]	11	9,1
[36-40]	10	8,3
[41-45]	11	9,1
[46-50]	11	9,1
[51-55]	6	5,0
[56-60]	17	14,0
[61-65]	9	7,4
[66-70]	12	9,9
[71-75]	7	5,8
>75	3	2,5
Total	121	100,0

Le nombre de LAM augmente avec l'âge : 24 (19,8 %) patients ont un âge inférieur à 30 ans, 32 (26,44 %) patients dont l'âge varie de 31 ans à 45 ans et 53,7 % ont plus de 45 ans (voir tableau 14).

### 1.2.1.3. Caractéristiques cliniques des LAM

Le tableau 15 résume les caractéristiques cliniques des LAM de l'adulte. Les signes cliniques ont été enregistrés chez 77 patients (63,6 %). Néanmoins dans 39 cas (32 %) aucun signe clinique n'a été renseigné.

## Résultats adultes

**Tableau 15:** Caractéristiques cliniques des LAM

<b>Pâleur cutanéomuqueuse</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	Absente	3	2,5
	Discrète	18	14,9
	Modéré	23	19,0
	Franche	77	63,6
	Total	121	100,0
<b>Syndrome tumoral</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	*NR	1	0,8
	Absent	80	66,1
	Présent	40	33,1
	Total	121	100,0
<b>SPMG <math>\geq 5</math>cm</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	1	0,8
	Absente	104	86,0
	Présente	16	13,2
	Total	121	100,0
<b>HPMG <math>\geq 5</math>cm</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	1	0,8
	Absente	109	90,1
	Présente	11	9,1
	Total	121	100,0
<b>ADP</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	1	0,8
	Absente	90	74,4
	Présente	30	24,8
	Total	121	100,0
<b>Syndrome hémorragique</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	1	0,8
	Absent	73	60,3
	Présent	47	38,8
	Total	121	100,0

\*NR : Non renseigné ou sans renseignement clinique

## Résultats adultes

<b>Fièvre</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	17	14,1
	Absente	69	57,0
	<b>présente</b>	<b>35</b>	<b>28,9</b>
	Total	121	100,0
<b>Syndrome infectieux</b>			
		<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
	NR	22	18,2
	Absente	51	42,1
	<b>Présente</b>	<b>48</b>	<b>39,7</b>
	Total	121	100,0

La pâleur cutanéomuqueuse (PCM) a été observée chez la majorité des patients atteints de LAM 97,5 % avec prédominance d'une PCM franche 63,6%.

Le syndrome tumoral a été retrouvé dans 33,1 % des cas, avec la prédominance de la survenue des adénopathies superficielles, le syndrome hémorragique dans 50% des cas.

48/121 (39,7 %) patients ont présenté au moins une infection prouvée sur prélèvements microbiologiques.

Les sites de localisation des infections étaient : pulmonaire, gastro-intestinal, sang, cutané, tissus mou, génito-urinaire et gingival.

35 /121 (38,9 %) patients ont été fébriles au diagnostic de la leucémie aigue avec une infection bactérienne et/ou fongique prouvée sur culture positive.

Les cultures ont été effectuées sur sang (hémocultures), urines, écouvillons de : gorge, anal et cutané.

1.2.1.4. Circonstances de découverte des LAM

Les circonstances de découverte (CDD) les plus fréquemment retrouvées dans les LAM de l'adulte étaient la consultation pour un syndrome anémique et hémorragique dans 21 % des cas (voir tableau 16 et figure 39).

Tableau 16: Circonstances de découverte des LAM

CDD	Effectifs	Fréquence %
Non renseigné (NR)	2	1,7
Fièvre et asthénie	12	9,9
Syndrome hémorragique	26	21,5
Adénopathies isolées	17	14,0
Douleurs abdominales	2	1,7
Douleurs osseuses	3	2,5
Asthénie persistante	24	19,8
Syndrome anémique	25	20,7
Syndrome infectieux	7	5,8
Découverte fortuite	3	2,5
<b>Total</b>	<b>121</b>	<b>100,0</b>

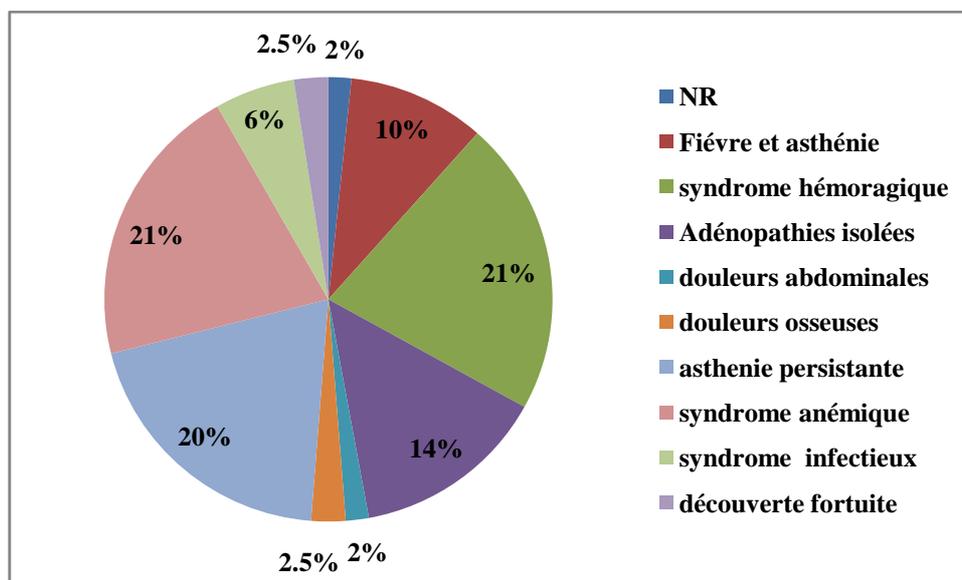


Figure 39: Représentation graphique des circonstances de découverte des LAM

**1.2.1.5. Analyse des données de l'hémogramme et de l'étude cytomorphologique**

Les données de la numération des globules blancs, plaquettes et d'hémoglobine sont résumées dans le tableau 17 :

**Tableau 17:** Données de la numération des globules blancs, plaquettes et d'hémoglobine dans les LAM

<b>Taux de globules blancs (GB)</b>	<b>Taux de plaquettes (Plaq)</b>
Le taux médian de <b>GB</b> est de <b>27,94 G/L±61,74</b> (Médian ± Ecart type) avec une valeur minimum de 0,56 G/L et maximum de 312G/L. L'intervalle Inter-Quartiles (IQ) est de (8,79-75,45 G/L).	Le taux médian des plaquettes est de 35G/L avec un minimum de 7G/L et un maximum de 200G/L. L'IQ est de (22-61,25 G/L).
<b>Taux d'hémoglobine (Hb)</b>	
Le taux médian de l'hémoglobine est de 8,25g/dl avec une valeur minimum de 3,3 g/dl et un taux maximum de 12,4 g/dl. L'IQ est de (7,4 -9,40 g/dl).	

**- Etude cytologique des LAM : frottis sanguin et médullogramme**

Le taux médian de blastes circulants était 62 %, IQ: 39-83 %. L'examen cytologique des frottis de moelle osseuse a permis d'affirmer le diagnostic et de classer les cas de LAM, en se basant sur les critères descriptifs de la classification FAB. L'étude du myélogramme a objectivé un taux médian de blastes de 72 %, IQ: 53-89%. Le taux de blastes médullaires a varié entre 5 % (observé dans le cas des LAM monoblastique type b (LAM5b) à prédominance monocyttaire mature) et 100 %.

La différence des médianes de blastes médullaires entre les différents types de LAM, ainsi que leur distribution médullaire, était statistiquement significative (p<0,001).

Dans les LAM ; les signes de dysgranulopoïèse, de dysérythropoïèse ont été retrouvés respectivement chez 5 % et 1,66 % des patients.

## Résultats adultes

Le tableau 18 résume les caractéristiques hémato biologiques des LAM chez les patients adultes.

**Tableau 18:** Caractéristiques hémato biologiques des LAM

<b>GB G/L</b>	<b>&lt;4</b>	<b>[4-10[</b>	<b>[10-30[</b>	<b>[30-50[</b>	<b>[50-100]</b>	<b>&gt;100</b>	<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	20	16	25	17	29	13	<b>120</b>
<b>Fréquence %</b>	16,66	13,33	20,83	14,16	24,16	10,83	<b>100%</b>
<b>plaq G/L</b>	<b>&lt;20</b>	<b>[20-100]</b>	<b>&gt;100</b>				<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	22	91	7				<b>120</b>
<b>Fréquence %</b>	18,34	75,83	5,83				<b>100%</b>
<b>Hb g/dl</b>	<b>&lt;8</b>	<b>[8-10]</b>	<b>]10-12]</b>	<b>&gt;12</b>			<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	51	49	18	2			<b>120</b>
<b>Fréquence %</b>	42,5	40,83	15	1,66			<b>100%</b>
<b>Blastes sang%</b>	<b>&lt;20</b>	<b>[20-40[</b>	<b>[40-60[</b>	<b>[60-80[</b>	<b>[80-100[</b>	<b>100</b>	<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	14	8	39	19	32	3	<b>115</b>
<b>Fréquence %</b>	12	6,95	33,91	16,52	27,82	2,60	<b>100%</b>

49,15% des patients adultes atteints de LAM ont un taux de globules blancs supérieur à 30 G/L dont 10,83 % ont un taux > 100G/L. Les formes hyper leucocytaires sont représentées dans 49 % des cas par les LAM2 et LAM4 de la classification cytologique FAB.

Concernant le taux de plaquettes 22/120 (18,34 %) des cas ont une thrombopénie sévère < 20 G/L. Une anémie sévère avec un taux d'Hb <8g/dl à été observé chez 51/120 patients (42,5%). Pas de différence significative entre les différents sous type de LAM  $P>0,05$ .

### 1.2.1.6. Classification cytologique FAB des sous types de LAM

Le tableau 19 résume la classification des LAM selon les critères morphologiques. Quatre cas de LAM étaient difficiles à classer par seulement les critères FAB. Six cas étaient classés en LAL.

**Tableau 19:** Classification cytologique des LAM selon les critères du groupe FAB

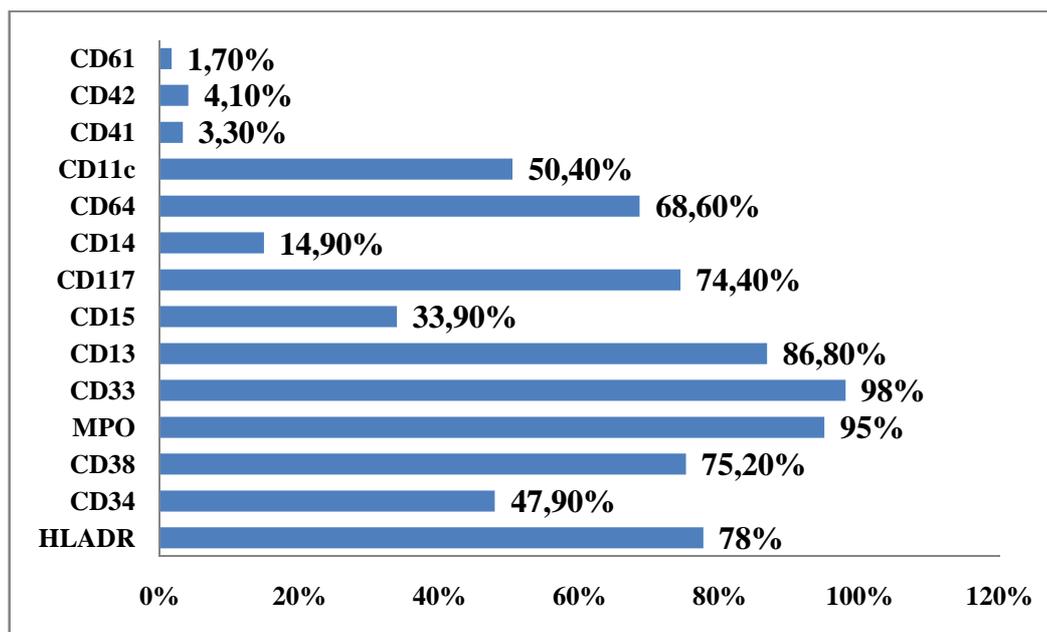
	Effectifs	Fréquence %
<b>LAM DC</b>	<b>6</b>	<b>5,0</b>
<b>LAM3 Variante</b>	<b>7</b>	<b>5,8</b>
<b>LAM probable ?</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>
<b>LAM1</b>	<b>14</b>	<b>11,6</b>
<b>LAM2</b>	<b>32</b>	<b>26,4</b>
<b>LAM3 Promyélocytaire</b>	<b>14</b>	<b>11,6</b>
<b>LAM4</b>	<b>27</b>	<b>22,3</b>
<b>LAM5</b>	<b>18</b>	<b>14,9</b>
<b>Total</b>	<b>121</b>	<b>100,0</b>

#### 1.2.1.7. Profil immunophénotypique des LAM

L'immunophénotypage par CMF a été réalisé sur **67 prélèvements médullaires** et **54 prélèvements sanguins**.

- **Fréquence d'expression des marqueurs de surface et intracytoplasmique testés sur les cellules blastiques dans les LAM**

Prédominance d'expression des marqueurs : CD33 (98%), MPO (95%) et le CD13 (86,8%). Les marqueurs d'immaturité ou non restreints à une lignée : HLADR, et CD34 sont présents dans respectivement 78 % et 47,90 % des cas (voir figure 40).



**Figure 40:** Expression des marqueurs myéloïdes et d'immaturité dans les LAM

## Résultats adultes

Le nombre total des patients varie avec chaque marqueur testé à cause parfois de l'addition séquentielle d'un marqueur durant la période d'étude (cas du Tdt, CD36 et CD56). Une hétérogénéité de l'expression des marqueurs de surface est observée : le pourcentage de patients positifs pour un antigène varie de 0% pour la Glycophorine A car nous n'avons eu dans notre série aucune LA à érythroblastes, à 98 % pour le CD33.

Le CD3 de surface et intracytoplasmique n'a pas été exprimé dans les LAM de l'adulte.

Le tableau 20 résume la fréquence de positivité des anticorps monoclonaux testés avec les cellules myéloblastiques.

**Tableau 20 :** Fréquence de positivité des anticorps monoclonaux testés avec les cellules myéloblastiques.

HLADR			CD38		
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%
NEGATIF	27	22,3	NT	27	22,3
POSITIF	94	77,7	POSITIF	91	75,2
Total	121	100,0	Total	121	100,0
CD34			MPO		
	Effectifs	Pourcentage		Effectifs	Pourcentage%
NEGATIF	63	52,1	NEGATIF	6	5,0
POSITIF	58	47,9	POSITIF	115	95,0
Total	121	100,0	Total	121	100,0
CD33			CD15		
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%
NEGATIF	2	1,7	NEGATIF	39	32,2
POSITIF	119	98,3	NT	41	33,9
Total	121	100,0	POSITIF	41	33,9
			Total	121	100,0
CD13			CD117		
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%
NEGATIF	15	12,4	NEGATIF	28	23,1
/	1	,8	/	2	1,7
POSITIF	105	86,8	POSITIF	91	75,0
Total	121	100,0	Total	121	100,0
CD14			CD41		
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%
NEGATIF	99	81,8	NEGATIF	117	96,7
NT	3	2,5	POSITIF	4	3,3
POSITIF	19	15,0	Total	121	100,0
Total	121	100,0			

## Résultats adultes

CD64				CD42			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%		
NEGATIF	36	29,8		NEGATIF	116	95,9	
NT	2	1,7		POSITIF	5	4,1	
POSITIF	83	68,6		Total	121	100,0	
Total	121	100,0					
CD11c				CD61			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%		
NEGATIF	16	13,2		NEGATIF	118	97,5	
NT	44	36,4		NT	1	,8	
POSITIF	61	50,4		POSITIF	2	1,7	
Total	121	100,0		Total	121	100,0	
CD2				CD4			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage %		
NEGATIF	111	91,7		NEGATIF	81	66,9	
NT	1	,8		NT	1	,8	
POSITIF	9	7,4		POSITIF	39	32,2	
Total	121	100,0		Total	121	100,0	
CD5				CD7			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%		
NEGATIF	100	82,6		NEGATIF	93	76,9	
NT	19	15,7		POSITIF	28	23,1	
POSITIF	2	1,7		Total	121	100,0	
Total	121	100,0					
CD10				TDT			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%		
NEGATIF	117	96,7		NEGATIF	54	44,6	
POSITIF	4	3,3		NT	63	52,1	
Total	121	100,0		POSITIF	4	3,3	
				Total	121	100,0	
CD36				CD56			
	Effectifs	Pourcentage%		Effectifs	Pourcentage%		
NEGATIF	41	33,9		NEGATIF	58	47,9	
NT	50	41,3		NT	46	38,0	
POSITIF	30	24,8		POSITIF	17	14,0	
Total	121	100,0		Total	121	100,0	
POSITIF	4	3,3		POSITIF	5	4,1	
Total	121	100,0		Total	121	100,0	

*NT = Non testé sur les blastes du patient*

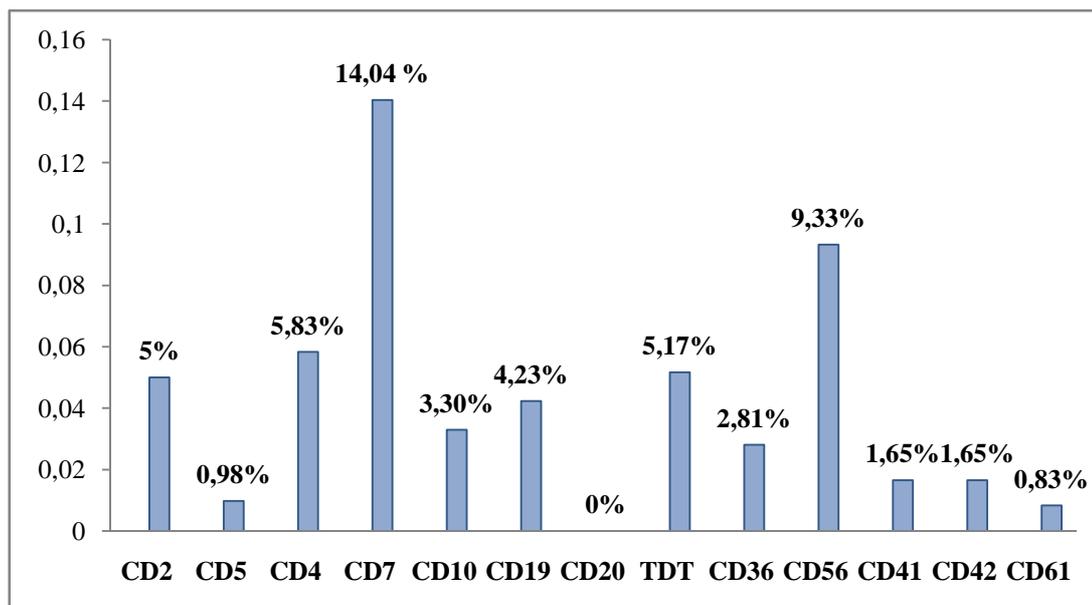
## Résultats adultes

### - Coexpression des antigènes lymphoïdes et myéloïdes dit aberrants dans les sous types de LAM

54/121 (44,6 %) patients adultes atteints de LAM ont présenté, en plus des marqueurs spécifiques pour la classification de la lignée en cause, des marqueurs dits : « aberrants appelés aussi : *Leukemia-Associated Immunophénotype (LAIP) Markers* » qui ne s'accordent pas avec la lignée d'origine. Le tableau 21 montre les cas de LAM avec coexpression d'antigènes aberrants. La fréquence d'expression pour chaque marqueur est déterminée en fonction du nombre de cas testés.

**Tableau 21:** Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAM

Cas LAM/ FAB	Ag aberrants	CD2	CD5	CD4	CD7	CD10	CD19	CD20	Tdt	CD36	CD56	CD41	CD42	CD61
LAM0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
LAM1	10	1	0	2	5	0	0	0	0	0	2	0	0	
LAM2	15	1	0	2	6	1	2	0	0	0	3	0	0	
LAM3	10	2	0	0	0	1	3	0	1	1	0	1	1	
LAM4	9	2	1	/	3	2	0	0	1	0	0	0	0	
LAM5	9	0	0	/	2	0	0	0	1	0	3	1	1	
LAM7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
N <sup>bre</sup> cas testés		120	102	118	121	121	118	88	58	71	75	121	121	20
Fréque- nce %		5	0,98	4,23	14,04	3,30	4,23	0	5,17	2,81	12	1,65	1,65	0,83



**Figure 41:** Co-expression d'antigènes aberrants dans les LAM

La co-expression d'antigènes lymphoïde de lignée B et T est retrouvée dans 38/121 cas de LAM (31,40 %), l'antigène de la lignée T le plus exprimé est le CD7 : 14% des cas avec une forte intensité d'expression. Pour la lignée B on retrouve l'antigène CD19 co-exprimé à 4,23% (voir figure 41).

C'est les cellules blastiques des LAM avec maturation (LAM2 selon FAB) qui co-expriment le plus de marqueurs aberrants 15/54 cas de LAM (27,7 %). Le CD56 l'antigène marqueur des lymphocytes T NK (Naturel Killer) est assez co-exprimé dans les LAM : 12 % pour 75 cas testés.

### 1.2.1.8. Exemples de cas discordants entre le diagnostic cytologique du FAB et l'immunophénotypage des LAM

**Tableau 22:** Diagnostic final des cas discordants

N°/Patient	Cytochimie au noir soudan (NS)	FAB	Marqueurs immunologiques	Diagnostic proposé	Diagnostic final
1	Positif	LAM DC présence de blastes en coupelles	<b>DR+faible, 34-, MPO+,38+,117+, 33+,11c+,13-</b>	LAM2 Cup like	<b>LAM2</b>
2	Positif fortement	LAM DC	<b>DR-,34-, MPO+,38+,117-,33+,13-,15+,64+, 11c+,56+</b>	LAM3v (variante)	<b>LAM3v</b>

## Résultats adultes

<b>3</b>	Positif	LAMDC présence de blastés en coupelles	<b>DR-,34-,38+, MPO+,117+, 33+,13+,64+,15+</b>	LAM2 Cup like	<b>LAM2</b>
<b>4</b>	Douteux	LAM probable	<b>DR+, 34+, MPO+,33+,38+,13+,41+, 42+,61+</b>	LAM7	<b>LAM7</b>
<b>5</b>	Non fait	LAMDC: 02 populations blastiques (l'une d'aspect plasmocytoïde et l'autre monocytoïde)	<b>DR+,34-, MPO+,38+,117- ,33+,13+,15+,64+,4+,56+</b>	LA plasmacytoïdes dérivée des cellules dendritiques	<b>LpDC</b>
<b>6</b>	Positif	LAMDC présence de blastés en coupelles	<b>DR-,34- ,38+, 117+, MPO+ 33+,13+,15+,64+,11c+,4+</b>	LAM2 Cup like	<b>LAM2</b>
<b>7</b>	Douteux	LAM probable	<b>DR+,34+, MPO- ,117+, 33+,13+,38+</b>	LAM à différentiation minime	<b>LAM0</b>
<b>8</b>	Positif	LAMDC	<b>DR-,34+, MPO+ ,117+, 33+,13-,64+,11c+,4+</b>	LAM avec maturation	<b>LAM2</b>
<b>9</b>	Douteux	LAM probable	<b>33+,117+,11c+,64+, MPO-,34+, DR+</b>	LAM à différentiation minime	<b>LAM0</b>

Un redressement diagnostique et une classification finale des cas de LAM discordants grâce à l'immunophénotypage par CMF, a été effectuée ; (voir tableau 22).

L'étude cytomorphologique de certains cas de LAM1 ou LAM 2, a permis de constater que plus de 20% de blastés contiennent une volumineuse inclusion translucide, posée à cheval sur le cytoplasme et le noyau, dont la taille peut atteindre le tiers du diamètre cellulaire on parle d'inclusions en coupelles ou Cup-Like.

1.2.1.9. Leucémies aiguës biphénotypiques

Tableau 23: Caractéristiques cliniques et biologiques des LA biphénotypiques

N°/Patient	Age ans/Sexe	PCM	Syndrome Tumoral	Fièvre	infection	CDD	GB G/L	Hb g/dl	Plq G/L	Blastes Sang%	Blastes MO %
1	40/ H	Franche	Présent	Absente	Absente	syndrome anémique	8,76	8,5	71	68	33
2	57/H	Discrète	Absent	/	/	découverte fortuite	24	10	114	29	57
3	23/F	Discrète	Absent	Absente	Absente	asthénie persistante	11,7	9,1	47	42	86
4	41/F	Franche	Présent	présente	Absente	syndrome hémorragique	0,49	7,3	14	/	99

Tableau 24: Caractéristiques immunophénotypiques des LA biphénotypiques

N°/Patient	Age (ans) /Sexe	FAB	Phénotypage	Diagnostic final
1	40/H	LAM probable NS non concluant	DR+,34+, MPO+, CD33+, CD13+, CD117-, <b>CD19+</b> , <b>CD79a+</b>	LA biphénotypique LAM/B
2	57/H	LAL probable NS-	DR+,34-, MPO+, CD38+, CD33+, CD13-, CD117+, <b>CD64+</b> , <b>CD79a+</b> , <b>CD19+</b> , <b>CD15+</b> , <b>CD56+</b>	LA biphénotypique LAM/B
3	23/F	LAM probable NS non concluant	DR-,CD34+,MPO+,CCD38+,CD117- , <b>CD33+</b> , <b>CD13+</b> , <b>CD7+</b> , <b>CD19+</b> , <b>CD79a+</b>	LA biphénotypique LAM/B
4	41/F	LAM probable NS non concluant	DR+,CD34+,MPO+,CD38+,CD33-,CD13- , <b>CD117</b> , <b>CD19+</b> , <b>CD10+</b> , <b>CD79a+</b> , <b>CD22cyt+</b> , <b>CD22s+</b>	LA biphénotypique LAM/B

4/164 (2,44%) leucémie aiguë adultes sont des LA biphénotypiques dont le diagnostic a été confirmé par CMF. Les quatre cas de LA biphénotypiques sont à coexpression myéloïde et lymphoïde B (voir tableau 24).

- Leucémie aiguë indifférenciée :

Un cas (01) de LA indifférenciée a été répertorié, il s'agit du patient MA de sexe masculin, âgé de 22 ans. L'étude cytologique montre des blastes présentant un aspect de lymphoblastes avec une coloration cytochimique au noir soudan négative.

## Résultats adultes

L'étude immunologique pose le diagnostic d'une *LA indifférenciée* avec le phénotype suivant : DR+, CD34+, CD38+, CD7+, CD15+, MPO-,CD33-,CD13-.

### 1.2.2. Leucémies aiguës lymphoblastiques

Dans notre série, selon la classification FAB, nous avons colligé **39/164 (23,78%)** cas de LAL adultes.

La moyenne d'âge est de **38,89 ± 14,32**(moyenne ± Ecart type) avec un âge minimum de 19 ans et maximum de 76 ans. L'intervalle interquartile (IQ) est de [26-48].

#### 1.2.2.1. Répartition des LAL selon le sexe

14 patients sont de sexe féminin (35,9 %) et 25 patients sont de sexe masculin (64,1%) avec un sexe ratio H/F = 1,78.

#### 1.2.2.2. Répartition des LAL selon les tranches d'âge

**Tableau 25:** Fréquence des LAL selon les tranches d'âges

Tranches d'âge		
	Effectifs	Fréquence %
[19-21[	1	2,2
<b>[21-25]</b>	<b>8</b>	<b>17,8</b>
[26-30]	5	11,1
[31-35]	4	8,9
[36-40]	4	8,9
[41-45]	6	13,3
[46-50]	3	6,7
[51-55]	1	2,2
[56-60]	2	4,4
[61-65]	3	6,7
[66-70]	1	2,2
>75	1	2,2
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>

## Résultats adultes

La majorité des patients se trouve dans la tranche d'âge de [19- 45 ans]. 28 patients (71,79 %) ont moins de 45 ans inclus et uniquement 11 patients (28,2 %) ont plus de 46 ans (voir tableau 25).

### 1.2.2.3. Répartition des LAL selon la classification morphologique FAB

Nous avons colligés 39 cas de LAL dont la fréquence des sous types FAB est la suivante : LAL1 15 cas (38,46 %), LAL2 21 cas (53,84 %) et les LAL3 3 cas (7,69%).

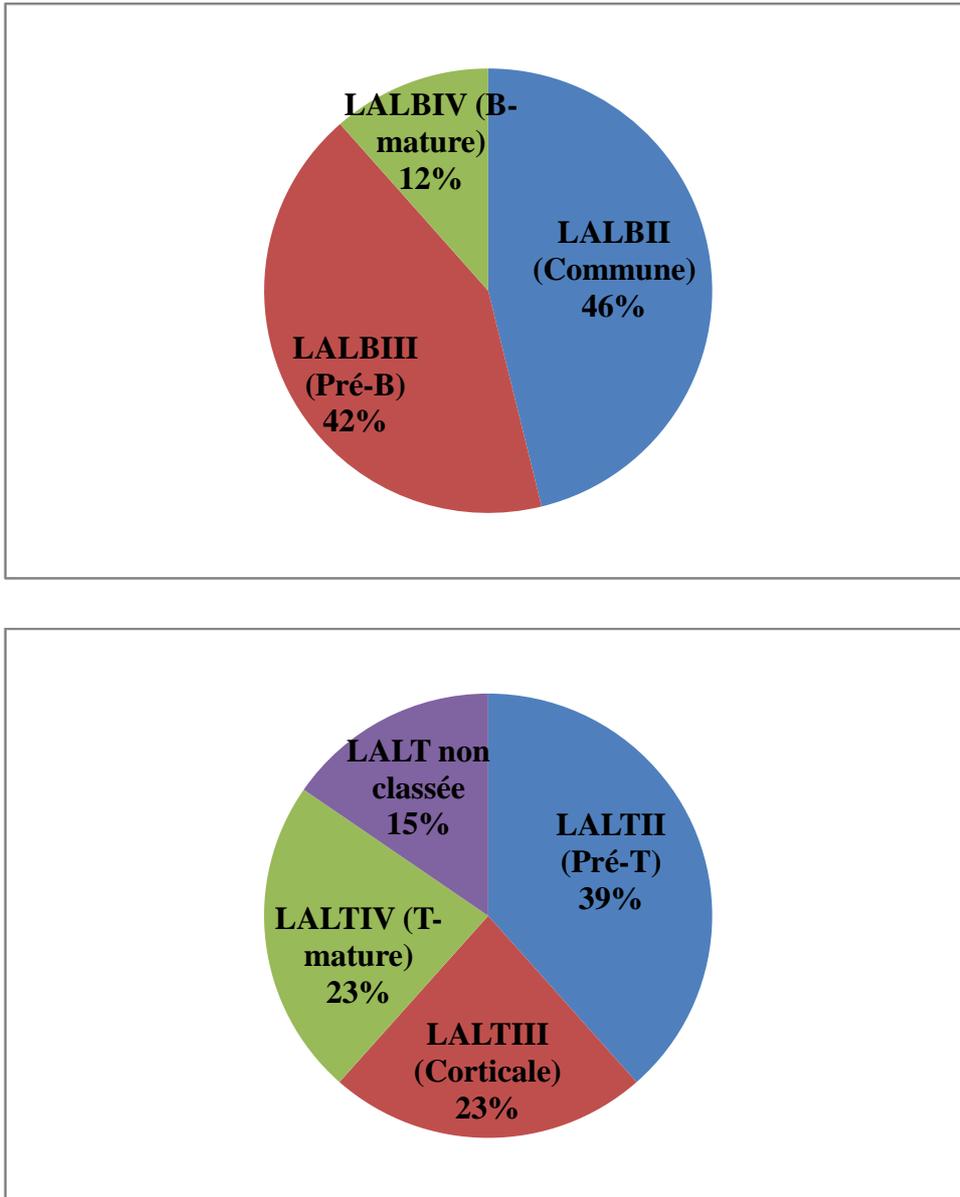
### 1.2.2.4. Répartition des LAL selon les sous types immunologiques

Les LAL étaient réparties en 26 cas de LALB (66,66 %) et 13 cas en LALT (33,33%) ( $Chi^2= 8,66$  et  $p=0.003$ ). La fréquence des sous types immunologiques est résumée dans le tableau 26.

**Tableau 26:** Fréquence des sous types immunologiques des LAL

<b>LALB</b>		
	<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
<b>LALBII (Commune)</b>	<b>12</b>	<b>46,15</b>
<b>LALBIII (Pré-B)</b>	<b>11</b>	<b>42,3</b>
<b>LALBIV (B-mature)</b>	<b>3</b>	<b>11,5</b>
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100,0</b>
<b>LALT</b>		
	<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
<b>LALTHI (Pré-T)</b>	<b>5</b>	<b>38,46</b>
<b>LALTIII (Corticale)</b>	<b>3</b>	<b>23,07</b>
<b>LALTIV (T-mature)</b>	<b>3</b>	<b>23,07</b>
<b>LALT non classés</b>	<b>2</b>	<b>15,38</b>
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

02 cas de LALT n'ont pas été classés en sous type par manque d'anticorps monoclonaux.



**Figure 42:** Fréquence des sous types immunologiques LAL B et LAL T

Le tableau 26 et la figure 42 montrent une prédominance des LALB sous type II ou commune 46 % et des LALT sous type prés T 39%.

#### 1.2.2.5. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des sous types immunologiques des LAL

Une corrélation entre l'immunophénotype des LAL et les caractéristiques cliniques des patients adultes est résumée dans le tableau 27.

## Résultats adultes

**Tableau 27:** LAL de l'adulte - Corrélation entre le phénotype des LAL et les caractéristiques cliniques

Paramètre	LAL B Total= 26 Effectifs (%)	LALT Total= 13 Effectifs (%)	Tests statistique Khi-2 de Pearson (%) et test de Student (moyennes)	P
Sexe : Femme	10 (38,5)	4(30,8)	3,28	0,07
Homme	16 (61,5)	9 (69,2)	0,22	0,63
Sexe ratio H/F	1,6	2,25	/	/
Age (moyenne) ± Ecart type Age (Mini-maxi) ans	36,11±11,8 (19-61)	44,42±17,5 (23-76)	Indice de Student t = 1,76	0,086
Syndrome tumoral	15 (57,7)	10 (76,9)	1,39	0.23
<b>ADP</b>	<b>61(23,1)</b>	<b>8(61,5)</b>	<b>5,57</b>	<b>0,018</b>
SPMG ≥ 5cm	14(53,8)	3 (23,1)	2,2	0,14
HPMG	5(19,2)	1(7,7)	0,22	0,64
PCM	24(92,3)	12(92,3)	0.000	1
<b>Fièvre</b>	<b>13(50)</b>	<b>11(84,6)</b>	<b>4,39</b>	<b>0,036</b>
Syndrome infectieux	13(50)	4(30,8)	0,64	0,42
Syndrome hémorragique	13(50)	5(38,5)	0,46	0,5

### 1.2.2.6. Caractéristiques hématologiques des sous types immunologiques des LAL

#### - Taux de globules blancs

La médiane du taux de GB dans les LAL type B est de 15,85±50,92 G/L, le taux varie de 0,80-238 G/L. L'IQ = [7,57-52,35]. Pour les LAL type T, la médiane est de 38,57±130 G/L avec des variations minimale et maximale de 3,99 à 491 G/L L'IQ = [6,69-57,41].

## Résultats adultes

---

L'hyperleucocytose  $> 30$  G/L est retrouvée dans 10/26 (38,5 %) des LALB versus 7/13 (53,84 %) des LAL T. Le taux de GB  $>100$  G/L à été retrouvé dans 1/13 cas des LALT (7,69%) et 2/26 cas des LAL B(7,69 %).

Absence de cas leucopénique dans les LALT versus 3/26 cas (11,5%) dans les LALB.

2/26 cas de pancytopenie soit 7,69 % étaient observé uniquement dans les LALB.

### - Taux d'hémoglobine

Le taux médian de l'Hb dans les LALB est de 8,85 g/dl  $\pm 1,98$  avec un minimum de 6,4 g/dl et un maximum de 15,5g/dl. L'IQ = [7,8-9,6].

Dans les LALT le taux médian en Hb est de 8,4g/dl  $\pm 1,69$  dont les valeurs varient de 7,4g/dl à 13,7g/dl. L'anémie définie par un taux d'Hb  $<12$  g/dl était retrouvée dans 12 cas (92,3%) de LAL T versus 24 cas (92,3%) dans les LAL B (p=1).

### - Taux de plaquettes

Le taux médian de plaquettes est de 47,5G/L  $\pm 51,48$  dans les LALB, les valeurs varient de 12G/L à 215/L, IQ = [22,5-87,5].

Dans les LAL T le taux médian de plaquettes est de 46 G/L  $\pm 91,68$ , les valeurs varient de 20G/L à 333G/L, IQ = [32-134].

Une thrombopénie (taux de plaquettes  $<100$ G/L était retrouvée dans 8 cas (38,46 %) des LALT versus 21 cas (19,23 %) dans les LALB (p=0,195).

### - Etude cytologique des LAL : frottis sanguin et médullogramme

Le taux médian de blastes circulants était 77 %, IQ: 49-88 %. L'examen cytologique des frottis de moelle osseuse a permis d'affirmer le diagnostic et de classer les cas de LAL, en se basant sur les critères descriptifs de la classification FAB. L'étude du myélogramme a objectivé un taux médian de blastes de 86 %, IQ: 72-91 %. Le taux de blastes médullaire a varié entre 25 % et 100 %.

Il n'existe pas de différences statistiquement significative des taux médian des blastes médullaires entre les sous types immunologiques de LAL (p=0,6 pour t=0,86), IC 95% = [-8,3-15].

1.2.2.7. Circonstances de découvertes des LAL

- Circonstances de découvertes des LALB

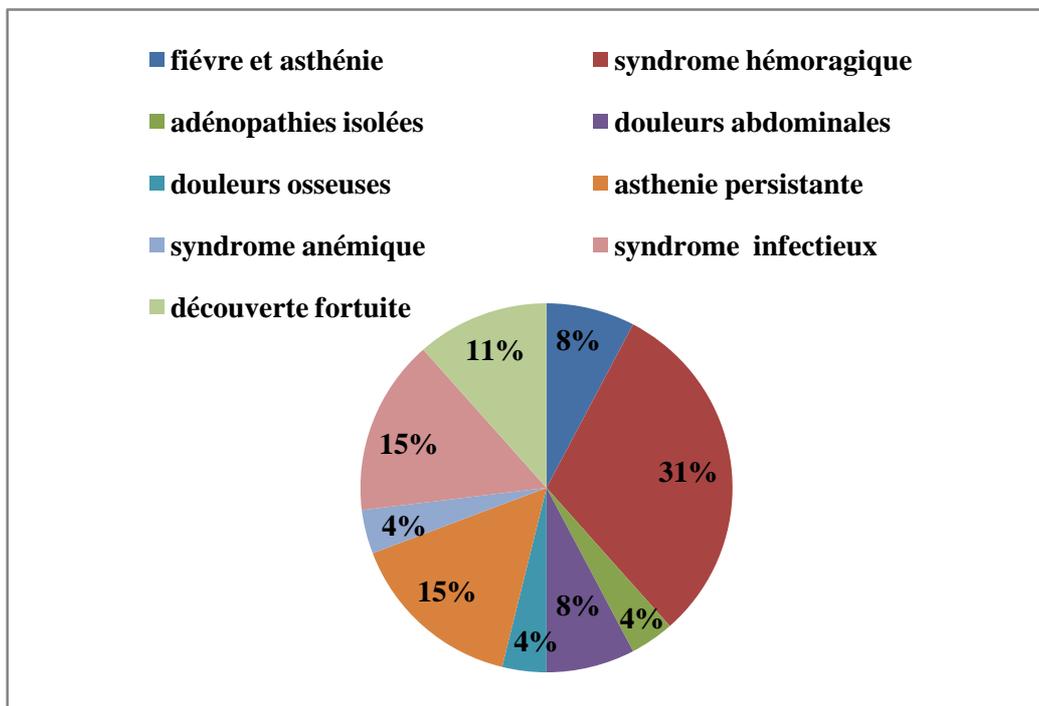


Figure 43: Circonstances de découvertes des LALB

Le syndrome hémorragique essentiellement modéré, est la circonstance de découverte la plus fréquente dans les LAL B : 31% des cas (voir figure 43).

- Circonstances de découvertes des LALT

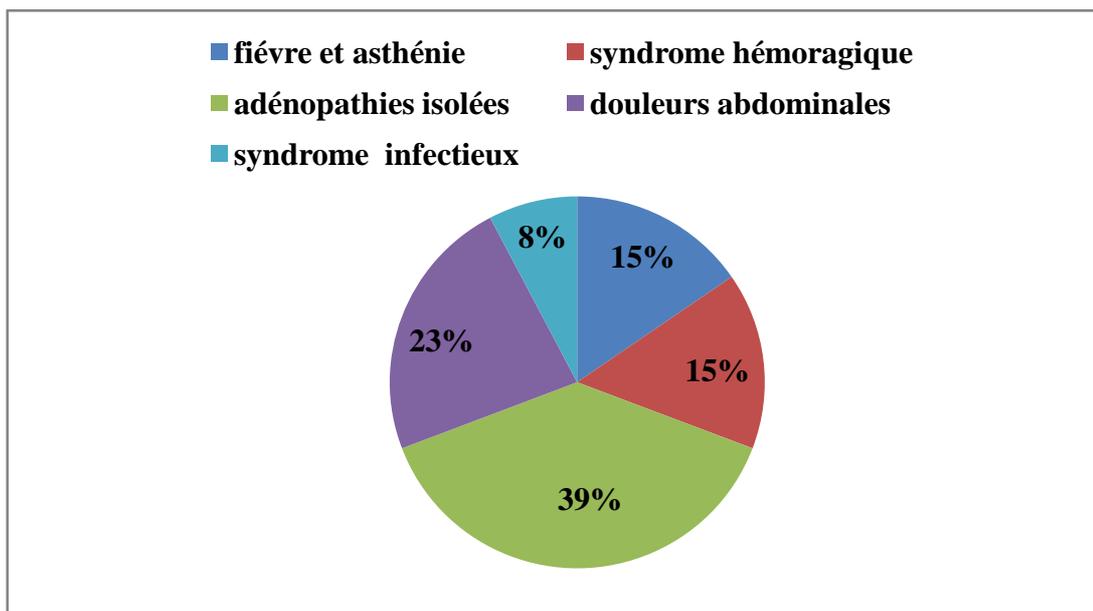


Figure 44: Circonstances de découvertes des LALT

## Résultats adultes

Dans les LAL, les patients ont consulté dans 39% des cas suite à la découverte d'ADP isolées (voir figure 44).

### 1.2.3. Fréquence d'expression des antigènes de différenciation leucocytaire dans les LAL B et T

L'étude immunophénotypique par CMF des cas de LAL à été réalisé sur 16/39 prélèvements sanguin (41,02%) et 23/39 prélèvements médullaires (59%).

#### 1.2.3.1. Fréquence d'expression antigénique dans les LAL B

Prédominance d'expression des marqueurs antigéniques lymphoïdes B spécifique: CD79a (100%), CD10 (100 %) et le CD 19 (91 %). Les marqueurs d'immaturité HLADR, CD34 sont présents dans respectivement 96,2%, 76,9 % des cas ; (voir tableau 28 et figure 45).

**Tableau 28:** Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LAL B

Antigène	N <sup>bre</sup> cas testés	N <sup>bre</sup> cas positifs	Fréquence %
<b>HLADR</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>96,2</b>
<b>CD34</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>76,9</b>
CD38	20	18	90
<b>CD19</b>	<b>25 (NT : 1cas)</b>	<b>25</b>	<b>100</b>
CD79acyt	26	26	100
CD20	17	9	52,94
<b>CD10</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>100</b>
<b>CD22cyt</b>	<b>26</b>	<b>12</b>	<b>46,12</b>
Tdt	15	10	66,66
Ch mucyt	26	13	50
IgMs	19	3	15,78

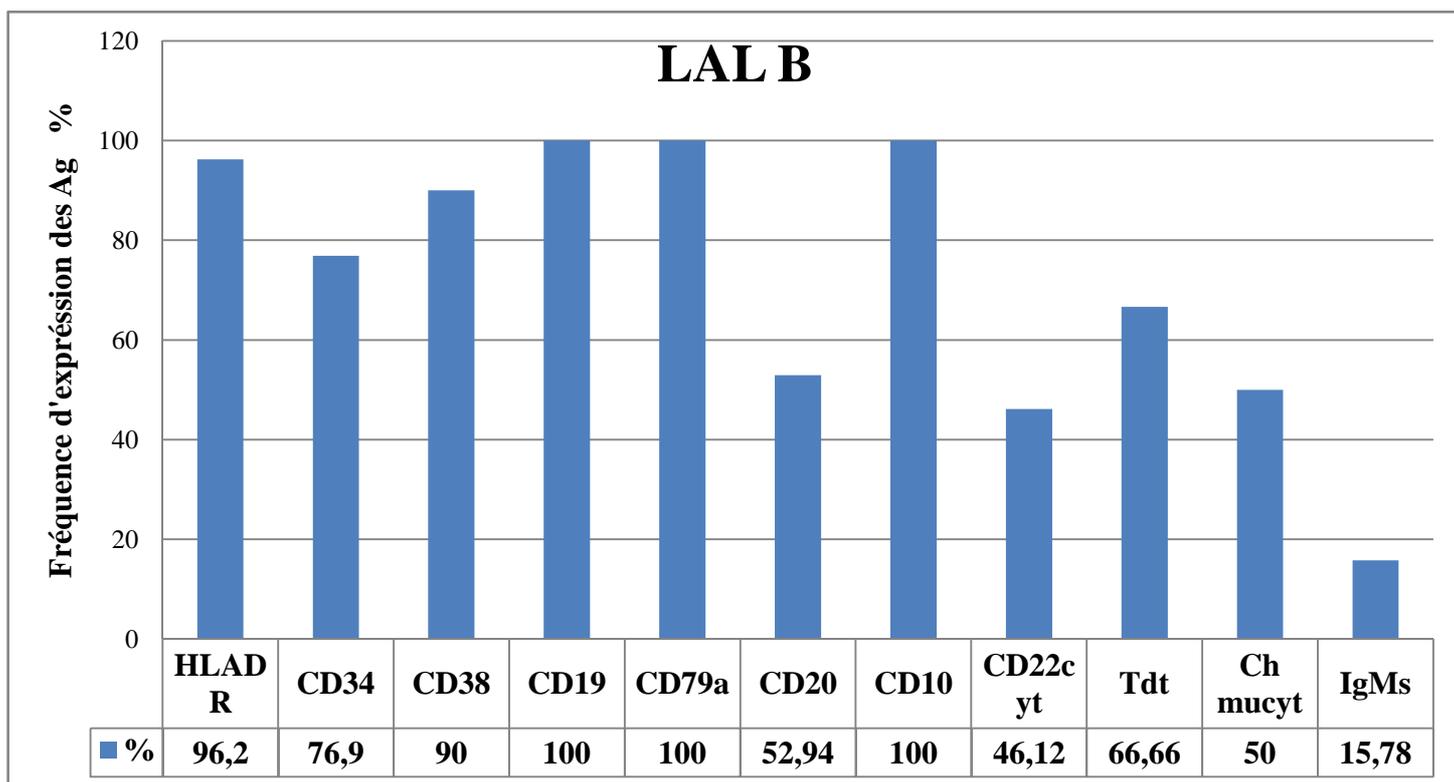


Figure 45: Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL B

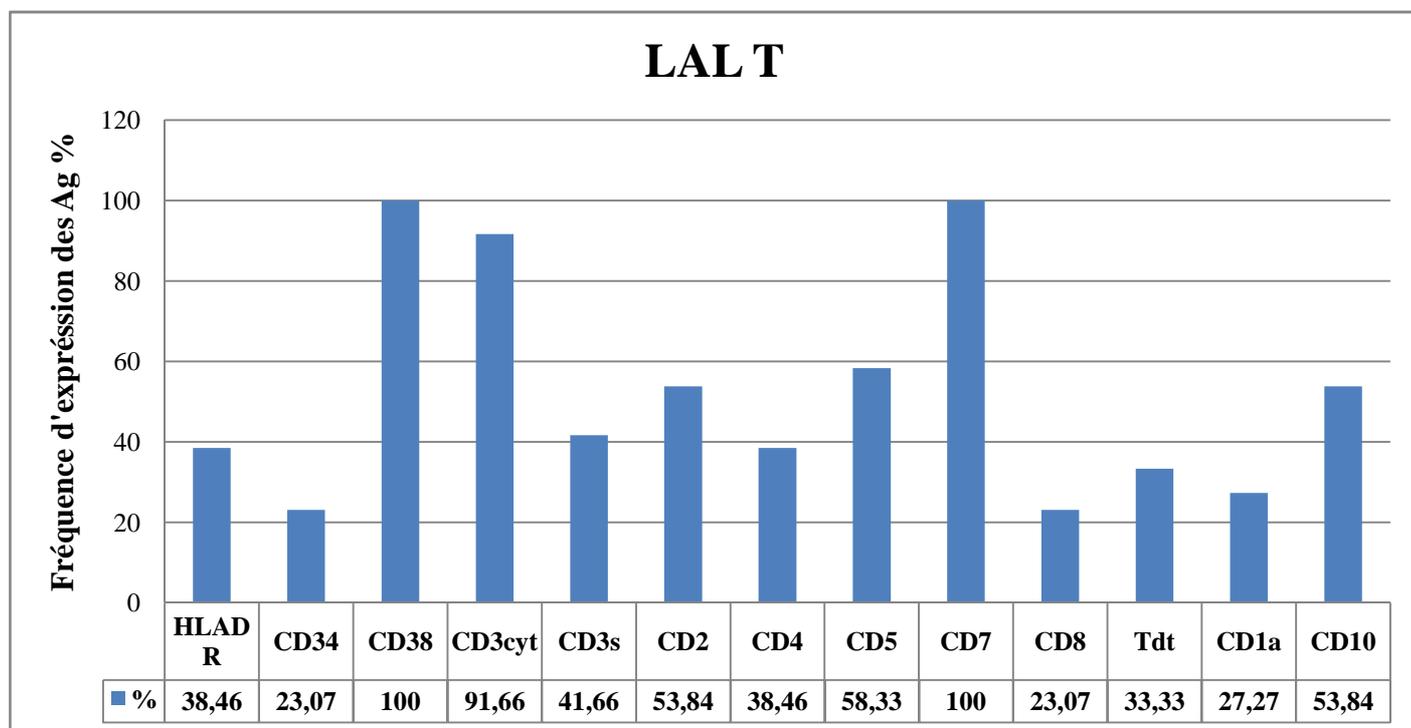
### 1.2.3.2. Fréquence d'expression antigénique dans les LAL T

Tableau 29: Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LALT

Antigène	N <sup>bre</sup> cas testés	N <sup>bre</sup> cas positifs	Fréquence %
HLADR	13	5	38,46
CD34	13	3	23,07
CD38	12	12	100
CD3cyt	12	11	91,66
CD3s	12	5	41,66
CD2	13	7	53,84
CD4	13	5	38,46
CD5	12	7	58,33
CD7	13	13	100
CD8	13	3	23,07
Tdt	9	3	33,33
CD1a	11	3	27,27
CD10	13	7	53,84

## Résultats adultes

Les Ag CD7, CD3cyt, CD2, CD5 sont les plus sensibles pour la détection des LAL de type T, le CD7 est l'Ag lymphoïde T de surface le plus exprimé 100 % des cas (voir tableau 29 et figure 46).



**Figure 46:** Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL T

Dans notre série d'étude des LAL, l'Ag CD117 marqueur de la cellule souche CFU-Mix et de spécificité myéloblastique, est rarement exprimé : 2 cas positifs dans les LAL T (15,4%) et 1 cas dans les LALB (3,8%).

### 1.2.4. Co-expression d'antigènes aberrants dans les LAL

La co-expression d'antigènes aberrants myéloïdes ou lymphoïde d'une autre lignée est résumée dans le tableau 30. L'antigène est considéré comme aberrant lorsque le score qui lui attribué est < 2.

Les LAL qui co-expriment des Ag myéloïdes (LAL My+) représentent 30,76% versus 69,23 % des cas de LAL n'exprimant pas d'Ag myéloïdes (LAL My-).

## Résultats adultes

**Tableau 30:** Expression d'antigènes aberrants selon la classification immunologique des LAL T et B

Type LALT	Ag aberrant	CD13	CD33	Sexe/Age	Survie			
LALT IV		positif	négatif	H/48ans	12m			
LALT II		positif	négatif	H/44ans	4m			
LALT II		négatif	positif	H/38ans	1m			
LALT II		négatif	positif	H/56ans	58m			
N <sup>bre</sup> cas testés		13	13					
N <sup>bre</sup> cas positifs		2	2					
Fréquence %		15,38	15,38					
Type LALB		CD13	CD33	CD11c	CD36	CD7	Sexe/Age	Survie mois
LA B III					Positif		H/44ans	6m
LALBII			Positif				H/32 ans	10m
LALBIII		Positif				Positif	F/29ans	8m
LALBIII				Positif			H/31ans	3m
LALBIII		Positif	Positif		Positif	Positif	F/47ans	0m
LALBIII			Positif				F/34ans	15m
LALBII					Positif		H/23ans	4m
LALBIV			Positif				F/59ans	65m
LALB II			Positif				H/53ans	0m
LALBIII					Positif		H/42ans	0m
LALBIII						Positif	H/21ans	24m
Nbre cas testés		26	26	11/26	14/26	26		
Nbre cas positifs		2	5	1	4	3		
Fréquence %		7,69	19,23	9,09	28,57	11,53		

### 1.2.4.1. Co-expression d'antigènes aberrants de nature myéloïde dans les LAL de lignée T

Parmi les 13 cas de LAL de la lignée T, 4 patients co-exprimaient des Ag myéloïdes (30,76%), il s'agit de LALT My+. Le CD13 était exprimé seul chez deux patients, pareil pour le CD33 il était exprimé d'une manière isolée chez les deux autres patients.

### **1.2.4.2. Co-expression d'antigènes aberrants de nature myéloïde dans les LAL de lignée B**

10/33 cas de LAL B, 30,3 % co-exprimaient des Ag aberrants ; 09 patients 27,27 % co-exprimaient des Ag myéloïdes : CD13, CD33, CD36, CD11c.

Le CD33 est l'Ag myéloïde le plus exprimé vu qu'il a été testé chez la totalité des patients 5/26 cas (19,23 %).

*L'Ag lymphoïde de la lignée T : le CD7 a été co-exprimé dans 03 cas (11,53%).*

### **1.3. Etude de la survie globale en fonction des facteurs pronostiques**

Les patients adultes de notre série d'étude dont l'âge est > 18 ans ont reçu des traitements spécifiques de chimiothérapie dès la phase d'induction, regroupés dans les protocoles suivants :

- Les cas de LAM à l'exception des LAM3 : Protocole Rubidomycine associés à l'Aracytine ;

- Les cas de LAM3 : association au protocole Rubidomycine- Aracytine de l'ATRA (l'acide tout-trans rétinoïque ou All-Trans Retinoic Acid) ;

- Les cas de LAL B : protocole Linker qui a été remplacé par les protocoles GRAAPH/GRAALL depuis la systématisation de la recherche du chromosome Philadelphie1 (Ph1) en 2017 ;

- (Si le patient est Ph1+ c'est le protocole GRAAPH 2005 qui a été utilisé et dans le cas où le patient est Ph1- , c'est les protocoles GRAALL 2005 de 2014 à 2016 et Linker de 2017 à 2019 qui ont été utilisés.

- Les cas de LAL T : c'est le protocole Linker qui a été utilisé.

Une prophylaxie neuroméningée par injections intrathécale de chimiothérapie (méthotrexate et corticoïdes) a été instaurée dès l'induction dans tous les cas de LAL et certaines LAM.

## Résultats adultes

### 1.3. 1. Fréquence des facteurs pronostiques liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL

**Tableau 31:** Fréquence des facteurs pronostiques liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL

	LAM (N°=121)		LAL (N°=39)		Tests statistiques	
	Effectifs	%	Effectifs	%	Chi2	<i>p</i>
<b>Sexe masculin</b>	57/121	<b>47,1</b>	25	<b>64,1</b>	<b>3,41</b>	<b>0,065</b>
<b>Age &gt; 60 ans</b>	<b>34/120</b>	<b>28,33</b>	<b>4</b>	<b>10,25</b>	<b>4,34</b>	<b>0,037</b>
<b>GB ≥ 50G/L</b>	45/120	<b>37,5</b>	13	<b>33,33</b>	<b>0,22</b>	<b>0,64</b>
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>40/120</b>	<b>33,33</b>	<b>25</b>	<b>64,10</b>	<b>11,53</b>	<b>0,001</b>

### 1.3.2. Survie globale en fonction des facteurs pronostiques liés à la LA

#### 1.3.2.1. Survie globale en fonction du type de la LA

Les cas censurés appelés aussi : les exclus vivants (VV) et les perdus de vue (PV)

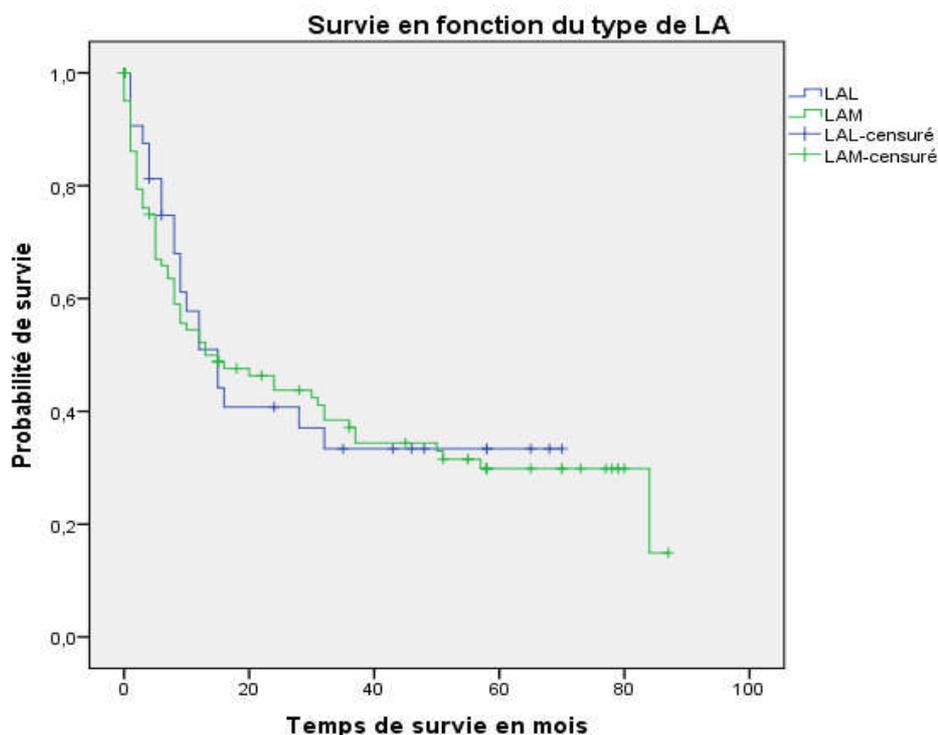
La survie globale est calculée de la date du diagnostic de la leucémie aigüe à la date du décès du patient.

Le taux de survie des LAL est meilleurs (33%) versus LAM (15%) ; (voir tableau 32).

**Tableau 32:** Survie globale en fonction du type de la LA : LAM/LAL

	Total	Nombre de décès	%	Nombre VV et PV	%	Nombre VV	% Survie
<b>LAL</b>	39	20	<b>51,28</b>	19	48,7	12	<b>33</b>
<b>LAM</b>	121	62	<b>51,23</b>	59	48,8	24	<b>15</b>
<b>Global</b>	160	82	<b>51,25</b>	78	48,8	36	<b>/</b>

## Résultats adultes



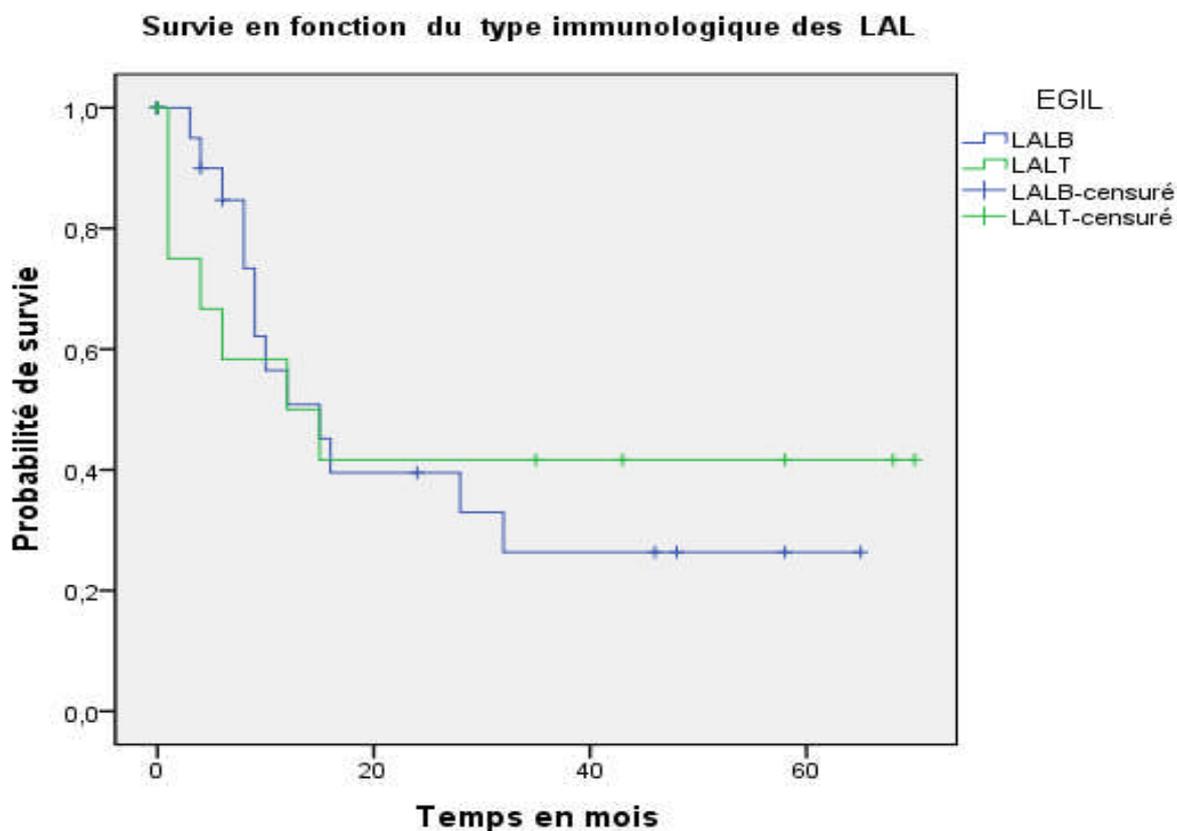
**Figure 47:** Courbe de survie globale en fonction du type de la LA : LAM/LAL

Le délai moyen de survie est de 34,65 mois pour les LAM avec un IC à 95% [27-42] versus 30,27 mois pour les LAL avec IC à 95 % [20-41]. La comparaison des survies au test de Log Rank donne un  $p=0,7$  pour un  $\chi^2=0,12$  ; (voir figure 47).

### 1.3.2.2. Probabilité de survie en fonction du type immunologique des LAL

**Tableau 33:** Survie globale en fonction du type immunologique des LAL :LALB/LALT

EGIL	Total des patients	Nombre de décès	%	Nombre de Vivants (VV) et perdues de vues (PV)	%	% Survie
<b>LALB</b>	26	13	50	13	50,0	<b>26</b>
<b>LALT</b>	13	7	53,8	6	46,2	<b>42</b>
<b>Global</b>	39	20	51,3	19	48,7	/



**Figure 48:** Survie globale en fonction du type immunologique des LAL : LALB/LALT

Le délai moyen de survie est de 26,66 mois pour les LAL de type B IC à 95 % [15,3-38] versus 32,5 mois pour les LAL de type T, IC [14,4-50,6]. La comparaison des survies au test de Log Rank donne un  $p=0,84$  pour un  $\chi^2 = 0,037$  ; (voir figure 48).

Le taux de survie dans les LALT (42%) est meilleur que dans les LALB (26%) ; (voir tableau 33).

## Résultats adultes

### 1.3.2.3. Probabilité de survie en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic

#### - CAS DES LAM

Le tableau 34 résume les résultats de la survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral et du taux de globules blancs au diagnostic des LAM.

**Tableau 34:** Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAM

<b>Groupes d'âge</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
≤ 60	89	42	47,2	47	52,8	20
> 60	29	17	58,6	12	41,4	0
<b>Global</b>	118	59	50,0	59	50,0	/
<b>Sexe</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>Femme</b>	64	33	51,5	31	48,4	<b>29</b>
<b>Homme</b>	57	29	50,8	28	49,1	<b>0</b>
<b>Global</b>	121	62	51,2	59	48,8	/
<b>Groupes de GB</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NR</b>	1	0	0	1	100,0	/
<b>&lt;50G/L</b>	75	36	48	39	52,0	<b>38</b>
<b>≥ 50G/L</b>	45	26	57,7	19	42,2	<b>0</b>
<b>Global</b>	121	62	51,2	59	48,8	/
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NR</b>	1	0	0	1	100,0	/
<b>Absent</b>	80	38	47,5	42	52,5	<b>33,6</b>
<b>Présent</b>	40	24	60	16	40,0	<b>0</b>
<b>Global</b>	121	62	51,2	59	48,8	/

## Résultats adultes

- Des différences statistiquement significatives entre les délais moyens de survie ont été retrouvées uniquement selon les groupes d'âge et les groupes du taux de GB.
- Le délai moyen de survie est de 40,68 mois pour les patients dont l'âge est  $\leq 60$ ans IC à 95 % [31,59-49,76] versus 15,87 mois pour les patients dont l'âge est  $> 60$ ans IC à 95 % [7,55-24,2]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un  $p=0,01$  pour un  $\text{Khi}^2=6,64$  ; (voir figure 49).
- Le délai moyen de survie est de 24,11 mois pour les patients dont le taux de GB  $< 50$ G/L IC à 95 % [18-30], versus 11,07 mois pour les patients avec un taux de GB  $\geq 50$  G/L IC à 95% [5,04-17,09]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un  $p=0,008$  pour un  $\text{Khi}^2=6,96$  ; (voir figure 50).

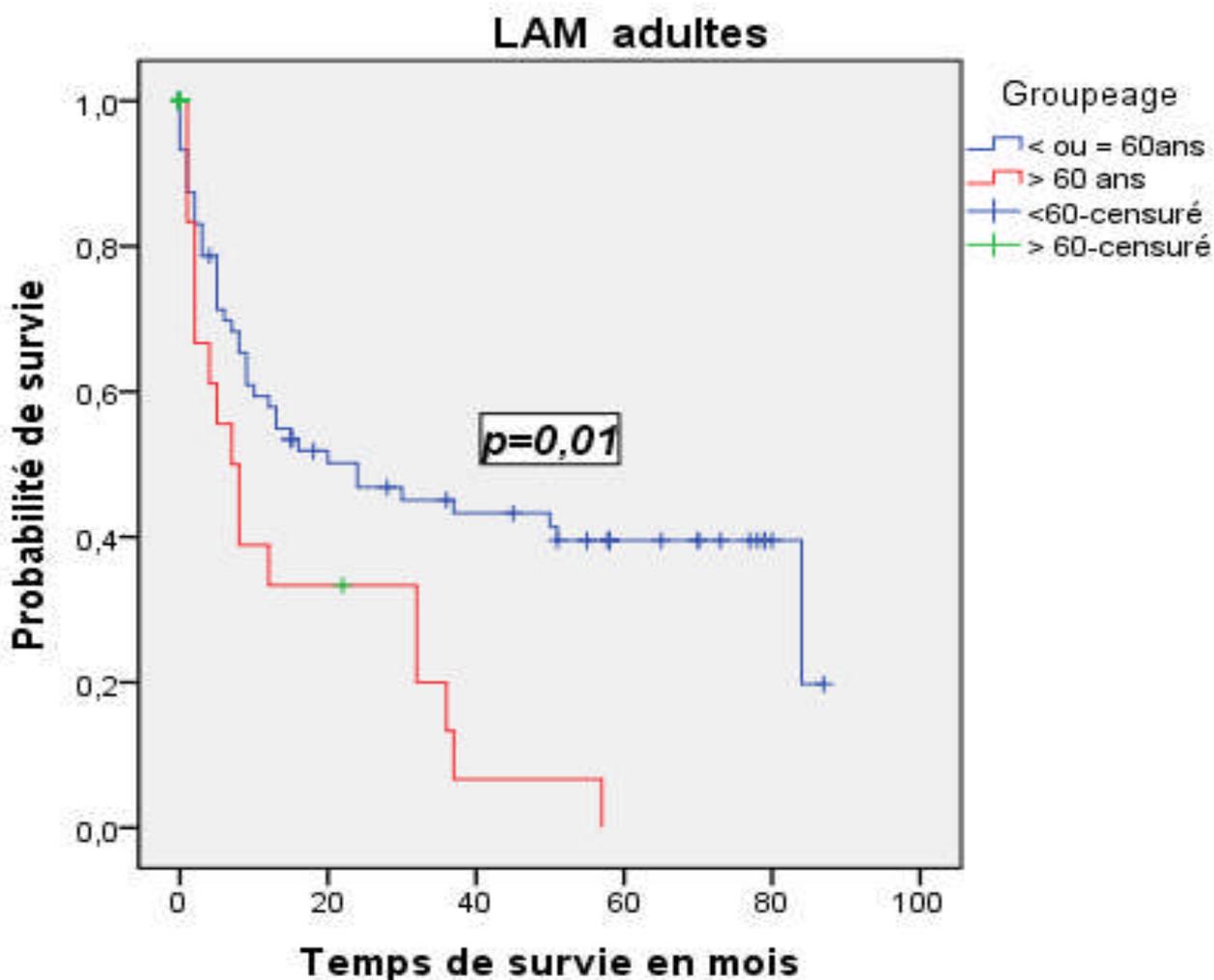


Figure 49: LAM adultes - Survie globale en fonction de l'âge

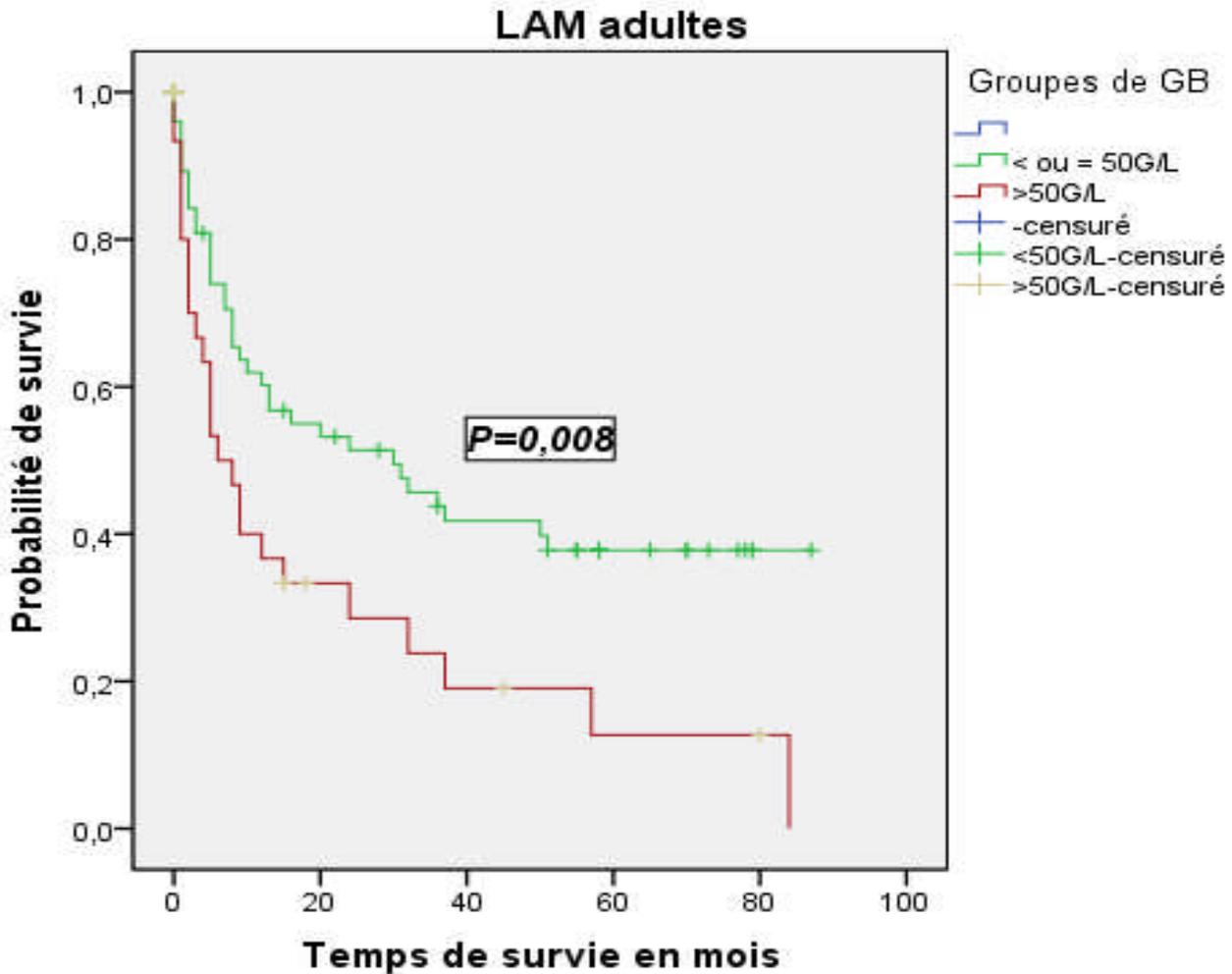


Figure 50: LAM adultes - Survie globale en fonction du taux de globules blancs

- CAS DES LAL

Tableau 35: Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAL

Sexe	Total	Nombre de décès	%	Nombre de VV et PV	%	% Survie
Femme	14	11	78,6	3	21,4	15,4
Homme	25	9	36	16	64,0	47,4
Global	39	20	51,3	19	48,7	/
Groupes d'âge	Total	Nombre de décès	%	Nombre de VV et PV	%	% Survie

## Résultats adultes

≤ 60 ans	36	17	47,2	19	52,8	37,4
> 60 ans	3	3	100	0	0,0	0
<b>Global</b>	39	20	51,3	19	48,7	/
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>Absent</b>	14	6	42,8	8	57,1	30
<b>Présent</b>	25	14	56	11	44,0	33
<b>Global</b>	39	20	51,3	19	48,7	/
<b>Taux de GB</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>&lt;50G/L</b>	26	13	50	13	50,0	34
<b>≥50G/L</b>	13	7	53,8	6	46,2	30
<b>Global</b>	39	20	51,3	19	48,7	/

- Le délai moyen de survie est de 32 mois pour les patients dont l'âge est ≤ 60ans IC à 95 % [20,7-43,3] versus 16 mois pour les patients dont l'âge est >60ans IC à 95 % [0,0-33,6]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un p=0,4 pour un Khi2=0,7.

- Le délai moyen de survie est de 32,5 mois pour les patients dont le taux de GB<50G/L IC à 95 % [20,2-45], versus 24,2 mois pour les patients avec un taux de GB ≥ 50 G/L IC à 95 % [6,3-4]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un p=0,3 pour un Khi2=0,9 ; (voir figure 51).

- Le délai moyen de survie est de 39 mois pour les patients de sexe masculin IC à 95% [24,4-53,14], versus 18,4 mois pour les patients de sexe féminin IC à 95% [6,8-30]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un **p = 0,06** pour un Khi2= 3,45 ; (voir figure 52).

- Le délai moyen de survie est presque identique pour les patients avec ou sans syndrome tumoral, il est de 28,90 mois en présence du syndrome tumoral IC à 95% [16,23-41,6], versus 28,13 mois en absence du syndrome tumoral IC à 95 % [14-42]. Le test de comparaison au Log Rank donne un p=0,6 pour un Khi2=0,26.

## Résultats adultes

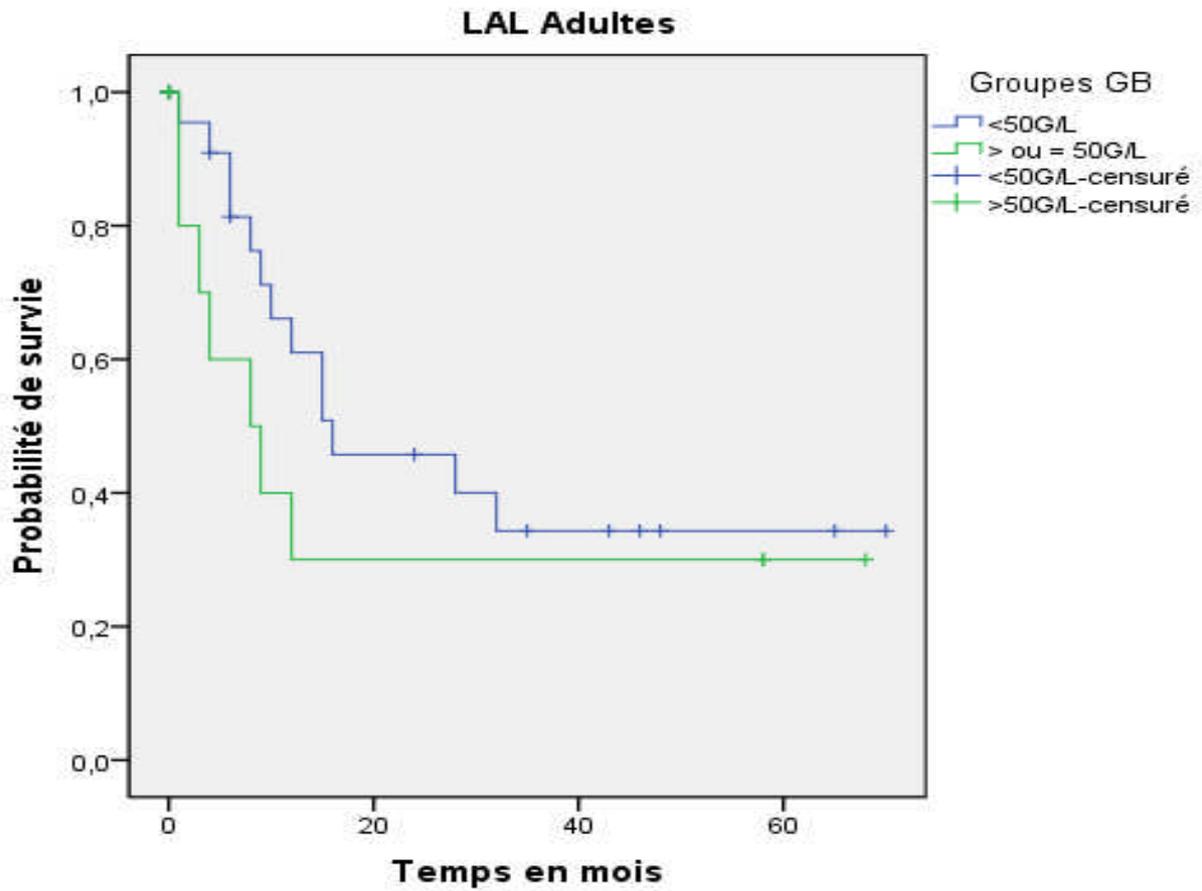


Figure 51: LAL adultes - Survie globale en fonction du taux de globules blancs

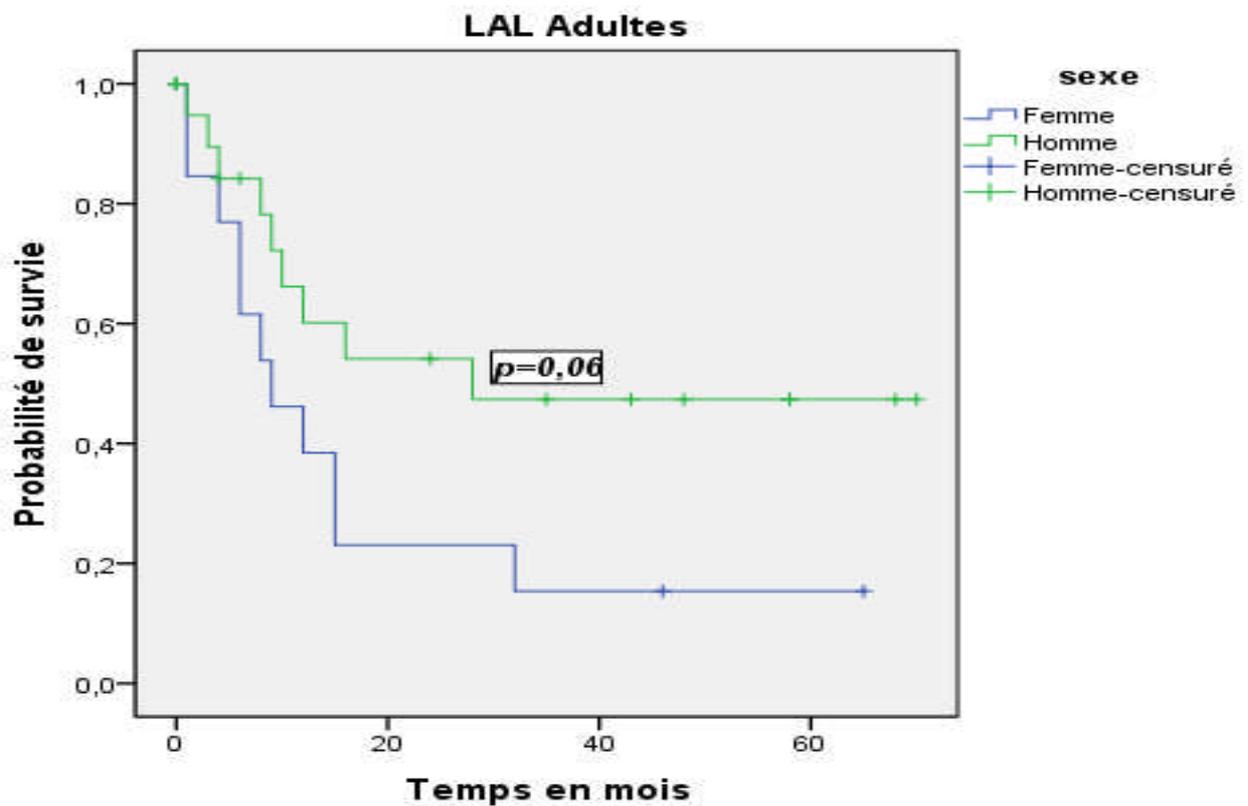


Figure 52: LAL adultes - Survie globale en fonction du sexe

## Résultats adultes

### 1.3.3. Valeur pronostique des différents marqueurs immunologiques exprimés dans les LA au diagnostic

#### 1.3.3.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface dans les LAM

##### 1.3.3.1.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface spécifique de la lignée myéloïde

Le tableau 36 résume le nombre de patients inclus jusqu'à la fin du suivi, la fréquence de l'événement survenus (décès) et des non événements (vivants et perdues de vue) en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.

**Tableau 36:** LAM adultes - Survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

<b>HLADR</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	27	12	<b>44,4</b>	15	<b>55,6</b>	<b>42</b>
<b>POSITIF</b>	94	50	<b>53,2</b>	44	<b>46,8</b>	<b>13</b>
<b>Global</b>	121	62	<b>51,1</b>	59	<b>48,8</b>	<b>/</b>
<b>CD34</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	63	33	<b>52,4</b>	30	<b>47,6</b>	<b>17</b>
<b>POSITIF</b>	58	29	<b>50</b>	29	<b>50,0</b>	<b>24</b>
<b>Global</b>	121	62	<b>51,1</b>	59	<b>48,8</b>	<b>/</b>
<b>CD117</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	29	17	<b>58,6</b>	12	<b>41,4</b>	<b>20,5</b>
<b>POSITIF</b>	91	45	<b>49,4</b>	46	<b>50,5</b>	<b>16,4</b>
<b>Global</b>	120	62	<b>51,6</b>	58	<b>48,3</b>	<b>/</b>
<b>CD64</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	36	19	<b>52,7</b>	17	<b>47,2</b>	<b>0</b>
<b>POSITIF</b>	83	42	<b>50,6</b>	41	<b>49,4</b>	<b>33</b>
<b>Global</b>	119	61	<b>51,3</b>	58	<b>48,7</b>	<b>/</b>
<b>CD15</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	38	22	<b>58</b>	16	<b>42,1</b>	<b>14</b>
<b>POSITIF</b>	41	17	<b>41,46</b>	24	<b>58,5</b>	<b>47</b>

## Résultats adultes

<b>Global</b>	79	39	<b>49,4</b>	40	<b>50,6</b>	/
<b>CD14</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	98	49	<b>50</b>	49	<b>50,0</b>	<b>17</b>
<b>POSITIF</b>	19	10	<b>52,6</b>	9	<b>47,4</b>	<b>0</b>
<b>Global</b>	117	59	<b>50,4</b>	58	<b>49,6</b>	/

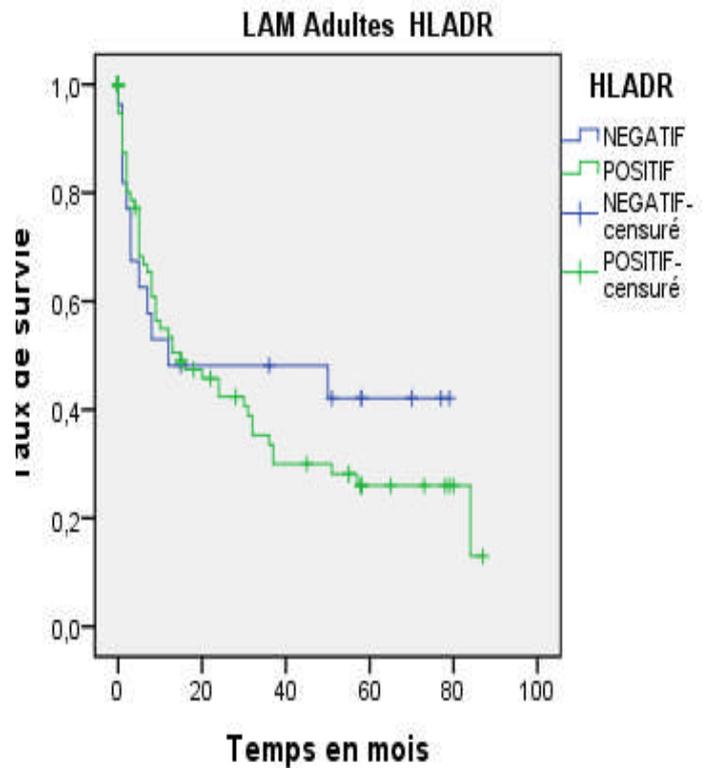
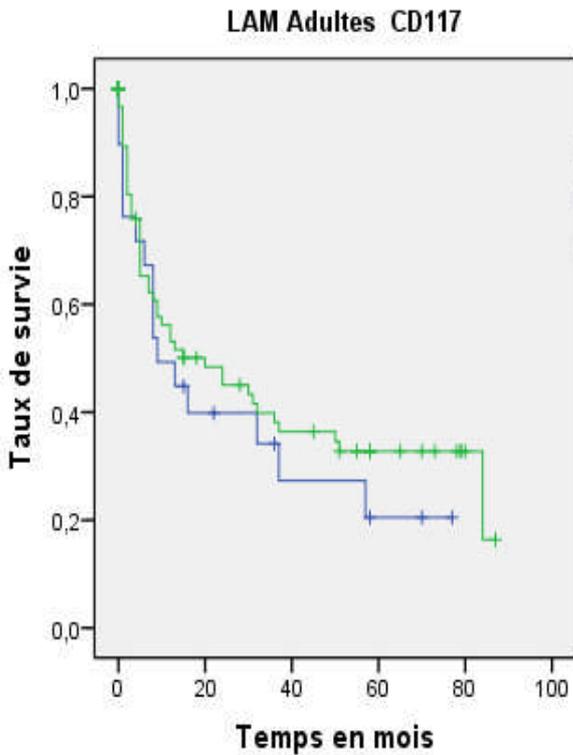
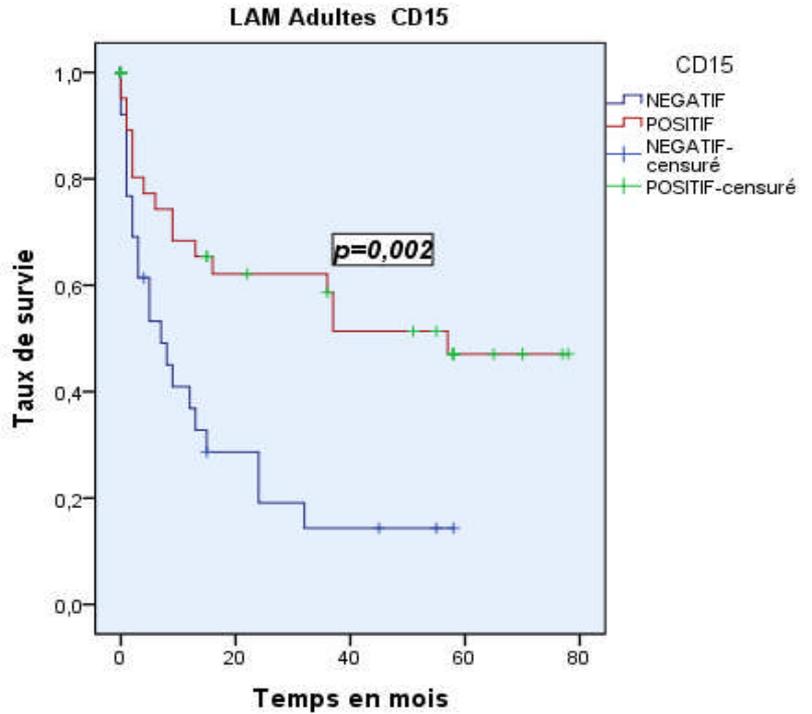
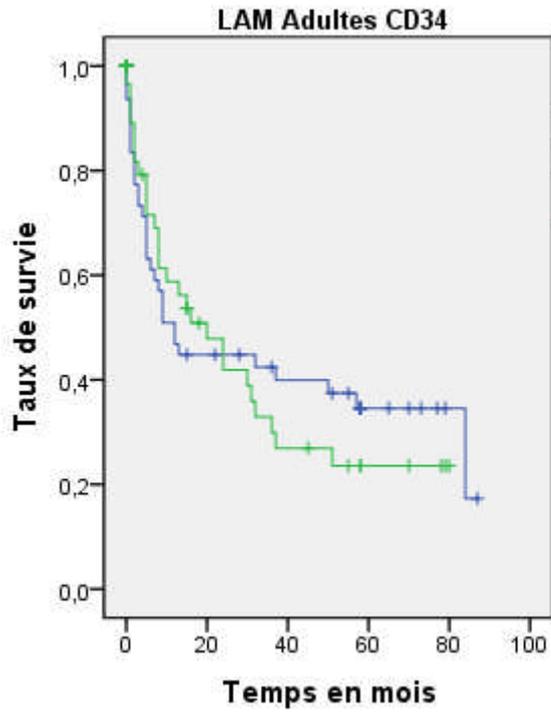
**Tableau 37:** LAM adultes- Statistiques et délais moyens de survie en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

Paramètre	Délai moyen de survie en mois	IC à 95%	Khi2	<i>p</i>
<b>HLADR+</b>	32,6	24-41	0,53	0,46
<b>HLADR-</b>	38,4	23-54		
<b>CD34+</b>	30,4	21-40	0,1	0,7
<b>CD34-</b>	36,7	26-47		
<b>CD117+</b>	36	27-45	0,8	0,36
<b>CD117-</b>	27	15-40		
<b>CD64+</b>	38,8	30-48	1,9	0,16
<b>CD64-</b>	25,8	12-40		
<b>CD15+</b>	<b>45</b>	<b>33,6-56,6</b>	<b>9,33</b>	<b>0,002</b>
<b>CD15-</b>	<b>16</b>	<b>8-23</b>		
<b>CD14+</b>	21,6	9,6-33,5	1,3	0,25
<b>CD14-</b>	37,5	29-46		

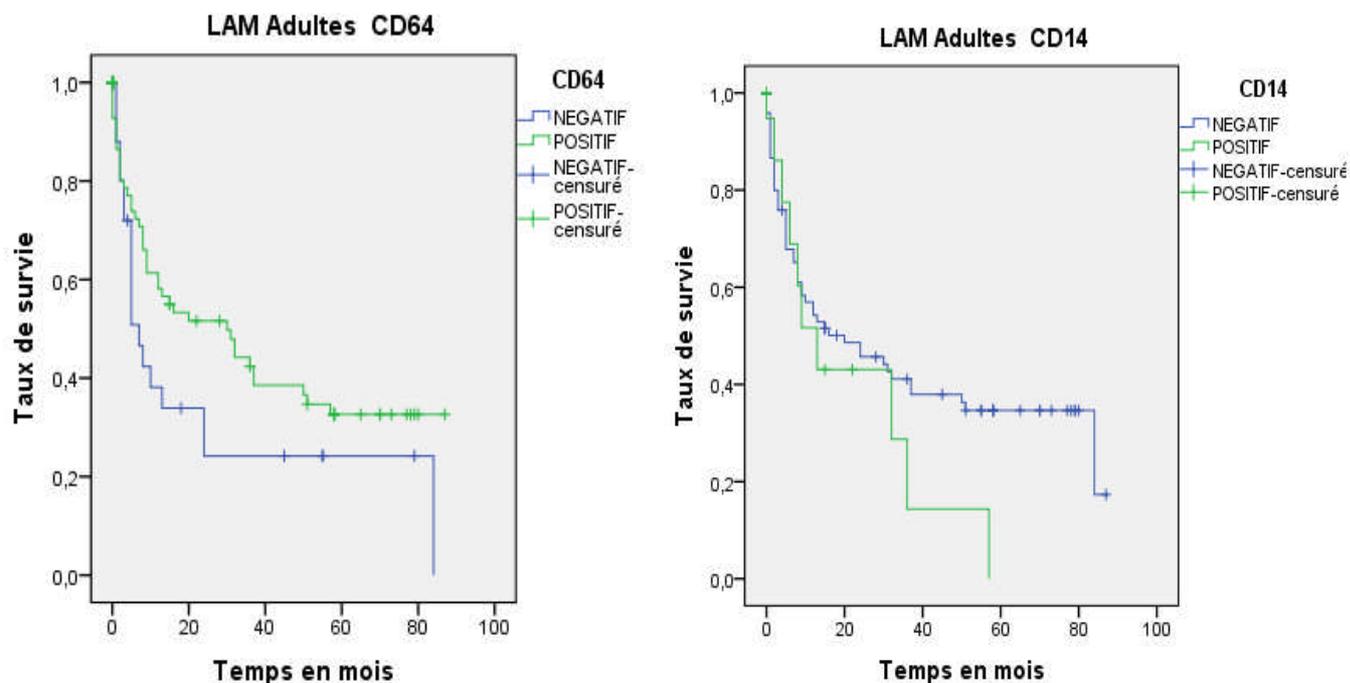
Le tableau 37 résume les délais moyens de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface dans les LAM.

La figure 53 illustre des exemples de courbes de survie globale de Kaplan Meyer selon l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface dans les LAM.

## Résultats adultes



## Résultats adultes



**Figure 53:** Courbes de survie globale selon l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface dans les LAM

Chez les patients atteints de LAM une MPO positive avec expression de CD13 et/ou CD33 reste des critères d'appartenance vers la lignée myéloïde, la positivité de la MPO et celui du CD13 de nos patients était de 95 % (115cas +/121), 88,3 % (106 cas +/120) et de 98,3 % pour le CD33 (119cas +/121).

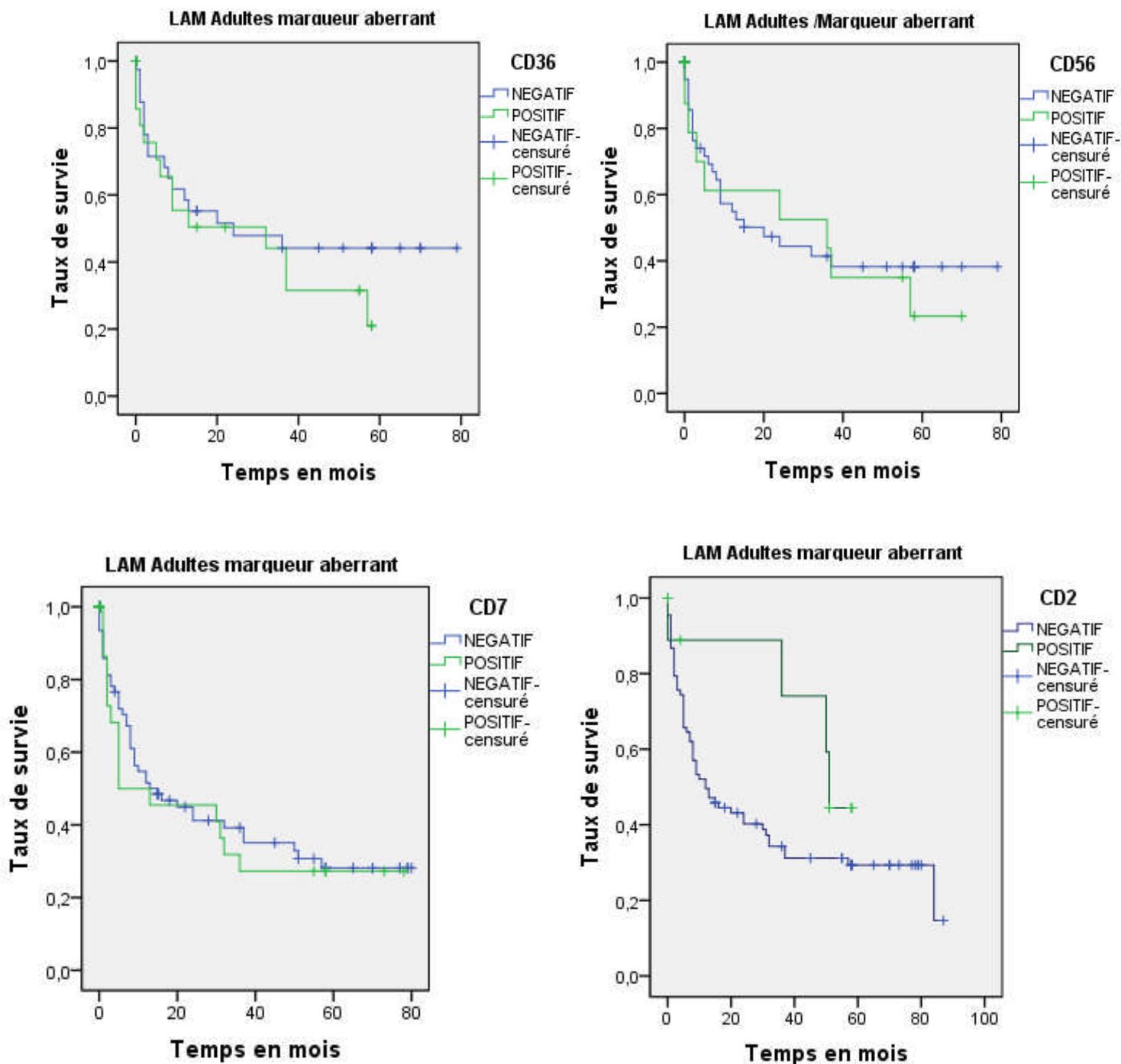
### 1.3.3.1.2. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface non spécifique de la lignée myéloïde : marqueurs aberrants

**Tableau 38:** LAM adultes- Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag aberrants

Paramètre	Délai moyen de survie en mois	% Survie	IC à 95%	Khi2	<i>p</i>
CD56+	32	23	16,6-48	0,22	0,6
CD56-	36	38	25,5-47		
<b>CD36+</b>	<b>27</b>	<b>21</b>	<b>17-37</b>	1,15	<b>0,3</b>
<b>CD36-</b>	<b>40</b>	<b>44</b>	<b>27-52</b>		
<b>CD2+</b>	<b>46</b>	<b>44,4</b>	<b>34-58</b>	1,48	<b>0,2</b>
<b>CD2-</b>	<b>33</b>	<b>14,7</b>	<b>25-41</b>		
CD4+	33	29,5	22-45	0,002	0,9

## Résultats adultes

<b>CD4-</b>	34	15	25-44	0,01	0,7
<b>CD7+</b>	29	27	16-42		
<b>CD7-</b>	33	28	24-41		



**Figure 54:** Courbes de survie globale selon l'expression ou non des Ag aberrants

## Résultats adultes

### 1.3.3.2. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface dans les LAL

#### - Cas des LAL T

**Tableau 39:** LALT de l'adulte – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

<b>HLADR</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	8	5	<b>62,5</b>	3	<b>37,5</b>	<b>37,5</b>
<b>POSITIF</b>	5	2	<b>40,0</b>	3	<b>60,0</b>	<b>50</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>53,8</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD34</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	10	5	<b>50,0</b>	5	<b>50,0</b>	<b>50</b>
<b>POSITIF</b>	3	2	<b>66,6</b>	1	<b>33,3</b>	<b>50</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>53,8</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD3s</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	8	3	<b>37,5</b>	5	<b>62,5</b>	<b>57</b>
<b>POSITIF</b>	5	4	<b>80,0</b>	1	<b>20,0</b>	<b>20</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>53,8</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD2</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	6	2	<b>33,3</b>	4	<b>66,7</b>	<b>60</b>
<b>POSITIF</b>	7	5	<b>71,4</b>	2	<b>28,6</b>	<b>29</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>53,8</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD4</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	8	6	<b>75,0</b>	2	<b>25,0</b>	<b>25</b>
<b>POSITIF</b>	5	1	<b>20,0</b>	4	<b>80,0</b>	<b>75</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>54,0</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD5</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	6	3	<b>50</b>	3	<b>50</b>	<b>40</b>
<b>POSITIF</b>	7	4	<b>57</b>	3	<b>43</b>	<b>43</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>54</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>
<b>CD10</b>	<b>Total</b>	<b>N<sup>bre</sup> de décès</b>	<b>%</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	6	3	<b>50</b>	3	<b>50</b>	<b>40</b>
<b>POSITIF</b>	7	4	<b>57</b>	3	<b>43</b>	<b>43</b>
<b>Global</b>	13	7	<b>54</b>	6	<b>46,2</b>	<b>/</b>

Le taux de survie est meilleur chez le groupe de patients CD4+ (75%) versus CD4- (25%) ; voir tableau 39.

## Résultats adultes

**Tableau 40:** LAL T adultes - Délai moyen et taux de survie en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

Paramètre	Délai moyen de survie en mois	IC à 95%	% Survie	Khi2	p
HLADR+	30	9-52	50	0,03	0,8
HLADR-	35	3-67	37,5		
CD34+	6,5	0-17	50	1,87	0,17
CD34-	37,7	17-58	50		
CD3s+	<b>17,6</b>	0-40	<b>20</b>	1,8	<b>0,18</b>
CD3s-	<b>42,8</b>	19-66	<b>57</b>		
CD2+	<b>14</b>	0,6-27	<b>29</b>	<b>3,17</b>	<b>0,07</b>
CD2-	<b>47</b>	23-72	<b>60</b>		
CD5+	34	11-57	43	0,065	0,8
CD5-	29	1,7-57	40		
CD4+	<b>56</b>	<b>33-79</b>	<b>75</b>	<b>3,6</b>	<b>0,05</b>
CD4-	<b>17</b>	<b>1,3-34</b>	<b>25</b>		
CD10+	35	12-57	43	0,2	0,6
CD10-	24	0,3-48	40		

Le délai moyen de survie globale du groupe de patients CD4+ (56mois) est statistiquement élevée en comparaison avec le groupe de patients CD4- (17mois)  $p=0,05$  ; voir tableau 40.

### - Cas des LAL B

#### - Surexpression du CD10 dans les LAL B :

Le CD10 était exprimé chez la totalité des patients LALB 26/26 cas (100 %).

13/26 patients à CD10+ sont décédés (50 %). Le délai moyen de survie chez les patients CD10+ est de 27 mois. Le taux de survie à la fin de l'étude est de 26,4 % pour une durée de survie de 65 mois.

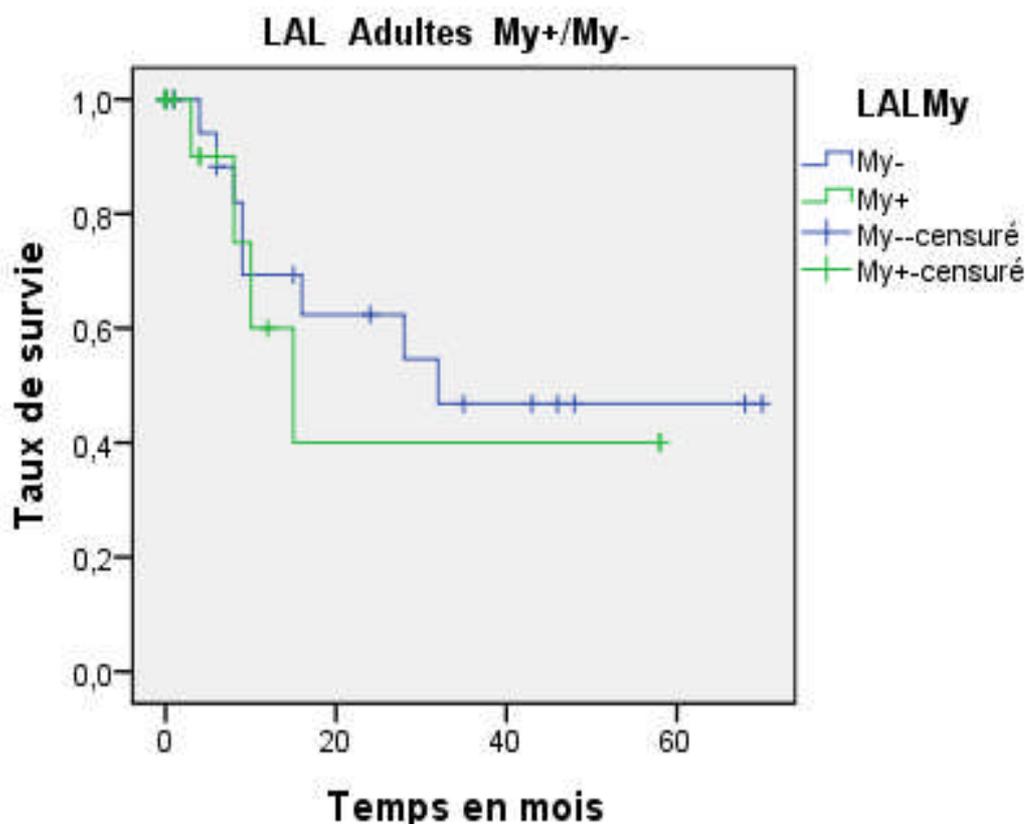
- **Co-expression du marqueur aberrant myéloïde le CD33 dans les LAL B**

Le CD33 est positif dans 6/26 cas de LALB (23%) et négatif dans 20/26 cas (78%). Le délai moyen de survie chez les patients CD33+ est de 39 mois IC à 95 % [13-64] versus 20 mois chez les patients CD33- IC à 95 % [11-28].  $P=0,3$

- **Co-expression de marqueurs myéloïdes dans les LAL**

La co-expression d'Ag myéloïdes a été retrouvée dans 14/36 cas (39 %) et négative dans 22/36 cas (61%). Le délai moyen de survie chez les patients My+ est de 29 mois IC à 95 % [10-48] versus 41 mois chez les patients My-, IC à 95 % [26-55]  $P=0,6$ .

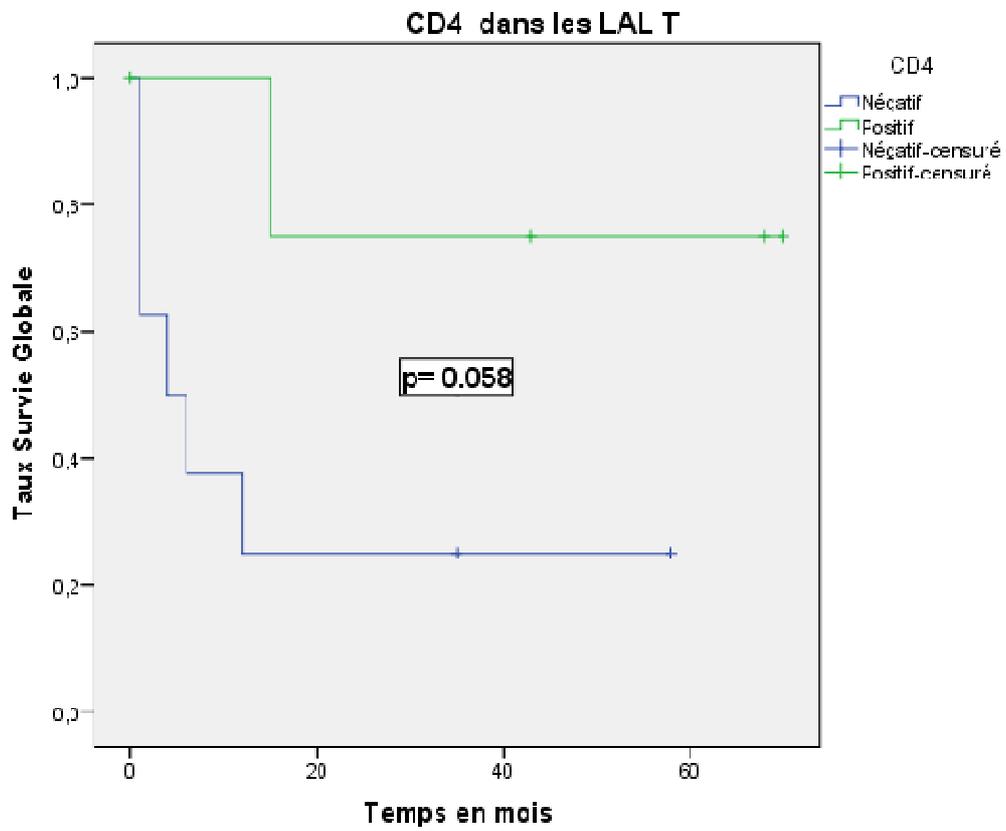
Le taux de survie chez les patients My- est de 47 % versus 40 % chez les patients My+ ; voir figure 55.



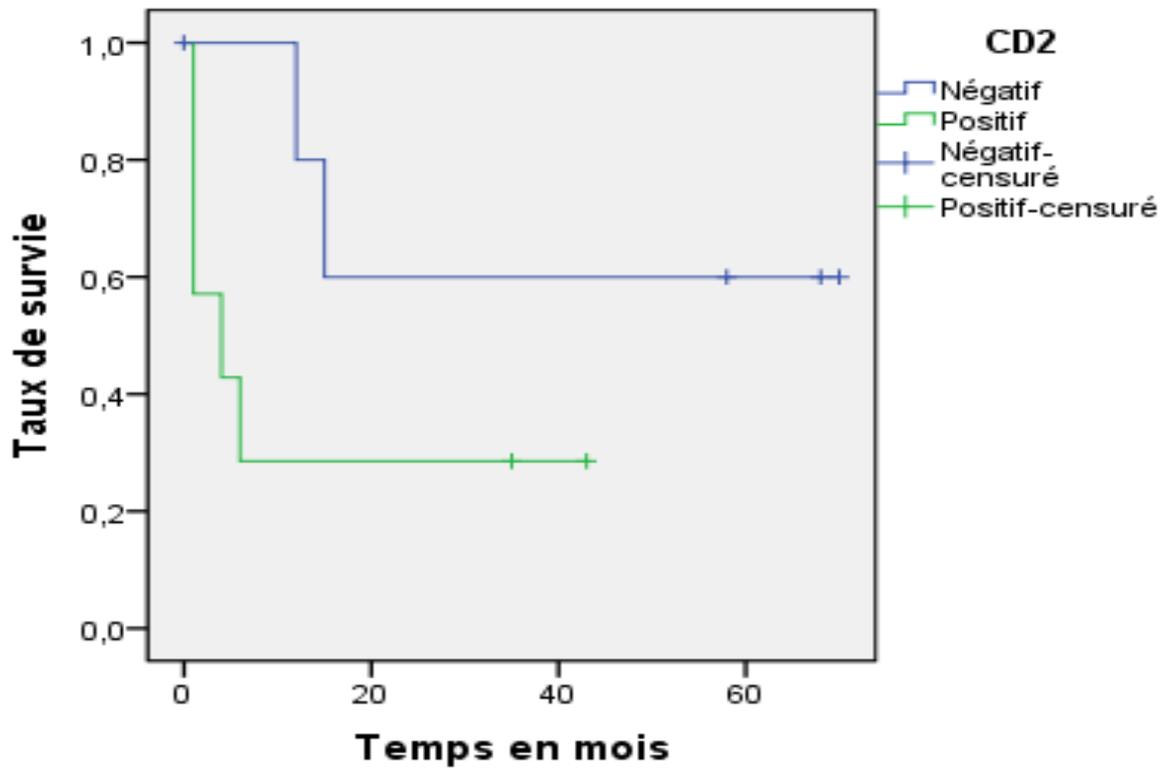
**Figure 55:** Courbe de survie globale selon l'expression ou non des antigènes aberrants myéloïdes dans les LAL

## Résultats adultes

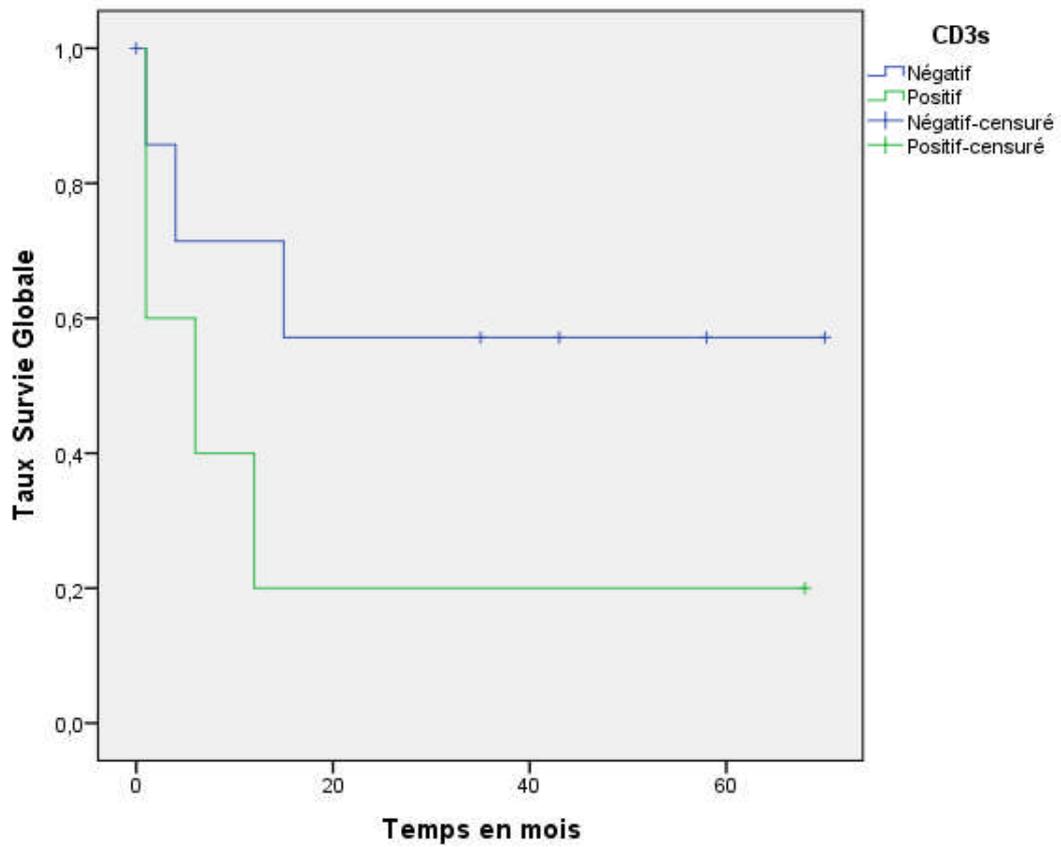
La figure 56 illustre des exemples de courbes de survie globale de Kaplan Meyer selon l'expression ou non des antigènes leucocytaires de surface dans les LALT.

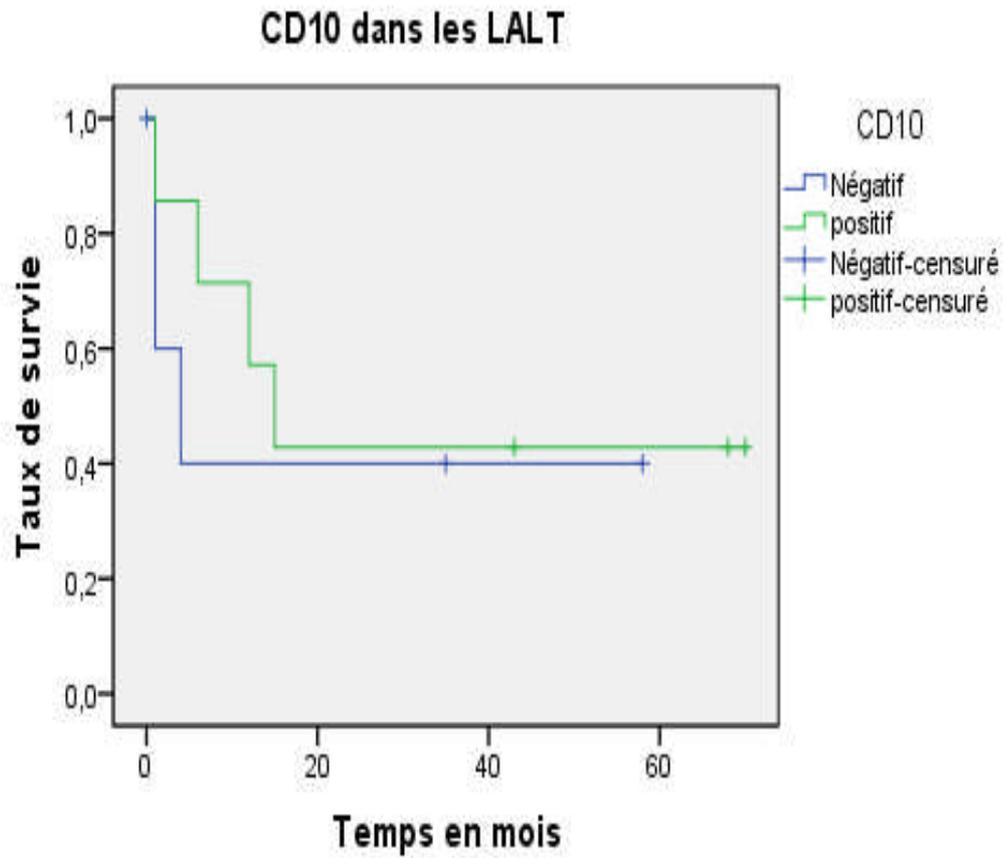


### CD2 dans les LALT



### CD3s dans les LALT





**Figure 56:** Courbes de survie globale selon l'expression ou non des antigènes leucocytaires de surface dans les LAL T

# **II.2**

## **Résultats**

### **enfants**

## 2. Description des résultats des patients enfants

### 2.1. Aspects épidémiologiques

#### 2.1.1. Répartition des patients selon le sexe

La série des patients enfants comprend 35 patients de sexe masculin et 35 patients de sexe féminin, soit une fréquence de 50% pour les deux sexes.

Le sex-ratio Garçons (G) / Filles (F) : G/F=1.

#### 2.1.2. Répartition des patients selon les tranches d'âge

L'âge médian est de : **5,4 ans ± 6,2** (Médiane ± Ecart type) avec des âges extrêmes allons de 7 mois à 18 ans. L'intervalle interquartile (IQ) = [3-15,6 ans] ; (voir tableau 41 et figure 57).

**Tableau 41:** Répartition des leucémies aiguës selon les tranches d'âges.

Tranches d'âges/ans	Effectifs	%
[30j-2[	5	7,1
<b>[2-6[</b>	<b>30</b>	<b>42,9</b>
[6-12[	11	15,7
[12-16[	5	7,1
[16-18]	19	27,1
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>

## Résultats enfants

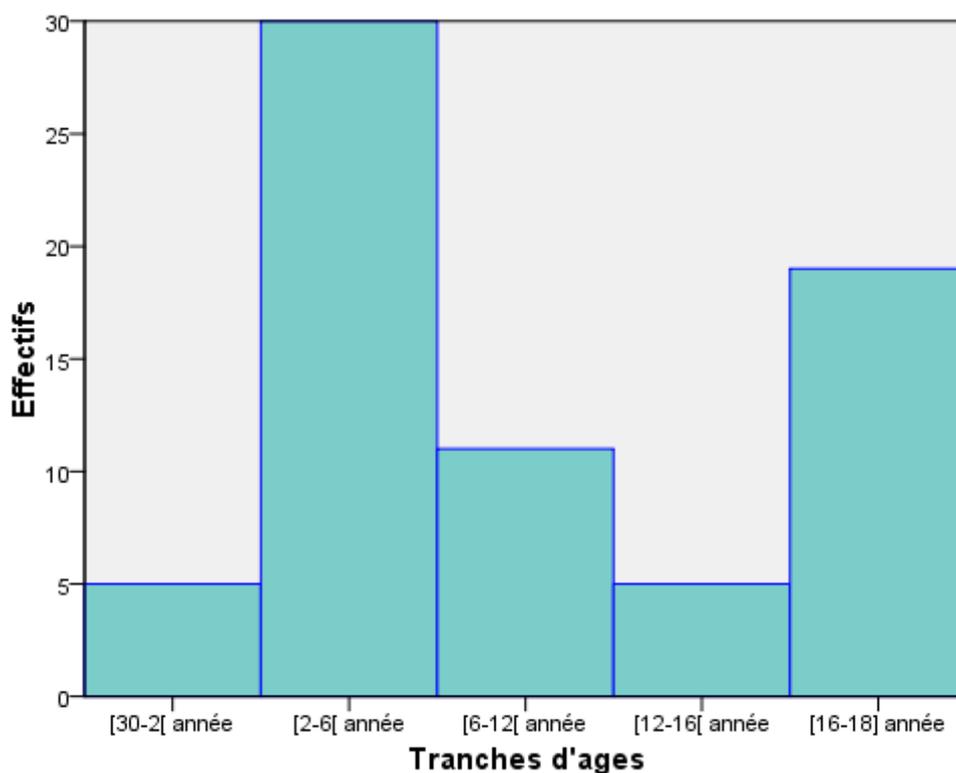


Figure 57: Répartition graphique des leucémies aigues selon les tranches d'âge

### 2.1.3. Répartition des patients selon l'âge et le sexe

Fréquence des cas de leucémie aigues de novo à la tranche d'âge de [2-6[ ans chez les filles et aux tranches d'âge [2-6[ ans et [16-18] ans chez les garçons ; (voir figure 58).

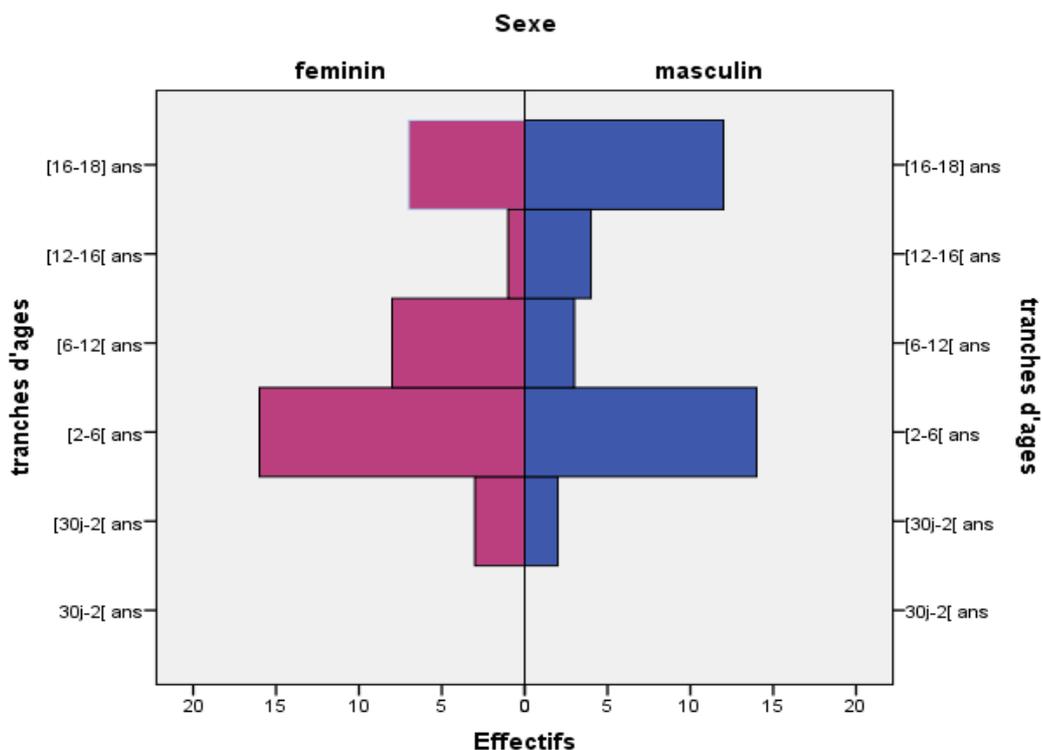


Figure 58: Pyramide des âges des cas de leucémies aigues en fonction du sexe

Le test de la médiane à échantillons indépendants, test de Chi-2 montre que les médianes des âges sont identiques pour les catégories de sexe. (Chi-2=0,23, P=0,63). Aussi, la distribution des âges est identique sur les catégories de sexe. (Test non paramétrique de Kruskal-Wallis à échantillons indépendants, P=0,27).

## **2.2. Aspects épidémiologiques cliniques et biologiques selon le type de la LA**

### **2.2.1. Leucémies aiguës lymphoblastiques**

Dans la série de l'enfant nous avons colligé, selon la classification FAB, 43/70 cas de LAL (61,4%) versus 24/70 cas de LAM (34,3%). L'incidence des LAL chez l'enfant est nettement élevée par rapport aux LAM ( $p=0,001$  pour un  $\text{Khi-2}=10,33$ ).

La médiane d'âge est de  $5 \pm 6,08$  (médiane  $\pm$  Ecart type) avec un âge minimum de 1 ans et maximum de 18 ans. L'intervalle interquartile (IQ) est de [3-14].

#### **2.2.1.1. Répartition des LAL selon le sexe**

22 patients sont de sexe féminin (51,2 %) et 21 patients sont de sexe masculin (48,8 %) avec un sexe ratio G/F = 0,95.

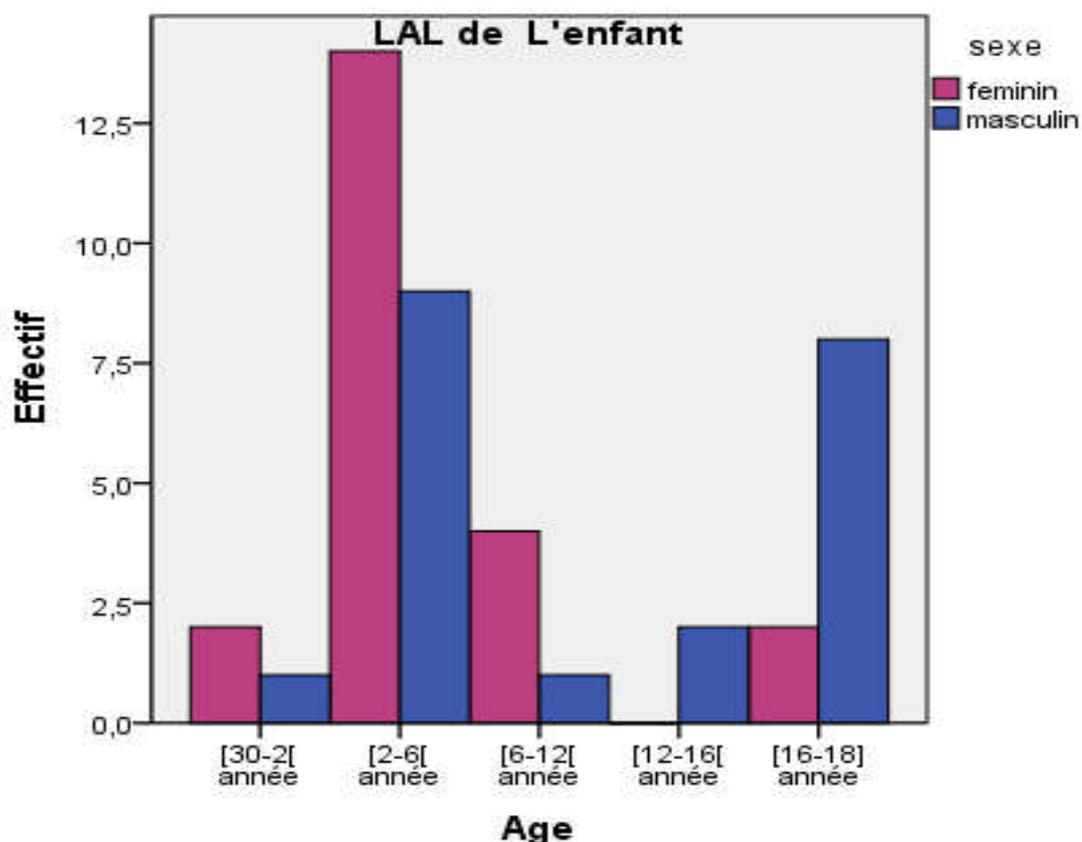
#### **2.2.1.2. Répartition des LAL selon les tranches d'âge**

**Tableau 42:** Fréquence des LAL selon les tranches d'âge

<b>Tranches d'âge / ans</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage %</b>
[30j-2[	3	7,0
<b>[2-6[</b>	<b>23</b>	<b>53,5</b>
[6-12[	5	11,6
[12-16[	2	4,7
<b>[16-18]</b>	<b>10</b>	<b>23,3</b>
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>

Plus de la moitié des enfants **23/43 cas (53,5 %)** se trouve dans la tranche d'âge de [2-6[ans ; (voir tableau 42).

### 2.2.1.3. Répartition des LAL selon l'âge et le sexe



**Figure 59:** Répartition des LAL selon l'âge et le sexe

Prédominance des cas de LAL dans la tranche d'âge de 2 à 6 ans dans les deux sexes ; (voir figure 59).

### 2.2.1.4. Répartition des LAL selon la classification morphologique FAB

La fréquence des sous types FAB est la suivante : LAL1 19/43 cas (44,2 %), LAL2 22/43 cas (51%) et les LAL3 2/43 cas (4,65%).

### 2.2.1.5. Répartition des LAL selon les sous types immunologiques

Les 43 cas de LAL de l'enfant étaient réparties en 33 cas de LALB (76,7 %) et 10 cas de LALT (23,2 %).

La série LAL de l'enfant, montre que les LALB sont statistiquement élevé par rapport aux LALT ( $Chi^2= 24,60$  et  $p<0.001$ ).

La fréquence des sous types immunologiques des LAL B et T est résumée dans le tableau 43.

**Tableau 43:** Fréquence des sous types immunologiques des LAL B et T

<b>LALB</b>		
	Effectifs	Fréquence %
<b>LALBII (Commune)</b>	<b>19</b>	<b>57,6</b>
<b>LALBIII (Pré-B)</b>	<b>12</b>	<b>36,4</b>
<b>LALBIV (B-mature)</b>	<b>2</b>	<b>6,1</b>
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>
<b>LALT</b>		
	Effectifs	Fréquence %
<b>LALTII (Pré-T)</b>	<b>3</b>	<b>30</b>
<b>LALTIII (Corticale)</b>	<b>4</b>	<b>40</b>
<b>LALTIV (T-mature)</b>	<b>3</b>	<b>30</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>

Prédominance des LALB sous type II ou commune à 57,6 % et des LALT corticale ou sous type III à 40 %.

#### 2.2.1.6. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des sous types immunologiques des LAL

Une corrélation entre l'immunophénotype des LAL et les caractéristiques cliniques des patients enfants est résumée dans le tableau 44.

**Tableau 44 :** LAL de l'enfant - Corrélation entre le phénotype des LAL et les caractéristiques cliniques positifs

Paramètre	LAL B Total=33 Effectifs (%)	LAL T Total=10 Effectifs (%)	Tests statistique : Khi-2 de Pearson (%) et Student (moyennes)	P
<b>Sexe : Féminin</b>	<b>18(54,5)</b>	<b>4(40)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>
<b>Masculin</b>	<b>15(45,4)</b>	<b>6(60)</b>		
<b>Sexe ratio M/F</b>	<b>0,83</b>	<b>1,5</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
<b>Age (moyenne) ± Ecart type Age (Mini-maxi) ans</b>	<b>6,5±6 (1-18)</b>	<b>10,6± 6,5 (1-18)</b>	<b>Indice de Student t = -1,90</b>	<b>0,06</b>
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>26(78,7)</b>	<b>9 (90)</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>

## Résultats enfants

<b>ADP</b>	<b>18(54,5)</b>	<b>7(70)</b>	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>
<b>SPMG <math>\geq 5</math>cm</b>	<b>18(54,5)</b>	<b>6(60)</b>	<b>0,09</b>	<b>0,76</b>
<b>HPMG</b>	<b>15(45,4)</b>	<b>3(30)</b>	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>
<b>PCM</b>	<b>30(90,9)</b>	<b>7(70)</b>	<b>2,8</b>	<b>0,09</b>
<b>Fièvre</b>	<b>19(57,5)</b>	<b>4(40)</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
<b>Syndrome infectieux</b>	<b>10/32=31,25</b>	<b>2(20)</b>	<b>0,082</b>	<b>0,7</b>
<b>Syndrome hémorragique</b>	<b>11(33,3)</b>	<b>5(50)</b>	<b>0,9</b>	<b>0,3</b>

La distribution des âges est identique entre le groupe des LALB et LALT ( $p=0,12$  par le test de Kolmogorov-Smirnov à échantillons indépendants, test = 1,18)

### 2.2.1.7. Caractéristiques hématologiques des sous types immunologiques des LAL

- **Statistiques des cas de LAL B** (voir tableau 45)

**Tableau 45:** Statistiques des cas de LAL B

	<b>GB</b>	<b>HB</b>	<b>PLQ</b>	<b>Blastose sanguine</b>	<b>Blastes dans la Moelle</b>
<b>Effectifs</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>28</b>	<b>32</b>
<b>Manquants</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
<b>Moyenne</b>	<b>54,590</b>	<b>8,222</b>	<b>67,13</b>	<b>60,54</b>	<b>76,38</b>
<b>Médiane</b>	<b>21,900</b>	<b>8,500</b>	<b>46,00</b>	<b>65,00</b>	<b>83,50</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>104,7825</b>	<b>2,0852</b>	<b>58,641</b>	<b>28,618</b>	<b>22,360</b>
<b>Minimum</b>	<b>1,1</b>	<b>3,6</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Maximum</b>	<b>543,0</b>	<b>12,0</b>	<b>227</b>	<b>96</b>	<b>100</b>
<b>25</b>	<b>6,228</b>	<b>6,550</b>	<b>22,50</b>	<b>35,75</b>	<b>71,00</b>
<b>Quartiles 50</b>	<b>21,900</b>	<b>8,500</b>	<b>46,00</b>	<b>65,00</b>	<b>83,50</b>
<b>75</b>	<b>51,425</b>	<b>9,550</b>	<b>93,75</b>	<b>85,75</b>	<b>90,75</b>

## Résultats enfants

- **Statistiques des cas de LALT** (voir tableau 46)

**Tableau 46:** Statistiques des cas de LAL T

	GB	HB	PLQ	Blastose sanguine	Blastes dans la Moelle
<b>Effectifs</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Manquants</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Moyenne</b>	<b>85,001</b>	<b>9,380</b>	<b>69,40</b>	<b>59,90</b>	<b>85,30</b>
<b>Médiane</b>	<b>70,000</b>	<b>8,250</b>	<b>40,50</b>	<b>53,00</b>	<b>89,00</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>80,4256</b>	<b>2,4243</b>	<b>73,870</b>	<b>29,637</b>	<b>13,508</b>
<b>Minimum</b>	<b>9,6</b>	<b>6,6</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>51</b>
<b>Maximum</b>	<b>235,0</b>	<b>12,4</b>	<b>215</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>25</b>	<b>20,833</b>	<b>7,300</b>	<b>21,50</b>	<b>38,50</b>	<b>80,75</b>
<b>Quartiles 50</b>	<b>70,000</b>	<b>8,250</b>	<b>40,50</b>	<b>53,00</b>	<b>89,00</b>
<b>75</b>	<b>141,475</b>	<b>12,050</b>	<b>102,75</b>	<b>89,00</b>	<b>93,50</b>

La comparaison des moyennes d'hémoglobine LALB versus LALT montre une différence significative ( $p < 0.001$  pour un  $t = -5,55$ ) et IC 95% = [-105 à -49].

L'anémie définie par un taux d'Hb  $< 11,5$ g/dl est plus fréquente dans les LAL type B 31/33 cas (94%) versus 7/10 cas (70 %) dans les LAL type T. La différence de fréquence est statistiquement significative ( $p = 0,012$  ; Khi-2=6,34).

Le taux moyen de plaquettes ne montre pas de différence significative entre LAL B et LALT ( $p = 0,9$ ).

Une thrombopénie avec un taux de plaquettes  $< 100$ G/L a été retrouvée dans 25/33 cas (75,7 %) des LALB versus 8/10 cas (80 %) dans les LALT ( $p = 0,8$ ).

La moyenne des GB est nettement élevée dans les LALT versus LALB  $t = 2,4$  avec  $p = 0,021$  et un IC à 95% [7-83].

L'hyperleucocytose  $> 30$  G/L est retrouvée dans 12/33 (36 %) des LALB versus 6/10 (60 %) des LAL T.

Absence de cas leucopéniques et pancytopéniques dans les LAL T de l'enfant.

## Résultats enfants

Présence de 6/33 (18%) de cas leucopéniques dans les LALB et 5/33 cas de pancytopénie (15,1 %).

La comparaison des taux moyens de blastes médullaires entre les types immunologiques de LAL ne montre pas une différence significative ( $p=0,14$ ).

Le test de Kolmogorov-Smirnov à échantillons indépendants montre que la distribution des globules blanc et de l'hémoglobine n'était pas identique entre les deux groupes de patients LAL B et LAL T avec respectivement des p value :  $p= 0,016$  ,  $p= 0,000$ .

### 2.2.1.8. Circonstances de découvertes des LAL

#### - Circonstances de découvertes des LALB

**Tableau 47:** Circonstances de découvertes des LALB

	Effectifs	Pourcentage %
Atteinte articulaire	2	6,1
Adénopathies	5	15,2
Asthénie	3	9,1
Douleurs abdominales	3	9,1
Douleurs osseuses	2	6,1
Fièvre associée	5	15,2
<b>Fièvre isolée</b>	<b>7</b>	<b>21,2</b>
Syndrome hémorragique	4	12,1
Syndrome infectieux	2	6,1
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>

La fièvre isolée est le motif de consultation le plus fréquent chez les enfants atteints de LAL type B (21,2%) ; (voir tableau 47).

#### - Circonstances de découvertes des LALT

Dans notre série, les enfants atteints de LALT ont consulté dans 50 % des cas suite à une asthénie qui peut être associée à d'autres signes cliniques tel que la fièvre, des ADP cervicales, épistaxis et ecchymoses ; (voir tableau 48).

**Tableau 48:** Circonstances de découvertes des LALT

	Effectifs	Pourcentage %
Adénopathies	1	10,0
<b>Asthénie</b>	<b>5</b>	<b>50,0</b>
Fièvre associée	1	10,0
Syndrome hémorragique	2	20,0
Signes neurologiques (épidurite)	1	10,0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>

**2.2.1.9. Fréquence d'expression des antigènes de différenciation leucocytaire dans les LALB et LALT**

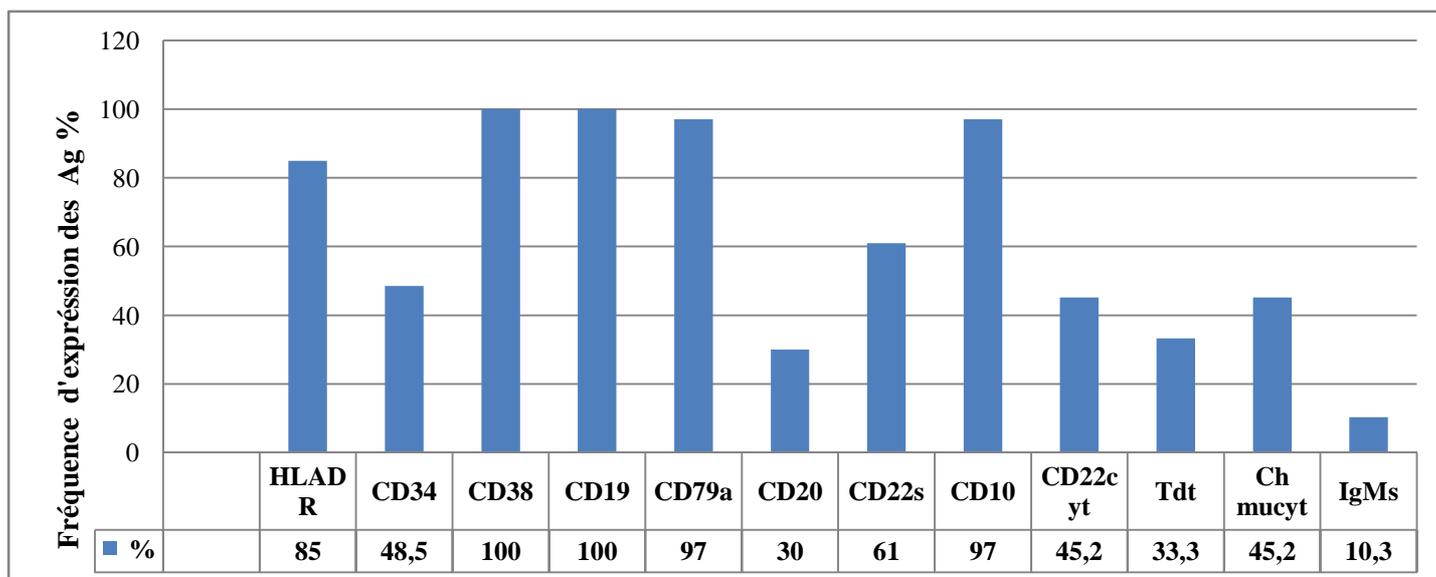
- **Fréquence d'expression antigénique dans les LALB**

Prédominance d'expression des marqueurs antigéniques lymphoïdes B spécifique : CD19 (100%), CD79a (97%) et le CD 10 (97 %); (voir tableau 49 et figure 60).

**Tableau 49:** Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LAL B

Antigène	Nombre cas Testés	Nombre cas positifs	Fréquence %
<b>HLADR</b>	<b>33</b>	<b>28</b>	<b>85</b>
<b>CD34</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>48,5</b>
CD38	27	27	100
<b>CD19</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>100</b>
<b>CD79a</b>	<b>33</b>	<b>32</b>	<b>97</b>
CD20	27	8	30
CD22s	23	14	61
<b>CD10</b>	<b>33</b>	<b>32</b>	<b>97</b>
<b>CD22cyt</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>45,2</b>
Tdt	21	7	33,3
Chmucyt	31	14	45,2
IgMs	29	3	10,3

## Résultats enfants



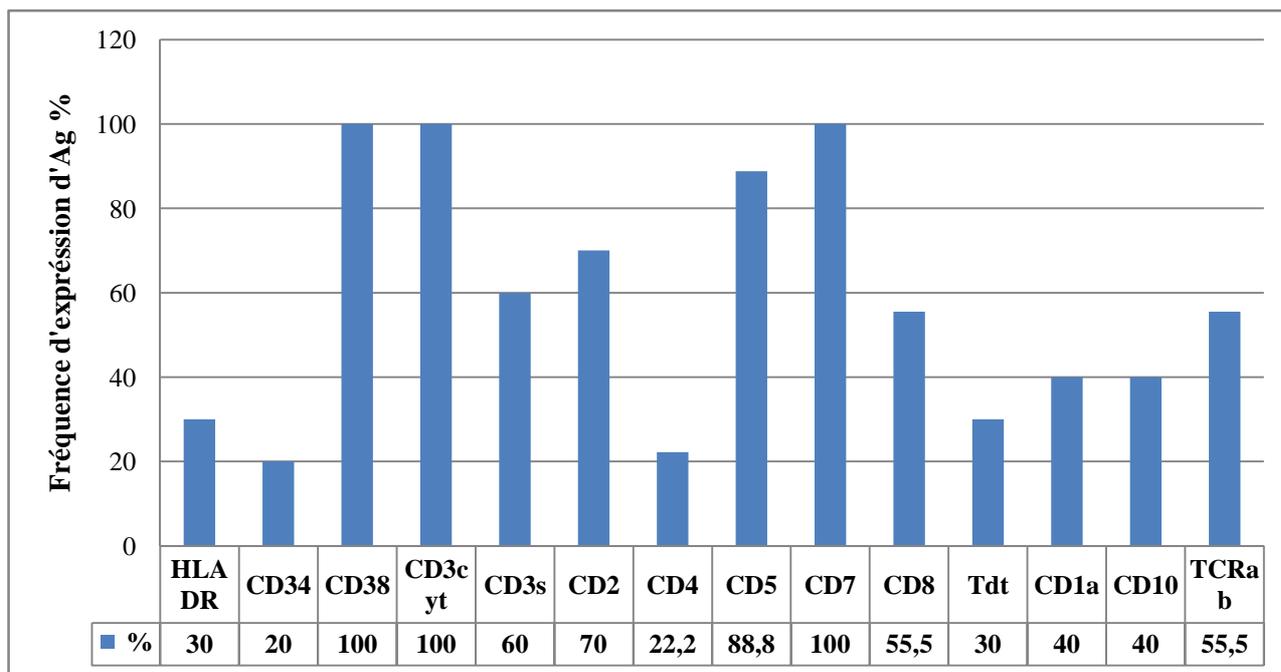
**Figure 60:** Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL B

### - Fréquence d'expression antigénique dans les LAL T

**Tableau 50:** Antigènes leucocytaires testés et leur positivité dans les LALT

Antigène	Nombre cas testés	Nombre cas positifs	Fréquence %
HLADR	10	3	30
CD34	10	2	20
CD38	6/10	6/10	100
CD3cyt	10	10	100
CD3s	10	6	60
CD2	10	7	70
CD4	9/10	2	22,2
CD5	9/10	8	88,8
CD7	10	10	100
CD8	9/10	5	55,5
Tdt	10	3	30
CD1a	10	4	40
CD10	10	4	40
TCRab	9	5	55,5

Les Ag CD7, CD3cyt, CD2, CD5 sont les plus sensibles pour la détection des LAL de type T, le CD7 est l'Ag lymphoïde T de surface le plus exprimé 100 % des cas ; (voir tableau 50 et figure 61).



**Figure 61:** Fréquence de positivité des antigènes testés dans les LAL T

L'Ag myéloïde intracytoplasmique MPOcyt était négatif dans toute les LAL de l'enfant, le CD117 Ag d'immaturité de la lignée myéloïde était retrouvé positif uniquement dans deux cas de LALT.

#### 2.2.1.10. Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAL

- **Coexpression d'antigènes aberrants de nature myéloïde dans les LAL de lignée T**

Parmi les 10 cas de LAL de la lignée T, deux (02) patients coexpriment l'Ag myéloïde CD13 (20 %). Le CD33 n'a pas été coexprimés.

- **Coexpression d'antigènes aberrants de nature myéloïde dans les LAL de lignée B**

Parmi les 33 cas de LAL B, 11 patients (33,3 %) coexprimaient des Ag aberrants. Seul 08/33 patients (24%) coexprimaient des Ag myéloïdes de type : CD13 (03 cas), CD33 (03cas) et le CD11c dans 02 cas.

Deux (02) Ag de la lignée lymphoïde T étaient coexprimé : le CD7 coexprimé dans 2/32 cas (6,25 %) et le CD2 coexprimé dans 1/32 cas (3,12%).

### 2.2.2. Leucémies aiguës myeloblastiques

24/70 patients (34,3 %) avec un diagnostic de LAM sont inclus dans notre étude.

La médiane d'âge est de  $11 \pm 6,22$  (moyenne  $\pm$  Ecart type) avec des extrêmes de 7 mois à 18 ans. IQ : [4-16 ans].

#### 2.2.2.1. Répartition des LAM selon le sexe

11/24 patients sont de sexe féminin (45,8 %) et 13/24 patients sont de sexe masculin (54,2 %) avec un sexe ratio G/F = 1,18.

#### 2.2.2.2. Répartition des LAM selon les tranches d'âge

Dans notre série, les LAM chez l'enfant sont fréquentes aux extrémités inférieures < 6 ans 7/24 cas (29,16 %), et supérieures de l'âge de l'enfant [16-18] ans 9/24 cas (37,5 %) ; (voir tableau 51).

**Tableau 51:** LAM de l'enfant et tranches d'âge

	Effectifs	Pourcentage %
[30j-2[	2	8,3
[2-6[	5	20,8
[6-12[	5	20,8
[12-16[	3	12,5
[16-18]	9	37,5
Total	24	100,0

Le test de la médiane à échantillons indépendants montre que les médianes des âges sont identiques pour les catégories de sexe. (Test Exact de Fisher,  $P=1$ ).

#### 2.2.2.3. Caractéristiques cliniques des LAM

Le tableau 52 résume les caractéristiques cliniques des LAM de l'enfant.

Tous les enfants de notre série d'étude ont présenté au moins un des signes cliniques décrit dans le tableau 52.

Tableau 52 : Caractéristiques cliniques des LAM

PCM			Fièvre		
	Effectifs	Fréquence %		Effectifs	Fréquence %
Discrète	4	16,7	Absente	13	54,2
Modérée	7	29,2	Présente	11	45,8
Franche	13	54,2	Total	24	100,0
Total	24	100,0			

Sd tumoral			SPMG $\geq$ 5cm		
	Effectifs	Fréquence %		Effectifs	Fréquence %
Absent	8	33,3	Absente	16	66,7
Présent	16	66,7	Présente	8	33,3
Total	24	100,0	Total	24	100,0

ADP			HPMG $\geq$ 5cm		
	Effectifs	Fréquence %		Effectifs	Fréquence %
Absentes	12	50,0	Absente	14	58,3
Présentes	12	50,0	Présente	10	41,7
Total	24	100,0	Total	24	100,0

Sd hémorragique			Sd infectieux		
	Effectifs	Fréquence %		Effectifs	Fréquence %
Absent	13	54,2	Absent	15	62,5
Présent	11	45,8	Présent	9	37,5
Total	24	100,0	Total	24	100,0

Tous les enfants atteints d'une LAM 24/24 (100%) ont présenté une pâleur cutanéo muqueuse (PCM) au diagnostic avec prédominance d'une PCM franche 54 %.

Le syndrome tumoral était retrouvé dans 66,7 % des cas, avec la prédominance de la survenue des adénopathies superficielles, le syndrome hémorragique dans 45,8 %, le saignement est essentiellement modéré.

9/24 patients ont présenté au moins une infection prouvée sur prélèvements microbiologiques, soit 37,5 %.

**2.2.2.4. Circonstances de découverte des LAM**

Les circonstances de découverte (CDD) les plus fréquemment retrouvée dans les LAM de l'enfant étaient la consultation pour une asthénie dans 33,3 % des cas suivie d'une fièvre dans 25 % des cas ; (voir tableau 53)

**Tableau 53 :** Circonstances de découverte des LAM

	<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence %</b>
<b>Douleurs articulaire</b>	<b>1</b>	<b>4,2</b>
<b>Adénopathies</b>	<b>2</b>	<b>8,3</b>
<b>Asthénie</b>	<b>8</b>	<b>33,3</b>
<b>Fièvre</b>	<b>6</b>	<b>25,0</b>
<b>Fièvre isolée</b>	<b>2</b>	<b>8,3</b>
<b>Syndrome hémorragique</b>	<b>4</b>	<b>16,7</b>
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>1</b>	<b>4,2</b>
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100,0</b>

**2.2.2.5. Analyse des données hématologique des LAM**

**Tableau 54:** Statistiques des données hématologique des LAM

	<b>Taux GB G/L</b>	<b>Taux HB g/dl</b>	<b>Taux PLQ G/L</b>	<b>blastose sanguine %</b>	<b>blastes dans la MO %</b>
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>24</b>
<b>Manquante</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Médiane</b>	<b>19,000</b>	<b>7,550</b>	<b>42,00</b>	<b>43,00</b>	<b>70,00</b>
<b>Ecart-type</b>	103,7228	1,3270	46,358	28,311	25,094
<b>Minimum</b>	<b>1,3</b>	<b>4,7</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>20</b>
<b>Maximum</b>	<b>480,0</b>	<b>9,9</b>	<b>200</b>	<b>95</b>	<b>97</b>
<b>Quartiles</b>					
<b>25</b>	<b>3,798</b>	<b>7,000</b>	<b>24,75</b>	<b>22,00</b>	<b>42,25</b>
<b>50</b>	19,000	7,550	42,00	43,00	70,00
<b>75</b>	<b>41,750</b>	<b>8,400</b>	<b>73,50</b>	<b>80,00</b>	<b>88,00</b>

**- Etude cytologique des LAM : frottis sanguin et médullogramme**

Le taux médian de blastes circulants était 43 %, IQ: 22-80 %. L'examen cytologique des frottis de moelle osseuse a permis d'affirmer le diagnostic et de classer les cas de LAM, en se basant sur les critères descriptifs de la classification FAB. L'étude du myélogramme a

## Résultats enfants

objectivé un taux médian de blastes de 70 %, IQ: 42-88 %. Le taux de blastes médullaire à varié entre 20 % et 97 % ; (voir tableau 54).

Les médianes des blastes médullaires sont statistiquement ( $p=0,23$ ) identiques pour les catégories de LAM, par contre, la distribution des blastes médullaires n'est pas statistiquement identiques entre les catégories de LAM. (Test de Kruskal-Walis  $p=0,023$ ).

**Tableau 55:** Caractéristiques hémato biologiques des LAM

<b>GB G/L</b>	<b>&lt;4</b>	<b>[4-10[</b>	<b>[10-30[</b>	<b>[30-50]</b>	<b>]50-100]</b>	<b>&gt;100</b>	<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	7	3	6	3	1	4	<b>24</b>
<b>Fréquence %</b>	29,4	12,6	25,2	12,6	4,2	16,8	<b>100%</b>
<b>plaq G/L</b>	<b>&lt;20</b>	<b>[20-100]</b>	<b>&gt;100</b>				<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	5	16	3				<b>24</b>
<b>Fréquence %</b>	21	67,2	12,6				<b>100%</b>
<b>Hb g/dl</b>	<b>&lt;8</b>	<b>[8-10]</b>	<b>]10-12]</b>	<b>&gt;12</b>			<b>Total</b>
<b>Effectifs</b>	16	8	0	0			<b>24</b>
<b>Fréquence %</b>	66,6	33,6	0	0			<b>100%</b>

Un tiers des patients enfants atteints de LAM 33,3 % ont un taux de globules blancs supérieur à 30 G/L dont 16,8 % ont un taux > 100G/L.

Concernant le taux de plaquettes 5/24 de nos patients (21%) ont une thrombopénie sévère < 20 G/L. 16/24 patients (66,6%) ont une anémie sévère avec un taux d'Hb < 8g/dl.

Pas de différence significative entre les différents sous type de LAM.  $P>0,05$

Tous les patients ont présenté au moins une anomalie de l'hémogramme, une thrombopénie a été observée dans 21/24 enfants (88,2%) des cas, une anémie dans les 24 cas de LAM (100%), une hyperleucocytose dans 14/24 cas (58,8 %), une leucopénie dans 7 cas (29,4 %) et une pancytopénie dans 6 cas /24 (25 %) ; voir tableau 55.

### 2.2.2.6. Classification cytologique FAB des sous types de LAM

Trois cas de LAM étaient difficiles à classer par les critères FAB seul, ils étaient classés en LAL. L'étude immunophénotypique a permis de redresser leur diagnostic.

**Tableau 56:** Classification cytologique des LAM selon les critères du groupe FAB

	Effectifs	Fréquence %
<b>LAM probable ?</b>	3	12,5
<b>LAM1</b>	3	12,5
<b>LAM2</b>	4	16,7
<b>LAM3</b>	<b>11</b>	<b>45,8</b>
<b>LAM4</b>	1	4,2
<b>LAM5</b>	2	8,3
<b>Total</b>	24	100,0

Prédominance des cas de LAM3 type promyélocytaire 11/24 cas soit 45,8 %, dont 2 cas de variantes cytologique ; voir tableau 56.

Aussi, le diagnostic du type de la leucémie aigue n'a pas été posé **chez trois patients** par l'étude cytologique seule. C'est l'étude immunophénotypique qui a permis de typer **ces trois cas** comme leucémie aigue biphénotypique que nous allons analyser dans le chapitre des **LA biphénotypique**.

#### 2.2.2.7. Profil immunophénotypique des LAM

L'immunophénotypage par cytométrie en flux a été réalisé sur **40 prélèvements médullaires et 30 prélèvements sanguins**.

Il existe une variation d'expression des marqueurs antigéniques, le pourcentage de patients positifs pour un antigène varie de 0% pour la Glycophorine A et le CD14 car nous n'avons eu dans notre série aucune LA à érythroblastes, ni de LAM5 type b monocytaire mature, à 95,8 % pour le CD33.

## Résultats enfants

**Tableau 57:** Fréquence de positivité des anticorps monoclonaux testés avec les cellules myéloblastiques

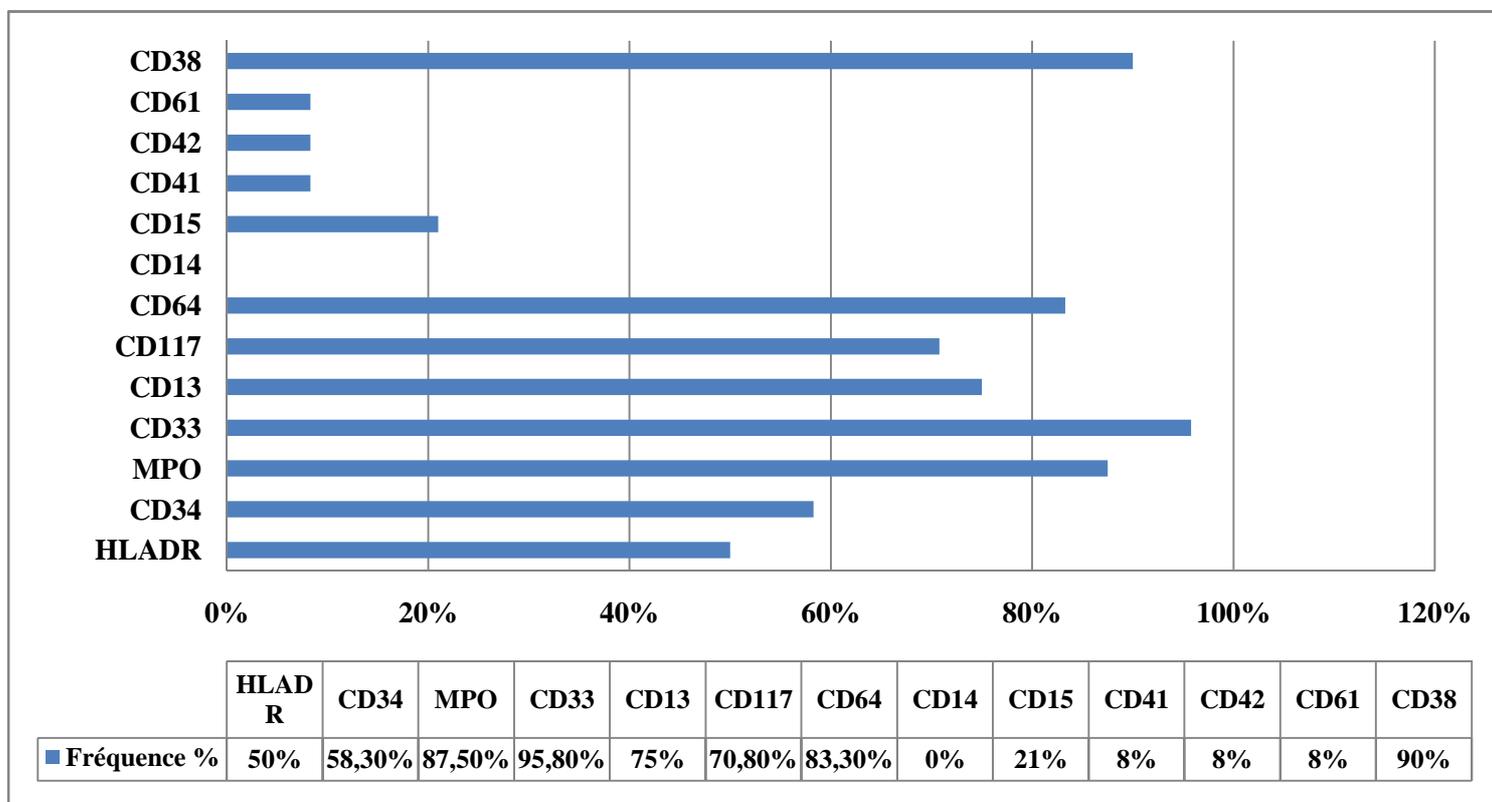
HLADR			CD34		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
Négatif	12	50,0	Négatif	10	41,7
Positif	12	50,0	Positif	14	58,3
Total	24	100,0	Total	24	100,0
CD33			CD13		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
Négatif	1	4,2	Négatif	6	25,0
Positif	23	95,8	Positif	18	75,0
Total	24	100,0	Total	24	100,0
MPO			CD117		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
Négatif	3	12,5	Négatif	7	29,2
Positif	21	87,5	Positif	17	70,8
Total	24	100,0	Total	24	100,0
CD64			CD14		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
Négatif	4	16,7	Négatif	24	100,0
Positif	20	83,3			
Total	24	100,0			
CD38			CD15		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
NT	4	16,7	NT	5	20,8
Négatif	2	8,3	Négatif	15	62,5
Positif	18	75,0	Positif	4	16,7
Total	24	100,0	Total	24	100,0
CD42			CD41		
	Effectifs	Pourcentage %		Effectifs	Pourcentage %
Négatif	21	87,5	Négatif	21	87,5
Positif	2	8,3	Positif	2	8,3
Total	24	100,0	Total	24	100,0
CD61					
	Effectifs	Pourcentage %			
Négatif	22	91,7			
Positif	2	8,3			
Total	24	100,0			

**- Fréquence d'expression des marqueurs de surface et intracytoplasmique testés sur les cellules blastiques dans les LAM**

Prédominance d'expression des marqueurs de la lignée myéloïdes : CD33 (95,8 %), MPO (87,5%), CD13 (75%) et le CD117 (70,8%). Les marqueurs d'immaturation HLADR, et

## Résultats enfants

CD34 sont présents dans respectivement 50 % et 58,3% des cas. Le CD38 un marqueur de prolifération est fortement exprimé (90%) ;(voir figure 62).



**Figure 62:** Expression des marqueurs myéloïdes et d'immatérité dans les LAM

### - Coexpression des antigènes lymphoïdes et myéloïdes aberrants dans les sous types de LAM

Une co-expression aberrante d'antigènes de lignées cellulaires différentes à été retrouvée sur les cellules blastiques des LAM de l'enfant, il s'agit des LAIP de type infidélité de lignée. La fréquence d'expression pour chaque marqueur est déterminée en fonction du nombre de cas testés; (voir tableau 58).

La coexpression d'antigènes lymphoïde de lignée B et T est retrouvée dans 12/24 cas de LAM (37,2 %), l'antigène de la lignée T le plus exprimé est le CD7 : 20,8 % des cas suivi par l'Ag CD2 à 12,5 % avec une surexpression pour les deux Ag. Pour la lignée B on retrouve l'antigène CD19 coexprimé à 4,16 % ; (voir tableau 58).

## Résultats enfants

**Tableau 58:** Coexpression d'antigènes aberrants dans les LAM

Nombre cas LAM/FAB	Ag aberrants	CD2	CD7	CD36	CDTdt	CD19	CD56
LAM0	0	0	0	0	0	0	0
LAM1	2	0	1	0	1	0	0
LAM2	3	0	1	0	0	1	1
LAM3	4	2	2	0	0	0	0
LAM4	0	0	0	0	0	0	0
LAM5	0	0	0	0	0	0	0
LAM7	3	1	1	1	0	0	0
Nombre cas testés		24	24	24	24	24	24
Fréquence %		12,5	20,83	4,16	4,16	4,16	4,16

### 2.2.2.8. Exemples de cas discordants entre le diagnostic cytologique du FAB et l'immunophénotypage des LAM

**Tableau 59 :** Diagnostic final des cas discordants

N°: Patient sexe/âge	Cytochimie au noir soudan (NS)	FAB	Résultat de l'immunophénotypage	Diagnostic final par CMF
1 féminin/8ans	Douteux	LAM/LAL ?	Dr-, CD34+, CD38+, CD41+, CD42+, CD61+, MPO-, CD117+, CD64+, CD13-, CD14-, CD33+, CD15-	LAM7 LAM méga caryoblastique
2 masculin/3ans	Douteux	LAM/LAL ?	Dr-, CD34+, CD38+, CD41+, CD42+, CD61+, MPO-, CD117+, CD64-, CD13-, CD14-, CD33+, CD15-	LAM7 LAM méga caryoblastique
3 féminin/1an	Douteux	LAM/LAL ?	Dr+, CD34+, CD38+, CD33+, CD41-, CD42-, CD61-, CD117+, MPO-, CD13-, CD64-, CD14-, CD15-	LAM0 LAM à différentiation minime

## Résultats enfants

L'immunophénotypage par CMF nous a permis de redresser le diagnostic des cas de LAM difficiles à classer par l'étude cytologique uniquement ; (voir tableau 59).

### 2.3. Leucémies aigues biphénotypiques

**Tableau 60 :** Caractéristiques cliniques et biologiques des LA biphénotypiques

N°Patient	Age/Sexe	PCM	Syndrome Tumoral	Fièvre	infection	CDD	GB G/L	Hb g/dl	Plq G/L	Blastes Sang%	Blastes MO %
1	3ans/m	Franche	Présent	Absente	Absente	Douleurs articulaires	12	6,6	19	36	34
2	7ans/f	Franche	Présent	Présente	Absente	Syndrome hémorragique	157	7,2	17	94	100
3	3ans/f	Discrète	Présent	Présente	Absente	Fièvre associée	48	11,7	21	82	70

**Tableau 61:** Caractéristiques immunophénotypiques des LA biphénotypiques

N° Patient	FAB	Résultat de l'immunophénotypage	Diagnostic final par CMF
1	LAM probable NS non concluant	DR+, CD34+, MPO+, CD33+, CD13+, CD117+, CD13+, CD19+, CD79a+	LA biphénotypique LAM/B
2	LAL2 probable NS-	DR-, CD34+, MPO-, CD33+, CD13+, CD117+, CD64+, CD79a-, CD19- , CD3cyt+, CD3s-, CD2-, CD5+, CD7+	LA biphénotypique LAM/T
3	LAM probable NS non concluant	DR+, CD34+, MPO+, CD33+, CD117- , CD13+, CD3cyt -, CD3s-, CD7- , CD19+, CD79a-, Tdt+, Chaîne mu cyt +	LA biphénotypique LAM/B

3/70 leucémie aigue de l'enfant (4,28%) sont des LA biphénotypiques dont le diagnostic a été confirmé par CMF. Les trois cas de LA biphénotypiques sont à coexpression myéloïde et lymphoïde B ou T; (voir tableau 61).

### 2.3. Etude de la survie globale en fonction des facteurs pronostiques

Dans ce chapitre, nous avons inclus les patients enfants dont l'âge a varié de 7 mois à 15 ans ayant reçu des traitements spécifiques de chimiothérapie dès la phase d'induction, regroupés dans les protocoles suivants :

- Les cas de LAM ont été traités par le protocole ELAM 2002
- Les cas de LAL ont été traités par le protocole EORTC 2000

Cependant, les enfants dont l'âge a varié de 15,5 à 18 ans ont été inclus dans les protocoles adultes de chimiothérapie.

#### 2.3.1. Fréquence des facteurs pronostique liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL

**Tableau 62:** Fréquence des facteurs pronostique liés au patient et à la LA dans les LAM et LAL

	LAM (N°= 24)		LAL (N°=43)		Tests statistiques	
	Effectifs	%	Effectifs	%	Chi2	p
<b>Sexe masculin</b>	13	<b>54,2</b>	21	<b>49</b>	<b>0,17</b>	<b>0,67</b>
<b>Age ≥ 10 ans</b>	<b>14</b>	<b>58,3</b>	<b>14</b>	<b>32,5</b>	<b>4,21</b>	<b>0,04</b>
<b>Age ≤ 1 an</b>	2	8,3	2	4,6	/	0,9
<b>GB ≥ 50G/L</b>	5	21	14/42	33	1,16	0,3
<b>Syndrome tumoral</b>	16	66,6	36	84	2,6	0,1

#### 2.3.2. Survie globale en fonction des facteurs pronostiques liés à la LA

##### 2.3.2.1. Survie globale en fonction du type de la LA

**Tableau 63:** Survie globale en fonction du type de la LA

	Total	N <sup>bre</sup> de décès	%	N <sup>bre</sup> VV et PV	%	N <sup>bre</sup> VV	% de survie
<b>LAM</b>	24	<b>17</b>	71	7	29,2	5/24	<b>20</b>
<b>LAL</b>	43	<b>20</b>	46,5	23	53,5	14/43	<b>32,5</b>
<b>Global</b>	67	<b>37</b>	55,2	30	44,8	19	/

Le délai moyen de survie est de 23 mois pour les LAM avec un IC à 95% [10,5-35] versus 45 mois pour les LAL avec IC à 95 % [34-56] ;(voir tableau 63).

## Résultats enfants

En terme de médiane, le taux médian de survie est de 13 mois pour les enfants atteints de LAM avec IC à 95 % [7-19] versus 52 mois pour ceux atteints de LAL avec IC à 95 % [23-80]. La comparaison des survies au test de Log Rank montre une différence statistiquement significative,  $p=0,04$  pour un khi2 = 4,22 ; (voir figure 63).

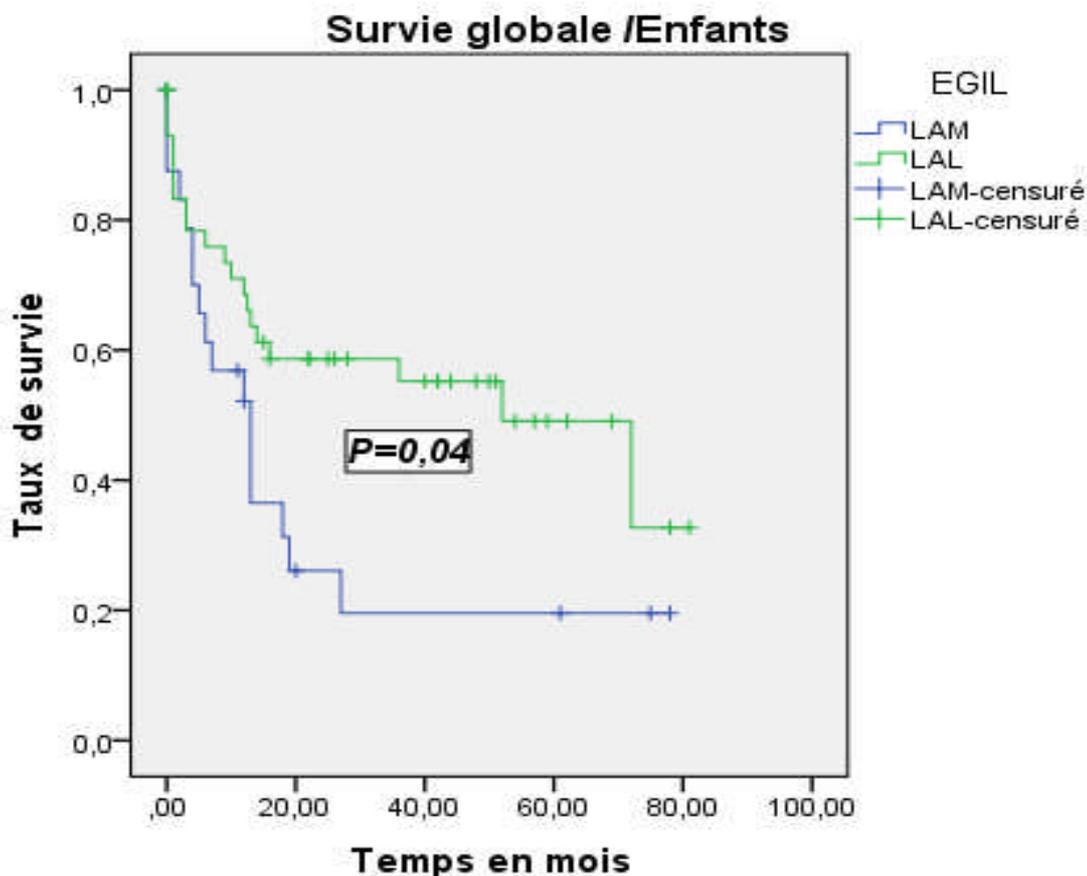
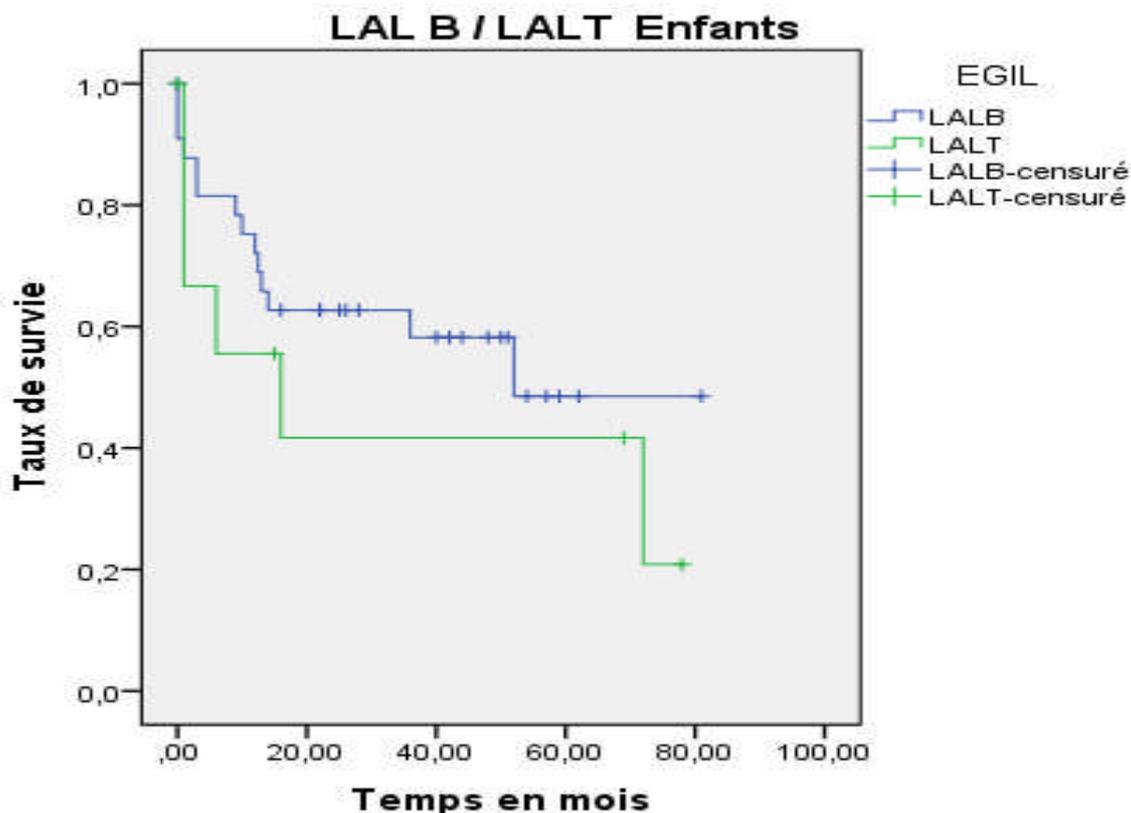


Figure 63: Courbe de survie globale en fonction du type de la LA : LAM/LAL

### 2.3.2.2. Probabilité de survie globale en fonction du type immunologique des LAL

Tableau 64: Survie globale en fonction du type immunologique des LAL: LALB/LALT

EGIL	Total des patients	N <sup>bre</sup> de décès	%	N <sup>bre</sup> (VV) et (PV)	%	Taux de survie %
LALB	33	14	42,4	19	57,6	48,5
LALT	10	6	60	4	40	20,8
Global	43	20	46,5	23	53,5	/



**Figure 64:** Courbe de survie globale en fonction du type immunologique des LAL : LALB /LALT

Le délai moyen de survie est de 48 mois pour les LAL B avec un IC à 95% [36-61] versus 34 mois pour les LAL T avec IC à 95 % [11-58]  $p=0,4$  pour un khi2 = 0,6 ; (voir figure 64). Le taux de survie globale est meilleur dans les LALB (48,5) versus LALT (20,8%) ; (voir tableau 64).

### 2.3.2.3. Probabilité de survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic

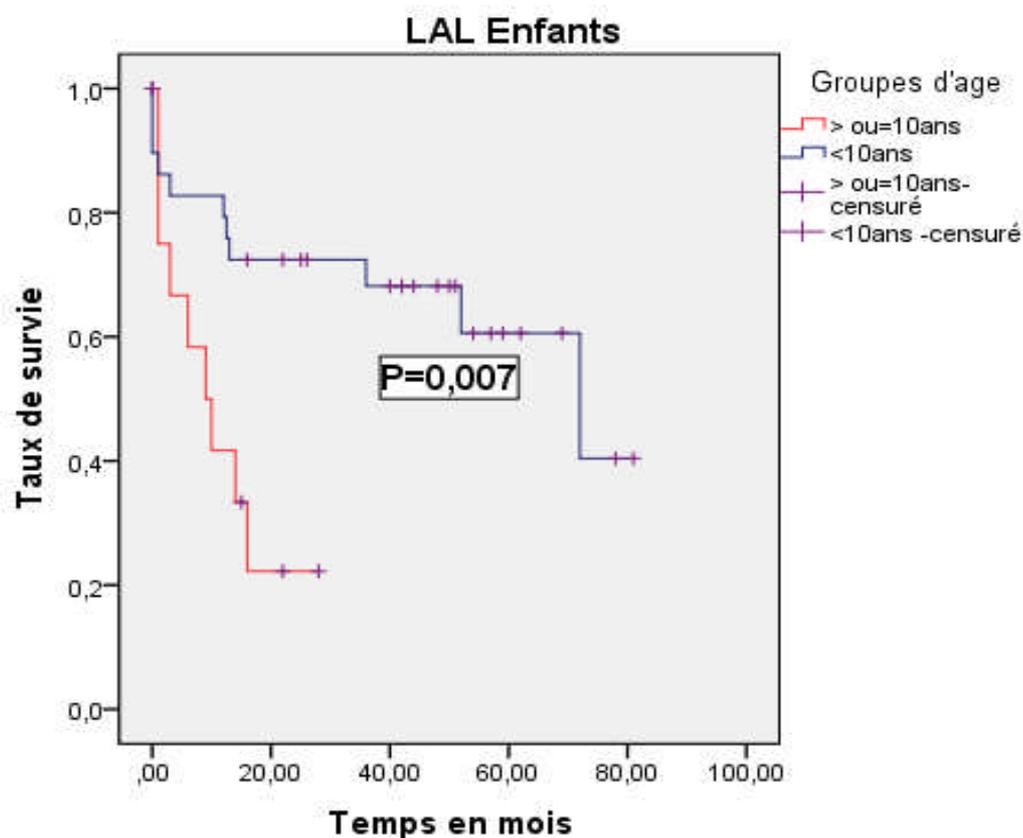
#### - CAS DES LAL

**Tableau 65 :** Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAL

Groupe d'âge	Total	Nombre de décès	% Décès	Nombre de VV et PV	%	% Survie
≥ 10ans	14	9	<b>64,3</b>	5	36	<b>22,2</b>
<10ans	29	11	<b>38</b>	18	62	<b>40,4</b>
Global	43	20	<b>46,5</b>	23	53,5	/

## Résultats enfants

Sexe	Total	Nombre de décès	% Décès	Nombre de VV et PV	%	%Survie
Féminin	22	6	27,2	16	72	45
Masculin	21	14	66,6	7	33	29
Global	43	20	46,5	23	53	/
Syndrome tumoral	Total	Nombre de décès	%Décès	Nombre de VV et PV	%	% Survie
Absent	7	3	43	4	57	50
Présent	36	17	47	19	53	33
Global	43	20	46,5	23	53,5	/
Taux de GB	Total	Nombre de décès	%Décès	Nombre de VV et PV	%	% Survie
<50G/L	27	10	37	17	63	41
≥50G/L	15	10	66,6	5	33	27
Global	42	20	47,6	22	52	/



**Figure 65:** LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction de l'âge

## Résultats enfants

- Les enfants atteints de LAL dont l'âge est  $\geq 10$  ans ont un délai moyen de survie de 11,7 mois IC à 95 % [6-17,5] versus 54 mois pour les patients dont l'âge est  $< 10$  ans IC à 95 % [42-66], avec un taux de survie meilleure (40%) ; (voir tableau 65).
- Le test de comparaison au Log Rank montre une différence de survie statistiquement significative en fonction de l'âge,  $p=0,007$  pour un  $\text{Khi-2}=7,3$  ; (voir figure 65).
- Le délai moyen de survie est de 24 mois pour les patients de sexe masculin IC à 95% [13-35] , versus 61 mois pour les patients de sexe féminin IC à 95% [48-74], avec un meilleur taux de survie (45%) ; (voir tableau 65). Le test de comparaison au Log Rank retrouve un  $p = 0,003$  pour un  $\text{Khi2} = 9$  ; (voir figure 66).

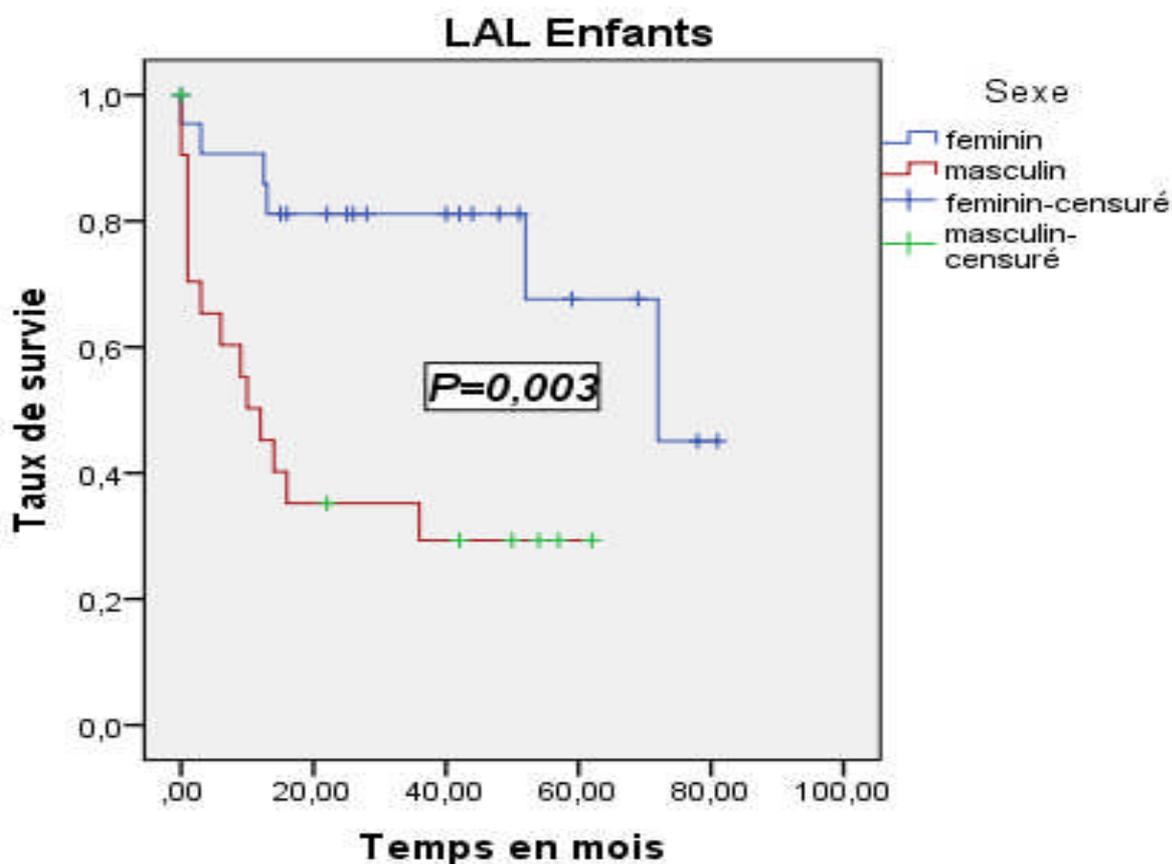
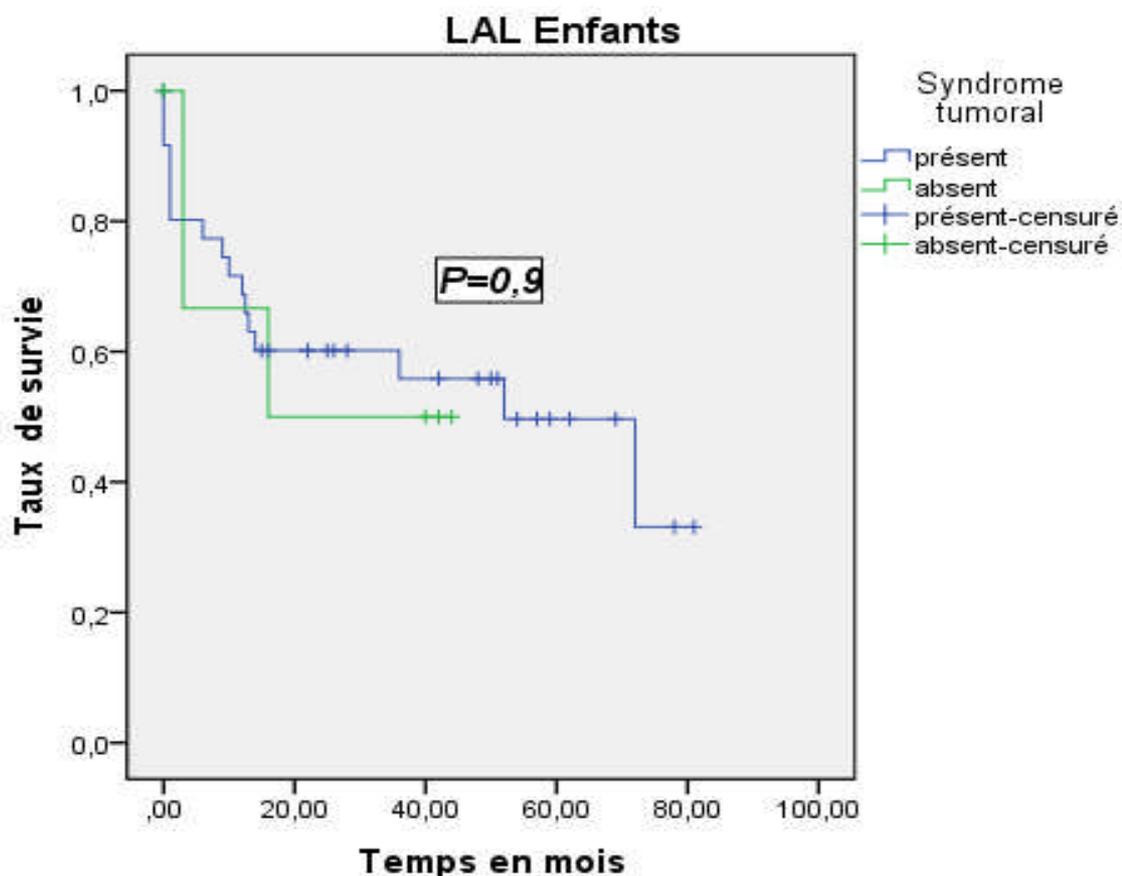


Figure 66: LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction du sexe

## Résultats enfants

- Le délai moyen de survie pour les patients avec syndrome tumoral est de 46 mois IC à 95% [34-58], versus 26 mois en absence du syndrome tumoral IC à 95 % [11-41]. La différence des délais de survie n'est pas statistiquement significative  $p=0,9$  ; (voir figure 67).



**Figure 67:** LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction de la présence ou non du syndrome tumoral

- Concernant le délai moyen de survie des enfants atteints de LAL en fonction du taux de GB, il est nettement meilleur chez les patients avec un taux de GB < 50 G/L 55 mois, IC à 95 % [42-68] versus 11 mois pour les patients avec un taux de GB  $\geq 50$  G/L IC à 95 % [6-17]  $p=0,005$  pour un Khi-2= 8 ; (voir figure 68).

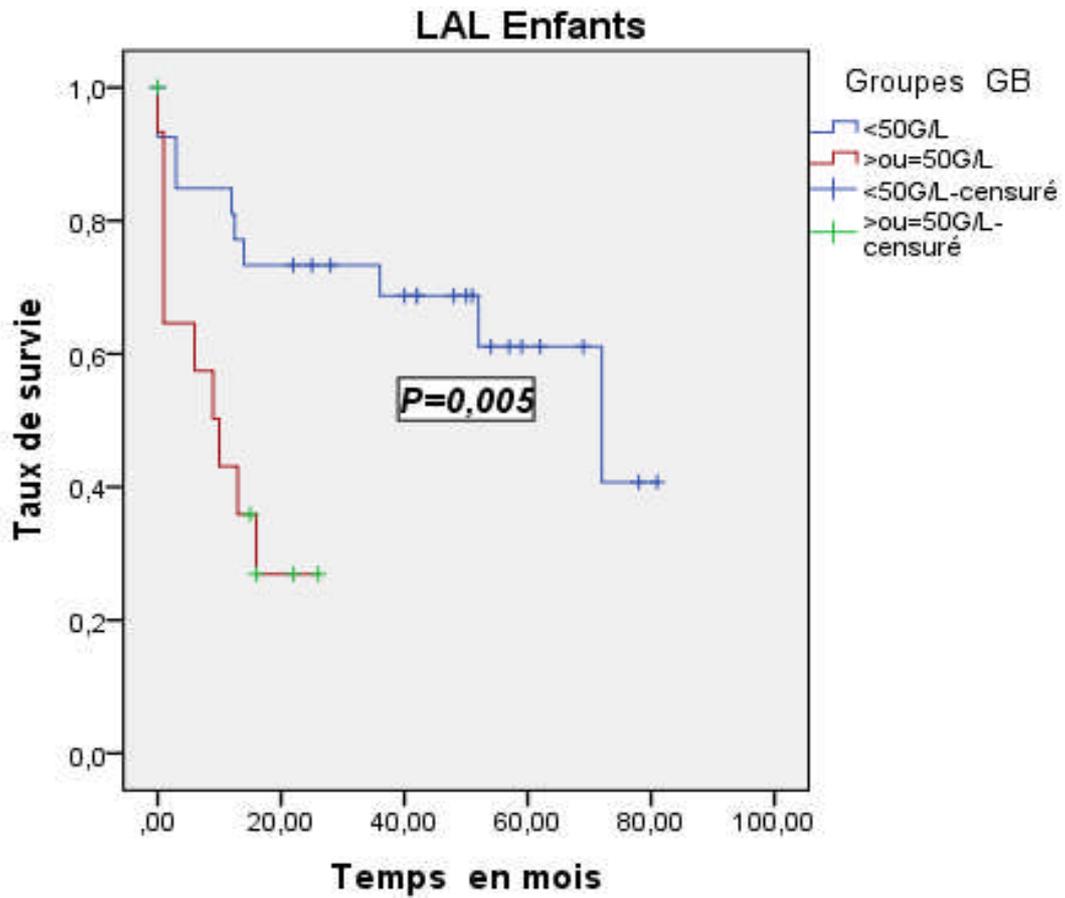


Figure 68 : LAL de l'enfant - Courbe de survie globale en fonction du taux de globules blancs

- CAS DES LAM

**Tableau 66:** Survie globale en fonction de l'âge, du sexe, du syndrome tumoral, et du taux de globules blancs au diagnostic dans les LAM

<b>Groupes d'âge</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
≥10ans	13	8	<b>61,5</b>	5	38,5	<b>23</b>
<10ans	11	7	<b>63,6</b>	4	36	<b>22</b>
Global	24	15	<b>62,5</b>	9	37,5	/
<b>Sexe</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
Féminin	11	8	<b>72,7</b>	3	27	<b>17</b>
Masculin	13	7	<b>54</b>	6	46	<b>27,4</b>
Global	24	15	<b>62,5</b>	9	37	/
<b>Groupes de GB</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<50G/L	18	10	<b>55,5</b>	8	44,4	<b>33</b>
≥50G/L	6	5	<b>83,3</b>	1	16,7	<b>21</b>
Global	24	15	<b>62,5</b>	9	37,5	/
<b>Syndrome tumoral</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre de VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
Absent	9	5		4	44,4	<b>23</b>
Présent	15	10		5	33,3	<b>42</b>
Global	24	15		9	37,5	/

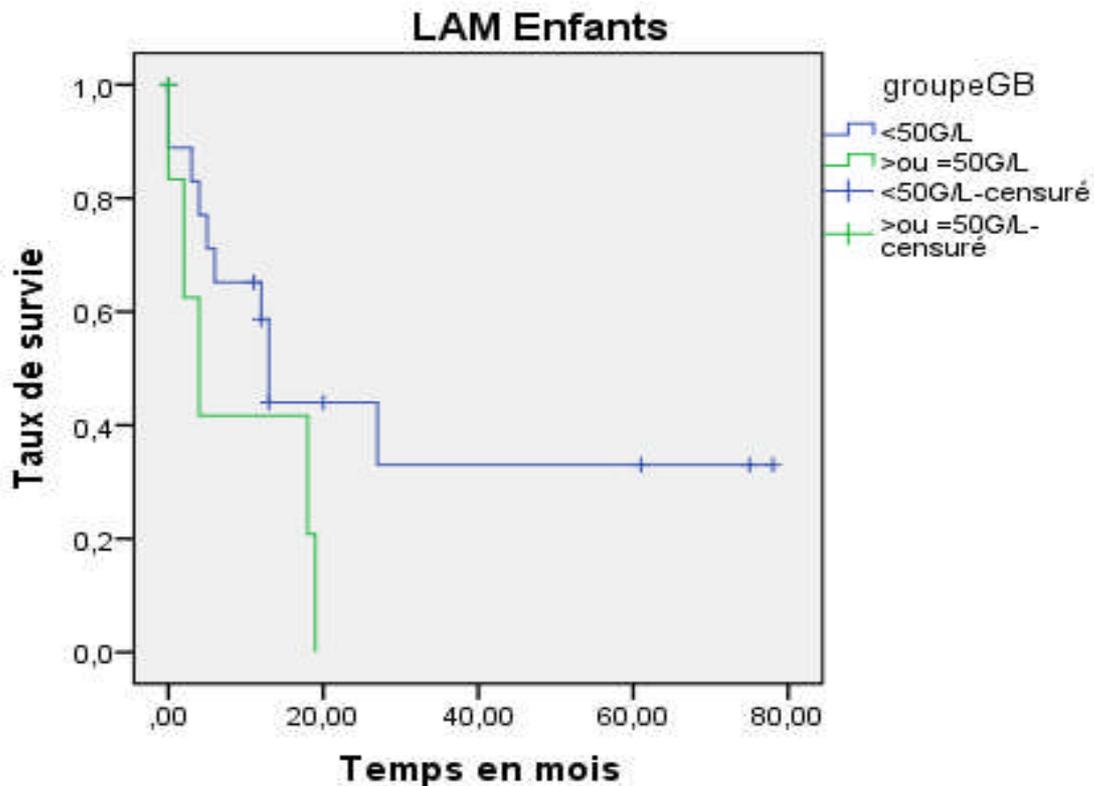
- Le délai moyen de survie est presque identique entre les deux groupes de patients : il est de 24 mois pour les patients dont l'âge est  $\geq 10$  ans IC à 95 % [6-43] et de 23 mois pour les patients dont l'âge est  $<10$  ans avec IC à 95 % [7,5-38]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un  $p=0,7$  pour un  $\text{Khi}^2=0,11$ .

- Le délai moyen de survie est de 28 mois pour les patients de sexe masculin IC à 95% [7-49], versus 22 mois pour les patients de sexe féminin IC [5-39]. Le test de comparaison au Log Rank retrouve un  $p = 0,8$  pour un  $\text{Khi}^2=0,07$ .

## Résultats enfants

- Le délai moyen de survie pour les patients ayant présenté un syndrome tumoral, est de 13 mois, IC à 95% [7-19], versus 36 mois en absence du syndrome tumoral IC à 95 % [12-60].
- La survie est nettement meilleure chez les enfants sans syndrome tumoral au diagnostic malgré un  $P=0,4$ .
- Le délai moyen de survie est de 32 mois pour les patients dont le taux de GB < 50G/L IC à 95 % [15-50], versus 8 mois uniquement pour les patients avec un taux de GB  $\geq 50$  G/L IC à 95% [1-17] ; (voir figure 69).
- La différence de survie est nettement significative malgré  $p=0,1$ .

Les taux de survie globale pour ces différents paramètres sont résumés dans le tableau 66.



**Figure 69:** LAM de l'enfant- Courbe de survie globale en fonction du taux de globules blancs

2.3.3. Valeur pronostique des différents marqueurs immunologiques exprimés dans les LA

2.3.3.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques dans les LAL

- Cas des LAL T

Tableau 67: LAL T de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

<b>HLADR</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	7	3	<b>43</b>	4	<b>57</b>	<b>44</b>
<b>POSITIF</b>	3	3	<b>100</b>	0	<b>0,0</b>	<b>0</b>
<b>Global</b>	10	6	<b>60</b>	4	<b>40</b>	/
<b>CD34</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	8	5	<b>62,5</b>	3	<b>37,5</b>	<b>21,4</b>
<b>POSITIF</b>	2	1	<b>50</b>	1	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Global</b>	10	6	<b>60</b>	4	<b>40</b>	/
<b>CD3s</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	4	3	<b>75</b>	1	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>POSITIF</b>	6	3	<b>50</b>	3	<b>50</b>	<b>33</b>
<b>Global</b>	10	6	<b>60</b>	4	<b>40</b>	/
<b>CD2</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	3	1	<b>33</b>	2	<b>67</b>	<b>67</b>
<b>POSITIF</b>	7	5	<b>71</b>	2	<b>29</b>	<b>17</b>
<b>Global</b>	10	6	<b>60</b>	4	<b>40</b>	/
<b>CD8</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	4	3	<b>75</b>	1	<b>25</b>	<b>0</b>
<b>POSITIF</b>	5	2	<b>40</b>	3	<b>60</b>	<b>60</b>
<b>Global</b>	9	5	<b>55</b>	4	<b>44</b>	/

**Tableau 68:** LAL T enfants – Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l’expression ou non des Ag leucocytaires de surface

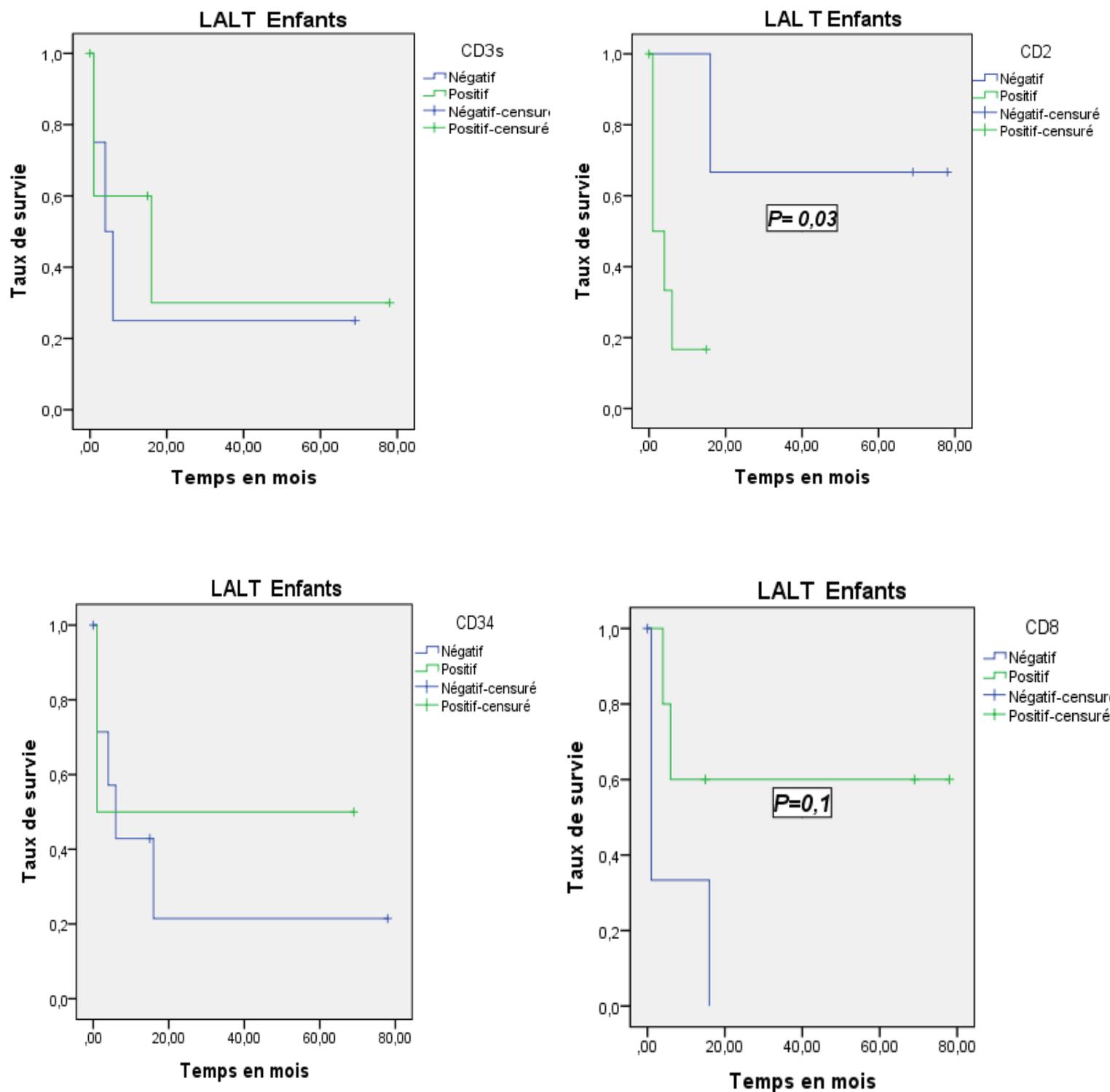
Paramètre	Délai moyen de survie en mois	IC à 95%	Taux de survie %	Khi-2	<i>p</i>
HLADR+	4	0,8-6,5	0,0	2,4	0,1
HLADR-	38,5	8-69	44,4		
CD34+	35	0-82	50	0,15	0,7
CD34-	22	0-46	21,4		
CD3s+	28,6	0-61	33	0,15	0,7
CD3s-	20	0-48	25		
CD2+	5	0,7-9	17	4,5	0,03
CD2-	57	24-90	67		
CD8+	49	17-80	60	2,7	0,01
CD8-	6	0-16	0		

Les patients enfants LALT CD8+ ont une meilleure survie que les groupes CD8- avec une signification statistique **p=0,01**. De même les patients CD2- ont une survie nettement meilleure que les patients CD2+ (**p=0,03**) ;(voir tableau 67 et 68).

Pour les autres groupes antigéniques (HLADR+et-, CD34+et- et CD3s+et-) la différence de survie reste légère et non statistiquement significative.

Les courbes de survie globale de Kaplan Mayer en fonction de l’expression ou non des Ag leucocytaires de surface dans les LALT de l’enfant sont illustrées dans la figure 70.

## Résultats enfants



**Figure 70:** LAL T de l'enfant – Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

## Résultats enfants

### - Cas des LAL B

**Tableau 69:** LAL B de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmiques

<b>HLADR</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	5	2	<b>40</b>	3	<b>60</b>	<b>60</b>
<b>POSITIF</b>	27	12	<b>43</b>	15	<b>56</b>	<b>40</b>
<b>Global</b>	32	14	<b>42</b>	18	<b>56</b>	/
<b>CD34</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	17	10	<b>59</b>	7	<b>41</b>	<b>33</b>
<b>POSITIF</b>	16	4	<b>25</b>	12	<b>75</b>	<b>75</b>
<b>Global</b>	33	14	<b>42</b>	19	<b>58</b>	/
<b>CD22cyt</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	17	8	<b>47</b>	9	<b>53</b>	<b>47</b>
<b>POSITIF</b>	14	4	<b>29</b>	10	<b>71</b>	<b>70</b>
<b>Global</b>	31	12	<b>39</b>	19	<b>61</b>	/
<b>CD22s</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	5	2	<b>40</b>	3	<b>60</b>	<b>60</b>
<b>POSITIF</b>	12	5	<b>42</b>	7	<b>58</b>	<b>58</b>
<b>Global</b>	17	7	<b>41</b>	10	<b>59</b>	/
<b>Chaîne mu cyt</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	15	4	<b>26,6</b>	11	<b>73</b>	<b>64</b>
<b>POSITIF</b>	14	7	<b>50</b>	7	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Global</b>	29	11	<b>38</b>	18	<b>62</b>	/
<b>Tdt</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	13	6	<b>46</b>	7	<b>54</b>	<b>54</b>
<b>POSITIF</b>	6	2	<b>33</b>	4	<b>67</b>	<b>67</b>
<b>Global</b>	19	8	<b>42</b>	11	<b>58</b>	/
<b>CD20</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	19	6	<b>32</b>	13	<b>68</b>	<b>59</b>
<b>POSITIF</b>	6	4	<b>67</b>	2	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>Global</b>	25	10	<b>40</b>	15	<b>60</b>	/

Les antigènes spécifiques de la lignée lymphoïde B et exprimés au stade précoce de la lymphopoïèse B : CD19, CD79a et l'Ag Calla ou le CD10 étaient exprimé respectivement dans 100 % des cas en fonction du nombre de cas testés et 32 cas /33 soit 97% pour le CD10.

## Résultats enfants

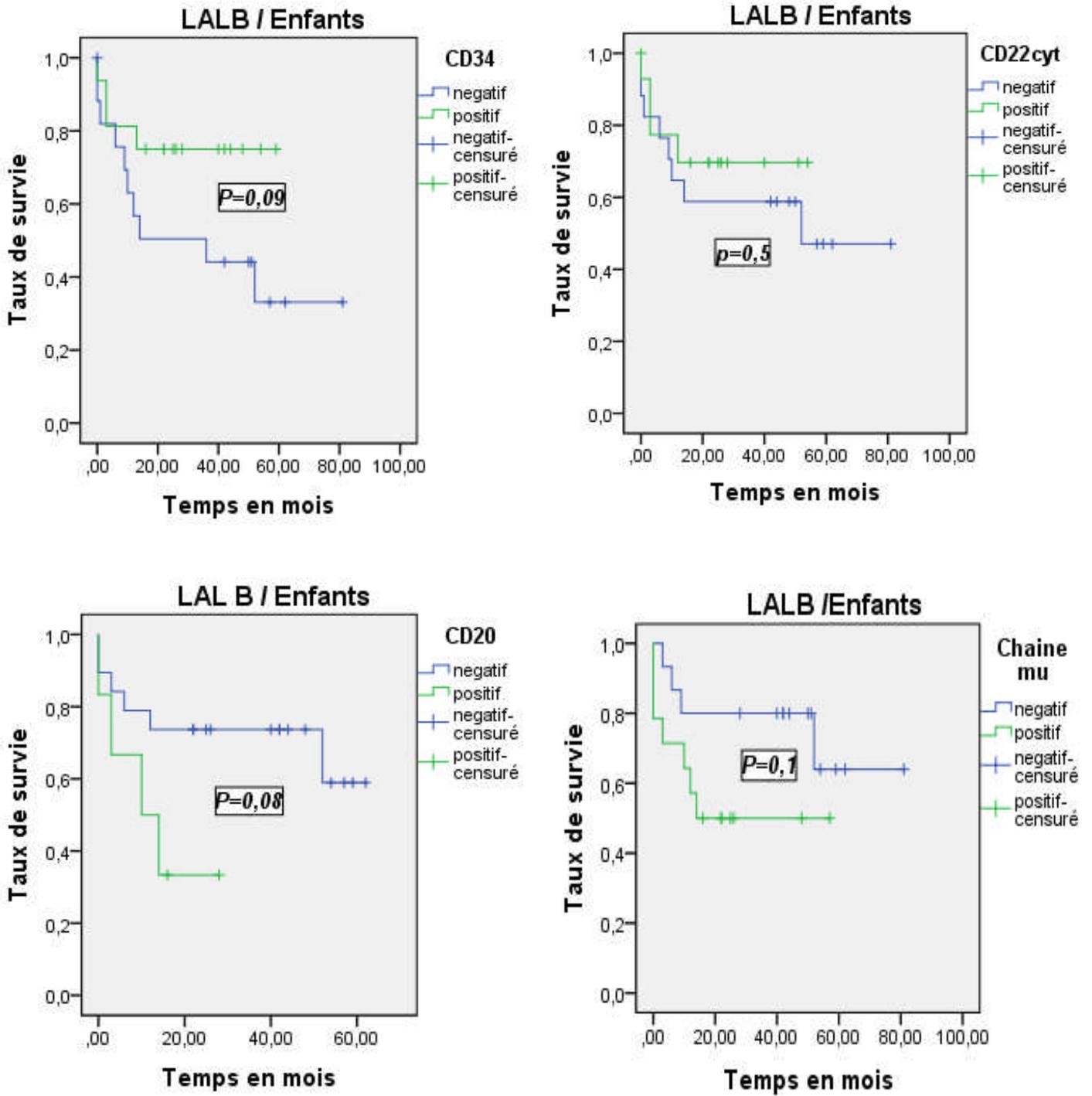
**Tableau 70 :** LAL B de l'enfant – Délai moyen et taux de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmiques

Paramètre	Délai moyen de survie en mois	IC à 95%	Taux de survie %	Khi-2	<i>p</i>
<b>HLADR+</b>	35	26-44,5	40	0,34	0,56
<b>HLADR-</b>	57	30-84	60		
<b>CD34+</b>	45	34-57	75	2,83	0,09
<b>CD34-</b>	38	21-55	33		
<b>CD22cyt+</b>	39	27-51	70	0,45	0,5
<b>CD22cyt-</b>	47	29-64	47		
<b>CD22s+</b>	30	18-42	58	0,0	0,98
<b>CD22s-</b>	33	10-55	60		
<b>Chaîne mucyt+</b>	31	18-45	50	2,73	0,1
<b>Chaîne mucyt-</b>	61	45-77	64		
<b>Tdt +</b>	19	11-27	67	0,25	0,6
<b>Tdt -</b>	31	17-44,5	54		
<b>CD20+</b>	14	5-23	33	2,96	0,08
<b>CD20-</b>	45	34-57	59		

Les taux de survie globale et délais moyens de survie, en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmiques, sont rapportés respectivement dans les tableaux 69 et 70.

Certaines courbes de survie globale de Kaplan Meyer en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmique dans les LALB de l'enfant, sont représentées dans la figure 71.

## Résultats enfants



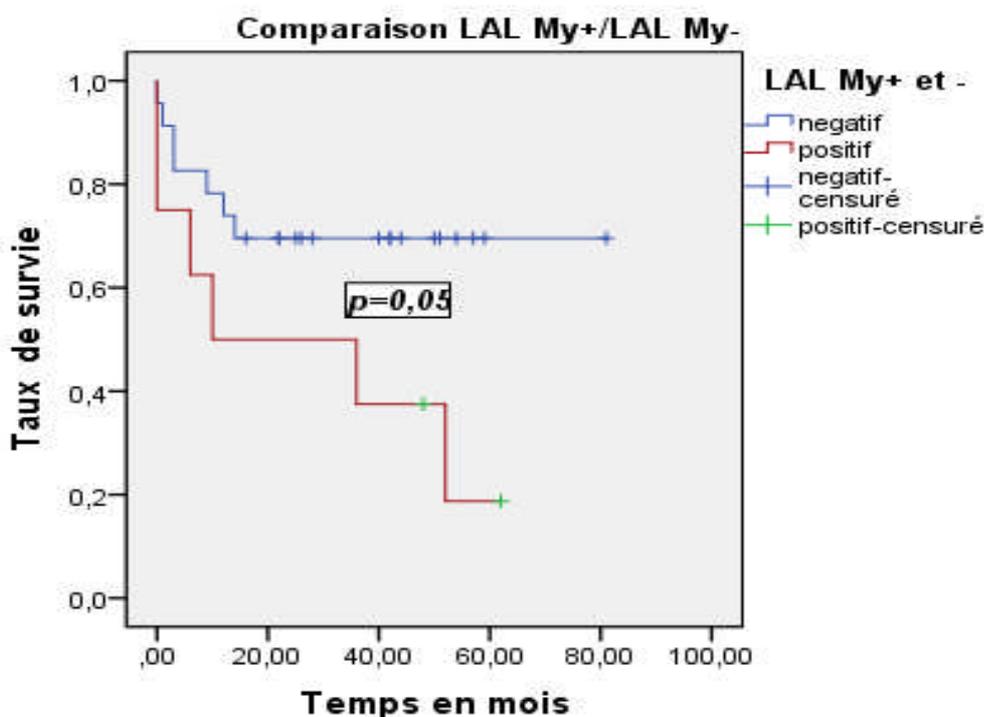
**Figure 71:** Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface et intracytoplasmique dans les LALB

**2.3.4. Survie globale des LALB avec expression des antigènes myéloïdes associées (LALB/My+) et sans expression d'antigènes myéloïdes (LAL B /My-)**

**Tableau 71:** Survie globale des LALB de l'enfant avec expression des antigènes myéloïdes associées (LALB/My+) et sans expression d'antigènes myéloïdes(LAL B /My-).

LALB et coexpression d'Ag aberrants myéloïdes	Total	Nombre de décès	% Décès	Nombre VV et PV	%	% Survie
LALB My+	8	6	75	2	25	19
LALB My-	23	7	30	16	70	70
Global	31	13	42	18	58	/

Le délai moyen de survie pour les cas de LAL B My+ est de 28 mois pour un IC à 95% [10-45], versus 58 mois pour les LALB My- avec un IC à 95 % [11-41]. La différence des délais de survie globale est statistiquement significative ( $p=0,05$  pour un Khi-2=3,7) ; (voir figure 72).



**Figure 72:** Courbe de survie globale des LAL B de l'enfant en fonction de l'expression ou non des Ag myéloïdes (LALB /My+ / LAL B /My-)

## Résultats enfants

### 2.3.4.1. Valeur pronostique des marqueurs immunologiques de surface dans les LAM

Le tableau 72 résume le nombre de sujets inclus jusqu'à la fin du suivi ou de l'étude, la fréquence de l'événement survenu (décès) et des non événements (vivants et perdues de vues) en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface.

**Tableau 72:** LAM de l'enfant – Taux du décès et de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

<b>HLADR</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	12	7	<b>58,3</b>	5	<b>42</b>	<b>34,3</b>
<b>POSITIF</b>	12	10	<b>83,3</b>	2	<b>17</b>	<b>18,3</b>
<b>Global</b>	24	17	<b>71</b>	7	<b>29</b>	<b>/</b>
<b>CD34</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	10	5	<b>50</b>	5	<b>50</b>	<b>45</b>
<b>POSITIF</b>	14	12	<b>86</b>	2	<b>14</b>	<b>15,6</b>
<b>Global</b>	24	17	<b>71</b>	7	<b>29</b>	<b>/</b>
<b>CD117</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>%Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	7	4	<b>57</b>	3	<b>43</b>	<b>29</b>
<b>POSITIF</b>	17	13	<b>76</b>	4	<b>23</b>	<b>17</b>
<b>Global</b>	24	17	<b>71</b>	7	<b>29</b>	<b>/</b>
<b>CD13</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	6	6	<b>100</b>	0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>POSITIF</b>	18	11	<b>61</b>	7	<b>39</b>	<b>30,1</b>
<b>Global</b>	24	17	<b>71</b>	7	<b>29</b>	<b>/</b>
<b>CD15</b>	<b>Total</b>	<b>Nombre de décès</b>	<b>% Décès</b>	<b>Nombre VV et PV</b>	<b>%</b>	<b>% Survie</b>
<b>NEGATIF</b>	15	10	<b>66,6</b>	5	<b>33</b>	<b>14,1</b>
<b>POSITIF</b>	4	4	<b>100</b>	0	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Global</b>	19	14	<b>73,6</b>	5	<b>26</b>	<b>/</b>

## Résultats enfants

**Tableau 73 :** LAM enfants- Délai moyen de survie globale en fonction l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

Paramètre	Délai moyen de survie en mois	IC à 95%	Khi-2	p
HLADR+	11	5-17	1,33	0,2
HLADR-	<b>32</b>	<b>11,5-53</b>		
CD34+	11	6-16	2,35	0,1
CD34-	<b>39</b>	<b>16-63</b>		
CD117+	21	8-34	0,006	0,9
CD117-	28	0-57		
CD13+	29	13-46	0,8	0,4
CD13-	11	4-18		
CD15+	<b>6</b>	<b>0-15</b>	<b>4,3</b>	<b>0,04</b>
CD15-	<b>18</b>	<b>7-30</b>		

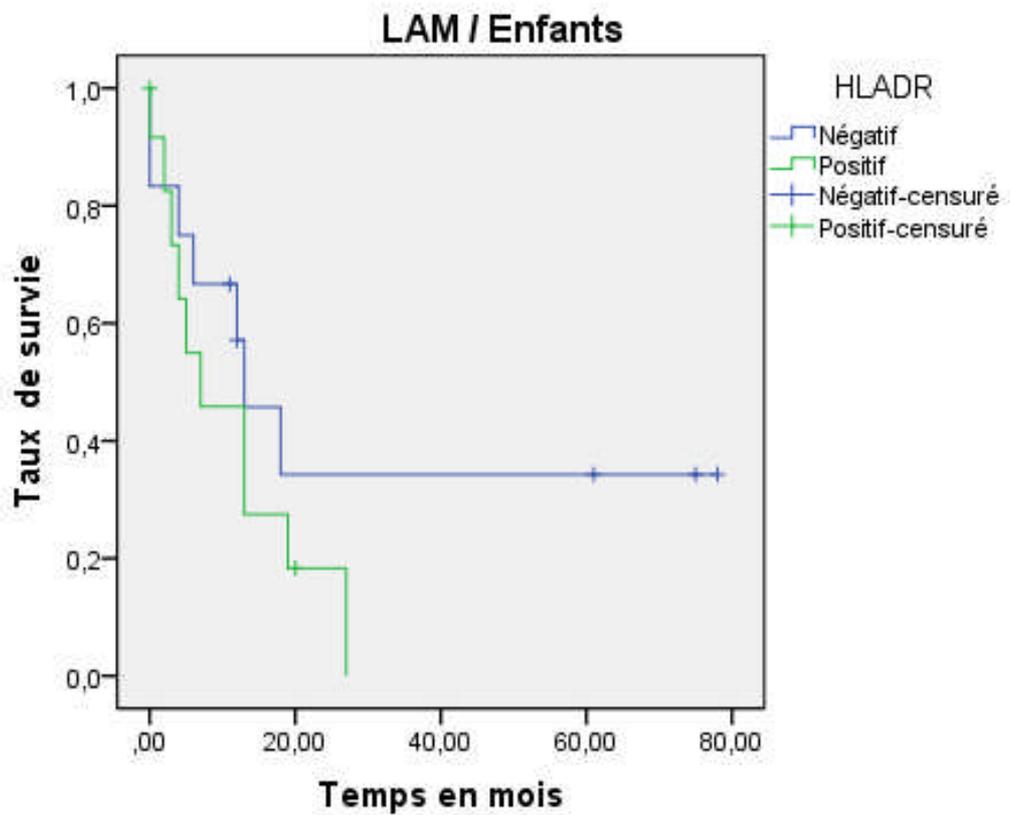
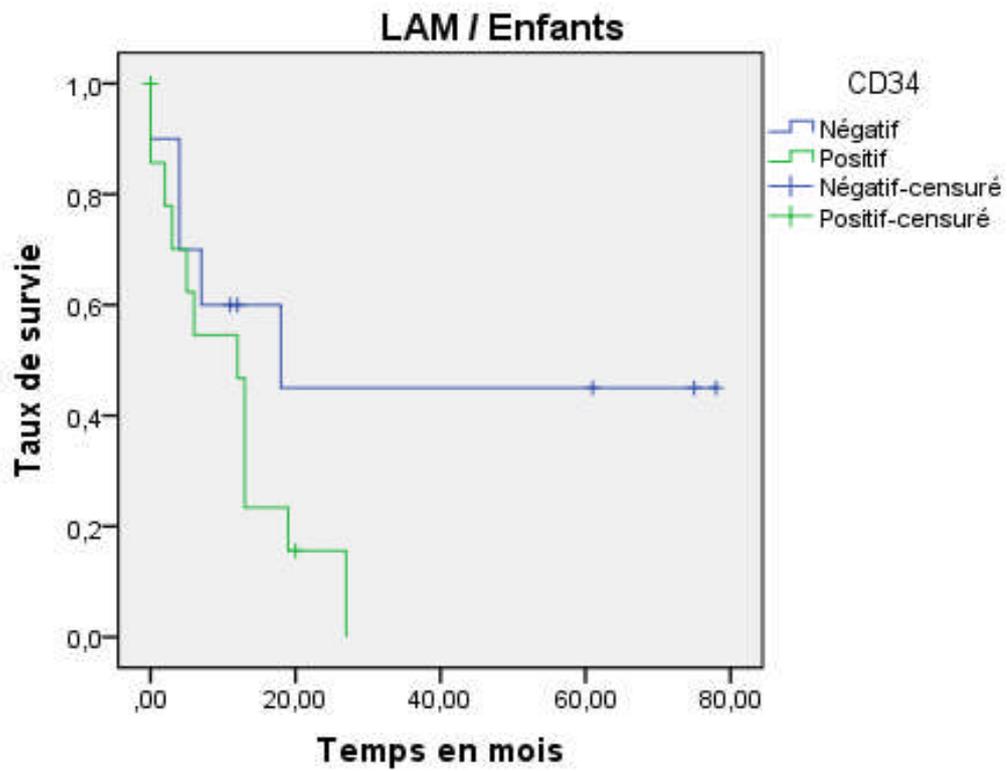
Chez les patients atteints de LAM : une MPOcyt positive avec expression du CD33 et du CD13 est un critère d'appartenance vers la lignée myéloïde, la positivité de la MPOcyt et celui du CD33 de nos patients était de 87,5% (21 cas +/24), 96% ( 23 cas +/24) et de 75% pour le CD13 (18cas +/24).

Le CD38 marqueur de prolifération des cellules blastiques était négatif chez 2/20 cas enfants LAM (10 %) et positifs chez 18/20 cas (90 %).

L'inégalité dans la distribution de ces marqueurs rend difficile la comparaison des groupes positifs et négatifs. Seuls la comparaison des groupes de patients CD15+ versus CD15- à montré une différence statistiquement significative en terme de taux de survie (voir tableau 72) et en délai moyen de survie (voir tableau 73).

Les courbes de survie globale de Kaplan Meyer et la comparaison des groupes d'antigènes négatifs et positifs au test de Log Rank ou son équivalent sur SPSS, sont illustrés dans la figure 73.

## Résultats enfants



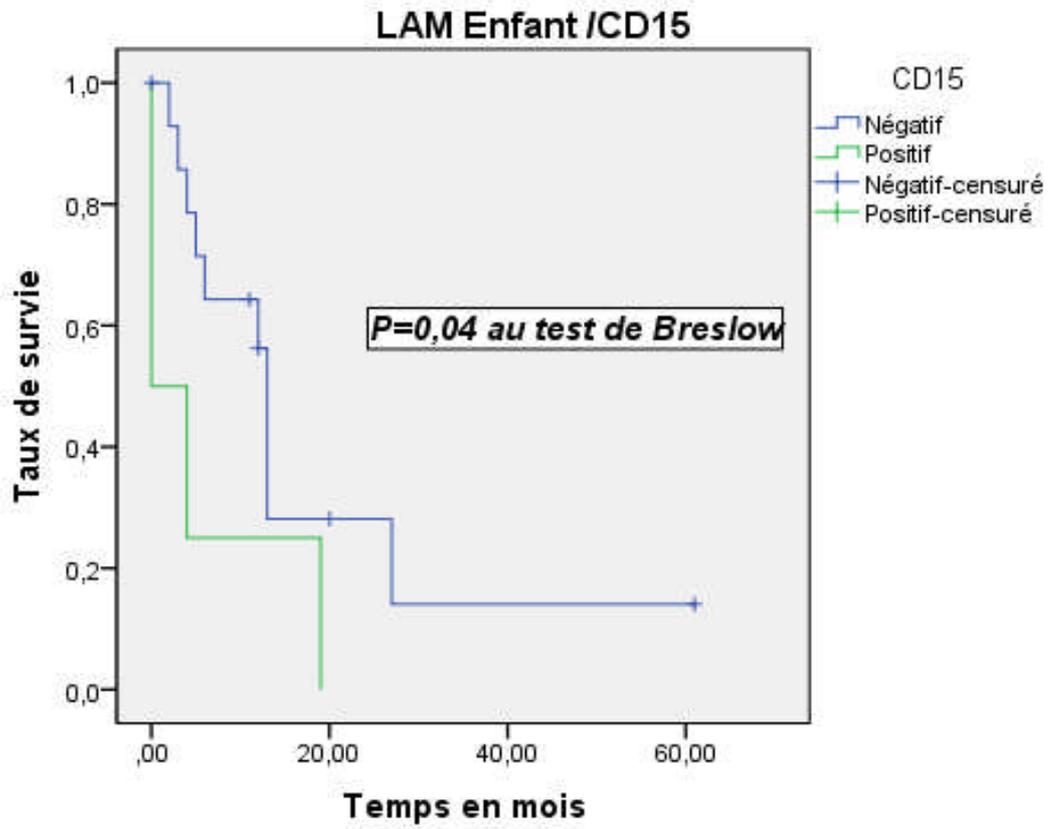


Figure 73 : LAM de l'enfant- Courbes de survie globale en fonction de l'expression ou non des Ag leucocytaires de surface

## **II.3**

# **Etude de la concordance entre le typage FAB et immunologique des leucemies aigues**

### 3. Description cytologique FAB et immunologique des LA

#### 3.1. Classification des sous types de LAM selon les critères cytomorphologiques du FAB

Tableau 74: Répartition des sous type de LAM selon FAB

Sous type de LAM selon FAB	Effectifs	Fréquence %
M1	17	11,7
M2	36	25
M3	32	22
M4	28	19,3
M5	20	14
LAM DC	12	8,3
Total	145	100

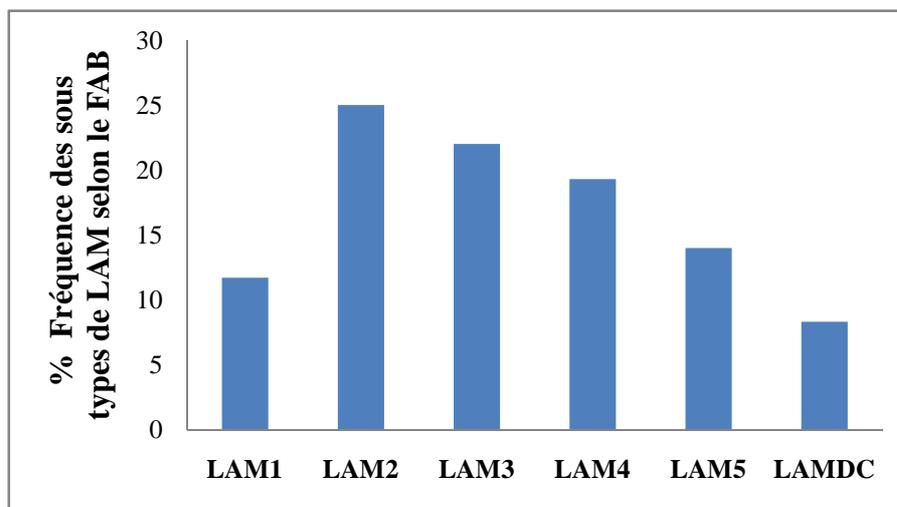


Figure 74: Répartition des sous type de LAM selon FAB

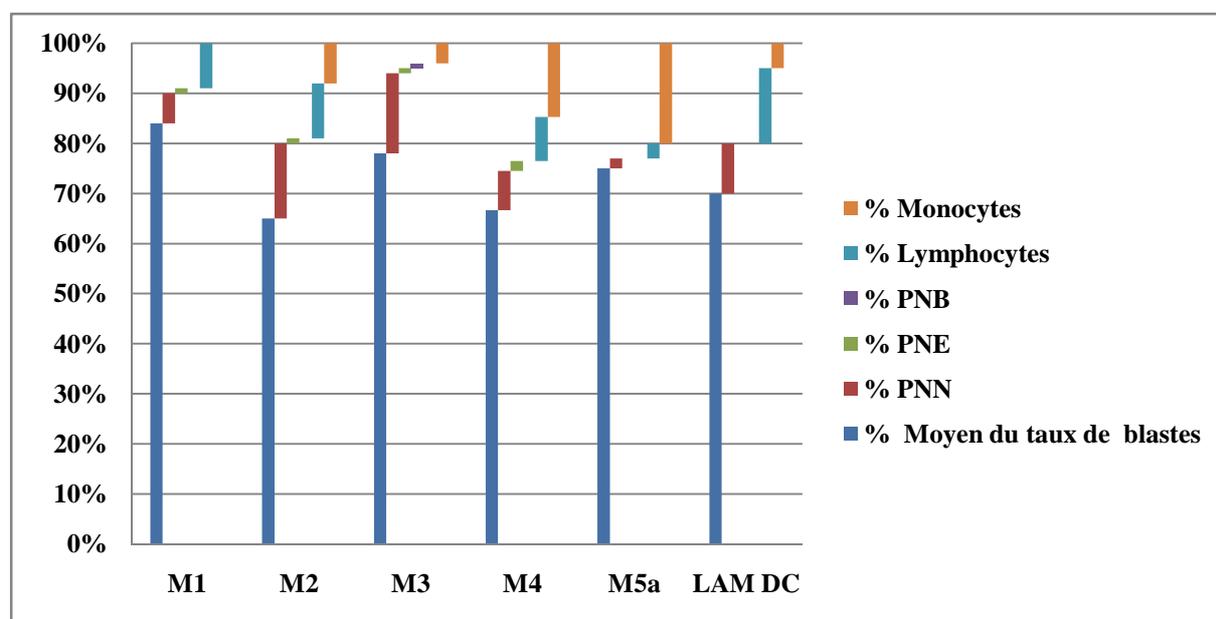
#### 3.2. Etude cytomorphologique du frottis de sang périphérique des sous types de LAM selon la classification FAB

Nous présentons dans le tableau les éléments analysés sur frottis sanguin en établissant une moyenne du % pour chaque élément et dans chaque sous type de LAM.

## Etude de la concordance entre le typage FAB et immunologiques des leucémies aiguës

**Tableau 75:** Equilibre leucocytaire sur frottis de sang périphérique selon les sous types de LAM

Sous types de LAM selon FAB	% blastes	% PNN	% PNE	% PNB	% Lymphocytes	% Monocytes
M1	84	6	1	0	9	0
M2	65	15	1	0	11	8
M3	78	16	1	1	0	4
M4	68	8	2	0	9	15
M5a	75	2	0	0	3	20
LAM DC	70	10	0	0	15	5



**Figure 75:** Equilibre leucocytaire sur frottis de sang périphérique selon les sous types de LAM

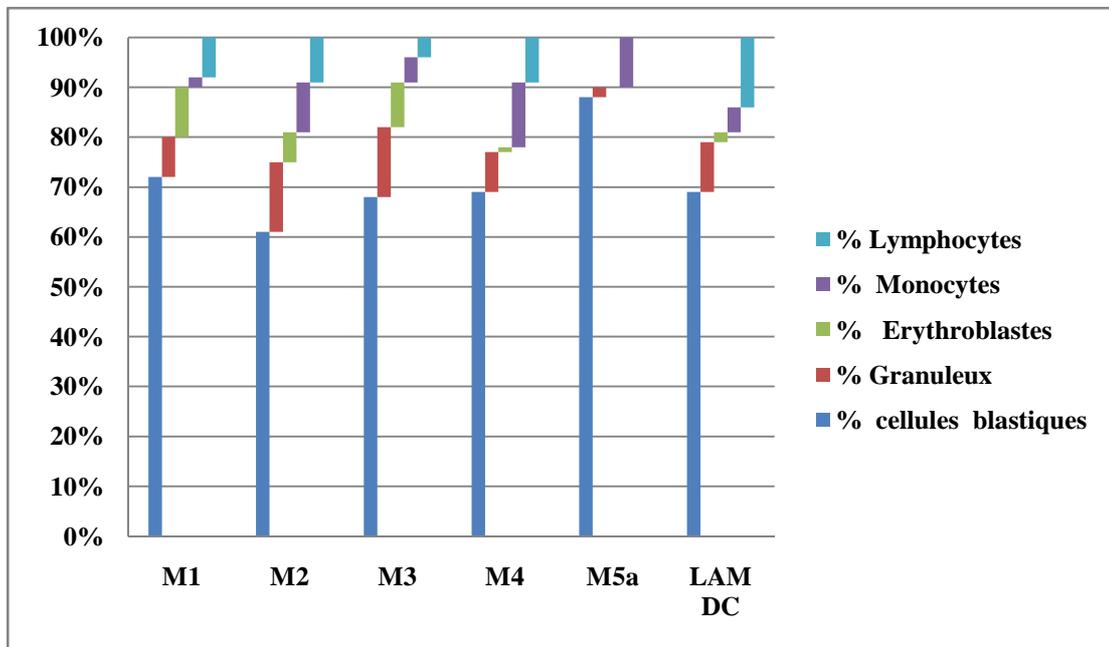
### 3.3. Etude cytomorphologique au frottis médullaire des sous types de LAM selon la classification FAB

**Tableau 76:** Fréquence des éléments médullaires selon les sous types de LAM

Sous types de LAM selon FAB	% blastes	% Granuleux	% Erythroblastes	% Monocytes	% Lymphocytes
M1	72	8	10	2	8
M2	61	14	6	10	9
M3	68	14	9	5	4

## Etude de la concordance entre le typage FAB et immunologiques des leucémies aiguës

M4	69	8	1	13	9
M5a	88	2	0	10	0
LAM DC	69	10	2	5	14



**Figure 76:** Répartition des éléments médullaires selon les sous types de LAM

### 3.4. Répartition des cas de LAM selon le degré de positivité de la coloration cytochimique au noir soudan

L'étude morphologique (frottis sanguin et frottis médullaire) complétée par la coloration cytochimique au noir soudan a permis d'établir une classification concluante des sous types de LAM dans **72,4 %** des cas de notre série d'étude ; (voir figure 77).

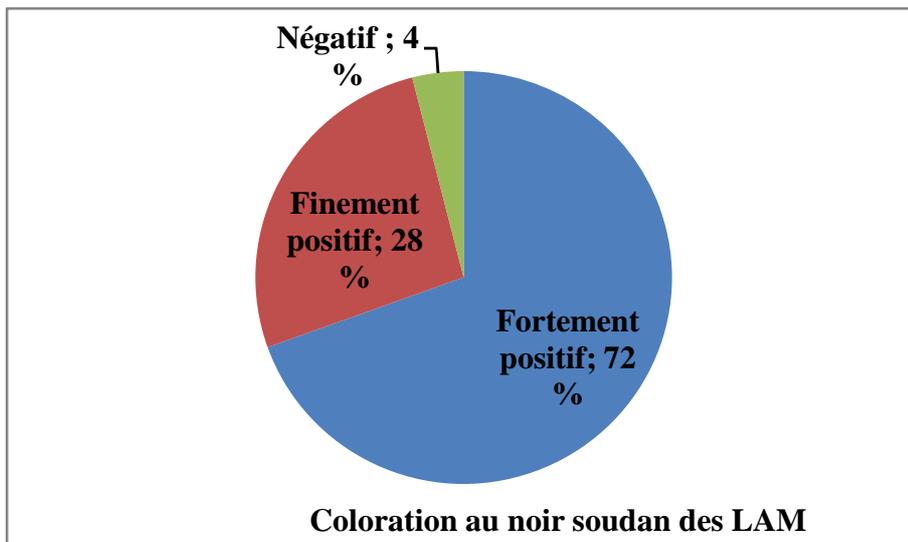


Figure 77: Degré de positivité du noir soudan dans les LAM

### 3.5. Classification immunophénotypique des cas de LAM difficiles à classer et redressement diagnostic

Tableau 77: Classification finale des sous types de LAM après immunophénotypage

Sous type de LAM selon EGIL	Effectifs	Fréquence %
M0	3	2
M1	19	13
M2	37	25,5
M3	32	22
M4	30	20,7
M5	20	14
M7	3	2
LApCD	1	0,7
Total	145	100

### 3.6. Fréquence d'expression des marqueurs antigéniques en fonction des sous types de LAM

#### 3.6.1. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM0

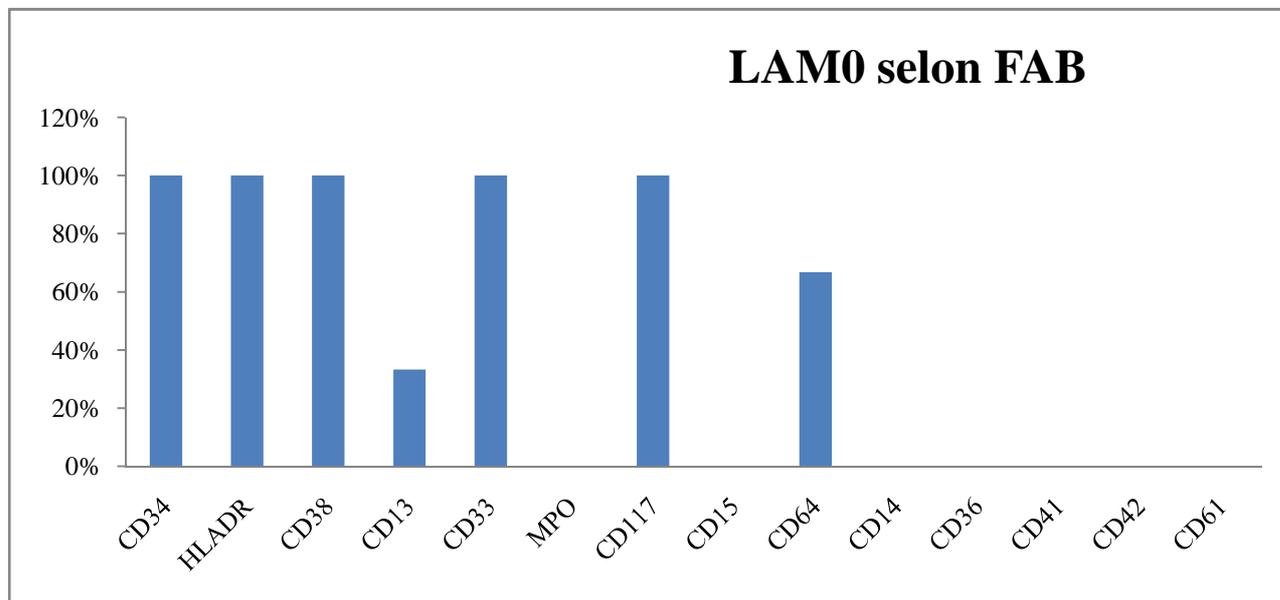


Figure 78: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM0

#### 3.6.2. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM1

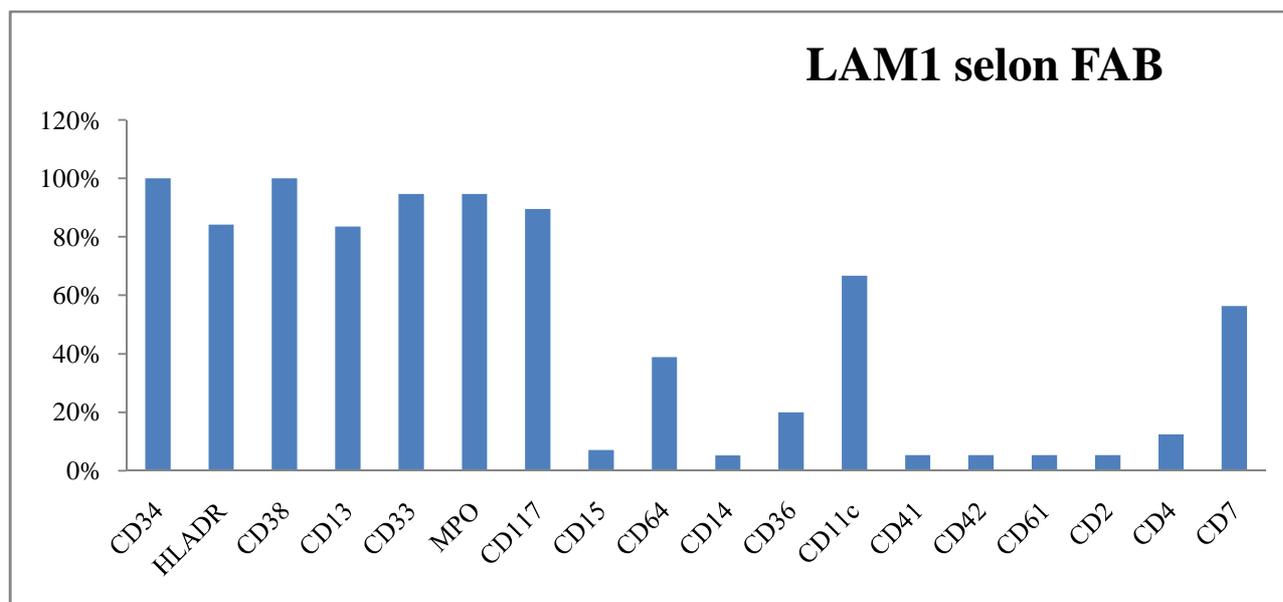


Figure 79: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM1

3.6.3. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM2

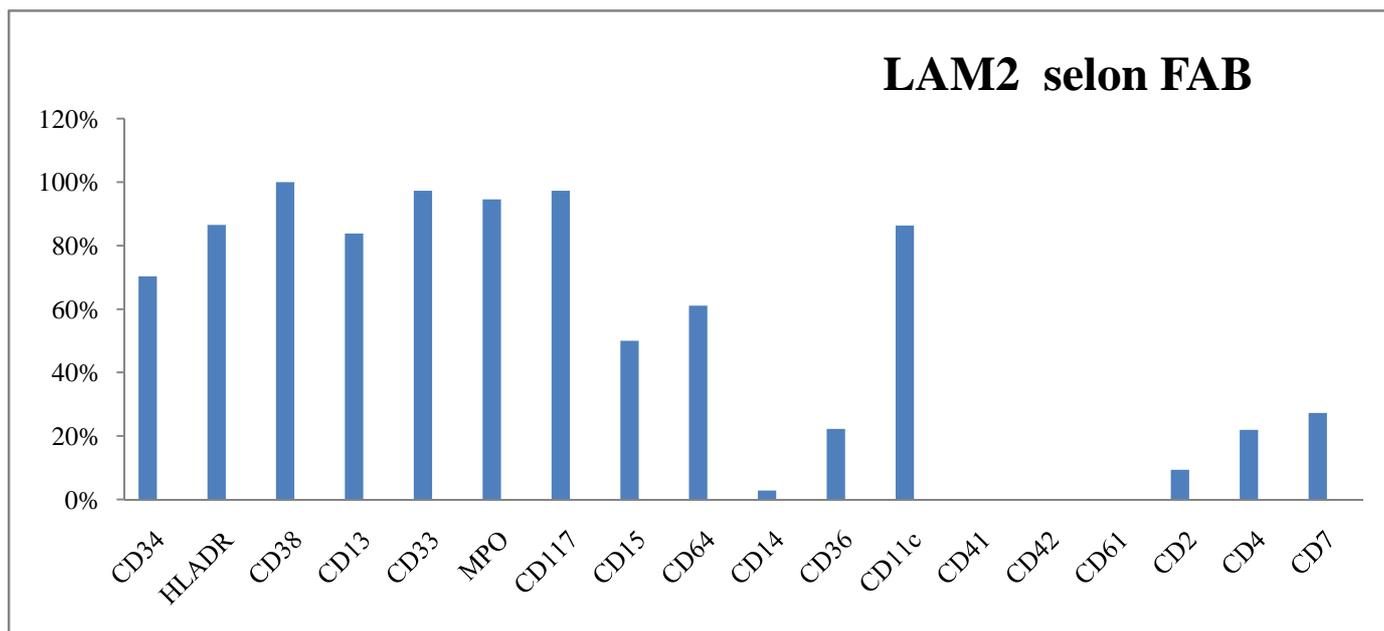


Figure 80 : Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM2

3.6.4. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM3

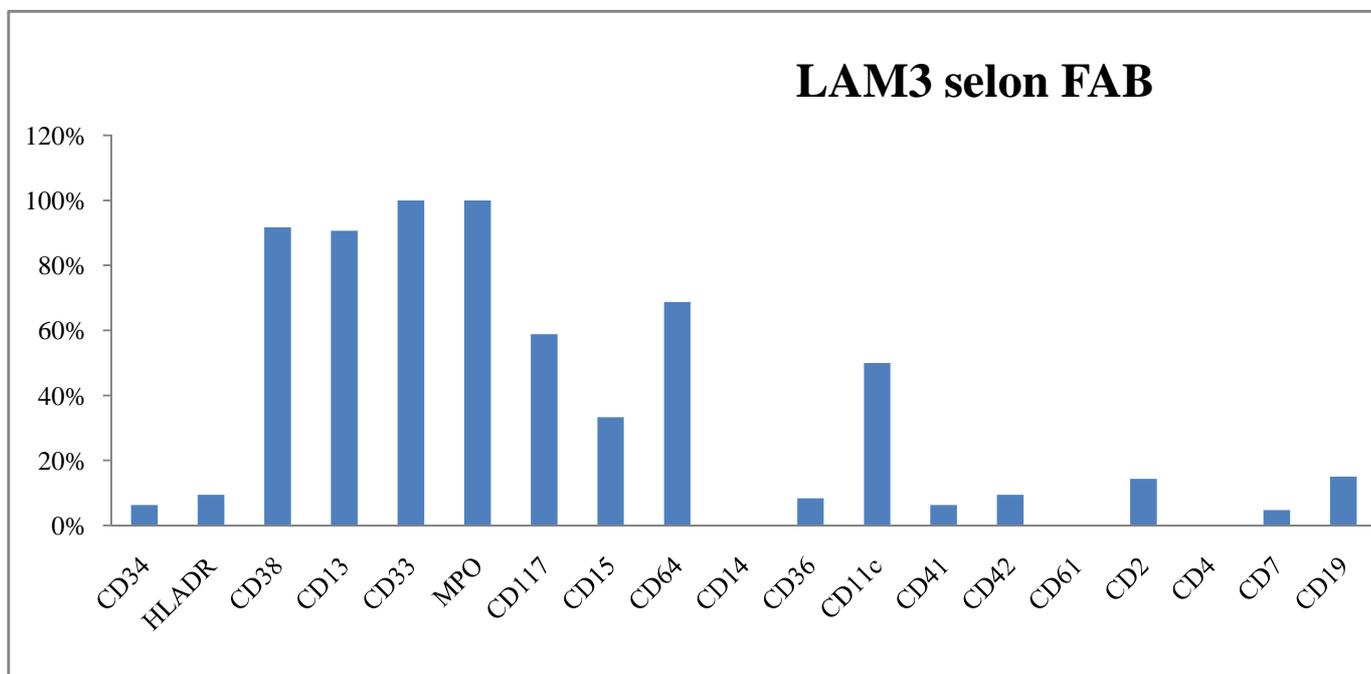


Figure 81: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM3

### 3.6.5. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM4

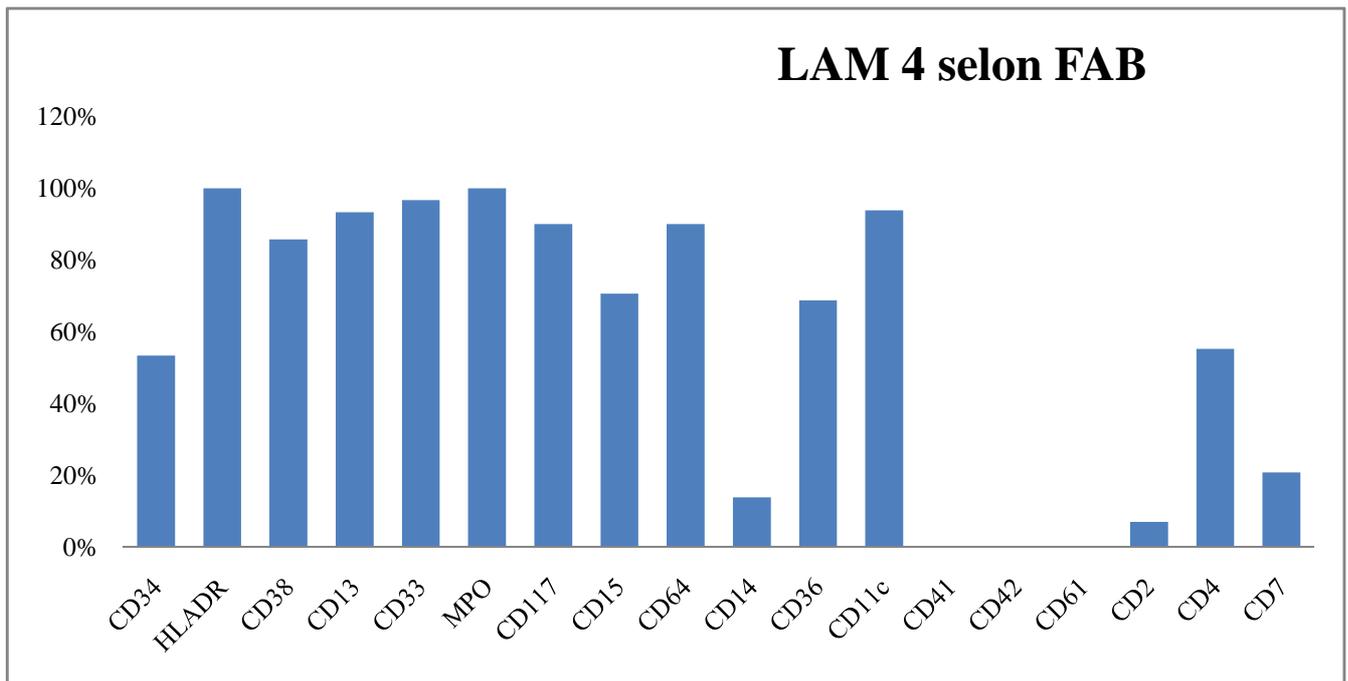


Figure 82: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM4

### 3.6.6. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM5

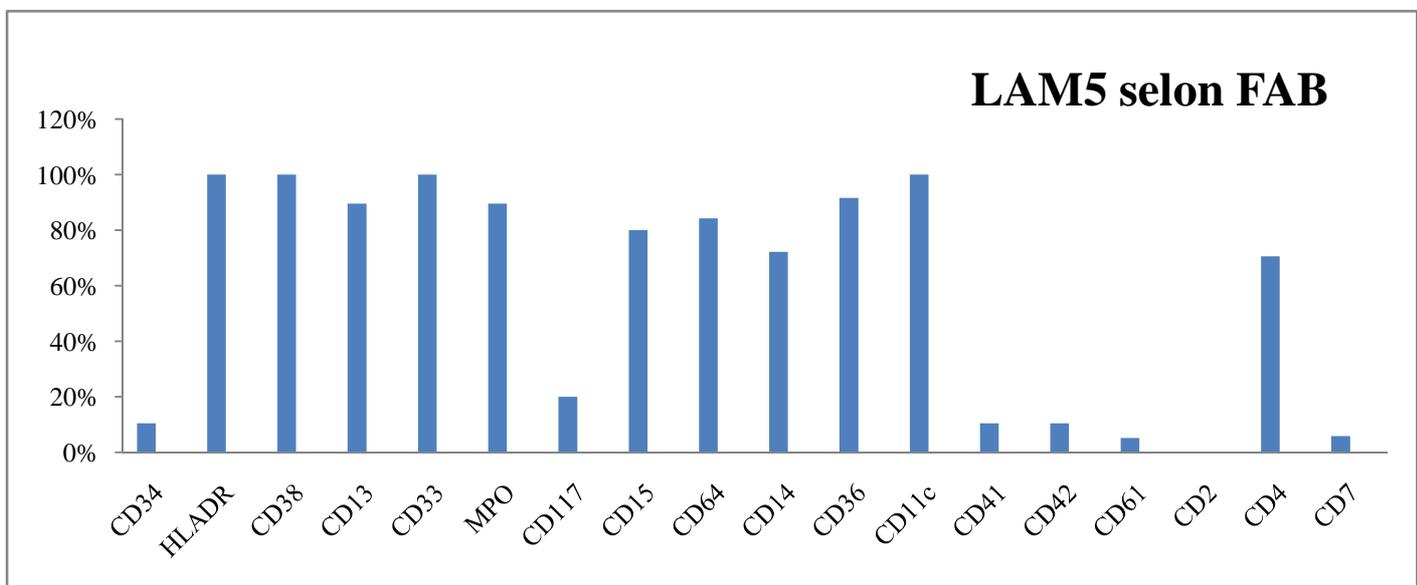


Figure 83: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM5

3.6.7. Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM7

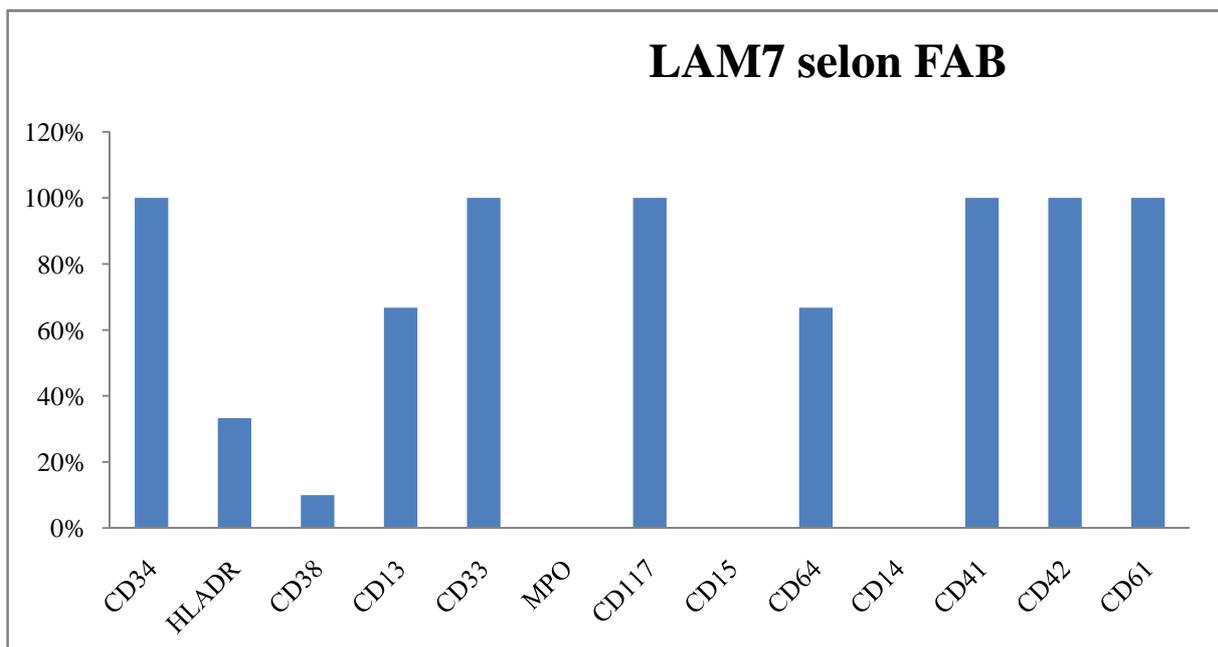


Figure 84: Fréquence d'expression des antigènes leucocytaires dans les LAM7

3.7. Etude de la concordance entre la classification cytologique FAB et immunologique des LAM selon EGIL

Pour les études de concordance entre la classification FAB et immunophénotypiques des sous types de LAM, nous avons analysé 145 cas de LAM (dont 24 enfants soit 16,5 % et 121 adultes soit 83%), chez qui la réactivité de certains anticorps monoclonaux à été testé sur les cellules blastiques.

Tableau 78: Tableau croisé entre la classification cytomorphologique du FAB et immunophénotypique des LAM

LAM : 145	Immunophénotypage		Khi-2	P	% Concordance
<b>Cytologie - FAB</b>	concordant	non concordant	765	<b>0,000</b>	<b>91 %</b> <i>Kappa = 0,69</i>
concordant	126	7			
non concordant	12	0			

Un pourcentage de concordance a été calculé avec la mesure de la valeur du coefficient Kappa de Cohen (K) qui a démontré **un accord fort** (voir tableau 78) entre l'étude cytomorphologique du FAB et immunophénotypique des LAM.

## Etude de la concordance entre le typage FAB et immunologiques des leucémies aigues

*Le % de concordance est de 91 % pour un  $K = 0,69$ .*

Cet accord est statistiquement significatif entre les deux types de classification :  
 $p = 0,000$  ( $\text{Chi}^2 = 765$ ).

### 3.8. Taux de concordance entre l'immunophénotypage selon EGIL et la classification cytologique FAB des sous types de LAM

**Tableau 79:** Taux de concordance entre l'immunophénotypage et la classification cytologique FAB des sous types de LAM

LAM1	Immunophénotypage		% Concordance
Cytologie-FAB	concordant	non concordant	<b>79 %</b>
concordant	15	2	
non concordant	4	0	

LAM2	Immunophénotypage		% Concordance
Cytologie-FAB	concordant	non concordant	<b>86 %</b>
concordant	32	4	
non concordant	5	0	

LAM3	Immunophénotypage		% Concordance
Cytologie - FAB	concordant	non concordant	<b>97%</b>
concordant	31	1	
non concordant	1	0	

LAM4	Immunophénotypage		% Concordance
Cytologie - FAB	concordant	non concordant	<b>93%</b>
concordant	28	0	
non concordant	2	0	

LAM5	Immunophénotypage		% Concordance
Cytologie - FAB	Concordant	Non concordant	<b>100%</b>
concordant	20	0	
Non concordant	0	0	

**Tableau 80:** Comparaison des résultats de la classification des sous type de LAM : FAB versus immunophénotypage

		<b>LAM / Immunophénotypage</b>							
		M1	M2	M3	M4	M5	M0	M7	LAPDC
<b>LAM</b> <b>Cytologie</b> <b>FAB</b>	LAMDC	1	3	1	0	0	3	3	1
	LAM1	15	2	0	0	0	0	0	0
	LAM2	2	32	0	2	0	0	0	0
	LAM3	1	0	31	0	0	0	0	0
	LAM4	0	0	0	28	0	0	0	0
	LAM5	0	0	0	0	20	0	0	0
	<b>Total : 145</b>	<b>19</b>	<b>37</b>	<b>32</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	3	3	1
	<b>% Concordance</b>	<b>79 %</b>	<b>86%</b>	<b>97 %</b>	<b>93 %</b>	<b>100 %</b>			

**3.9. Confrontation entre le typage cytologique FAB et immunophénotypique dans le diagnostic des LAB versus LAL et LAM**

Sur la seule classification cytomorphologique du FAB, nous avons retrouvé 84 patients atteints de LAL dont 44 enfants soit 52,4 % et 40 adultes soit 47,6 %. Et 150 cas de LAM dont 26 enfants soit 17.3 % et 124 adultes soit 82.6 % ;(voir tableau 81).

L'étude immunophénotypique nous a permis de redresser le diagnostic ; Sept (07 cas) de LAB ont été retrouvés dont 03 cas chez l'enfant et 04 cas chez l'adulte.

**Tableau 81:** Tableaux croisés : cytologie FAB versus immunophénotypage pour le typage des LAB

<b>Cytologie-FAB</b>	<b>Immunophénotypage</b>		<b>% Concordance</b>
	Concordant	non Concordant	
LAL : 84 cas	Concordant	non Concordant	<b>97,6%</b>
Concordant	LAL : 82	LAB : 2	
Non concordant	2	0	
LAM : 150 cas	Concordant	Non concordant	<b>96.6 %</b>
Concordant	LAM : 145	LAB : 5	
Non concordant	5	0	

On constate un redressement de 5,8 % LAL vs LAB et LAM vs LAB.

# **Partie 3**

# **Discussion**

Notre étude a recensé 234 cas de LA nouvellement diagnostiqués au CHU de Tizi-Ouzou sur 5ans. Sur l'ensemble des LA recensées 145/234 cas (62 %) sont de lignée myéloïde et 82/234 cas (35 %) sont de lignée lymphoïde. Cependant, 7/234 cas (3%) sont de phénotype mixte.

### - **Données cliniques et cytologiques de l'adulte**

Chez les patients adultes de plus de 18 ans, les LAM représentent 74 % (121/164 cas) des LA. Ces proportions concordent à celles décrites dans la littérature où les LAM représentent 75 à 80 % des LA chez l'adulte [153, 143]. L'âge moyen des patients atteints de LAM dans notre étude est de 47,5 ans. Cependant, la plupart des autres études épidémiologiques observent une médiane d'âge des LAM plus élevée, établie autour de 65 ans [143]. Aux Etats-Unis, la médiane d'âge est de 67 ans [153]. L'équipe de X. Troussard sur l'incidence des hémopathies malignes en Basse – Normandie France rapporte un âge moyen des LAM de 63 ans [137].

Plus de la moitié des patients adultes LAM ont un âge > 45ans. Parmi le groupe de LAM recensées, on retrouve une légère prédominance féminine (rapport H/F = 0,89).

Selon la classification FAB, nous avons colligé 39/164 cas de LAL chez les adultes (24 %) avec un âge moyen de 39 ans et une tranche d'âge majoritaire de [19- 45 ans], 28 patients (72 %) ont moins de 45 ans ;le sex ratio H/F = 1,78 une prédominance masculine est constatée.

Cette prédominance masculine ainsi que la tranche d'âge dans le groupe des LAL adultes est comparable à l'étude de X.Troussard en France [137].

Sur le plan clinique, un syndrome tumoral est décrit dans 33 % des cas au diagnostic. Ceci est révélé fréquemment par des adénopathies superficielles. Il a été démontré que ces manifestations sont plus communes dans les LAL que les LAM [154].

Comme indiqué classiquement dans la littérature, nous avons retrouvé chez nos patients adultes atteints d'une LAM au moins une anomalie de l'hémogramme, une thrombopénie a été observée dans 94,17 % des cas, une anémie dans 98,33 %, une hyperleucocytose dans 69,98 % des cas, une leucopénie dans 16,66 % et une pancytopenie dans 77,5 % [155, 156].

## Discussion

---

La répartition des cas de LAM de l'adulte selon la classification FAB est comparable aux données publiées. Dans notre étude, les M2 et M4 représentent la majorité avec des taux respectifs de 26% et de 22 %, suivies des M3 (17,4 %) et M5 (15%).

Les différentes séries publiées rapportent une proportion de M2 variant de 10 à 40 % des LAM [157,158]. Les précédentes publications mentionnent une plus faible proportion de M5 que celle observée dans notre série. La leucémie aiguë promyélocytaire ou M3 est présente dans 11,6 % des cas de LAM diagnostiqués au CHU de Tizi Ouzou, ce qui est 2 fois plus élevée avec ce qui a été rapporté dans la littérature [133,159]. La LAM7 est très rare, elle représente environ 2 % des LAM [157]. Nous avons recensé un cas de M7, le diagnostic a été posé à l'immunophénotypage par CMF.

Cependant, l'immunophénotypage a permis de sous typer 9 % des cas de LAM qui n'ont pas été classés à la seule étude cytomorphologique de FAB, ceci nous a permis le diagnostic d'un cas de LAM7 et de 2 cas de LAM sans maturation ou LAM0 et un cas de LpDC, des entités qui restent rares.

Sur les 39 cas de LAL colligés chez l'adulte la fréquence des sous types FAB est la suivante : 15 cas de LAL1 soit 38,46 % , 21 cas de LAL2 soit 53,84 % et 3 cas LAL3 soit 8 %. Plus de la moitié des cas sont des LAL type 2.

Dans une étude antérieure à Alger [135], il a été retrouvé sur 43 patients adultes LAL, 30 cas de LAL2 (70%) , 7 cas de LAL1 (16%) et 6 cas de LAL3 (14%).

### - Données cliniques et cytologiques de l'enfant

Dans notre étude, chez l'enfant, les LAL étaient plus fréquentes (61,4 %) suivies par les LAM (34 %) et LA Biphénotypiques (4,3 %). L'incidence des LAL chez l'enfant est nettement élevée par rapport aux LAM ( $p=0,001$ ). Dans les LAL le phénotype B représentait 77 % des LAL. Nos résultats confirment ceux d'autres auteurs qui ont montré que la LAL représente près de 80% de la leucémie chez les enfants de moins de 15 ans [160].

L'âge médian de la survenue de la leucémie aiguë chez l'enfant était de 5,4 ans avec une différence nettement significative entre les patients atteints de LAM et ceux atteints de LAL (11 ans versus 5 ans) ;  $p<0,05$ . Ceci peut être expliqué par la prédominance de LAL chez les enfants contrairement à la LAM [161].

## Discussion

---

Dans la distribution des LA de l'enfant on retrouve un pic maximum à la tranche d'âge de [2-6]ans 43 %, ce qui correspond aux données publiées dans la littérature [24,31].

Nous avons recensé 21 enfants de sexe masculin et 22 de sexe féminin, soit respectivement 48,8% et 51,2%. Le sex-ratio M/F = 0,95 ce qui n'est pas en accord avec des études nationales qui évoquent la plus grande vulnérabilité des garçons par rapport aux filles, avec un sex-ratio de 2 [31,135].

Les LA de l'enfant s'associent toujours à des degrés variables à des signes de prolifération et d'insuffisance médullaire. Les enfants atteints de LA présentent les symptômes suivants: fatigue, fièvre persistante, infections, ecchymoses, douleurs osseuses, arthralgies ou adénopathies [162,163]. Dans notre série, la présentation clinique était identique pour les cas de LAM et LAL, cependant le tableau clinique de patients atteints de LAM été plus grave.

Les anomalies de l'hémogramme étaient principalement représentées par la thrombopénie (LAL : 77 % vs LAM : 88%), l'anémie (LAL : 88% vs LAM : 100 %) et l'hyperleucocytose >30 Giga/L (LAL : 42 % vs LAM : 59 %). La moyenne des GB a été nettement élevée dans les LAL-T versus LAL-B (p=0,021).

Ces résultats sont similaires à ceux de la littérature [6,164]. Nous avons noté des cas de leucémies avec leucopénie chez 14% des patients atteints de LAL et 29 % des cas de LAM. Contrairement à une hyperleucocytose, une leucopénie est moins habituelle dans les LA surtout lymphoblastiques.

Nos données montrent aussi qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative du taux de blastes sanguin et médullaire dans les différents types de leucémies aiguës ; p>0.05.

En tenant compte de l'étude cytomorphologique des LAL, nous avons retrouvé 19/43 cas de LAL1 soit 44,2 % suivis par les LAL2 22/43 cas soit 51 % et les LAL3 2/43 cas soit 4,65 %. Parmi ces trois types cytologiques la rareté des LAL3 a aussi été décrite (4,6 %) [24] (6,5%) [165].

La répartition des cas de LAM selon la classification FAB retrouve une prédominance des LAM promyélocyaires ou LAM3 : 11/24 cas (45,8 %).

Trois cas de LAM étaient difficiles à classer par les critères FAB seul, ils étaient classés en LAL. L'étude immunophénotypique a permis de redresser leur diagnostic : 02 cas de LA mégacaryoblastique LAM7, 01 cas de LAM sans maturation LAM0.

### - Les LA biphénotypiques

Les LAB dites de phénotype mixte sont rares, elles représentent 2 à 5 % des LA [166,167]. Notre étude a recensé 4/164 cas des LA de l'adulte soit 2,44%, sont à coexpression myéloïde et lymphoïde B, 3/70 LA de l'enfant soit 4,28 %, sont à coexpression myéloïde et lymphoïde B ou T.

Au total 7/234 cas soit 3 % de LAB colligés durant notre période d'étude et dont le diagnostic a été confirmé par CMF ; des résultats comparables aux données de la littérature néanmoins les données épidémiologiques concernant les leucémies biphénotypiques restent actuellement rares. Dans une étude rétrospective réalisée chez 693 patients leucémiques adultes et enfants recrutés entre janvier 1990 et août 1997, les LAB ont été diagnostiquées chez 25 cas (3,6%) [168]. Une fréquence plus élevée est parfois observée dans certaines séries de la littérature [169], une variabilité liée à une utilisation plus ou moins fréquente de la CMF dans le diagnostic d'une LA. Aussi, un taux 2 fois plus élevé par rapport à notre étude 6% vs 3 % a été rapporté dans la littérature [132].

### - Analyse du profil immunophénotypique des LAM

L'étude immunophénotypique permet la mise en évidence de divers antigènes de différenciation membranaire et intracytoplasmique confirmant l'appartenance à une lignée. Le nombre total de patients testé positif à un marqueur varie avec chaque marqueur testé à cause parfois du nombre insuffisant de cellules et l'addition séquentielle d'un marqueur durant cette période. Dans les LAM de l'adulte, une grande hétérogénéité de l'expression des marqueurs de surface a été observée, le pourcentage de patients positifs pour un antigène varie de 0% pour le CD235 ou la Glycophorine A à 98 % pour le CD33.

Le présent travail, montre que l'analyse des antigènes de différenciation, à savoir CD13, CD33, CD117, CD64, CD15, sur les cellules blastiques des LAM a permis de stratifier les LAM avec une reproductibilité élevée, dans les sous-types immunologiques, chacun lié à des stades spécifiques de différenciation myéloïdes. Chez l'adulte, l'expression

## Discussion

---

des marqueurs myéloïdes est représentée ainsi : CD33 (98%), MPOcyt (95%) et le CD13 (87%), suivi par le CD117 (74,4%), CD64 (68,6%), et le CD15 (34%).

Chez l'enfant, nous avons retrouvé les taux suivants : CD33 (95,8 %), MPOcyt (87,5%), CD64 (83%), CD13 (75%), CD117 (70,8 %), et le CD15 (21%).

Le marqueur le plus exprimé sur les cellules blastiques est le CD33 sa fréquence reste élevée par rapport aux autres séries de la littérature, le taux varie de 60% [172], 73% [171] 89 % [135], 91% [170] et 90% [133]. Le CD13 est aussi largement exprimé 80%. Le taux d'expression du CD13 varie selon les différentes études de 58% [171], 75 % [172], 80% [133,63] à 90% [170].

Le CD15, qui a été signalé comme un antigène de différenciation tardive [173] est fortement exprimé dans les populations de LAM monoblastiques en association avec le CD36.

Le CD117 est le marqueur le plus spécifique pour le diagnostic des LAM, vu que ce dernier n'a jamais été retrouvé dans les LAL. La combinaison CD13/CD33/CD117 et la MPOcyt nous a permis de classer 100 % des leucémies aigues en LAM, un résultat identique a été décrit [139].

Les marqueurs non restreints à une lignée : HLA-DR, et CD34 sont présents respectivement dans 78 % et 48 % des LA de l'adulte et 50% HLA-DR positif, 58 % de CD34 positifs dans les LA de l'enfant.

Le panel choisis pour cette classification sont suffisants car tous les cas de LA exprimaient au moins l'un d'entre eux. L'expression des antigènes pan-myéloïdes CD13, CD33 et CD117 avait une large distribution dans la population des LAM étudiée. La combinaison de ces trois marqueurs sont très sensibles pour le diagnostic de la LAM, plus de 95% des cas sont positifs pour au moins l'un d'entre eux, et semble légèrement supérieur à la détection unique de la myéloperoxydase comme antigène cytoplasmique [174].

De plus, la recherche de positivité de l'antigène MPO cytoplasmique comme marqueur d'attribution de lignée, à montré que plus de 98% des cas rapportés pourraient être identifiés comme LAM. Inversement, la négativité de CD13, CD33 et le CD117 définit un petit groupe de leucémie aiguë qui reste d'origine myéloïde avec expression de la MPO.

### - Analyse du profil immunophénotypique des LAL

#### LAL B

L'expression intracytoplasmique de CD79a ou de la chaîne epsilon de CD3 signe son engagement à la lignée lymphoïde respectivement B et T, elle est associée à l'expression membranaire de la molécule CD19 pour la lignée B. Concernant la lignée T, elles expriment en premier lieu la molécule d'adhésion CD7 dans une phase précoce pouvant conduire à un retour vers la lignée myéloïde. Les antigènes CD2 et CD5 apparaissent par la suite [175].

Les 43 cas des LAL de l'enfant ont été réparties en 33 cas de LALB (76,7 %) et 10 cas de LALT (23,2 %), les LALT ne sont pas aussi fréquentes que les LALB ( $p < 0.001$ ). Ces taux sont semblables aux données nationales [176] (LALB : 75 %, LALT : 25 %) et internationales tel que les données du registre national Français des hémopathies de l'enfant [33], qui montrent que chez les enfants de moins de 15 ans, les LAL représentent environ 80 % des cas de leucémies aiguës, et plus de 80 % d'entre elles sont des LAL B et 20 % des LALT.

Chez l'adulte, nous avons retrouvé 26/39 cas de LAL B (66,66 %) et 13/39 cas de LALT (33,33 %) ( $p = 0.003$ ). Ces résultats sont comparables à ce qui a été publié dans la littérature internationale LALB (65%), LALT (33%) [177,178] et nationale, les LALT adulte représentent un peu moins que le tiers des LALB avec des taux respectifs de 23% et 77% [176].

Cependant, contrairement à ce qui a été rapporté dans une étude nationale antérieure les LALT ont une fréquence élevée que ce soit chez les enfants ou les adultes (enfants : LALT 42% , LALB 55% et chez l'adulte : LALT 44% , LALB 56%) [135].

L'antigène CD19 est exprimé dans 91 % à 100% des cas (enfants-adultes) ; il est spécifique de la lignée B ; sa positivité varie selon les séries de 96% à 100 % [179], [180], [181], [182], [136]. Il n'est jamais trouvé dans les LAL de type T.

Le CD10 (anciennement CALLA : lymphoblastique aigu commun antigène leucémique) à été exprimé dans 97 % à 100% des cas (enfants-adultes) et son taux a varié selon les sous types de LAL B de 0% à 100 %. Selon les séries d'études nationales et internationales le taux de l'antigène Calla varie de 75% [136], 78 % [135], 90% [181] à 94% [180]. Le CD10, a été l'un des premiers marqueurs disponibles pour identifier les

## Discussion

---

cellules leucémiques chez les enfants atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës [183]. Un antigène doué d'une activité enzymatique type Aminopéptidase [184]. Dans les LAL B, l'expression du CD10 est impliqué dans la définition des sous types EGIL B-I versus B-II, il doit être absent du sous groupe B-I et présent sur le sous groupe B-II [17]. Le taux du CD10 diminue dans les formes matures de LAL B [185].

L'incidence des cas de LAL B-I chez l'enfant varie de 5 à 55% selon des séries d'études [186,185]. Les résultats d'une large série pédiatrique [186] soulignent une incidence plus élevée chez les nourrissons, bien qu'un taux plus faible a été observé dans une autre série d'étude [185]. Les LAL B-I surviennent également chez les adultes, avec une incidence à environ 15% [187].

Dans notre série, aucun cas de sous type LAL B-I n'a été recensé que ce soit dans la série pédiatrique ou adulte.

L'antigène HLA-DR est exprimé dans 85% à 96% des cas, sa fréquence d'expression dans les études nationales et internationales varie de 94% [135], 97 % [136], à 100% [180]. C'est un des marqueurs les plus sensibles de la lignée B mais non spécifique, bien qu'il soit moins fréquent au niveau des LAL T, il est présent dans les cellules blastiques des LAM.

L'antigène CD34, marqueur d'immatunité spécifique de la cellule souche hématopoïétique est exprimé dans 48,5 % des LAL B de l'enfant et 77 % des LAL B de l'adulte, ces taux sont inversés par rapport à ceux retrouvés dans une série nationale 71 % et 38 % (enfants-adultes) [135] et restent élevés dans les études internationales 82% [180], 60 % à 70 % [188]. Ceci peut être expliqué par le stade de maturation le plus fréquent dans chaque étude, sachant qu'à chacun des quatre stades de maturation des cellules de la lignée lymphoïde B un phénotype bien précis. Les deux premiers stades (Pro-B et Pré-Pré-B) regroupent des cellules caractérisées par l'expression de la TdT, du CD34 et du CD10.

Au stade Pro-B, le CD34 est exprimé plus fortement que le CD10, le CD22 est exprimé principalement dans le cytoplasme et très faiblement en surface. Le passage au stade Pré-Pré-B (LAL BII) est caractérisé par une diminution de la densité d'expression du CD34 s'accompagnant d'une augmentation de la densité d'expression du CD10 et du CD22 de surface. Au stade Pré-B (LAL BIII), les cellules perdent l'expression du CD34, de la TdT et montrent une expression maximale du CD10. L'expression du CD22 continue d'augmenter en

## Discussion

---

surface alors que des chaînes u apparaissent dans le cytoplasme de ces cellules. Le passage au stade B mature va être caractérisé par la disparition progressive du CD10, l'augmentation de l'expression du CD22 de surface, l'apparition du CD20 et de chaînes Ig D et Ig M en surface [189].

Dans notre série le phénotype LAL B-II est le plus fréquent que ce soit chez l'enfant (57,6%) ou chez l'adulte (46%), et nous rapportant un synchronisme d'expression entre le CD34 et le CD22cytoplasmique. Cependant, nous avons 1/5 cas de LAL B- IV ou LAL3 selon FAB avec expression de CD34, alors que les LAL3 composées de cellules matures de la différenciation B n'expriment pas cet antigène il s'agit d'un asynchronisme d'expression retrouvée dans différentes études [181].

### LAL T

Dans les LAL T, les antigènes CD3cyt, CD7, CD5, CD2 sont les plus exprimés au diagnostic. Dans notre série, le CD7 et CD3cyt sont exprimés dans 100% des cas de l'enfant. 92 % et 100 % dans les LALT de l'adulte. Dans la littérature l'expression du CD7 varie de 92 % à 100% des cas [179,189].

Le CD7 est une glycoprotéine appartenant à la super-famille d'immunoglobulines [190], il est exprimé sur les cellules T et Natural Killer (NK) impliquée dans l'activation, prolifération et production de cytokines permettant des propriétés adhésives aux cellules matures [191,192]. De plus, le CD7 est l'antigène de surface le plus précoce des lymphocytes T normaux et des lymphocytes T à précurseurs malins [190, 192].

Devant une MPO négative, les CD3cyt et CD5 sont les meilleurs marqueurs permettant de distinguer la LAM0 des LAL à précurseur T.[9]

L'expression de CD10 dans les LALT est décrite dans plusieurs séries de la littérature [186, 193,194]. Dans notre étude l'expression du CD10 était de 40 % chez l'enfant et 54 % dans la série adulte. Il semble être une caractéristique rare des LAL T, des incidences similaires d'environ 30% ont été rapportées dans la littérature. Cela pourrait être lié au possible rôles physiologiques du CD10 dans la maturation thymique normale sur les cellules T activées.

Les antigènes CD34 et HLA-DR sont fréquemment exprimés surtout dans les formes les plus immatures de LAL-T, décrites comme associées à un mauvais pronostic, de même que les cas négatifs pour le CD10 [195, 196].

Chez l'adulte, les LAL-T représentent environ 25% de l'ensemble des LAL et les LAL-B 75%, dont 25% de LAL B avec t (9;22). Chez l'enfant, les LAL-T sont moins fréquentes et représentent environ 11% de l'ensemble des LAL [186].

Les LAL B à t (9;22) (q34;q11) avec réarrangements BCR/ABL sont plus fréquentes chez l'adulte que chez l'enfant et elles sont souvent associées à l'expression de CD19, CD34 et CD10. Leur mauvais pronostic justifie un traitement par des inhibiteurs de la tyrosine kinase qui améliore la réponse au traitement [36].

### - Expression d'antigènes aberrants

L'expression d'antigènes aberrants est souvent considérée comme une infidélité de lignée, dans notre série elle était plus fréquente dans les LA de l'adulte que celles de l'enfant.

### Expression d'antigènes myéloïdes dans les LAL B et T

Dans la littérature, des LAL positives à l'antigène myéloïde ont été rapportées dans les groupes pédiatriques et adultes avec des fréquences plus ou moins égales, allant de 11% à 35% sur l'ensemble des LA [197].

Dans notre série adulte, les LAL qui expriment un ou plusieurs antigènes myéloïdes (LAL My+) représentent 30,76% versus 69,23 % de LAL n'exprimant pas d'antigènes myéloïdes (LAL My-).

Dans les LALB, 9/33 patients (27,27 %) ont exprimé des Ag myéloïdes : CD13 (6,69%), CD11c (9,09%), CD33 (19,23%), CD36 (28,57%), Le CD33 est l'Ag myéloïde le plus exprimé vu qu'il a été testé chez la totalité des patients.

Selon les données de la littérature, l'incidence des marqueurs myéloïdes dans les LAL de l'adulte varie de 26% [135], 31% [198], 40% [200] à 54% [199]. Cette variabilité peut être liée au nombre total de patients LAL. Parmi les 13 cas de LAL T, 04 patients ont exprimé des Ag myéloïdes (30,76%). Le CD13 et CD33 étaient exprimés seul chez deux patients avec un taux de 15,38 % pour chaque marqueur.

## Discussion

---

En revanche, parmi les 43 patients enfants atteints de LAL dans notre étude, seulement 8/43 cas ont exprimé des marqueurs myéloïdes (CD 13, CD33). Dans une méta étude [197] portant sur plus de 500 cas enfants avec leucémie aigue, uniquement 11 cas (2%) de LAL avec expression de marqueurs myéloïde positifs ont été retrouvés.

Certains phénotypes sont corrélés à des anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires récurrentes ayant une incidence pronostique péjorative. L'expression d'antigènes myéloïdes (CD13 et CD33) dans les LAL B peut être associée à un réarrangement BCR-ABL particulièrement fréquent chez l'adulte [201]. Dans le groupe des LAL pro-B, certaines LAL CD10 négative expriment de façon anormale le CD15 et le CD65 (antigènes myéloïdes) et sont associées à des translocations impliquant la région 11 q23 et le gène MLL comme la translocation t (4;11) ayant un mauvais pronostic [202, 203]. Parmi les LAL pré-B, certaines n'expriment pas le CD34, comportent la translocation t (1 ; 19) et sont de pronostic défavorable [204]. Les protocoles thérapeutiques récents tenant compte de ces remaniements génomiques proposent dans ces cas une intensification thérapeutique qui pourrait améliorer la survie des patients.

### **Expression d'antigènes lymphoïdes dans les sous types de LAM**

Dans les LAM de l'adulte, l'expression d'antigènes lymphoïde de lignée B et T a été retrouvée dans 38/121 cas de LAM (31,40 %), l'antigène de la lignée T le plus exprimé est le CD7 14% des cas avec une forte intensité d'expression. Pour les antigènes de la lignée B on a retrouvé l'antigène CD19 dans 4,23% des cas.

Nous avons constaté dans notre étude, que se sont les cellules blastiques des LAM avec maturation (LAM2 selon FAB) qui ont exprimé le plus de marqueurs aberrants 15/54 cas de LAM (27,7%). Le CD56 antigène marqueur des lymphocytes T NK (Naturel Killer) a été assez exprimés dans les LAM : 12 % pour 75 cas testés.

L'association d'expression de l'antigène CD19 a été observée dans 2 des 29 cas de LAM2 et 03 des 20 cas de LAM3. Aucune des cas de leucémies aigues myéloïdes testées n'été positif pour le CD20.

Parmi les antigènes T associées, le CD2, CD4, CD5, et le CD7 ont été trouvés. Le CD7 a été observée dans 1 des 2 cas de LAM0 (44%), 5 sur 16 cas des LAM1 (31,3%), 6 sur 29 cas des LAM2 (20,7%), 3 sur 29 cas des LAM 4 (10,3%), et 2 des 18 cas LAM 5

## Discussion

---

(11,1%), suivi par le CD2, qui a été observée dans 6 des 120 LAM testées pour cet antigène (5 %), enfin le CD4 observé chez 5 des 118 cas de LAM (4,23%) [9].

Dans les LAM de l'enfant, l'expression d'antigènes lymphoïde de lignée B et T a été retrouvée dans 12/24 cas de LAM (37,2 %), l'antigène de la lignée T le plus exprimé est le CD7 (20,8 %) des cas, suivi par l'Ag CD2 à 12,5 % avec une surexpression pour les deux Ag. Pour la lignée B l'antigène CD19 a été exprimé à 4,16 %.

Dans la littérature, l'incidence rapportée de la LAM à CD2 + varie entre 11% et 25% [197].

Pour le CD7, bien qu'il soit un marqueur associé à pan-T et NK, il est exprimé de manière aberrante sur les cellules blastiques de LAM [205, 206, 207] avec une fréquence d'expression rapportée qui varie de 12% à 32% selon de nombreuses études internationales [208, 209, 210, 123, 205, 211, 212, 213, 214].

Les corrélations décrites entre données immunologiques et cytogénétiques et/ou moléculaires, associées à certains groupes morphologiques sont ainsi mieux détectées. Par exemple, l'expression des marqueurs CD34, CD19 et CD56 dans une LAM2 ou M1 est associée à une translocation t (8;21) avec réarrangement des gènes AML1/ETO [215, 216, 217]. L'expression du CD2 associée à celle des antigènes CD33, CD13 dans les LAM4 avec maturation éosinophile correspond à une inversion pericentrique du chromosome 16 et surtout un réarrangement du CBF/MYH11 [218]. Le phénotype typique d'une LAM3 est la forte expression des CD33 et CD13 avec une homogénéité d'expression du CD33 et l'hétérogénéité d'expression du CD13. Le HLA-DR, CD34 sont négatifs [1, 204].

### **L'expression d'antigènes associés aux mégacaryocytes**

Les antigènes CD41, CD42 et CD61, bien que positifs dans tous nos cas de LAM 7 testés (CD41 4/4, CD42 4/4; CD61 4/4), ont également été observés dans les cas de LAM3 et LAM5, l'importance d'une telle expression n'est pas claire, mais une liaison non spécifique des plaquettes via les récepteurs Fc semble être l'explication probable. Cependant, l'expression aberrante de ces antigènes associés aux plaquettes peut être une alternative explication, puisque dans certaines études l'expression de seulement un de ces antigènes et non les deux ou les trois a été observée [9].

### - Impact des facteurs pronostiques sur la survie globale

Plusieurs facteurs influencent le pronostic des leucémies aiguës. Les données de survie sont totalement différentes entre les LA lymphoïdes et myéloïdes, avec un pronostic plus sombre pour les LAM.

Dans notre étude, les deux facteurs associés de façon indépendante à un sous type de leucémie aigue chez l'adulte sont l'âge > 60 ans plus fréquent dans les LAM ( $p=0,037$ ), le syndrome tumoral, fréquent dans les LAL ( $p=0,001$ ).

Dans les LAM de l'adulte de notre série, le taux de survie à 5 ans est de 13% chez les patients de moins de 60ans avec un délai moyen de survie de 40,68 mois versus 20% de survie globale à 3 ans. 0% de survie à 5 ans chez les patients de plus de 60 ans pour un délai moyen de survie de 15,87 mois. La différence de survie des patients LAM selon l'âge est nettement significative ( $p=0.01$ ). Ces taux de survie sont moins importants que ceux rapportés par certaines études internationales. Un taux de survie globale à 1 an de 28 % chez des patients de plus de 60 ans atteints de LAM a été observé [219]. Aussi il a été rapporté un taux de survie globale à 5 ans de 23 % chez les moins de 55 ans contre 11 % pour les patients âgés de plus de 55 ans [143].

Le pronostic selon le sexe apparaît différent. Les hommes ont une survie moyenne globale plus longue que les femmes. Le délai moyen de survie est de 35,60 mois pour les patients de sexe masculin versus 33,96 mois pour les patients de sexe féminin. Cependant, cette différence n'est pas significative ( $p=0,96$ ).

L'hyperleucocytose constitue un facteur pronostique majeur dans les LAM de l'adulte, le pronostic est plus favorable quand la leucocytose est inférieure à 50 G/L. Le délai moyen de survie est de 24,11 mois pour les patients dont le taux de GB < 50G/L versus 11,07 mois pour les patients avec un taux de GB  $\geq 50$  G/L ;  $p=0,008$ . Le compte de leucocytes au diagnostic de LAM apparaît comme un facteur pronostique indépendant. L'hyperleucocytose initiale représente un facteur de mauvais pronostic et s'associe à un taux de mortalité plus élevé [49].

Dans la littérature, il est rapporté que dans les LAL de l'adulte, l'âge (> 60 ans) est un facteur péjoratif. La survie maximale n'excède pas 2ans et demi, le taux de survie globale est de 33% versus 10-20 % de survie globale à trois ans [132]. Les patients les

## Discussion

---

plus âgés (> 60 ans) bénéficient de protocoles adaptés mais le taux de rémission est moins élevé et la médiane de survie observée est souvent inférieure à 1 an [220].

Selon nos résultats nous avons conclu que ni la présence du syndrome tumoral ni l'hyperleucocytose supérieure à 50 G/L n'ont en revanche d'impact pronostique dans la population de LAL adultes, la survie globale moyenne est de 28 mois pour les LAL avec syndrome tumoral comme pour les LAL sans syndrome tumoral ( $p=0,6$ ), elle est également de 32,5 mois pour les formes non hyperleucocytaires, versus 24 mois pour les LAL hyperleucocytaires, ce qui n'est pas statistiquement différent ( $p = 0,3$ ).

Contrairement aux LAM, le sexe semble être un facteur de pronostic dans les LAL de l'adulte, le taux de survie globale à 5 ans chez les hommes est de 47,4% versus 15,4 % chez les femmes bien que la différence n'est pas tout à fait significative ( $p= 0,06$ ).

Concernant la valeur pronostique du phénotype immunologique LALB/LALT, les LAL de la lignée T, sont considérées comme de bon pronostic chez l'adulte, néanmoins, elles ont un pronostic globalement superposable à celles de la lignée B [221, 222].

Dans notre série, la survie moyenne globale est faible 26 % dans les LALB versus 42 % dans les LALT.

Dans la population enfant de notre étude, l'âge  $\geq 10$  ans est un facteur associé au sous type de la leucémie aigue. La survenue des LAM est nettement plus élevée chez les enfants dont l'âge  $\geq 10$ ans ( $p=0,04$ ).

Le pronostic des LAL est bien meilleur chez les enfants versus LAM avec des taux de survie globale à 5ans de 20% et 49 % pour les LAM et LAL respectivement ( $p=0.04$ ).

Malgré le faible taux de survie, nos résultats rejoignent les données de certains auteurs sur l'impact positif des LAL de l'enfant sur la survie globale.[223, 224].

En outre, l'étude de l'impact pronostic de l'âge, du sexe et de l'hyperleucocytose, des LAL de l'enfant de notre série a montré que l'âge  $\geq 10$ ans, le sexe masculin et l'hyperleucocytose  $>50$ G/L sont des facteurs intimement liés au mauvais pronostic. Ainsi, les enfants atteints de LAL dont l'âge est  $\geq 10$  ans ont un délai moyen de survie de 11,7 mois versus 54 mois pour les patients dont l'âge est  $< 10$  ans ( $p=0.007$ ).

Le délai moyen de survie est de 24 mois pour les patients de sexe masculin versus 61 mois pour les patients de sexe féminin ( $p=0.003$ ).Concernant le délai moyen

## Discussion

---

de survie des enfants atteints de LAL en fonction du taux de GB, il est nettement meilleur chez les patients avec un taux de GB < 50G/L estimé à 55 mois, versus 11 mois pour ceux avec un taux de GB  $\geq$ 50 G/L ( $p=0.005$ ). Ces résultats sont corrélés aux données de la littérature, qui montrent que chez l'enfant et l'adolescent, la tranche d'âge associée à un pronostic favorable va de 1 à 10ans. Les LAL de l'adolescent de plus de 15 ans sont souvent considérées comme à haut risque, du fait des caractéristiques qui se rapprochent de celles des adultes. Le sexe masculin a longtemps été considéré comme un facteur de mauvais pronostic.

Les raisons de cette différence ne sont que partiellement expliquées dans la littérature par la fréquence plus élevée de LAL T dans cette population et par les rechutes testiculaires. Il semble également que le taux de rechute médullaire soit supérieur chez les garçons. L'introduction de l'intensification des thérapeutiques dans les protocoles de chimiothérapies a nettement réduit l'impact de ce facteur pronostique [49].

La valeur pronostique du phénotype immunologique LALB/LALT de l'enfant a été observée. Les enfants à LAL B ont une meilleure survie que ceux présentant une LAL T malgré la non significativité statistique ( $p=0.4$ ). Le délai moyen de survie est de 48 mois pour les LAL B versus 34 mois pour les LAL T.

Nombreuses études ont démontré la relation entre le pronostic et l'expression de certains marqueurs antigéniques tel que le CD34,CD14,CD117 et le CD7 dans les LAM.

Une étude française [225] qui a porté sur la classification immunologique de 176 LAM nouvellement diagnostiquées chez l'adulte, a montré un lien fortement significatif entre la diminution de la survie globale et la positivité du CD34 ( $p=0.0002$ ) du CD7 ( $p=0.04$ ) et le CD14 ( $p<0.008$ ). De même, une étude nationale sur l'impact pronostic du C-KIT (CD117) dans les LAM a retrouvé de point de vue évolutif que l'expression du CD117 est associée à un avantage significatif de survie globale ( $p=0.002$ ) avec une survie médiane de 16 mois dans le groupe de patients CD117(+) versus 9 mois dans le groupe de patients CD117(-) [226]. Contrairement aux résultats de notre série de LAM chez l'adulte avec inclusion des leucémies aiguës promyélocyaires (connus pour leur pronostic favorable), seul l'expression cytométrique de l'antigène de maturation granulocytaire CD15 a montré un impact significatif après analyse uni variée de la survie globale ( $p=0.002$ ). Le délai moyen de survie est de 45 mois pour le groupe CD15+ versus 16 mois pour le groupe CD15(-), avec des taux de survie globale à 5 ans de 47% et 14% respectivement.

## Discussion

---

Contrairement à la série enfants LAM, une légère différence en terme de survie a été constatée chez le groupe d'enfants CD15(-) et CD15(+) avec une moyenne de survie de 18 mois et 6 mois respectivement ( $p=0.04$ ).

Les groupes de patients adultes LAMCD34- versus CD34+ ont une moyenne de survie légèrement meilleure (36.7 mois versus 30.4 mois), néanmoins un taux de survie globale à 5 ans médiocre (34.6 % versus 23.6%) et reste statistiquement non significatif ( $p=0.7$ ). Une divergence entre de nombreux auteurs a été retrouvée concernant la corrélation entre la rémission complète et l'expression ou non du CD34 chez les patients LAM de novo. Depuis les années 90, il a été mis en place des protocoles de chimiothérapies incorporant des agents de différenciation et cytoablatifs dès la chimiothérapie d'induction, afin d'éradiquer les cellules leucémiques CD34+, c'est le cas d'utiliser de l'aracytine à haute dose dans les protocoles de chimiothérapie pour le traitement des patients LAM.

Cependant, l'absence de différence significative en terme de survie entre les patients LAM CD34 + et LAMCD34 - peut être expliquée par le fait que les patients ne sont pas traités uniformément à l'induction, certains reçoivent de hautes doses de chimiothérapie en induction tandis que d'autres reçoivent des doses basses de chimiothérapies ou pas du tout.

Pour les patients adultes LAM HLADR+ versus HLADR-, le taux de survie globale à 5 ans est respectivement de 26 % versus 42 % avec des moyennes de survie respectives de 32 mois versus 38 mois malgré un  $p=0.46$ .

L'association d'une meilleure survie avec l'absence du HLADR sur les cellules myéloblastiques n'a pas été confirmée dans de larges séries [225, 227].

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'expression aberrante du marqueur T CD7 dans les LAM, était de pronostic défavorable [205, 212, 213] alors que d'autres études dont la notre, n'ont pas trouvé une association pronostic entre l'expression du CD7 et les sous types de LAM [208, 13, 214]. Ceci peut être dû soit aux différences de taille de cohorte soit aux méthodes d'étude de la survie globale du CD7 : analyse statistique univariée versus multivariée, soit aux types de protocoles thérapeutiques.

Dans les LAM de l'adulte, nous avons constaté une nette différence en termes de moyenne de survie globale à 5 ans entre les groupes de patients exprimant ou non le CD4. Les

## Discussion

---

délais moyens de survie sont de 56 et 17 mois pour les CD4(+) et CD4(-) respectivement ( $p=0.05$ ).

Chez les enfants LAL de notre série d'étude, l'impact pronostic des antigènes CD2 et CD8 a été observé. Les patients enfants LAL CD8(+) ont une meilleure survie que les groupes CD8(-) avec une signification statistique  $p=0,01$ . De même les patients CD2(-) ont une survie nettement meilleure que les patients CD2(+) ( $p=0,03$ ).

Enfin, la moyenne de survie globale pour les enfants LAL B avec coexpression de marqueurs myéloïdes (My+) est de 28 mois versus 58 mois pour les LALB sans expression de marqueurs myéloïdes (My-) ; une différence de survie globale est constatée dans les deux groupes malgré l'absence d'une nette signification statistique ( $p=0.05$ ). Dans la littérature la signification pronostique de l'expression associée d'antigènes myéloïdes dans les LAL de l'enfant reste controversée. Un taux de RC à 100% dans les LAL My+ et My-, probablement lié à la chimiothérapie intensive utilisée, a été décrit [228]. Bien qu'il ait été publié que les patients avec LAL My+ ont un mauvais pronostic versus LAL My- [229].

Aussi, il a été rapporté dans la littérature que 77,77% des enfants LAL My- ont atteint une RC contre 75% des enfants LAL My+, donc pas de différence constatée [135].

L'utilisation d'un large panel d'anticorps monoclonaux sur une série plus importante de patients atteints de LAL est indispensable afin de retrouver plus de co-expression d'antigènes myéloïdes pour pouvoir identifier des caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques spécifiques aux LAL My(+) versus LAL My(-).

### - **Fréquence d'expression des marqueurs de surface dans les sous types FAB de LAM et la concordance entre la classification cytologique FAB et l'immunophénotype des LA**

L'étude de l'expression des marqueurs de surface est toutefois déterminante pour le diagnostic des leucémies aiguës myéloblastiques type M0, M7, M1(CD34+, HLADR+) versus M1 Cup like et LAM3 typique et variante (CD34-,HLADR-), M5a versus M5b, ainsi que de la leucémie aiguë biphénotypique. Cependant, des associations antigéniques lient le profil immunologique et les sous types morphologiques.

### **–Marqueurs non assignés à une lignée**

Dans notre étude, le CD34 et le HLA-DR ont été exprimé sur une plus grande population de cellules myéloïdes engagées mais immatures, ce qui nous a conduits à sélectionner le CD34 et le HLA-DR comme marqueurs non associés à une lignée. La fréquence de positivité du HLA-DR et CD34 est assez similaire dans les sous types de LAM suivants LAM0, LAM1, avec une forte expression seule du HLA-DR dans les LAM5 et du CD34 dans les LAM7, cela était indiqué dans la différenciation myéloïde normale [225].

Nous avons constaté l'absence d'expression du CD34 et du HLADR dans plus de 80% des cas de LAM3, moins de 10% ont exprimé soit le HLADR soit le CD34 soit les deux marqueurs.

### **–L'antigène CD117 (c-kit)**

Dans notre série d'étude nous avons noté une corrélation significative entre la classification FAB des LAM et certains antigènes leucocytaires. Le CD117 (c-kit) a été exprimé dans 100 % des cas de M7 et M0, dans 89.5% des cas de M1, dans 97 % des cas de M2, dans 58.8 % des cas M3 et dans 90 % des cas M4. Dans le sous type M5 l'expression du CD117 est faible 20 % strictement limitée aux stades précoces avec une faible intensité d'expression.

Nos résultats rejoignent les données de la littérature [230]. Il a été retrouvé que dans 82 LAM adulte le CD117 a été exprimé dans 100% des cas de M1 et M7, dans 80% des cas de M0, dans 75% des cas de M2, dans 70% des cas de M3 et dans 82% des cas de M4. Dans le sous-type M5, 10/11 cas de M5b (91%) manquaient complètement d'expression de l'antigène CD117, alors que 100% des cas de M5a étaient positifs. Cette étude a aussi confirmé que dans les LAL, qu'il s'agisse de lignées B ou T, l'expression de surface de CD117 n'a jamais été observée. Nous concluons que l'antigène CD117 présente une spécificité élevée pour les LAM, indépendamment de la classification FAB, et représente un marqueur fiable pour caractériser le degré de différenciation des blastes myéloïdes et monocytaires.

### **–Antigènes pan myéloïdes**

L'expression du CD13 et CD33 (antigènes pan myéloïdes) a été forte dans tout les sous types de LAM de notre étude de M1 à M5.

Globalement, le CD33 est un marqueur beaucoup plus sensible que le CD13 pour la lignée myéloïde, mais moins spécifique que le CD13.

### **–Marqueurs associés préférentiellement à une lignée : tel que le CD14, CD64, CD36 et le CD11c.**

Ce sont des antigènes fortement exprimés sur les blastes ayant un engagement monocytaire, une plus forte expression du CD14, CD11c et du CD36 dans les LAM5 vs LAM4, CD14 :72% vs 13%, CD11c :100% vs 93,80 %, CD36 : 92% vs 69%. L'expression du CD64 est presque identique entre LAM5 et LAM4 (84% vs 90%).

### **–Concordance entre la classification cytologique FAB et l'immunophénotype des sous types de LAM**

Le taux de concordance entre la classification FAB des LAM versus classification immunophénotypique (voir tableau 78) est élevé 91 %, avec un accord Kappa fort 0,69 ; ( $p < 0.001$ ). Ces résultats ont permis de conclure à la complémentarité entre les deux classifications et leur dépendance.

Ainsi, par les critères immunophénotypiques versus cytomorphologique la concordance est de 79% pour la M1, 86 % pour M2, 97 % pour M3, 93 % pour M4, et 100 % pour M5 (voir tableau 80). Nous n'avons pas étudié la concordance des cas de LAM à réaction cytochimique négative (LAM0 et LAM7) vu la taille minime des échantillons. Dans la littérature nationale [135] il a été retrouvé que 80 % des cas sont des M1, 60% de M2, 80% de M3, 90% de M4, et 75% de M5, une différence de concordance entre les M1 et M2 est constatée avec notre série d'étude.

Comparant la classification FAB et immunophénotypique, avec d'autres travaux de la littérature [231], il s'avère que nos résultats sont semblables à ceux publiés : M1 85% versus 79%, M2 93 % vs 86 %, M4 81 % vs 93 %, M5 100% vs 100 %. Les discordances observées dans la classification des LAM entre les études cytomorphologiques du FAB

## Discussion

---

et immunophénotypiques, ont portées essentiellement entre : M1/M2, M1/M5a, M2/M4, M1/M3variante ou M2/M3 variante, sans oublier la combinaison LAM1/LAL2.

La distinction entre ces différents types de leucémies aigue myéloïdes, nécessite la combinaison FAB/immunophénotypage.

Les antigènes CD34 et HLADR ne sont pas assignés à 100 % aux blastes de type M1 ni aux blastes de type M2.Cependant, nous avons constaté dans notre série de patients LAM qu'une forte positivité des marqueurs : MPO, CD33,CD64,CD11c et le CD15àété observé dans les LAM avec maturation (LAM2 selon FAB), ce qui nous à permis la distinction M1/M2.

La positivité quasi constante du HLADR, CD33, CD36 du CD4 et la faible positivité (voir négativité) du CD117 marque les LAM monoblastiques immatures (LAM5a selon FAB), ce qui n'est pas le cas des LAM sans maturation (LAM1 selon la classification du FAB)

La difficulté de distinction morphologique M2/M4 lorsque le taux de la population monocytaire n'est pas concluant, est levée devant le profil immuno phénotypique suivant : faible intensité de la MPO dans les M4 versus M2, expression forte et constante du CD36, CD4 et du HLADR sur les cellules myéloblastiques des M4.

A la différence de ce qui est cité dans la littérature nationale et internationale [135,231] nous avons retrouvé :

– Un variant morphologique rare de LAM, ne figurant pas dans la classification OMS 2008 et fortement associé a une mutation de NPM1 et de FLT3 : la LAM à cup-like nuclei, qui peut poser un problème de diagnostic différentiel sur l'aspect morphologique avec une leucémie aigue promyélocytaire variante (LAM3 variante selon FAB).Cette entité rare de LAM décrite pour la première fois en 1994 , est définie selon les auteurs par la présence d'une invagination nucléaire dans au moins 10 % (plus communément utilisé) des blastes . Cette morphologie est significativement associée aux LAM1 et LAM2. L'invagination nucléaire peut aller jusqu'au franc clivage, donnant un aspect nucléaire bilobé, pouvant être à l' origine de la confusion avec une LAM3 variante. [231]

## Discussion

---

Dans notre d'étude, trois cas de LAM avec des blastes Cup-like étaient difficile à différencier cytologiquement des LAM3 variantes. L'examen cytologique du sang et de la moelle a montré un envahissement blastique (plus de 90 % sur les deux territoires).

Les caractéristiques cytomorphologiques communes retrouvées chez les trois patients sont les suivantes : la population blastique en majorité est indifférenciée homogène, constituée d'éléments de grande taille, a noyau central, assez régulier, cytoplasme discrètement basophile, finement granulaire. Une association de blastes à noyau parfois très contourné, agranulaires et parfois à noyau bilobé. Il n'y a pas de corps d'Auer visible.

En l'absence des études moléculaires, nous nous sommes basés sur l'étude minutieuse du profil immunophénotypique médullaire de ces LAM qui nous a permis de les classer en LAM2 à Cuplike et de les distinguer des LAM3 variantes afin de mieux orienter la conduite thérapeutique. L'immunophénotypage a démontré l'affiliation myéloïde de la prolifération tumorale avec absence d'expression des marqueurs d'immatunité CD34 et HLADR.

*\*Cas N°1*:HLA DR+faible, CD34-,MPO+,CD38+,CD117+,CD33+, CD13-,CD11c+

*\*Cas N°2* :HLADR-,CD34-,CD38+, MPO+,CD117+, CD33+,CD13+,CD64+,CD15+

*\*Cas N°3* :HLADR-,CD34- ,CD38+, MPO+ ,CD117 +, CD33+ ,CD13+ ,CD15+, CD64+ , CD11c.

Ce phénotype est assez superposable à celui des LAM3 variantes, la différence est dans l'intensité d'expression de la MPO et le CD33, plus forte dans la LAM3 variante et celles du CD117 et le CD13 plus intense dans les LAM2 Cup-like.

– La LA plasmacytoïde dérivée des cellules dendritiques myéloïdes (LpDC) : 01 cas a été retrouvé dans notre série d'étude. Il s'agit d'un type rare de leucémie aigue, représente environ 1% des leucémies aigues. Elle est distinguée comme une entité à part entière grâce à l'étude immunophénotypique par le groupe EGIL dans la classification OMS 2001 des LA. Ce cas est celui d'un patient B. Ali, de sexe masculin âgé de 39 ans sans antécédents carcinologiques, ayant consulté en hématologie en 2015 pour fièvre, asthénie et pâleur cutanéomuqueuse franche. L'examen clinique ne retrouve pas de syndrome tumoral, ni syndrome hémorragique. Aucune atteinte cutanée n'a été observée.

## Discussion

---

Le bilan biologique a révélé une leucopénie à 1.16 G/L avec anémie à 8.9 g/dL, une thrombopénie à 64 G/L. Le bilan d'hémostase montre des TP, TCA et fibrinogène normaux, sans syndrome de lyse ni CIVD. L'examen du frottis sanguin a retrouvé quelques cellules immatures indifférenciées, le myélogramme a montré une moelle richement blastique avec absence de mégacaryocytes. La moelle est envahie par un important contingent de cellules immatures de taille moyenne à grande, le rapport nucléocytoplasmique est diminué, la chromatine est très fine, le cytoplasme modérément basophile, présence parfois de micro vacuoles cytoplasmiques. Absence de grains et de corps d'Auer. Ces blastes ont un aspect parfois lymphomateux, parfois monoblastique avec de longs prolongements cytoplasmiques.

L'immunophénotypage médullaire a montré l'existence d'une population positionnée en fenêtre blastique CD45 faible, CD34 négative et HLADR positif. Cette population exprime en forte intensité le CD56 et le CD4. Les marqueurs lymphoïdes B (CD19, CD79a cyt) et T (CD3cyt) sont négatifs, avec expression des marqueurs myéloïdes: MPO+faiblement, CD13+, CD15+ et monocytaires CD64+, CD33+ sans positivité du CD117.

La co-expression des marqueurs CD56 et CD4, devant une cytologie aspécifique, signe des blastes de LpDC à composante myélomonocytaire.

Le patient a reçu une chimiothérapie de type LAM, son pronostic était plutôt favorable avec un taux de survie à 5 ans de 100%.

# **Recommendations**

## Recommandations

---

La CMF est devenue un outil incontournable du diagnostic des LA, elle doit être intégrée aux examens de routine de ces maladies en utilisant des panels simplifiés au quotidien. L'assignement de lignée est en effet le critère principal nécessaire au clinicien pour guider les choix thérapeutiques. Ainsi, il est utile de définir au diagnostic les caractéristiques immunophénotypiques qui seront mises à profit pour rechercher la maladie résiduelle ou caractériser la rechute comme issue du même clone ou d'une autre population de blastes.

Les études de survie peuvent bénéficier de l'approche précise apportée par la CMF en fournissant de meilleurs marqueurs pronostiques.

À la fin de notre étude et sur la base des résultats obtenus, on a ressorti les recommandations suivantes :

- L'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux de **1ère ligne** contenant les marqueurs **lymphoïdes B** (CD79<sup>cyt</sup>, CD22<sup>cyt</sup>, CD19, CD10), les **marqueurs lymphoïdes T** (CD3<sup>cyt</sup>, CD2, CD7), le Tdt et les **marqueurs myéloïdes** (CD117, CD13, CD33, MPO<sup>cyt</sup>), pour orienter la démarche diagnostique et un panel de **2ème ligne** pour le sous-typage des LA qui contient : CD45, HLADR, CD34, CD41, CD42, CD61, chaîne mu<sup>cyt</sup>, chaînes kappa et lambda, CD64, CD36, CD15, CD3s, CD1a, CD20, CD5, CD14, CD4, CD8, CD56 et la glycophorine A.
- L'utilisation d'un large panel d'anticorps monoclonaux sur une série plus importante de patients LAM, LAL est indispensable afin de retrouver plus de co-expression d'antigènes myéloïdes /lymphoïdes pour pouvoir identifier des caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques spécifiques aux LAL My(+) vs LAL My(-) et LAM Ly(+) vs LAM Ly(-).
- L'étude du caryotype des blastes au diagnostic vu que l'étude cytogénétique est l'un des facteurs pronostic majeurs permettant une stratification des LAL et LAM en groupes de risques favorables et défavorables en vue d'une adaptation du traitement aux probabilités de rechute et de survie.

Pour mener à bien la technique de CMF, nous proposons de meilleures conduites qui consistent à :

### Choisir la nature du prélèvement :

Le prélèvement doit être orienté vers la population tumorale la mieux représentée. Il s'agit de la moelle osseuse dans le cas des LA. Toutefois, l'existence d'un envahissement

## **Recommandations**

---

sanguin (ou méningé, rarement) peut rendre un échantillon de sang ou du liquide cébrospinal propre à la caractérisation de la leucémie, et de façon parfois très précieuse lorsque le prélèvement médullaire est difficile. Quelle que soit la nature du prélèvement choisi, l'évaluation cytologique du degré d'envahissement par la population anormale doit toujours être réalisée et corrélée avec les résultats obtenus en cytométrie.

### **Respecter les conditions et modalités de prélèvement de sang et de la moelle osseuse :**

- De préférence, réaliser l'analyse le jour même (dans les 12 heures). Dans ce cas, les deux types d'anticoagulants EDTA et l'héparine peuvent être utilisés indifféremment ;
- L'utilisation d'un échantillon prélevé sur EDTA est possible jusqu'à 24 heures après le prélèvement ;
- L'utilisation d'un échantillon prélevé sur héparine est possible jusqu'à 48 heures après le prélèvement ;
- Conservation de l'échantillon à température ambiante (20-25 °C) de préférence, et ne doit subir aucun choc thermique (risque d'internalisation de certains antigènes de surface (HLADR) ;
- Acheminer les prélèvements le plus rapidement possible au laboratoire de cytométrie ;
- Prévoir une codification pour chaque échantillon afin de préserver l'anonymat du patient ;
- Etre exigeant sur les données cliniques fournies par le prescripteur via une fiche de renseignements du patient tel que : la nature « suspectée » de la population à étudier. Cette donnée oriente la recherche de la population d'intérêt d'après ses caractéristiques de diffraction ou d'expression de certains antigènes (intensité d'expression de l'antigène pan-leucocytaire CD45), et la composition des panels d'anticorps monoclonaux à utiliser.

### **Contrôler cytologiquement la représentativité cellulaire de l'échantillon**

- Doit au mieux être mené sur des échantillons prélevés sur EDTA depuis moins de 6 heures ;
- Le contrôle doit porter réellement sur la suspension cellulaire directement utilisée pour les marquages, pour vérifier que la population d'intérêt est bien présente dans le tube afin d'estimer sa proportion. Ce contrôle repose sur :

## Recommandations

---

- Un frottis sanguin réalisé à partir du tube initial ;
- Un frottis médullaire réalisé à partir de la suspension prélevée pour le typage et non les frottis réalisés lors du prélèvement avec les premiers mm<sup>3</sup> de moelle.

# Conclusion

## Conclusion

---

La classification des LA à fait appel aux recommandations du groupe FAB depuis une vingtaine d'années. L'intérêt longtemps porté à cette classification tient à sa relative simplicité basée sur une description morphologique, après coloration des frottis de sang et de moelle osseuse, complétée par des examens cytochimiques, accessibles à tous les laboratoires et tenant compte des anomalies cytomorphologiques du sang et de la moelle.

Le myélogramme lu par un cytologiste averti reste l'examen de première intention en cas de suspicion d'une LA. Il est en effet très rapide à réaliser. C'est aussi sans doute la technique qui permet le mieux d'apprécier les anomalies qualitatives des cellules. A cet effet, cet examen a ses limites, il est en partie subjectif, nécessite une solide expérience et ne permet de compter qu'un faible nombre de cellules parfois dans des zones qui ne sont pas représentatives de la distribution cellulaire globale. De plus il ne permet pas la différenciation des sous populations lymphocytaires.

C'est dans ce contexte que l'analyse par CMF, qui permet une analyse immunologique complémentaire de la morphologie comme préconisé dans la classification OMS 2008 des LA a été mise en place depuis 2012 au laboratoire d'hémobiologie du CHU de Tizi Ouzou. Elle est devenue indispensable dans le diagnostic et la classification des LA. En effet, cette technique permet de distinguer quatre catégories de LA selon leur lignée d'origine : myéloïde, lymphoïde, phénotype mixte, histiocytaire et dendritique. La classification des cellules anormales dans une entité nosologique est une étape indispensable à la prise en charge optimisée du patient. Quand la LA est MPO ou noir soudan négatif, l'examen par CMF des cellules blastiques est indispensable, l'examen microscopique étant insuffisant pour porter avec certitude le diagnostic de LAL. La classification FAB est dans ce cas peu utile, en dehors de l'identification de la LAL3 de type Burkitt qui parfois prête à confusion avec la LAM5a, voir LALT.

Actuellement, plus de 20 marqueurs sont analysés par CMF de façon combinée ; mais aucun pris isolément, ne peut classer les différents sous-types de LA en particulier le groupe des LAM. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la classification FAB ne repose pas uniquement sur des critères morphologiques mais aussi sur la présence et le nombre de progéniteurs granulocytaires, monocytaires ou érythrocytaires.

Dans cette étude nous avons voulu exploiter la masse d'information apportée par l'analyse immunophénotypique dans la classification des LA afin de comprendre

## Conclusion

---

quand faut-il en avoir recours à cette technique sensible et spécifique mais coûteuse en temps et en formation.

L'immunophénotypage par CMF réalisé chez tous nos patients, soit 234 LA dont 70 (30%) chez l'enfant et 164 (69,6%) chez l'adulte, a permis l'exploration des situations suivantes : l'identification de la lignée myéloïde, parmi les 234 patients, 145 cas (62%) sont des LAM (121 cas chez l'adulte et 24 cas chez l'enfant), l'exclusion des lignées lymphoïdes des LAM peu différenciées qui sont essentiellement de type M0, M7 et cytMPO négative, souvent étiquetés comme LAL par l'étude cytologique. Nous avons recensé 82/234 cas de LAL (35 %) dont 43 LAL chez l'enfant et 39 LAL chez l'adulte, cette distinction est importante vu le caractère péjoratif des formes peu différenciées.

La CMF nous a permis, de différencier parmi les LAL les formes T et les formes B. Ainsi, sur les 82 cas de LAL 59 (72%) sont des LALB et 23 (28 %) des LAL T.

Un manque de performance de la cytologie classique a été constaté dans la distinction des formes B mature (LAL3) des autres formes lymphoblastiques. Sur 39 cas de LAL de l'adulte, nous avons distingué par CMF 03 (8%) de LAL3 type burkitt-like et chez l'enfant 02 cas sur 43(4.65%) de LAL3 distingué. Cette distinction est importante pour un traitement plus spécifique et une survie meilleure.

De part sa performance la CMF nous a permis d'individualiser les LAL biphénotypiques ou à phénotype mixte (MPAL), de très rares cas de LAL biphénotypiques ont été recensés soit 7/234 cas (3%). Un cas (0.42%) de LA à cellules dendritiques myéloïdes a été identifié sur les 234 cas de LA diagnostiquées. Le profil immunophénotypique de ces entités était important à déterminer pour orienter la conduite thérapeutique et le pronostic.

Par ailleurs, la CMF permet de distinguer les blastes des hématogones qui correspondent aux précurseurs B (type 1 et 2) ainsi qu'aux B immatures (type 3). Les hématogones de type 1 sont CD19+, CD38+ fort, CD10+ fort, CD34+, et CD45+ faible. Le passage au stade hématogones de type-2 se caractérise par une perte du CD34, une diminution de l'expression du CD10 et une augmentation de celle du CD45. Au stade B transitionnel, le CD45 a le même niveau d'expression que celui des cellules B matures, le CD38 reste fort et CD10 positif. Le passage au stade B mature est marqué par la perte du

## Conclusion

---

CD10, CD45 est fort et l'expression de CD38 diminue progressivement jusqu'à devenir négatif. Les hémotogones persistent chez l'enfant jusqu'à l'âge de 6 ans. La distinction lymphocytes / hémotogones / blastes myéloïdes est délicate en cytologie, et qu'un certain nombre d'hémotogones au niveau médullaire sont souvent comptées avec les lymphocytes.

Les LAM0 montrent une différenciation myéloïde minimale, et souvent une morphologie FAB L1 / L2 bien qu'un diagnostic de LAM0 peut être exclu grâce à l'analyse multiparamétrique offerte par la CMF. Les marqueurs cytMPO, cytCD3 et cytCD79a, sont les meilleurs marqueurs pour distinguer les LAM0 des LALB et LALT. Les antigènes CD2, CD4, CD7, CD10 et CD19 ne peuvent pas être considérés comme des signes de différenciation lymphoïde parce que nous avons l'expression de ces antigènes lymphocytes T et B associés aux LAM comme antigènes infidèles ou aberrants.

Les antigènes aberrants semblent s'affirmer comme les meilleurs marqueurs pronostiques pour suivre l'évolution sous traitement dont certains sont corrélés à la présence d'anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires et à des évolutions pronostiques défavorables.

Nous avons constaté que les associations antigéniques lient le profil immunologique et les sous types morphologiques. Dans notre étude, le CD34 et le HLA-DR ont été exprimé sur une plus grande population de cellules myéloïdes engagées mais immatures, ce qui nous a conduits à sélectionner le CD34 et le HLA-DR comme marqueurs non associés à une lignée. La fréquence de positivité du HLA-DR et CD34 est assez similaire dans les sous types de LAM suivants LAM0, LAM1, avec une forte expression seule du HLA-DR dans les LAM5 et du CD34 dans les LAM7.

L'absence d'expression du CD34 et du HLADR a été constatée dans plus de 80% des cas de LAM3, moins de 10% ont exprimé soit le HLADR soit le CD34 soit les deux marqueurs.

L'antigène CD117 présente une spécificité élevée pour les LAM, et représente un marqueur fiable pour caractériser le degré de différenciation des blastes myéloïdes et monocytaires. Le CD117 a été exprimé dans 100 % des cas de M7 et M0, dans 89.5% des cas de M1, dans 97 % des cas de M2, dans 58.8 % des cas M3 et dans 90 % des cas M4. Dans le sous type M5 l'expression du CD117 est faible 20 % strictement limitée aux stades précoces avec une faible intensité d'expression.

## Conclusion

---

Le diagnostic des LAM M4, M5b typiques peut être posé sans CMF en utilisant la classification FAB. Néanmoins, le diagnostic de la LAM7 ne peut être posé par la classification FAB seul, étant donné que la plupart de ces cas ont une fibrose médullaire.

La difficulté diagnostique peut être aggravée par le fait que dans plusieurs cas les mégacaryoblastes sont petits, ressemblant à des lymphoblastes ou même à des lymphocytes. Dans de tels cas, l'immunophénotypage par CMF occupe une place irremplaçable par l'identification des cellules blastiques «atypiques» rares en circulation comme les mégacaryoblastes, exprimant CD41 et / ou CD61 mais MPO négative. Ainsi, un diagnostic de LAM7 ne doit pas être écarté devant un sang périphérique ne présentant pas 20% d'envahissement blastique, car c'est souvent le cas avec les LAM7.

En effet, l'assignement des cellules blastiques à une lignée est le critère principal nécessaire au clinicien pour guider les choix thérapeutiques. Des marqueurs antigéniques clés dans l'immunophénotypage des LAM et LAL permettent une stratification en sous-ensembles cliniquement pertinents avec des expressions antigéniques, qui doivent être prise en compte pour définir des populations LAM ou LAL à risque élevé. Chez les enfants LALT de notre série d'étude, l'impact pronostic des antigènes CD2 et CD8 a été observé. Les patients enfants LALT CD8(+) ont une meilleure survie que les groupes CD8(-) avec une signification statistique  $p=0,01$ . De même les patients CD2(-) ont une survie nettement meilleure que les patients CD2(+) ( $p=0,03$ ).

Aussi, le taux de concordance entre la classification FAB des LAM versus classification immunophénotypique est élevé 91 % ( $p<0.001$ ). Ces résultats ont permis de conclure à la complémentarité entre les deux classifications (FAB /immunophénotypage) et leur dépendance.

Enfin, nos résultats confirment que l'immunophénotypage des LA nous à permis une classification orientée et fiable.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

---

- [1]. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5):937-5.
- [2]. Janet M Torpy, CassioLynm, MA, Richard M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of the American Medical Association*. 2009; 301(4):452.
- [3]. Boudjerra N, Colonna P .LA de l'enfant 280 cas observés en 20 ans à Alger. XVème Congrès medical Maghrébin, Casablanca, 28-29 et 30 Avril 1986.
- [4]. James W. Vardiman, Nancy Lee Harris And al. The World Health Organization (WHO) Classification Of The Myeloid Neoplasms. *Blood*. 2002; 100(7):2292-302.
- [5]. Michèle Imbert, Oriane Wagner-Ballon. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Francaise des laboratoires*. 2015; 471:29-33.
- [6]. Ben Salah N, El Borgi W, Chelbi A, Ben Lakhal F, Gouider E, Aounallah Skhiri H, Hafsia R.Diagnostic de lignée dans les leucémies aiguës : confrontation entre cytologie et immunophénotypage. *Pathologie Biologie*. 2014 ; 62(6):345-7.
- [7]. Basso G, Buldini B, De Zen L et Orfao A - New Methodologic Approaches For Immunophenotyping Acute Leukemias. *Haematologica*, 2001; 86, 675-692.
- [8]. Jouault H. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*. 2002; 344: 25-30.
- [9]. Zahid. K, Eric Crawford, M. Hanif Pathan. and al. Flow Cytometric Analysis of Acute Leukemias Diagnostic Utility and Critical Analysis of Data. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2003; 127: 42–48.
- [10]. Hyun Gyung Lee, Hee Jo Baek, Ho Sung Kim, Soo Min Park, Tai Ju Hwang, Hoon Kook. Biphenotypic acute leukemia or acute leukemia of ambiguous lineage in childhood: clinical characteristics and outcome. *Blood Reserch*.2019; 54(1):63-73
- [11]. Xu XQ, Wang JM, Lu SQ, and al. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a chinese population. *Haematologica*. 2009; 94(7):919-27.
- [12]. Chang Hong, Joanna Yeung, Joseph Brandwein, Qi-long Yi. CD7 expression predicts poor disease free survival and post-remission survival in patients with acute myeloid leukemia and normal karyotype *Leukemia Research*.2007; (31): 157–162.
- [13]. Chang H, Salma F, Yi QL, and al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2004; 28(1): 43-8.
- [14]. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, and al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European leukemia network package 10. *Leukemia*.2011; 25(4):567-74.

## Bibliographie

---

- [15]. Mauvieux.L, Lessard.M, Lioure.B. Les leucémies aiguës de l'enfant. Maladies du sang et transfusion. Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine. Module 07; 2005-2006; DCEM3: 97-110.
- [16]. Bennett J.M, Catovsky D, Daniel MT, and al. Proposals For The Classification Of Acute Leukemias: French-American-British (FAB) Cooperative Group, *British Journal Of Haematology*. 33: 451, 1976.
- [17]. Bene Mc, Castoldi G, Knapp W, Ludwig Wd, Matutes E, Orfao A, Van'tveer Mb. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9(10); 1783-1786.
- [18]. Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola and James W. Vardiman The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; (20), 127: 2391-2405
- [19]. De Botton.S, Fenaux.P, Quesnel. B. Facteurs pronostiques des leucémies aiguës et des lymphomes. *Réanimation*. 2002 ; 11 : 306-16
- [20]. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. 2010; 115:453–74.
- [21]. Visser O, Trama A, Maynadié M, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012 ; 48(17):3257-66.
- [22]. Marc Maynadiéa, Xavier Troussard. Épidémiologie des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2015; 471: 29-33.
- [23]. Bekadja.A. les leucémies aigues myéloïdes: aspects épidémiologiques, clinique, biologique et thérapeutique: rapport du groupe algérien de travail des leucémies aigues myéloïdes/ syndromes myélodysplasiques (période 2011-2017). *Hématologie*. 2019 ; 25 (supplément 1) : 64.
- [24]. Tazi K, Khattab M, AlaouiMsefer. Profil épidémiologique et presentation clinique initiale des leucémies aiguës de l'enfant en milieu marocain.XV éme congrès maghrébin 28-29 et 30 Avril 1986 Casablanca.
- [25]. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/browse\\_csr.php](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/browse_csr.php).
- [26]. Krim.A et al. Evaluation du protocole d'induction «3+7» des leucémies aigues myéloblastiques dans la vraie vie : expérience multicentrique de l'ouest algérien. *Hématologie*. 2019 ; 25 (supplément1) : 68.
- [27]. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, et al. Incidence des cancers de l'enfant en France : données des registres pédiatriques nationaux 2000-2004. *BEH* 2010;:49-50.
- [28]. Gatta G, van der ZwanJM, CasaliPG, et al. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. *European Journal of Cancer*. 2011;47(17): 2493-511.

## Bibliographie

---

- [29]. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010; 116(19):3724-34.
- [30]. Zouaoui.Z et al. Etude épidémiologique nationale des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte (LAL) travail coopératif du groupe algérien d'étude des LAL sur une période de 04 ans (jan 2010 - déc. 2013).*Revue Algérienne d'Hématologie*. 2016 ; 12:5.
- [31]. Boudjerra N. Aspects Epidémiologiques Des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques LAL de l'enfant en Algérie. Travail Cooperative Multicentrique Sur Une Période De 10 Ans (1994- 2003).A propos de 931 Patients. *Revue Algérienne d'Hématologie*.N°6-7 2012 : 15-17.
- [32]. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncology*. 2014; 15(9):931-42.
- [33]. Monnereau A, Troussard X, Belot A, et al. Unbiased estimates of long-term net survival of hematological malignancy patients detailed by major subtypes in France. *International journal of Cancer*. 2013; 132(10):2378-87.
- [34]. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood* 2012; 119(1):34-43.
- [35]. Allouda.M et al. Evaluation du protocole linker dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte etude multicentrique. *Revue Algérienne d'Hématologie*, 2016 ; 12 : 10-16.
- [36]. Troussard X., Maarouf N. Biphenotypic leukaemia (BAL): myth, reality, prospects. *Spectra biologie*. 2006; 152: 34-38.
- [37]. Weinberg O.K., Arber D.A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia*. 2010; 24(11): 1844-51.
- [38]. Sylvie Gisselbrecht. *Medecine/sciences* 2003; n° 2, vol. 19 : 201-10. <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2003192201>.
- [39]. Inserm. Cancer et environnement. Collection Expertise Collective, 2008. 907pages.
- [40]. Dick J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008; 112(13): 4793-807.
- [41]. Llopis L. Molecular biology and prognostic value in acute myeloid leukemia. *Hématologie*. 2009; 15(6): 426-43.
- [42]. Gilliland D.G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Seminaire Hematologie*. 2002; 39(4) Suppl 3: 6-11.
- [43]. D. Gary Gilliland, James D. Griffin, The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100 (5): 1532–1542.

## Bibliographie

---

- [44]. Herman Van den Berghe, Organizer, Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, on 15-17 September 1986 Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. *British Journal of Haematology*. 1988; 68: 487-494.
- [45]. Bloom Field, C.D, Brunning RD. FAB M7: acute megakaryoblastic leukemia beyond morphology. *Annals of Internal Medicine*. 1985; 103 (3):450-2.
- [46]. Bennett. JM. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. 1985; 103(3):460-2.
- [47]. Bennett. JM. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British Journal of Haematology*. 1991; 78(3):325-9.
- [48]. Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *British Journal of Haematology*. 2001; 113(3):737-45.
- [49]. Preudhomme C, Llopis L, Boissel N. Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës. *EMC – Hématologie*, 13-018-G-05, 2012.
- [50]. Benett JM, Catovsky D, Daniel MT and al. The French-American-British (FAB) Cooperative Group. Correspondence; a variant form of hypergranular promyelocytic leukemia (M3). *British Journal of Haematology*. 1980; 44: 169-70
- [51]. Berger R, Bernheim A, Daniel MT, and al. Cytogenetic studies on acute myelomonocytic leukemia (M4) with eosinophilia. *Leukemia Research*. 1985; 9: 279-88
- [52]. Martin S, Tallman, Haesook T. Kim, Elisabeth Paietta, John M. Bennett, Gordon Dewald, Peter A. Cassileth, Peter H. Wiernik, and Jacob M. Rowe. Acute Monocytic Leukemia (French-American- British classification M5) Does Not Have a Worse Prognosis than other subtypes of Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of clinical oncology*. 2004; 22 (7):1276-86.
- [53]. Killick S, Matutes E. Acute Erythroid leukaemias. *Atlas Genet Cytogen et Oncol Haematology*. July 2002.
- [54]. Drexle HG. Classification of acute myeloid leukemia a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia* 1987; 1(10):697-705.
- [55]. J Storr, G Dolan, E Coustan-Smith, D Barnett, J T Reilly. Value of monoclonal anti-myeloperoxidase (MPO) for diagnosing acute leukaemia. *Journal of Clinical Pathology*. 1990; 43(10):847-9.
- [56]. Imbert M, Ballon O W. Place du biologiste dans la prise en charge des leucémies aiguës : de l'hémogramme à la classification OMS. *Revue Francophone des Laboratoires* 2015, (471) : 83-90.
- [57]. Borowitz MJ, Bene MC, Harris NL, Porwit A, Matutes E. Acute leukemias of ambiguous lineage. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press. 2008; 2:150-5.

## Bibliographie

---

- [58]. Van den Ancker W., Terwijn M., Westers T.M., Merle P.A., van Beckhoven E., Drager A.M., et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO 2008 classification. *Leukemia*. 2010; 24(7): 1392-6.
- [59]. Brito-Babapulle.F et al. Clinico pathological features of acute undifferentiated leukaemia with a stem cell phenotype. *British Journal of Haematology*, 1990; 76(2):210-4.
- [60]. Nathan J. Charles, MD, Daniel F. Boyer, MD. Mixed-Phenotype Acute Leukemia. *Archives Pathology Laboratory Medicine*, (2017), 141 (11): 1462–1468.
- [61]. Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, Catovsky D. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica*, 01 Jan 1997,82(1):64-66,
- [62]. Batinić D, Dubravčić K, Rajić L, Mikulić M, Labar B. Biphenotypic and bilineal acute leukemias. *Acta medica Croatica*, Oct 2008, 62(4):387-390, 01.
- [63]. X. Thomas. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. *EMC - Hématologie*, 2(4), 1–13,2007.
- [64]. F.Huguet, C.Récher. Leucémies aiguës de l'adulte. *EMC- traité de médecine Akos*, 7(3);1-9,2012.
- [65]. Liesner RJ, Goldstone AH. ABC of clinical haematology.The acute leukaemias. *British Medical journal*. 1997 ; 314(7082):733-6
- [66]. F.Bauduer. Aspects cliniques des leucémies aiguës. *EMC- Hématologie*, 13-018-G-10,2002.
- [67]. Genevieve F, Galois AC, Mercier- Bataille D, et al. Revue microscopique du frottis sanguine : propositions du groupe francophone d'hématologie cellulaire (GFHG).*Feuillets de biologie* 2014; 317 :7-16.
- [68]. H. Löffler, J. Rastetter, T. Haferlach Atlas of Clinical Hematology, Sixth Revised Edition, 2004.
- [69]. Moloney WC, Mcpherson K, Fliegelman L. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1960 May; 8:200–7.
- [70]. Bozdech MJ, Bainton DF. Identification of alpha-naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1981; 153(1):182–95.
- [71]. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Revue Oncology Hematology*. 2005; 56(2):223–34.
- [72]. Browman GP, NeamePB, Soamboonsrup P. The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. *Blood*. 1986; 68(4):900–5.

## Bibliographie

---

- [73]. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four and five color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010. Jan; 78(1):4-10.
- [74]. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008; 111(8):3941–67.
- [75]. Béné MC, Lacombe F. place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Francophone Des Laboratoires.* 2015 ;(471) : 35–41.
- [76]. <http://wiki.clinicalflow.com/introduction-flow-cytometric-analysis>
- [77]. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood.* 2010 ; 115(3):453–74.
- [78]. Francine Mugnereta, Christiane Charrinb. Cytogénétique conventionnelle et moléculaire des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires.* 2002 ; 344 :31-40.
- [79]. Keagle MB, editor. The principles of clinical cytogenetics. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press; 2005. 596 pages.
- [80]. Laport GF, Larson RA. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Seminars Oncology* 1997; 24:70-82.
- [81]. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Medical progress: Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1051-62.
- [82]. Burd, A., Levine, R. L., Ruppert, A. S., Mims, A. S., Borate, U., Stein, E. M., ... Byrd, J. C. Precision medicine treatment in acute myeloid leukemia using prospective genomic profiling: feasibility and preliminary efficacy of the Beat AML Master Trial. *Nature Medicine*, 2020; 26(12): 1852– 1858.
- [83]. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myéloïde leukemia. *American Society of Hematology.* 2001; (1):62-86.
- [84]. Pui CH, Evans WE. Drug Therapy: Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 1998; 339: 605-15.
- [85]. L.Zafrani, G.Monneret. Comprendre la cytométrie en flux. *Médecine Intensive Réanimation.* (2017); 26:517-522.
- [86]. G.Valet. La cytométrie en flux.Nouveaux challenges.Perspectives.Paris: Eds Techniques et Documentation- Lavoisier ; 2006,3-27p.
- [87]. Recktenwald, D.J. (1993) Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 1993; (2):387-94.

## Bibliographie

---

- [88]. Brown, M. and Wittwer, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* 2000; (46): 1221-9.
- [89]. Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O. and Roederer, M. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical Chemistry*.2000 ;( 48):1819-27.
- [90]. Melamed, M.R. A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods Cell Biology*. 2001; (63): 3-17.
- [91]. Laboux O et al. Microwave irradiation of ethanol-fixed bone improves preservation, reduces processing time, and allows both light and electron microscopy on the same sample. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004; 52: 1267-1275.
- [92]. Coons A.H and Kaplan M.H. Localization of antigen in tissue celis; improvements in a method for the detection of antigen by means offluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 80: 1-13.
- [93]. Van DillaM.A et al. CeIlmicrofluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*. 1969; 163: 1213-1214.
- [94]. Shapiro H.M et al. Combined blood cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1976; 24(1): 396-401.
- [95]. Steinkamp J.A et al. Dual-laser flow cytometry of single mammalian celis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.1979; 27: 273-276.
- [96]. Reinherz E.L et al. Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1979; 76(8): 4061-4065.
- [97]. Ronot. X., Grunwald. D, Mayol. J-F., Boutonnat. J. La cytométrie en flux. Paris : Eds, Techniques et Documentation- Lavoisier; 2006,456p.
- [98]. <https://www.univ-reims.fr/urcacyt/urcacyt-plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html>
- [99]. Leach, M. Drummond, M. et Doig, A. (2013). Practical Flow Cytometry in Haemotology Diagnosis. Singapour: Eds, WILEY-BLACKWELL.
- [100]. Kachel V et al. Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments, in Flow Cytometry and Sorting, Melamed M.R, Lindmo T., Mendelsohn M.L., Eds, Wiley- Liss Publications; 1990, 27-44p.
- [101]. Steen H.B. Characteristics of flow cytometers. In “Flow Cytometry and Sorting”, Melamed M.R, Lindmo T., Mendelsohn M.L., Eds, Wiley-Liss Publications; 1990, 11-26p.
- [102]. Kapoor, V., Subach, F.V., Kozlov, V.G., Grudin, A., Verkhusha, V.V. and Telford, W.G. New lasers for flow cytometry: filling the gaps. *Nature Methods* 2007, 4; 678-9.

## Bibliographie

---

- [103]. Perfetto, S.P. and Roederer, M. Increased immunofluorescence sensitivity using 532 nm laser excitation. *Cytometry A*. 2007; 71: 73-9.
- [104]. Kapoor, V., Karpov, V., Linton, C., Subach, F.V., Verkhusha, V.V. and Telford, W.G. Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2008 ; 73 : 570-7.
- [105]. Brahim.M, Immunophénotypage des lymphomes par cytométrie en flux sur cytoponction Thèse de doctorat en sciences médicales Novembre 2010 Université d'Oran.
- [106]. <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/PrincipesTechniques.html>
- [107]. Salzman G.C et al. Light Scattering with stream-in-air flow systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 1:264-267.
- [108]. [http://www.irmb-inserm.fr/cours\\_cytométrie\\_2015.pdf](http://www.irmb-inserm.fr/cours_cytométrie_2015.pdf)
- [109]. <http://acces.ens-lyon.fr/la-cytometrie-en-flux>
- [110]. Julie Pont. Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique. Thèse en Sciences pharmaceutiques. Université Grenoble Alpes; 2015, 114p.
- [111]. Cindy Celeste et Réhane Delisle. Travail de diplôme 2013-2014, Cours de Quarroz, Cytométrie de flux : Interprétation des histogrammes. Lausanne: CHUV- ES santé.
- [112]. [http://www.edu.upmc.fr/Les\\_outils\\_techniques\\_avancées\\_de\\_cytométrie.pdf](http://www.edu.upmc.fr/Les_outils_techniques_avancées_de_cytométrie.pdf)
- [113]. Jean-François. Mayol., Corinne-Laplace. Bilhé., Christian D.Mulle. La cytométrie en flux, 2ème Eds, Paris, Lavoisier; 2020, 497p.
- [114]. Brown S et Poujol C, Dynamique de la compartimentation cellulaire. Institut des sciences du végétal, CNRS UPR2355, 91198 Gif-sur-Yvette, et plate-forme d'imagerie cellulaire de l'institut de neurosciences, institut François Magendie. Université de Bordeaux II. 2009; 35p.
- [115]. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd Eds. Springer Verlag; 2006, 958 p.
- [116]. Valeur B. MN Berberan-Santos. Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2nd Eds. Wiley-VCH; 2012, 569p.
- [117]. <https://www.ibs.fr/recherche/groupe-de-recherche/groupe-dynamique-et-cinetique-des-processus-moleculaires>
- [118]. The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th eds., Molecular Probes Invitrogen. 2010, 973p.
- [119]. Horobin, R. W., Kiernan, J. A. Conn's Biological Stains A Handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and Médecine. 10th edition. Oxford: BIOS Scientific; 2002, 571p.

## Bibliographie

---

- [120]. Kramer HJ, WesterhuisWH, Amesz J. Low Temperature Spectroscopy of intact algae. *Physiologie Végétale*. 1985; 23: 535-543.
- [121]. <https://www6.inrae.fr/fluorochromes.pdf>
- [122]. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997; 90(8):2863-92.
- [123]. Ankur Ahuja, Seema Tyagi, Tulika Seth, Hara Prasad Pati, Comparison of Immunohistochemistry, Cytochemistry, and Flow Cytometry in AML for Myeloperoxidase Detection. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* 2018; 34(2):233-239.
- [124]. Casasnovas RO, Campos L, Mugneret F, Charrin C, Béné MC, Garand R, et al. Immunophenotypic patterns and cytogenetic anomalies in acute nonlymphoblastic leukemia subtypes: a prospective study of 432 patients. *Leukemia*. 1998; 12(1):34-43.
- [125]. Al-Mawali A, To LB, Gillis D, Hissaria P, Mundy J, Lewis I. The presence of leukaemia-associated phenotypes is an independent predictor of induction failure in acute myeloid leukaemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2009; 31(1):61-8.
- [126]. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematologica* 2004; 112 (1-2):8-15.
- [127]. Brahimi M., Saidi D., Touhami H., Bekadja MA., The use of CD45/SSC Dot Plots in the Classification of Acute Leukemias. *Hematology and Thromboembolic Diseases*. 2014; 2(2):2-2.
- [128]. Olivier Lees, Marie-Christine Béné et les membres du GEIL. Immunophénotypage des leucocytes. Clusters de différenciation humains applications à la caractérisation des hémopathies. Paris : Biotem Editions, 1998.
- [129]. Bene Mc, Lees O, Faure G &LEGEIL - Immunophénotypage Des Leucémies : Recommandations. *Revue française des laboratoires*. 1996; 267: 47-52.
- [130]. Bekadja MA et al. Etude Epidémiologique Nationale Des Leucémies Aiguës Lymphoïdes(LAL) En Algérie. Travail Cooperative et Multicentrique Sur Une Période De 7 Ans (2004- 2010).A propos de 790 patients. *Revue Algérienne d'hématologie*. 2012; N°6-7 : 11-14.
- [131]. Talbi A, Harieche F, Moussaoui H, Belhadri F and al. Aspects clinico biologiques et devenir des leucémies aiguës biphénotypiques. *Revue Algérienne d'hématologie* 2012; N°6-7:65-67.
- [132]. Oukid.S, Taoussi.S, M.T.Abad Profil des leucémies aiguës biphénotypiques en Cytométrie en Flux et Hybridation In Situ .*Revue Algérienne d'hématologie*.2012 ; N°6-7:25-29.
- [133]. Saidi. D, Brahimi.M. L'immunophénotypage par Cytométrie en Flux des Leucémies aiguës Non Lymphoblastiques 4ème Congrès National d'Hématologie Alger 5-7 Mai 2007 Communication personnelle orale.

## Bibliographie

---

- [134]. Venditti and al. AML-M0 and other FAB subtypes. *Blood* 1997; 89, (2): 621-629.
- [135]. Trabzi-Azeli Anissa. Application de l'immunophénotypage à la classification des leucémies aiguës .Thèse pour le diplôme de docteur en sciences médicale, faculté de médecine d'Alger.Juillet 1999.
- [136]. Oukid.S, Taoussi.S, K.M.Benlabiod, M.T. Abad. Profil Phénotypique des leucémies aiguës lymphoblastiques. *Revue Algérienne d'Hématologie*, 2012 ; N°6-7 : 21-24.
- [137]. Troussard X., Duchenet V., Cornet E., Mouchel D., Malet M., Collignon A. Haematologica Imalignancies: incidence in Basse-Normandie, France, for 1997-2004. *Revue Epidemiologie Sante Publique*. 2009; 57(3): 151-8.
- [138]. Ludwig W.D; Reiter A, Loffler.H, and al. Immunophénotypic features of childhood and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Experience of the German Multicentre Trials ALLBFM and GMALL. *Leukemia and lymphoma*. 1994; 13:71-76.
- [139]. Mansour.B et al Les expressions antigéniques dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte : expérience de l'EHU 1er Novembre). *Hématologie*. 2019; 25, (supplement 1):65.
- [140]. Matutes E, PicklWF, Van't Veer and al. Mixedphenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood*. 2011; 117: 3163–3171.
- [141]. Krawczynska A and Robak T. Monoclonal Antibodies In Diagnosis Of Acute Leukemias. *Przegląd Lekarski*. 1996; 53: 20-25.
- [142]. Gatta G, van der ZwanJM, CasaliPG, et al. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. *European Journal of Cancer*. 2011; 47(17): 2493-511.
- [143]. Deschler B., Lubbert M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology.*Cancer*. 2006; 107(9): 2099-2107.
- [144]. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, and Gratama JW. Flow cytometricdifferential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2009; 76 B: 18-26.
- [145]. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral bloodadmixture in bone marrow aspirates. *Experimental Hematology*. 1980; 8:103-107.
- [146]. <https://beckmancoulter.com/techdocs>.
- [147]. [http://rai.unam.mx/manuales/ucf\\_BDAccuriC6SoftwareUser\\_Guide.pdf](http://rai.unam.mx/manuales/ucf_BDAccuriC6SoftwareUser_Guide.pdf).
- [148]. Métézeau P. La cytométrie en flux:Guide pratique de la preparation à l'analyse des cellules. Limoges. France : PULIM edition, 1994.

## Bibliographie

---

- [149]. Rothe G, Schmitz G. For the working group on flow cytometry and image analysis. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996; 10:877-95.
- [150]. Maura R. V. Ikoma, Alex F. Sandes, Leandro S. Thiago, Geraldo B, and al. First Proposed Panels on Acute Leukemia for Four-Color Immunophenotyping by Flow Cytometry from the Brazilian Group of Flow Cytometry-GBCFLUX. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2015; 88B:194-203
- [151]. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960; 20:37-46.
- [152]. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-74.
- [153]. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/)
- [154]. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Practice and Reserch Clinical Haematology*. 2002; 15: 597-621.
- [155]. Sebahoun G. Anémies caractérisation, mécanisme, orientation diagnostique. In: Sebahoun G, ed. *Hématologie clinique*. Paris: Arnette, 2005: 45-8.
- [156]. Imbert M. Place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des laboratoires*. 2002; 344: 67-70.
- [157]. Bacher U., Kern W., Schnittger S., Hiddemann W., Schoch C., Haferlach T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. *Annals of Hematology*, 2005. 84(12): 785-91.
- [158]. Valensi F. Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé. EMC, 2003 ; 13- 018-G-05: 7 pages.
- [159]. Mugneret F., Callier P., Favre-Audry B. Chromosomal abnormalities in acute myeloid leukaemias. *Pathology and Biology*. 2003; 51(6): 314-28.
- [160]. Coebergh JW, Reedijk AM, de Vries E, Martos C, Jakab Z, Steliarova-Foucher E, Kamps WA. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997: report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* 2006; 42(13):2019-36.
- [161]. Schaison G, Baruchel A, Le blanc T. Traitement des leucémies aiguës lymphoïdes de l'enfant. *Revue du Praticien*. 1996; 46(1): 48-54.
- [162]. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Oncology*. 2008; 55(1):1-20
- [163]. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematology Oncology Clinical of North America*. 2010; 24:35-63.

## Bibliographie

---

- [164]. Sophie Bustany, Michelle Malet, Veronique Salaun, Dina Naguib, Ghislaine Plessis, Xavier Troussard. La leucémie peu différenciée (MO): aspect hématologique, immunophénotypique, cytogénétique, incidence pronostique expérience de Caen. *Revue Française des Laboratoires*. 2007; 37(395): 51-58.
- [165]. Braham JmiliN et al. Etude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques : analyse de 152 cas par cytométrie en flux. *Annales Biologie Clinique*. 2009; 67 (5): 543-51.
- [166]. Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, Catovsky D. Définition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica*. 1997;82(1):64-6
- [167]. Matutes E, Pickl, W. F., van't Veer, M., Morilla, R., Swansbury, J., Strobl, H., ... Ludwig, W.-D. Mixed-Phénotype acute Leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classifications. *Blood*. 2011; 117 (11): 3163-3171.
- [168]. Killick S, Matutes E, Powles RL, Hamblin M, and al. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica*. 1999; 84(8): 699-706.
- [169]. Hanson Ca, Abaza M, Sheldon S, Ross Cw, and al. Acute biphenotypic leukaemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis. *British Journal of Haematology*. 1993; 84(1): 49-60.
- [170]. Christopher L. Reading, Elihu H. Estey, and al. Expression of Unusual Immunophenotype Combinations in Acute Myelogenous Leukemia. *Blood*. 1993; 81 (11): 3083-3090
- [171]. Robert B. Geller, Marianna Zahurak, Craig A. Hurwitz, and al. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My 10). *British journal of Haematology*. 1990, 76: 340-347.
- [172]. E Solary, RO Casasnovas, L Campos, MC Beneand al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR-phenotypes with shorter survival. Groupe d' Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). *Leukemia*, 1992; 6(5):393-399.
- [173]. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in Monocyte activation. *Blood*. 1997; 89: 307-314.
- [174]. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. *British Journal of Haematology*. 1992; 80: 62- 68.
- [175]. Marie-Christine Béné, Francis Lacombe. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française du Laboratoire* 2015; 35-41.
- [176]. Saidi D et al. La cytométrie en flux dans les leucémies aigues au CHU Oran. Workshop immunophénotypage, HCA 8 MAI 2007.

## Bibliographie

---

- [177]. Y.Fakhfakh et al.Aspects épidémiologiques, cliniques et biologiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte du Sud Tunisien. *Hématologie*.2019; 25 (supplement 1): page 65.
- [178]. Kersey J.H., Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukaemia. *Blood*.1997; 90: 4243-4251.
- [179]. Jean C.Y. Wang, Patrice Beauregard, and al. MonoclonalAntibodies in the Management of Acute Leukemia. *American Journal of Hematology* .1995; 50:188-199.
- [180]. S. Thomas Traweek, MD.ImmunophenotypicAnalysisof Acute Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*.1993; 99: 504-512.
- [181]. Michael J. Borowitz, MD, PhD. Immunologic Markers in Childhood Acute Lymphoblastic *Leukemia Hematology/Oncology Clinics of North America*. 1990; 4 (4) :743-765.
- [182]. Edward A. Copelan and Elizabeth A. McGuire. The Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Blood*.1995; 85, N° 5 : 1151-1168.
- [183]. Greaves MF, Brown G, Rapson NT, Lister TA. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1975; 4:67- 84.
- [184]. 184. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993; 82:1052-70.
- [185]. Garand R, Béné MC & the GEIL. A new approach of acute lymphoblastic leukemia immunophenotypic classification: 1984-1994 the GEIL experience. *Leukemia and Lymphoma*. 1994; 13 (Suppl 1):1-6.
- [186]. Pui CH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Clinical significance of CD10 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1993; 7:35-40.
- [187]. Van't Veer MB, van PuttenWLJ, Verdonck LF. Acute lymphoblastic leukemia in adults: immunological subtypes and clinical features atpresentation. *Annals of Hematology*. 1993; 66:277-82.
- [188]. W. D. Ludwig, A. Reiterb, H. Löfflerc, and al. Immunophenotypic Features of Childhood and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. *Leukemia and Lymphoma*.1994; 13 (1): 71-76.
- [189]. Bernard Husson. Analyse de la maturation des cellules médullaires. Journées de formation en cytométrie organisées par l'ABC-BVC 15 et 16 mai 2002.
- [190]. Rabinowich H, Pricop L, HerbermanRB, Whiteside L. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. *Journal of Immunology* .1994; 152:517-26.
- [191]. Barcena A, Muench MO, Roncarolo MG, Spits H. Tracing the expression of CD7 and other antigens during T- and myeloid-cell differentiation in the human fetal liver and thymus. *Leukemia and Lymphoma*. 1995; 17:1-11.

## Bibliographie

---

- [192]. Sempowski GD, Lee DMN, Kaufman RE, Hanes BF. Structure and function of the CD7 molecule. *Critical Reviews in Immunology*. 1999; 19:331-48.
- [193]. Solary E, Casanovas RO, Campos L, et al. Surface markers in adult myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+, and CD14/DR- phenotypes with shorter survival. *Leukemia*. 1992; 6:393-9.
- [194]. Vidriales MB, Orfao A, Gonzalez M, et al. Expression of NK and lymphoid-associated antigens in blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*. 1993; 7:2026-9.
- [195]. Cortes J.E., Kantardjian H.M., Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*. 1995; 76: 2393-2417.
- [196]. Uckun F.M., Sensel M.G., Sun L., Steinherz P.G., Trigg M.E., Heerema N.A., Sather H.N., Reaman G.H., Gaynon P.S., Biology and treatment of childhood T lineage acute lymphoblastic leukaemia, *Blood*. 1998; 91: 735-746.
- [197]. D. Boban et al. Correlation of Morphological FAB Classification and Immunophenotyping: Value in Recognition of Morphological, Cytochemical and Immunological Characteristics of Mixed Leukaemias. *European journal of Cancer*. 1993; 29A (8) : 1167-1172.
- [198]. V Buccheri, E Matutes, MJ Dyer, D Catovsky. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia*. 1993; 7(6):919-927.
- [199]. F. Lauria, D. Raspadori, G. Martinelli and al. Increased expression of myeloid antigen markers in adult acute lymphoblastic leukaemia patients: diagnostic and prognostic implications. *British Journal of Haematology*. 1994; 87: 286-292.
- [200]. H. Alejandro Preti, M.D and al. Myeloid Markers in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. Correlations with Patient and Disease Characteristics and with Prognosis. *Cancer*. 1995; 76:1564-70.
- [201]. Copelan E.A, Mc Guire E.A, The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 1995;85: 1151-1168.
- [202]. Czuczman M.S., Dodge R.K., Stewart C.C., Frankel S.R, Davey ER., Powell B.L., Szatrowski T.P., Schiffer C.A., Larson R.A., Bloomfield C.D., Value of immunophenotyping in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and leukemia group B study 8364. *Blood*. 1999; 93 : 3931-3939.
- [203]. Ludwig W.D., Rieder H., Bartam C.R., Heinze B., and al, Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukaemia, Results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/87. *Blood*. 1998; 92: 1898-1909.
- [204]. Jennings C.D., Foon K.A., Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancies, *Blood*. 1997; 90: 2863-2892.
- [205]. Kita K, Miwa H, Nakase K, Kawakami K, Kobayashi T, Kobayashi T, et al. Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. *Blood*. 1993; 81:2399-405.

## Bibliographie

---

- [206]. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biological and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*. 1998; 58:278-84.
- [207]. Auewarakul CU, Promsuwicha O, U-Pratya Y, Pattanapanyasat K, Issaragrisil S. Immunophenotypic profile of adult acute myeloid leukemia (AML): analysis of 267 cases in Thailand. *Asian Pac Journal Allergy Immunology*. 2003; 21:153-60.
- [208]. Brown PN, Jesper J, Pedersen-Bjergaard J, Victor MA, Geisler CH. The prognostic significance of chromosomal analysis and immunophenotyping in 117 patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 1997; 21:985-95.
- [209]. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G, et al. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1998; 12:1056-63.
- [210]. Ogata K, Yokose N, Shioi Y, Ishida Y, Tomiyama J, Hamaguchi H, et al. Reappraisal of the clinical significance of CD7 expression in association with cytogenetics in de novo acute myeloid leukaemia. *British Journal of Hematology*. 2001; 115:612-5.
- [211]. Cruse JM, Lewis RE, Pierce S, Lam J, Tadros Y. Aberrant expression of CD7, CD56, and CD79a antigens in acute myeloid leukemias. *Experimental and Molecular Pathology*. 2005; 79: 39 - 41
- [212]. Miwa H, Nakase K, Kita K. Biological characteristics of CD7 (+) acute leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 1996; 21:239-44.
- [213]. Del Poeta G, Stasi R, Venditti A, Cox C, Aronica G, Masi M, et al. CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 1995; 17:111-9.
- [214]. Saito T, Usui N, Dobashi N, Maki N, Asai O, Yano S, et al. Prognostic significance of CD7 expression in adult acute myeloid leukemia. *Rinsho Ketsueki*. 1998; 39:481-6.
- [215]. Andrieu V., Radford-Weiss I., Troussard X., Chane C., Valensi E, Guasnu M., Haddad E, Viguier E, Dreyfus E, Varet B., Flandrin G., Macintyre E., Molecular detection of t(8 ;21)/AML1 -ErO: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype, *British Journal of Haematology*. 1996; 92: 855-865.
- [216]. Ferrara E, Di Noto R., Annunziata M., Copic C., Lo Pardo C., Boccuni P., Sebastio L., Del Vecchio L., Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukaemia, *British Journal of Haematology*. 1998; 102: 444-448.
- [217]. Hurwitz C.A., Raimondi S.C., Head D., Krance R., Mirro J., Kalwinsky D.K., Ayers G.D., Behm EG, Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children, *Blood*. 1992; 80: 3182-3188.
- [218]. Adriaansen H.J., Boekhorst P.A., Hagemeyer A.M., van der Schoot C.E., Delwel H.R., Van Dongen J.J., A leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood*. 1993; 81 :3043-3051.

## Bibliographie

---

- [219]. Pulsoni A., Pagano L., Latagliata R., Casini M., Cerri R., Crugnola M., et al. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004; 89(3): 296-302.
- [220]. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2010; 150:389-405.
- [221]. Huguet F, Leguay T, Raffoux E, Thomas X, Beldjord K, Delabesse E, et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL- 2003 study. *Journal of Clinical and Oncology*. 2009; 27:911-8.
- [222]. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *Journal of Clinical and Oncology*. 2003; 21:3616–22.
- [223]. Clavel J., Goubin A., Auclerc M.F., Auvrignon A., Waterkeyn C., Patte C., et al. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *European Journal of Cancer*. 2004; 13(2): 97-103.
- [224]. Hussein H., Sidhom I., Naga S.A., Amin M., Ebied E., Khairy A., et al. Outcome and prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in children at the National Cancer Institute, Egypt. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2004; 26(8): 507-14.
- [225]. RO Casasnovas ,FKSlimane, R Garand , GC Faure, L Campos, V Deneys , M Bernier , A Falkenrodt , G Lecalvez , M Maynadie and MC Béné. Immunological classification of acutemyeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*. 2003; 17:515–527.
- [226]. S.Belbachir, M. Guenna, A. Krim,B. Entasoltan,N. Yafour,S. Bélaïdi,M.Brahimi, A.Arabi, R. Bouhass,A.Bekadja. et al. Impact pronostic du C- Kit (CD117) dans les leucémies aiguës myéloblastiques : expérience de l'EHU Oran. *Hématologie*. 2019; 25 (supplément 1):79.
- [227]. D. M. Swirsky, M. F. Greaves, R. G. Gray A, J. K. H. Rees. Terminal deoxynucleotidyl transferase and HLA-DR expression appear unrelated to prognosis of acute myeloid leukaemia. *British journal of Haematology*. 1988; 70 :193-198
- [228]. Ching-Hon Pui, Frederick G. Behm, Bahadur Singh, Gaston K. Rivera, and al. Myeloid-Associated Antigen Expression Lacks Prognostic Value in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Intensive Multiagent Chemotherapy. *Blood*. 1990; 75(1): 198-202.
- [229]. S R Wiersma , J Ortega, E Sobel, K I Weinberg. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *New England Journal of Medicine*. 1991; 325(19):1378-82.
- [230]. Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, Melillo L , and al. CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica*. 1998; 83(5):392-7.

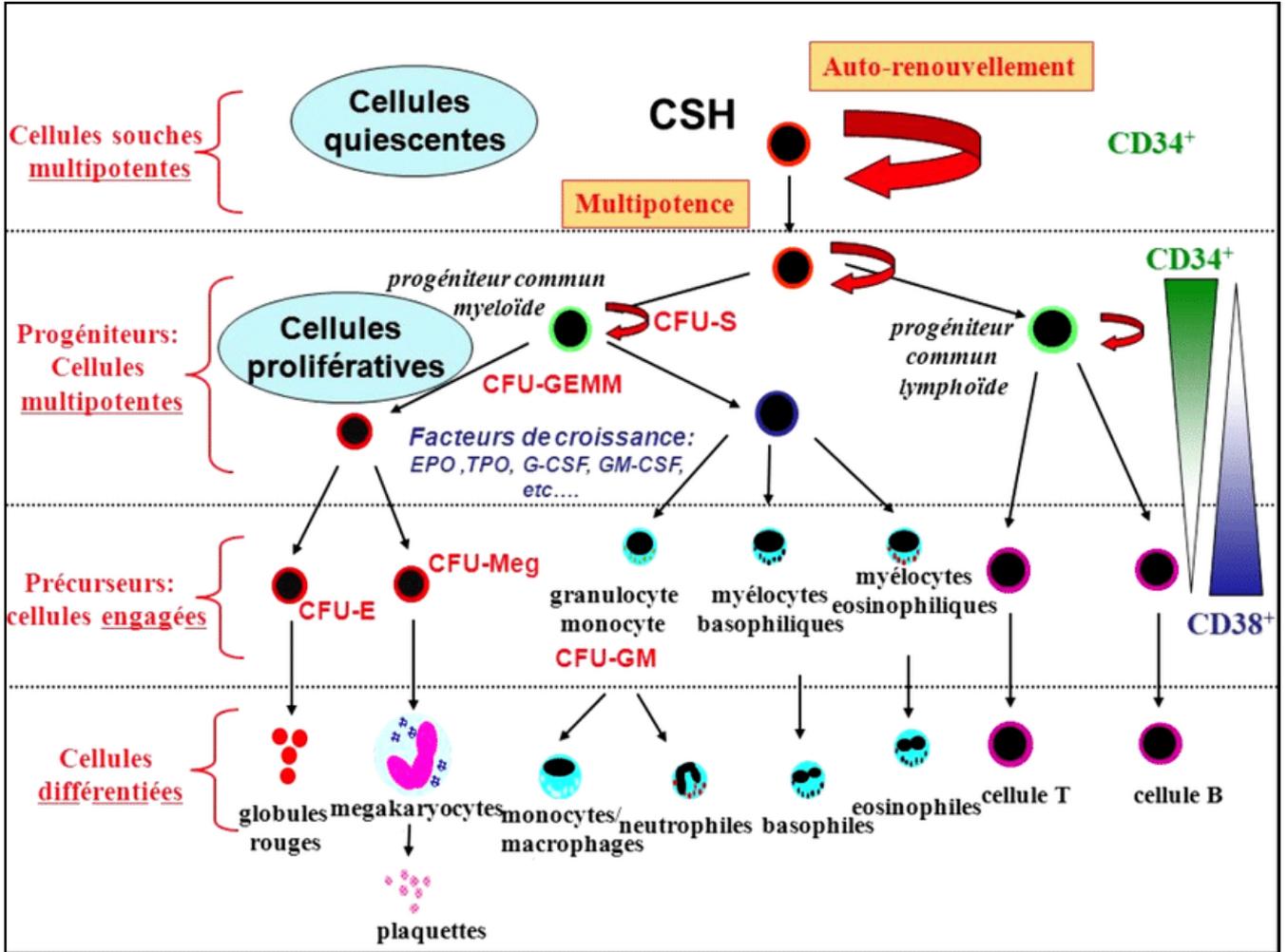
## Bibliographie

---

- [231]. Neame PB, Soamboonsrup P, Browman GP, et al. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*. 1986; 68:1355-1362.
- [232]. Andre-Kerneis E, Vincenot-Blouin A, Fouillard L, Abarah W, Frayfer J, Cassinat B, de Botton S, Saada V. Caractéristiques biologiques des LAM a cup-like nuclei, une entité rare associée à une mutation de NPM1 et de FLT3 : confusion diagnostique possible avec une leucémie aigue promyélocytaire variant microgranulaire ; a propos de trois cas. *Hématologie*. 2013 ; 19 : 279-284.
- [233]. Juneau et al. 2016. <https://www.researchgate.net/figure/Expression-de-CD34-et-de-CD38-par-les-cellules-hematopietiques-durant-les-differents>

# **Annexes**

**Annexe 1 : Schéma de l'hématopoïèse [233].**



**Annexe 2 : Fiche de renseignements**

**1. IDENTIFICATION DU PATIENT**

Date d'hospitalisation : .....

N° du patient : .....

Service demandeur: .....

Noms : .....

Prénom: .....

Date de naissance : .....

Age: .....

Lieu de naissance: .....

Code postal : I \_ I \_ I \_ I \_ I \_ I

Sexe : .....

**2. ANTECEDENTS PERSONNELS**

**Notion de consanguinité**

- Oui
- Non
- Non précisé

**Pathologies malignes antérieure**

- Tumeur solide Date du diagnostic .....
- Pathologie hématologique Date du diagnostic .....
- Non
- Non précisé

**3. ANTECEDENTS FAMILIAUX**

- Oui
- 1er degré  Tumeur solide  Pathologie hématologique  
Nombre
- 2ème degré  Tumeur solide  Pathologie hématologique  
Nombre .....
- 3ème degré  Tumeur solide  Pathologie hématologique  
Nombre .....
- Non
- Non précisé

## 4. DIAGNOSTIC

Date du diagnostic de certitude : I \_ I \_ I \_ I \_ I \_ I

Il s'agit d'une LA primaire « de Novo »

LA secondaire

### Circonstances de découverte

Symptômes Clinique

Date des 1ers symptômes I \_ I \_ I \_ I \_ I \_ I

Fortuite

N.F.S

GB : ..... Hb : ..... Plq : .....

Autres

Non précisé

### Examen clinique

ECOG  0  1  2  3  4

Poids ..... T° : ..... TA : .....

Pâleur cutanéomuqueuse  Absente  Discrète  Modérée  Franche

Fièvre  Oui  Non  Non précisé

Syndrome (Sd) hémorragique  Cutané  Muqueux  Non précisé

Modéré  Sévère  Non précisé

Viscéral

Infection  Oui  Non  Préciser.....

Non précisé

Sd tumoral

{	SPMG	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	DS.....
	HPMG	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	FH.....
	Adénopathies superficielles	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	

Taille : de ..... à .....

Siège .....

Douleurs osseuses, articulaires  Oui  Non

Localisation médiastinale  Oui  Non

Localisation testiculaire  Oui  Non

Signes neurologiques  Oui  Non

Autres localisations : .....

## 5. NATURE DE PRELEVEMENT

Sang périphérique

Moelle osseuse

Autre (préciser)

## 6. LES BILANS AU DIAGNOSTIQUE

### ▪ Hémogramme

**GB** = ..... G/l    **GR**= ..... T/l    **Hb**=..... g /dl    **VGM**=..... fl

**CCMH**=..... g /dl    **TCMH**=.....pg    **PLQ**=..... G /l

### ▪ Frottis sanguin

<b><u>GR :</u></b>
<b><u>GB :</u></b> <b><u>PNN :</u></b> <b><u>PE :</u></b> <b><u>PB :</u></b> <b><u>Lym :</u></b> <b><u>Mono :</u></b> <b><u>Autres cellules :</u></b>
<b><u>Description des blastes</u></b>
<b><u>Plquettes :</u></b>

### ▪ Frottis médullaire

Taux de réticulocytes : ..... G/L

Frottis médullaire : nombre de lames (.....)

Richesse en mégacaryocytes : (nombre) .....

**Lignée granuleuse :** ..... %

**Lignée érythroblastiques :** ..... %

#### **Série neutrophile**

Cellules indifférenciées :

Promyélocyte :

Myélocytes :

Pro érythroblastes :

Erythro.basophiles :

Erythro.polychromatophiles :

Erythro.acidophiles :

Métamyélocytes :  
Poly. Neutrophiles :

**Lignée non myéloïde :       %**

**Série éosinophile :       %**  
Myélocytes :  
Métamyélocytes :  
Poly. Eosinophiles :

**Lymphocyte :  
Monocyte :  
Plasmocyte :**

**Série basophile :       %**  
**Noyaux nus: présents**  
**Cellules difficile à classer:**

**Lignée mégacaryocytaire :  
Phagocytes :**

▪ **Colorations Cyto chimique**

Noir soudan :

▪ **Type de LA**

▪ **Commentaire**

▪ **Résultats de CMF au diagnostic :**

**Marquage membranaire**

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>	<b>PC5.5</b>
CD13 =	CD15 =	CD45	CD117 =
CD36 =	CD14 =	CD45	CD64 =
CD42b=	CD41a=	CD45	/
CD71 =	CD61=	CD45	/
CD65=	Glyco A =	CD45	/
HLADR=	CD13 =	CD45	CD34 =
CD19=	CD10 =	CD45	CD20 =
CD33=	CD7=	CD45	CD2 =
CD3=	CD8=	CD45	CD4 =

## Annexes

CD4=	CD16=	CD45	CD56 =
	CD1a=	CD45	CD5 =
Tdt =	TCR $\alpha/\beta$ =	CD45	/
Igs=	CD38=	CD45	CD20 =
CD19=	CD22=	CD45	CD117=
	CD38=	CD45	CD34=
<b>Marquage intra cytoplasmique</b>			
CD3cyt=	MPO cyt =	CD45	CD79a cyt=
Ch M cyt=	CD22cyt=	CD45	/

s : surface : cyt : cytoplasmique

(Si Ig s+ à rechercher la monotypie Kappa et ou lambda)

▪ **Type de LA :**

▪ **Marqueurs phénotypique aberrants :**

## 7. VOLET THERAPEUTIQUE

### ■ Traitement symptomatique

Date de début de traitement : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

Zyloric  Oui  Non

Transfusion  Oui  Non

Nbre CG : ..... Nbre Plaq : ..... Nbre PFC : ..... Nbre CUP : .....

Corticoïdes  Oui  Non

Réponse aux Corticoïdes :  Oui  Non

Antibiotiques :  Oui  Non

### ■ Traitement spécifique (Chimiothérapie)

Type de protocole :

Date J1 de la 1ère cure : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

Nombre de cures : .....

Evaluation (date) : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I      Jours : J..... Phase : .....

Sang : .....

Moelle : ..... % Blastes : .....

RC1 :  Oui  Non      à J..... (Préciser) Date : .....

Echec :  Oui  Non

Complications :  CIVD  Syndrome de lyse tumoral  Infection  
 Anémie  Hémorragies  Autre Préciser .....

Décès en induction  Non  Oui      Date : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

Causes : .....

Consolidation :  Oui  Non

Intensification :  Oui  Non

Rechute :  Oui  Non      Date de la rechute : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

Blastes résiduels :

Moelle

Neuroméningé isolée

Autres localisations :

**Traitement de relais** :  Oui  Non Type : .....

2<sup>ème</sup> RC :  Oui  Non Date : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

**Grefe de moelle osseuse (GMO)** :  Oui  Non Date : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

En  RC1 (fin d'induction)  RC2 (après rechute)

## 8. Statut du patient à la date des dernières nouvelles

### 1-Rechute :

- a)  Médullaire
- b)  Extra médullaire  Neuroméningé  Testiculaire  Autre .....
- c)  Mixte, Préciser .....

2-Décédé :  Oui  Non **Date du décès** : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

Causes du décès : .....

3-  Perdu de vue Date dernière nouvelle : I \_\_ I \_\_ I \_\_\_\_ I

4-  Vivant RC1  Vivant RC2  Vivant GMO  Vivant Echec

### Annexe 3

#### **Description des Clusters de différenciation essentiels qui regroupent les antigènes recherchés et pour lesquels des anticorps monoclonaux spécifiques ont été utilisés pour déterminer le profil immunophénotypiques des leucémies aiguës de notre étude**

##### ■ **CD45**

Est un marqueur pan-leucocytaire. Son intensité d'expression varie en fonction du type cellulaire, et sur un graphique CD45/SS il permet de cibler les blastes qui expriment plus faiblement le CD45.

##### ■ **CD3**

Est un antigène strictement spécifique de la lignée T, qui est essentiel à l'activité physiologique du lymphocyte T puisqu'il va transmettre le signal d'activation induit par l'engagement du TCR dans une réaction immunitaire. Durant la lymphopoïèse T, le CD3 ne sera pas tout de suite exprimé sur la membrane cellulaire, il va tout d'abord apparaître en intracytoplasmique au stade d'Early Thymique Progenitor (ETP). Il ne sera exprimé en surface seulement une fois que les réarrangements géniques auront permis la production d'un TCR fonctionnel, à partir du stade double positif. Selon la classification EGIL, le CD3 n'est exprimé en surface que dans le type le plus mature de LAL-T, les LAL-T de type IV. On note cependant que certaines LAL-T vont co-exprimer du CD3 de surface et du CD1a (signant une LAL-T III selon EGIL)[65]. En termes d'intensité d'expression, le CD3 est plus faiblement exprimé par les blastes que par les lymphocytes T matures normaux.

##### ■ **CD4 et CD8**

Sont exprimés par les thymocytes puis par respectivement 2/3 et 1/3 des lymphocytes T matures. Le CD4 peut être également exprimé à un niveau plus faible par les monocytes, les macrophages et certaines cellules dendritiques. Dans la population lymphocytaire T normale, les lymphocytes T expriment le CD4 ou le CD8, jamais les 2 simultanément. Les cellules pouvant exprimer à la fois du CD4 et CD8 sont les thymocytes doubles positifs

qui sont exclusivement localisés au niveau du thymus. La co-expression du CD4 et du CD8 au niveau médullaire ou du sang signe donc la présence de cellules leucémiques, et constitue un LAIP qui permettra le suivi de la maladie résiduelle.

### ■ CD7

Protéine transmembranaire, membre de la superfamille des immunoglobulines, exprimée par les thymocytes, les lymphocytes T et NK. CD7 joue un rôle essentiel dans les interactions cellulaires entre lymphocytes T et dans les interactions entre lymphocytes T et lymphocytes B au cours du processus de maturation lymphocytaire.

### ■ CD10

Est exprimé à un stade plus tardif que le CD34 au cours de la lymphopoïèse T, et son expression est brève. Ces deux marqueurs ne sont exprimés au diagnostic de LAL-T que dans une minorité de cas, mais quand ils sont présents ils sont des marqueurs utiles au suivi de la MRD, d'autant plus que leur niveau d'expression reste stable après traitement contrairement aux CD99 et TdT [66].

### ■ CD13

Metalloprotéase membranaire exprimée par les progéniteurs granulocytaires, monocytaires précoces et les cellules matures de ces lignées. Le CD13 joue un rôle dans la présentation des antigènes à la surface des cellules par l'excision des acides aminés N-terminaux des peptides liés au CMH de classe II.

### ■ CD14

Récepteur à endotoxine (lipopolysaccharide) exprimé en particulier par les cellules monocytaires et macrophagiques. Le CD14 joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée anti-bactérienne. Il est particulièrement positif dans les LAM à différenciation monocyttaire (LAM4 et LAM5).

### ■ CD19

Glycoprotéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines, présente à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques folliculaires du système hématopoïétique. Le CD19 est un régulateur crucial dans le développement, l'activation et la différenciation des

lymphocytes B. À la surface des lymphocytes B, le CD19 s'associe aux CD21, CD81 et CD225 pour former un complexe de transduction du signal.

### ■ **CD33**

Molécule d'adhésion appartenant à la famille des **SIGLECS** (Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin), impliquée dans les interactions entre cellules. CD33 est fortement exprimé par les myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et monocytes [92]. Il est positif dans 85 à 90% des LAM.

### ■ **CD34**

Est l'un des marqueurs apparaissant le plus précocement pendant l'hématopoïèse et sera exprimé par de nombreux progéniteurs hématopoïétiques. Dans la lymphopoïèse T, son expression sera rapidement perdue, au stade "early prothymocyte" [66].

### ■ **CD38**

Glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et la transduction du signal. CD38 est exprimé sur les thymocytes et également à la surface des lymphocytes T, lymphocytes B et cellules NK, expression augmentée au moment de l'activation lymphocytaire.

### ■ **CD56 et CD16**

Le **CD56** est un antigène présent sur les cellules NK. Le **CD16** est exprimé par les cellules NK, les monocytes et macrophages et par les polynucléaires neutrophiles.

L'utilisation d'anticorps anti CD16 et anti CD56 dans notre panel nous permet de cibler et d'exclure de l'analyse les cellules NK normales. De plus, certaines leucémies expriment de façon aberrante ces antigènes.

### ■ **CD64**

Glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des récepteurs du complément. CD64 a la particularité d'avoir une forte affinité pour la partie constante Fc des IgG. Il a un rôle dans l'initiation et l'adaptation de la réponse immunitaire. Il est principalement exprimé par les macrophages, les monocytes.

### ■ **CD79a**

Glycoprotéine membranaire qui, associé au CD79b, forme le récepteur hétérodimérique des lymphocytes B (BCR). Ce récepteur est responsable de la signalisation des lymphocytes B.

C'est l'équivalent du CD3 pour les lymphocytes B. Il est exprimé à tous les stades de maturation des cellules B, depuis le lymphocyte pré-B précoce jusqu'au plasmocyte.

### ■ **CD117**

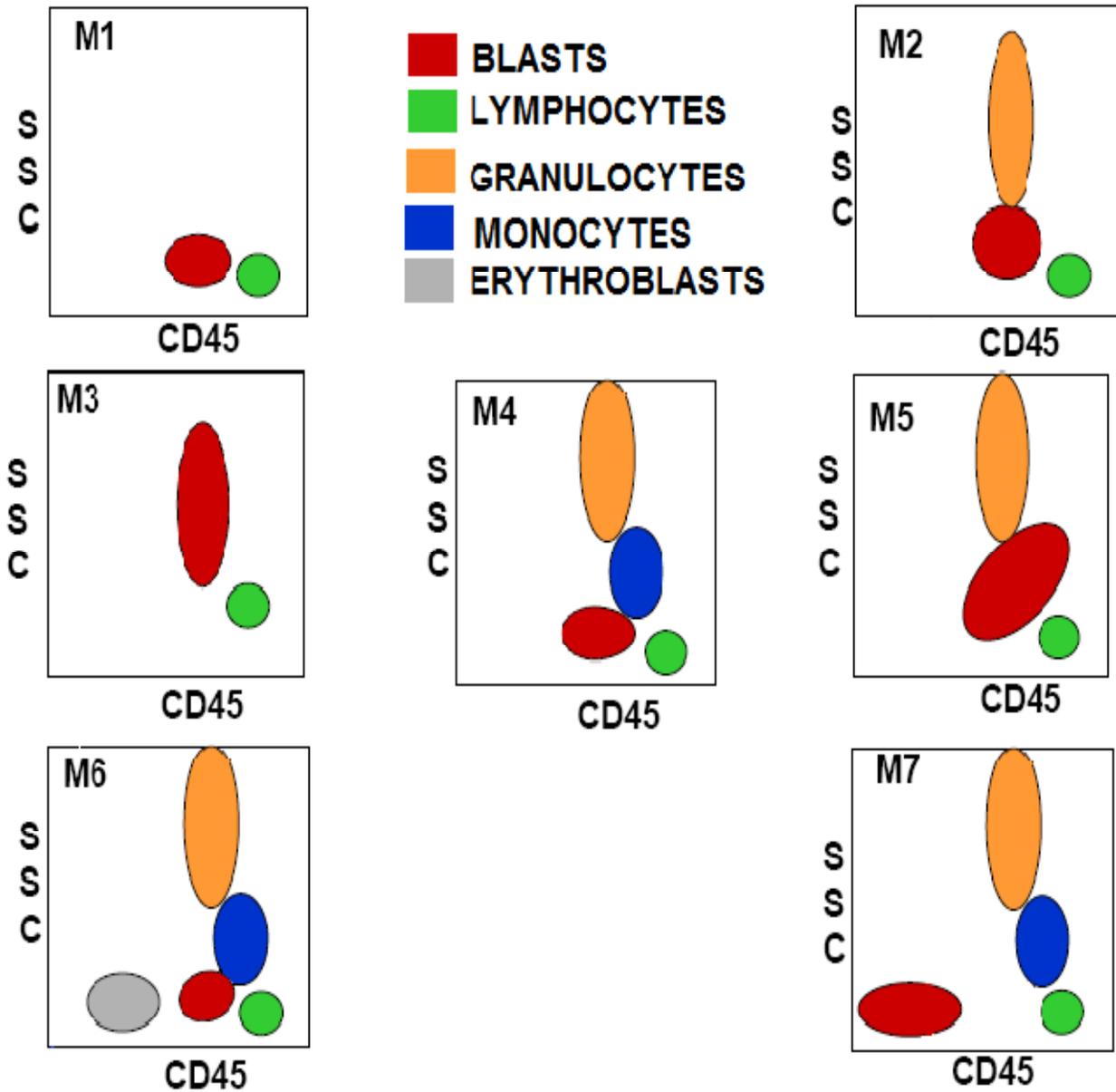
Récepteur tyrosine kinase du CSF codé par l'oncogène c-kit. Le CD117 est exprimé par les myéloblastes, les cellules érythrocytaires primitives, quelques mégacaryoblastes et par les cellules mastocytaires.

### ■ **TdT**

Le terminal deoxy nucleotidyl transferase est une ADN polymérase qui participe à l'addition de nucléotides pendant les réarrangements des gènes du TCR et des immunoglobulines. De manière physiologique la TdT est fortement exprimée par les thymocytes corticaux immatures, puis son expression sera perdue dans les cellules T matures normales périphériques. Sa présence sur des cellules T sanguines ou médullaires est donc anormale. La TdT est retrouvée de façon pathologique dans les LAL-T, les LAL-B à précurseurs B et dans environ 5% des LAM.

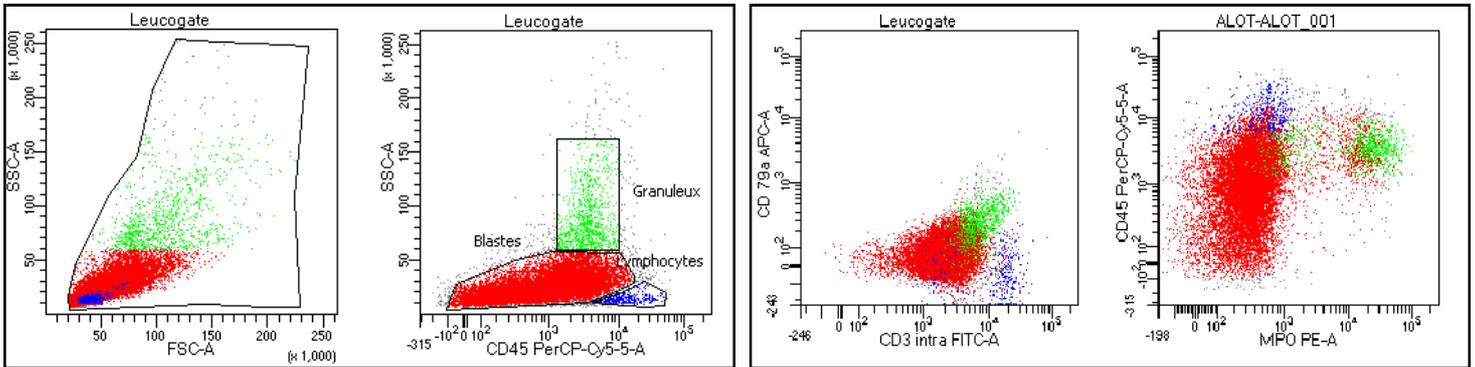
**Annexe 4**

Corrélation entre les différents sous types de LAM selon FAB et le profil des dots plot CD45/SSC [133].



**Annexe 5 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

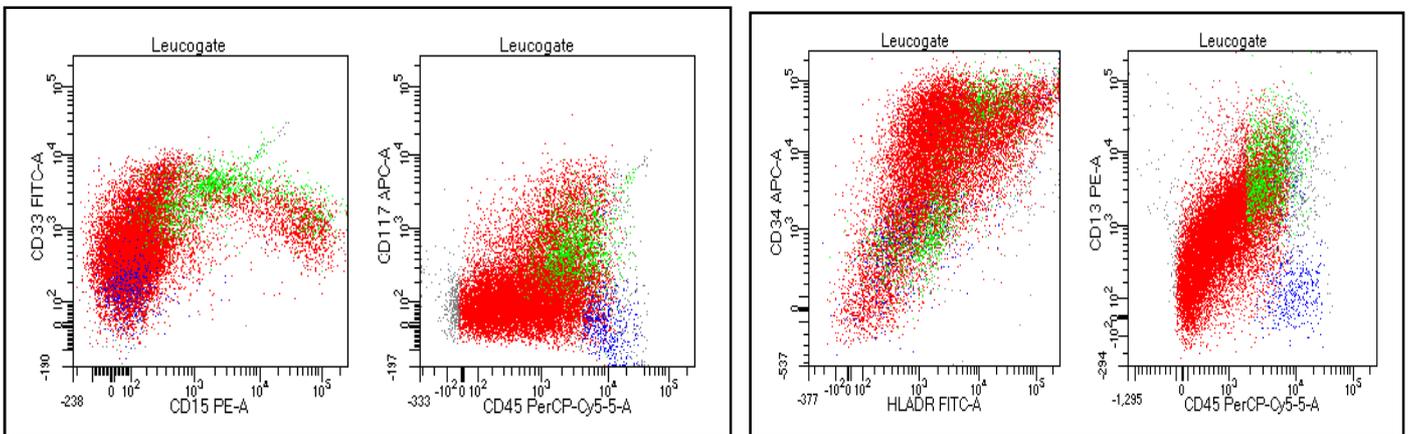
**Cas d'une LA sans maturation : LAM0**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des blastes.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe montre une MPOcyt négative.



Représentation biparamétrique des marqueurs myéloïdes : CD33-CD15 après marquage de surface. Ce graphe montre CD33 positif et CD15 négatif.

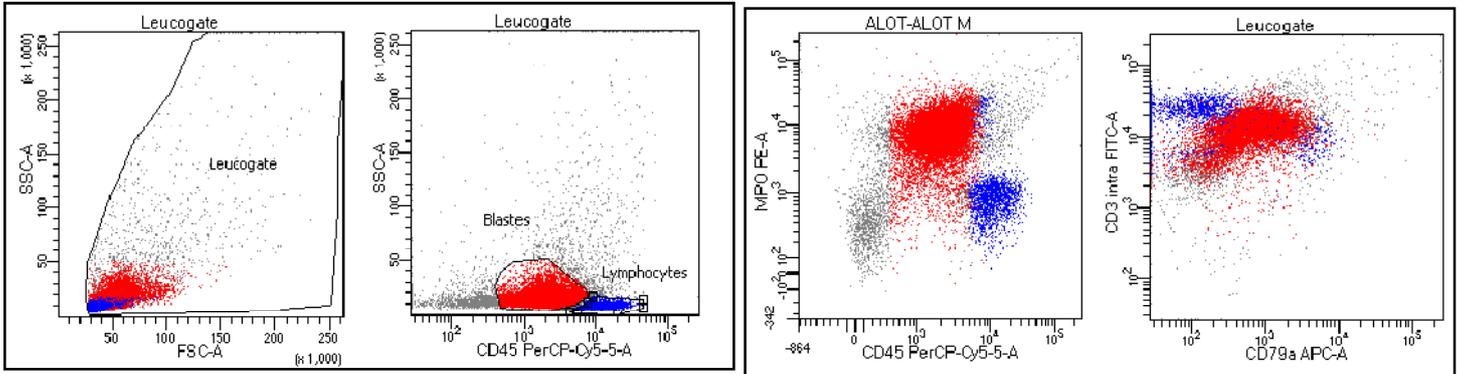
Représentation biparamétrique des marqueurs CD117-CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la faible positivité du marqueur myéloïde CD117.

Représentation biparamétrique des marqueurs HLADR- CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité des deux marqueurs.

Représentation biparamétrique des marqueurs CD13- CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la positivité de CD13 marqueur pan myéloïde.

**Annexe 6 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

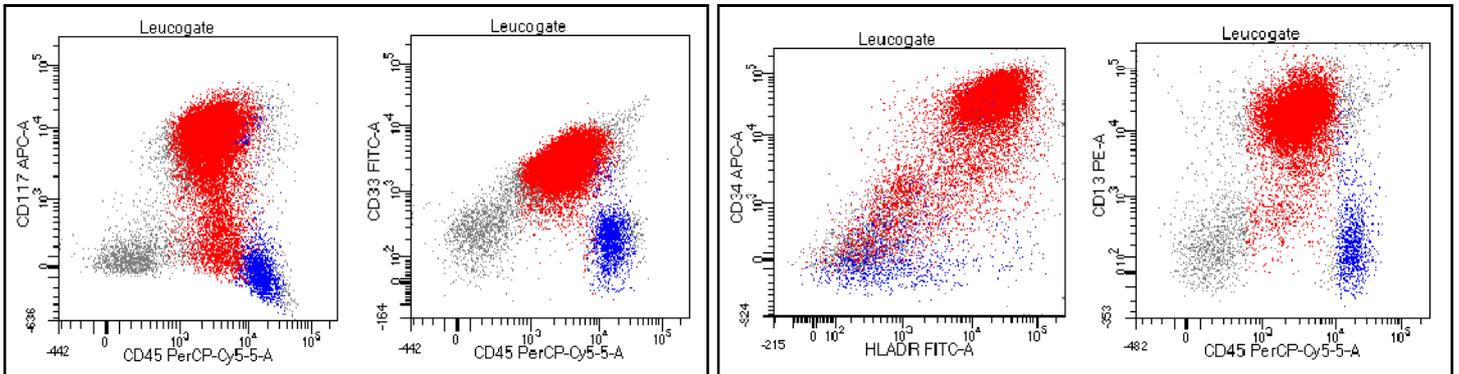
**Cas d'une LA à maturation minimale : LAM1**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des blastes.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe montre une MPOcyt positive.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.



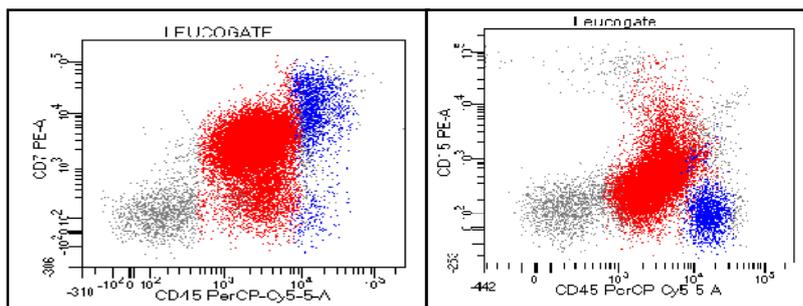
Représentation biparamétrique des marqueurs CD117-CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité du marqueur myéloïde CD117.

Représentation biparamétrique des marqueurs CD13- CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la positivité de CD33 marqueur pan myéloïde.

Représentation biparamétrique des marqueurs HLADR- CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité des deux marqueurs.

Représentation biparamétrique des marqueurs CD13- CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité de CD13 marqueur pan myéloïde.

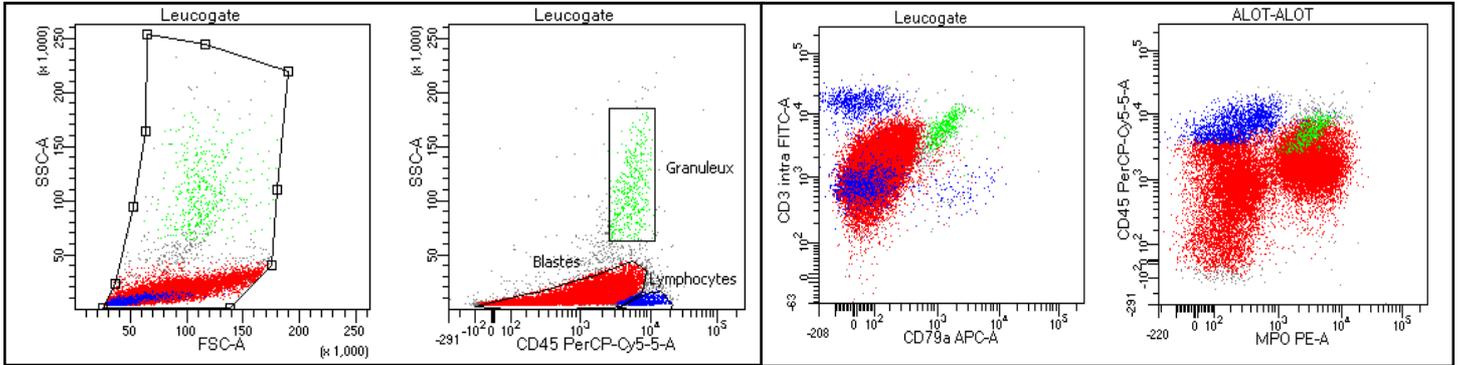
Ce graphe montre une forte positivité du CD7 marqueur aberrant.



Ce graphe montre une faible positivité du CD15 marqueur myéloïde de maturation.

**Annexe 7 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

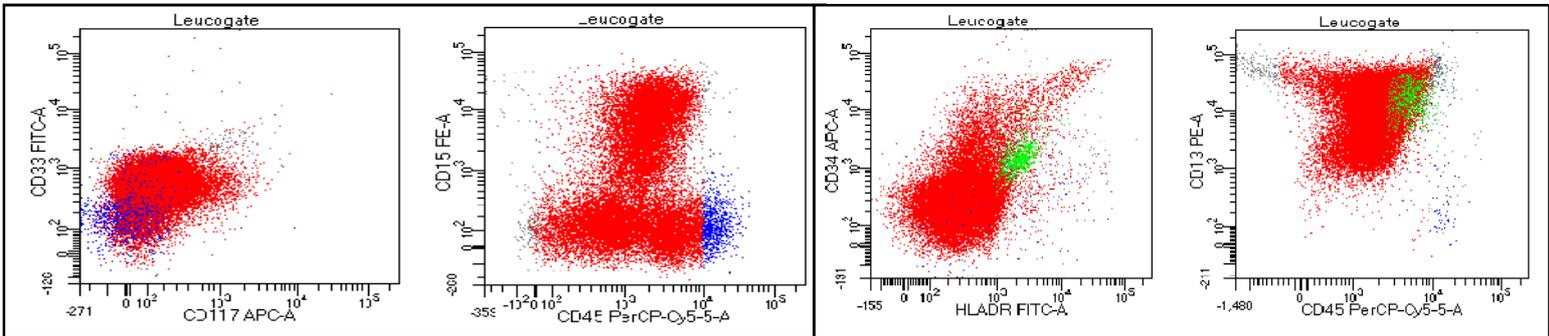
**Cas d'une LA à maturation : LAM2**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des blastés.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastés : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastés. Ce graphe montre une MPOcyt fortement positive.



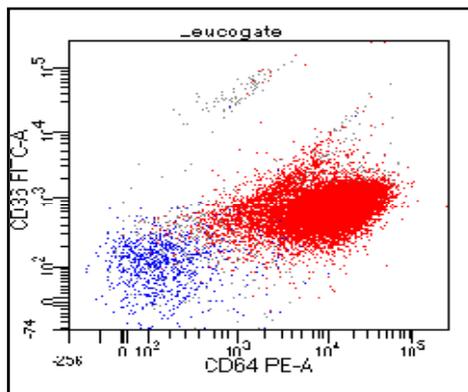
Représentation biparamétrique des marqueurs CD117-CD33 après marquage de surface. Ce graphe montre la positivité des deux marqueurs myéloïdes.

Ce graphe montre une forte positivité du CD15 marqueur myéloïde de maturation.

Représentation biparamétrique des marqueurs HLADR- CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre CD34 faible, HLADR négatif.

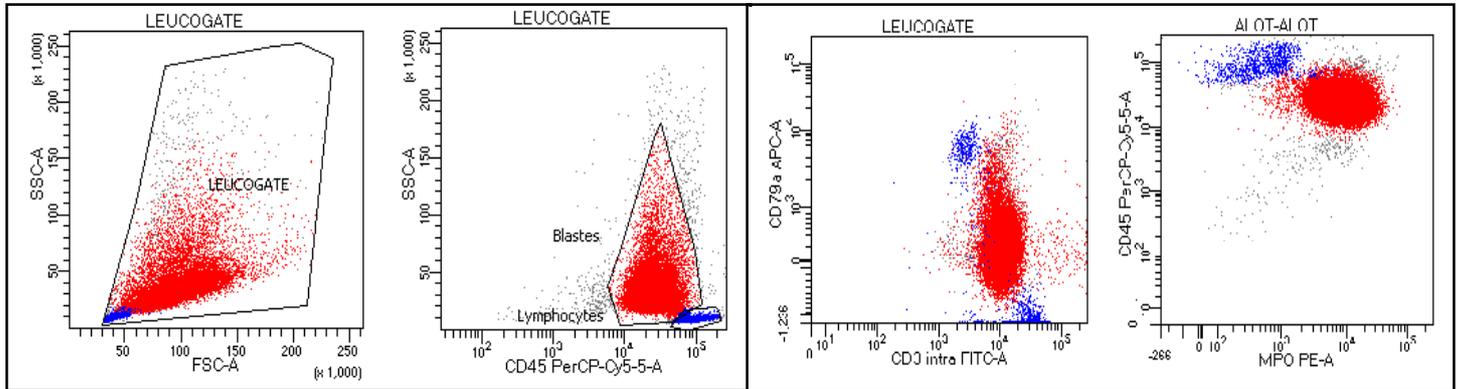
Représentation biparamétrique des marqueurs CD13-CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité de CD13 marqueur pan myéloïde.

Représentation biparamétrique des marqueurs monocytaires CD64-CD36 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité des deux marqueurs sur les blastés, qui signifie l'engagement des cellules leucémiques vers la lignée monocyttaire.



**Annexe 8 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

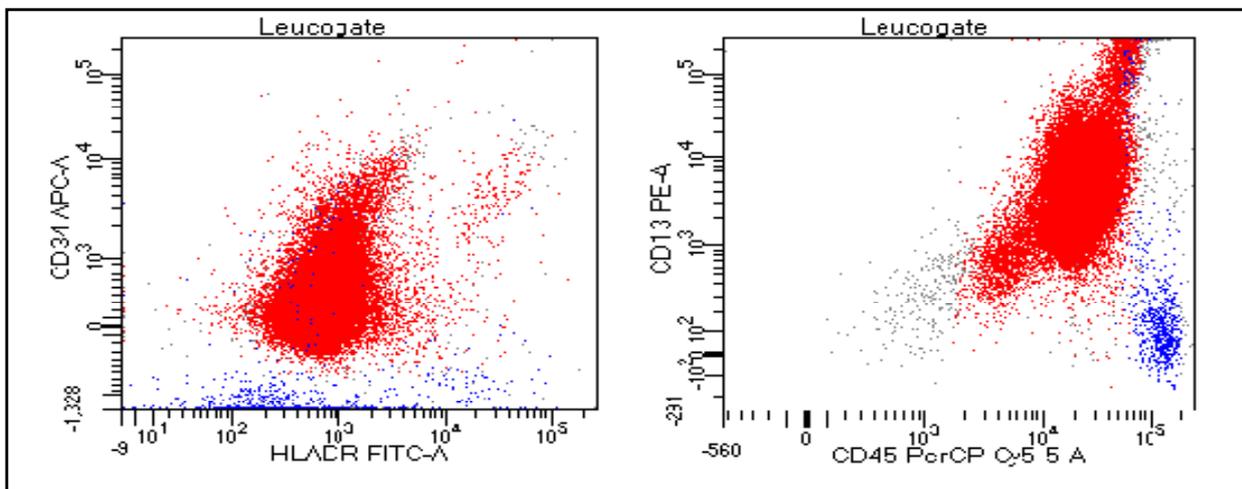
**Cas d'une LA promyélocytaire : LAM3 typique**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des blastes qui ont la forme d'une flamme dans la LAM3

Panel d'orientation, marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.

Panel d'orientation, marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe montre une MPOcyt fortement positive.

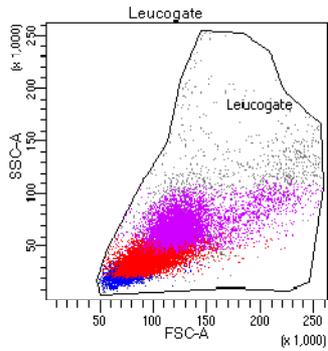


Représentation biparamétrique des marqueurs d'immaturité HLADR-CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre CD34 faible, HLADR négatif.

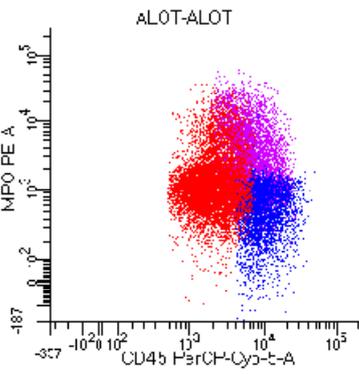
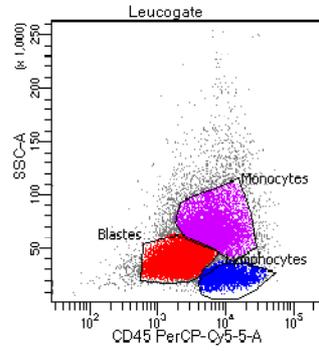
Représentation biparamétrique des marqueurs CD13- CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité de CD13 marqueur pan myéloïde.

**Annexe 9 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

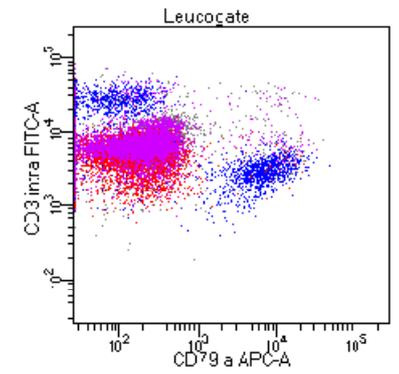
**Cas d'une LA myélomonocytaire : LAM4**



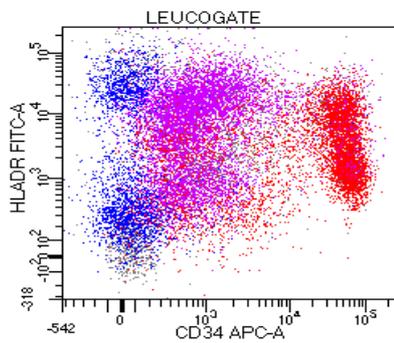
Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des blastes et les monocytes.



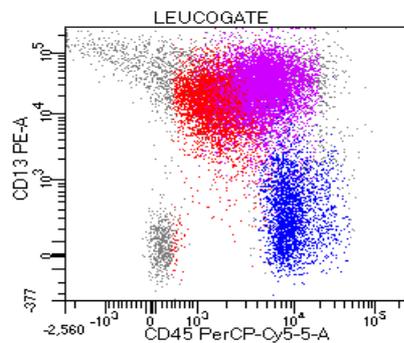
Marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe montre une MPOcyt positive sur blastes et les monocytes.



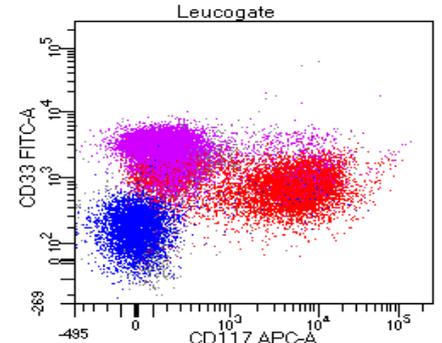
Panel d'orientation, marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.



Représentation biparamétrique des marqueurs d'immaturité HLADR-CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre CD34 et HLADR fortement positif.



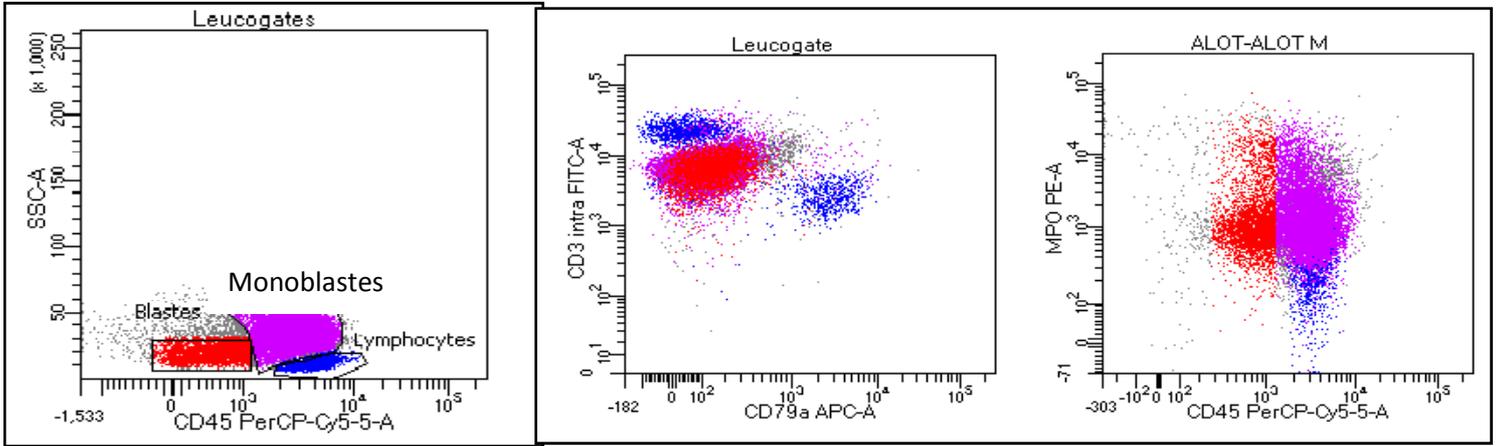
Représentation biparamétrique des marqueurs CD13- CD45 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité du CD13 marqueur pan myéloïde sur les blastes et les monocytes.



Représentation biparamétrique des marqueurs CD33-CD117 après marquage de surface. Ce graphe montre la forte positivité du CD117 et la négativité du CD33 sur les blastes.

**Annexe 10 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée myéloïde. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

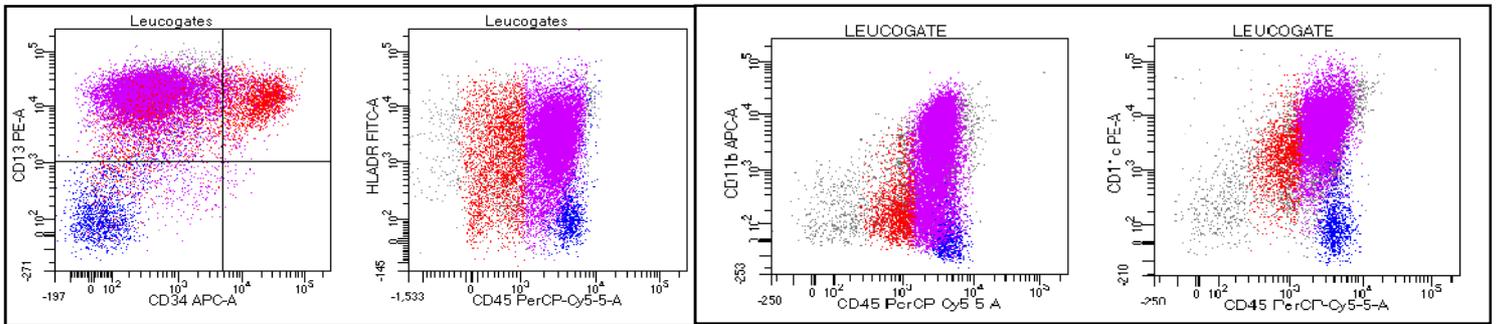
**Cas d'une LA monoblastique : LAM5b**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC après marquage de surface pour l'identification des monoblastes.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : représentation biparamétrique des CD3cyt-CD79a qui sont négatifs.

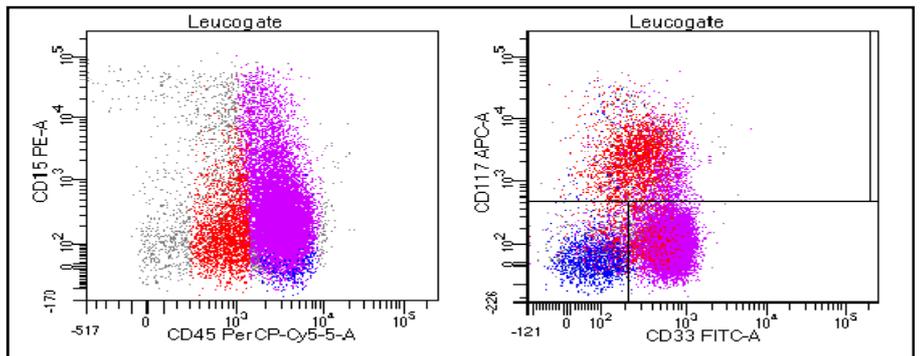
Panel d'orientation, marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. La MPOcyt est faiblement positive sur les monoblastes



Ces deux graphes biparamétriques montrent la forte positivité des monoblastes pour le CD13, HLADR et la négativité du CD34, en marquage de surface.

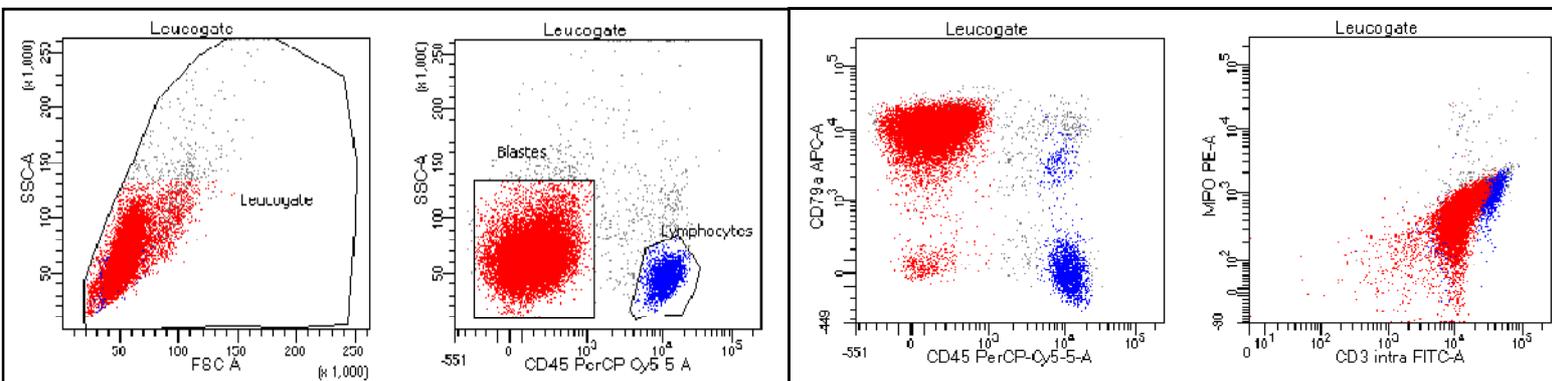
Ces deux graphes biparamétriques montrent la forte positivité des monoblastes pour les marqueurs monocytaires CD11c et CD11b, en marquage de surface.

Ces deux graphes biparamétriques montrent : les monoblastes expriment fortement le CD33, faiblement le CD15 et CD117 négatif. Le marquage est fait en surface.



**Annexe 11 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée lymphoïde B. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

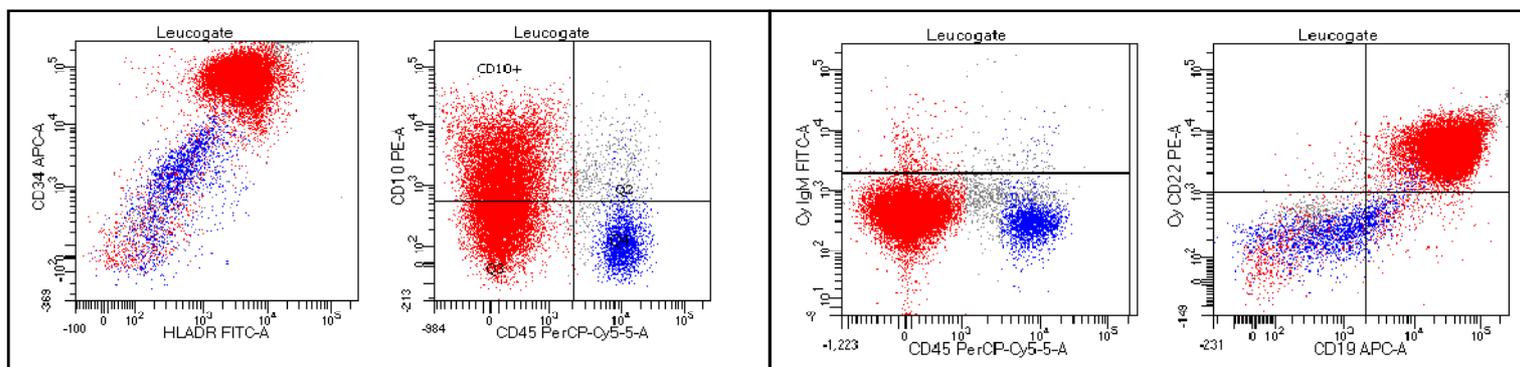
**Cas d'une LAL B sous type II (LALB Commune)**



Représentation mono-paramétrique CD45/SSC en marquage de surface pour l'identification des blastes qui sont dans ce cas : CD45 négatif.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde des blastes : CD79a positif un marqueur lymphoïde B. Il s'agit d'une LALB.

Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe biparamétrique montre une MPOcyt et CD3cyt négatifs.

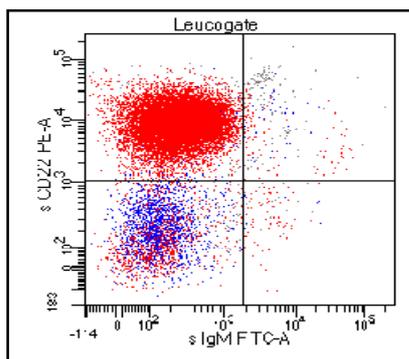


Représentation biparamétrique des marqueurs HLADR- CD34 après marquage de surface. Ce graphe montre CD34 et HLADR fortement positifs.

Ce graphe montre un CD10 positif permettant de déterminer le sous type de la LALB.

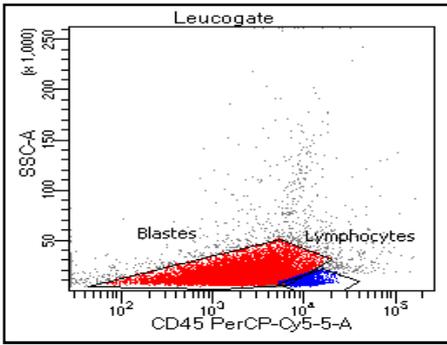
Graphes biparamétriques qui montrent des lymphoblastes exprimant fortement les marqueurs lymphoïdes B : CD22cyt en marquage intracytoplasmique et le CD19 en surface, avec la négativité de la chaîne mu en intracytoplasmique.

Graphe biparamétrique CD22s-IgMs après marquage de surface. CD22s fortement positif, IgMs négatif.

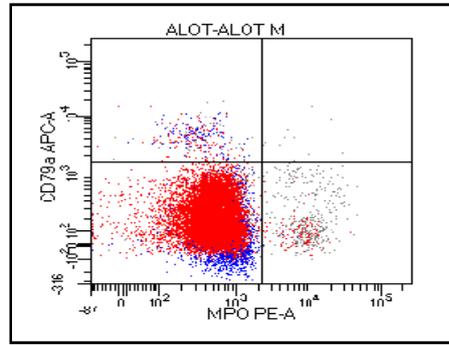


**Annexe 12 :** Cytogrammes de détection des blastes par CMF et leur assignement à la lignée lymphoïde T. (Images de la plate forme de CMF du laboratoire d'hémobiologie du CHU Tizi Ouzou).

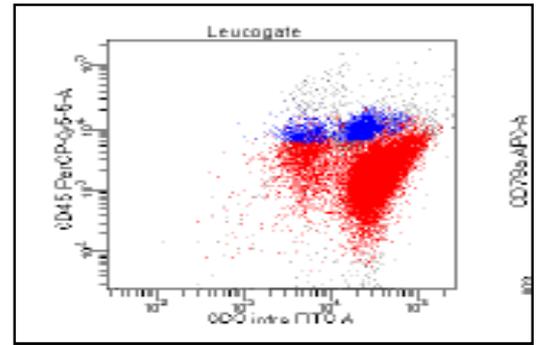
**Cas d'une LALT sous type III (LALT cortical)**



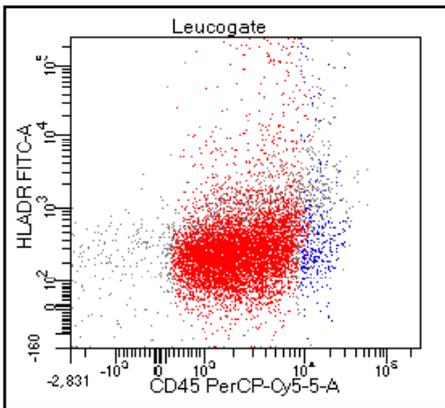
Représentation mono-paramétrique CD45/SSC en marquage de surface pour l'identification des blastes qui sont dans ce cas : CD45 faible.



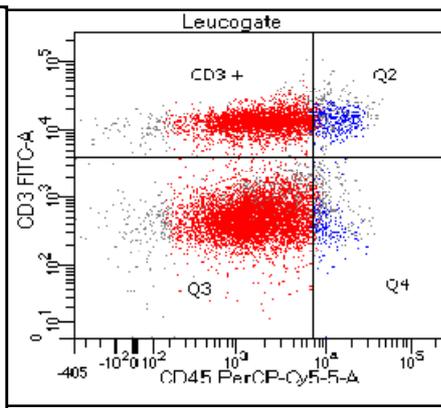
Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde ou myéloïde des blastes. Ce graphe biparamétrique montre une MPOcyt et CD79acyt négatifs.



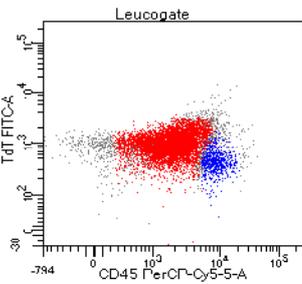
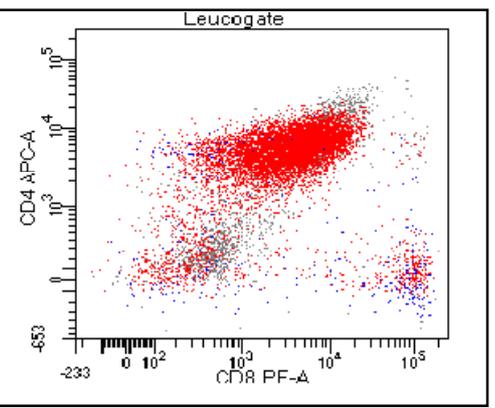
Panel d'orientation après marquage intracytoplasmique pour déterminer la nature lymphoïde T des blastes. Ce graphe biparamétrique CD3cyt-CD45 montre un CD3cyt positif, il s'agit de blastes T (LALT).



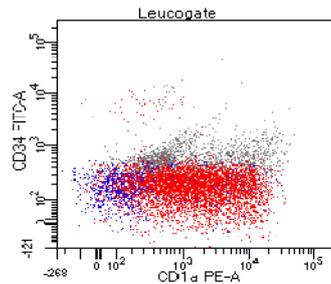
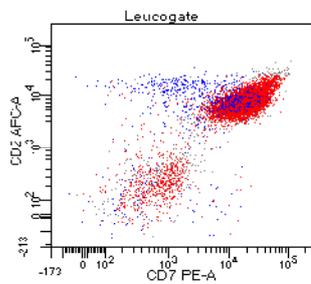
Graphe biparamétrique CD45-HLDR marquage de surface. Montre des blastes T à HLADR négatif.



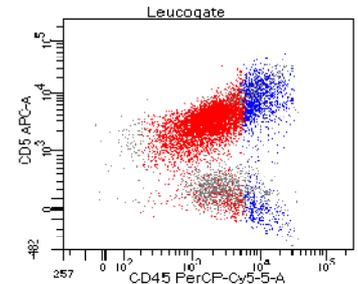
Graphes biparamétriques qui montrent des lymphoblastes exprimant fortement les marqueurs lymphoïdes T : CD4, CD8 et faiblement le CD3 en surface.



Graphes biparamétriques qui montrent des lymphoblastes exprimant les marqueurs lymphoïdes T précoces : CD7, CD2 et le Tdt en intracytoplasmique.



Graphes biparamétriques qui montrent des lymphoblastes exprimant les marqueurs lymphoïdes T : CD5 et le CD1a (marqueur T cortical) avec la négativité du CD34.



## Résumé :

L'immunophénotypage par CMF est devenue une technique incontournable dans la stratégie diagnostique des LA, à côté de l'examen cytomorphologique. Il permet de confirmer la lignée cellulaire engagée dans le processus leucémique, et de préciser le stade de blocage des blastes dans leur différenciation pour identifier et/ou préciser le diagnostic des diverses formes de LA.

L'objectif de ce travail est d'étudier le profil immunophénotypique d'un ensemble de cas de LA de « novo » diagnostiqués au laboratoire d'hémobiologie du CHU de Tizi-Ouzou, par la technique de CMF, et de déterminer le lien entre la fréquence d'expression de certains marqueurs antigéniques et le pronostic des patients.

Le diagnostic de la LA a été posé sur sang et/ou moelle par étude cytomorphologique selon FAB, les échantillons ont été traités par CMF sur deux types de cytomètres, l'EPICS XL (Beckman Coulter) et l'ACCURI (Beckton Dickinson) à 4 couleurs après marquage par un panel d'anticorps monoclonaux. Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive et prospective.

234 LA ont été diagnostiquées dont 70 (30%) chez l'enfant et 164 (69,6%) chez l'adulte. Parmi les 234 patients, 82 (35 %) cas de LAL (43 LAL chez l'enfant et 39 LAL chez l'adulte) et 145(62%) cas sont des LAM (121 cas chez l'adulte et 24 cas chez l'enfant). Sur les 82 cas de LAL 59 (72 %) cas sont des LALB et 23 (28 %) cas de LAL T. De très rares cas de LA biphénotypiques ont été recensés 7/234 (3%) cas. 01cas de LpDC et 03 cas de de LAM à Cup Like que nous avons distingués des LAM3 variantes. L'âge moyen des patients adultes : 45 ans  $\pm$  16,25(19ans -78ans), chez l'enfant l'âge médian : 5,4 ans  $\pm$  6,2 (7 mois -18 ans). Le délai moyen de survie 40,68 mois pour les patients dont l'âge  $\leq$ 60ans vs 15,87 mois pour les patients dont l'âge > 60ans ; p=0,01. Le délai moyen de survie est de 24,11 mois pour les patients dont le taux de GB < 50G/L vs 11,07 mois pour les patients avec un taux de GB  $\geq$ 50 G/L; p=0,008. Dans la série enfants : l'incidence des LAL (61% ) chez l'enfant est nettement plus élevée par rapport aux LAM (34%) ; p=0,001 et les LALB(76%) sont plus élevés par rapport aux LALT(23%) ; p<0.001. L'anémie est plus fréquente dans les LAL B 94% vs 70 % dans les LAL T (p=0,012). L'hyperleucocytose > 30 G/L est retrouvée dans 36 % des LALB vs 60 % des LAL T. Globalement, la fréquence d'expression des marqueurs antigéniques montre une prédominance des marqueurs suivants : HLADR, CD19, CD79a et le CD10 dans les LALB, et de la MPOcyt, CD13, CD117 et le CD33 dans les LAM. L'expression du CD15 a montré un impact significatif sur la survie globale ; p=0.002. Le délai moyen de survie est de 45 mois pour le groupe CD15+ vs 16 mois pour le groupe CD15(-) avec des taux de survie globale à 5 ans de 47% et 14% respectivement. Contrairement à la série enfants LAM, le groupe d'enfants CD15(-) et CD15(+) ont une moyenne de survie de 18 mois et 6 mois respectivement ; p=0.04. Dans les LALT de l'adulte, les délais moyens de survie sont de 56 et 17 mois pour les CD4+ et CD4(-) respectivement ; p=0,05. Chez les enfants LALT l'impact pronostic des antigènes CD2 et CD8 a été observé. Les patients enfants LALT CD8(+) ont une meilleure survie que les groupes CD8(-); p=0,01. De même les patients CD2 (-) ont une survie nettement meilleure que les patients CD2(+);p=0,03. Les taux de survie globale des groupes de patients CD34(+)/CD34(-) et HLADR(+)/HLADR (-) sont faibles mais les moyennes de survie sont meilleure en cas d'absence du CD34 et du HLADR malgré la non significativité statistique; p>0,05.

Ce travail souligne la place indispensable de l'immunophénotypage, en complément de l'analyse cytomorphologique, dans le diagnostic et la classification des LA, à reconnaître des entités rares et à orienter le pronostic par l'expression ou non de certains marqueurs antigéniques.

**Mots clés :** Leucémies aiguës, Leucémies aiguës lymphoïdes, Leucémies aiguës myéloïdes, Leucémies aiguës biphénotypiques, Classification FAB des leucémies aiguës, Classification OMS des leucémies aiguës, Immunophénotypage, Cytométrie en flux, Marqueurs antigéniques, Survie globale, Délai moyen de survie globale.

**Directeur de thèse :**

**Pr HAIRECHE**

Laboratoire d'hémobiologie et banque de sang  
Faculté de médecine de Tizi Ouzou

**Auteur :**

**Dr F.KESSAL**

Laboratoire d'hémobiologie et banque de sang  
Faculté de médecine de Tizi Ouzou

## Abstract:

Immunophenotyping by FCM has become an essential technique in the diagnostic strategy of AL, alongside cytomorphological examination. It makes it possible to confirm the cell line involved in the leukemic process, and to specify the stage of blocking of the blasts in their differentiation in order to identify and / or specify the diagnosis of the various forms of AL.

The objective of this work is to study the immunophenotypic profile of a set of de “*novo*” AL cases diagnosed in the hemobiology laboratory of the Tizi-Ouzou University Hospital, by the FCM technique, and to determine the link between the frequency of expression of certain antigen markers and the prognosis of the patients.

The diagnosis of AL was made on blood and / or marrow by cytomorphological study according to FAB; the samples were treated with FCM on two types of cytometers, EPICS XL (Beckman Coulter) and ACCURI (Beckton Dickinson) at 4 colors after labeling with a panel of monoclonal antibodies. This is a cross-sectional study with a descriptive and prospective aim.

234 AL were diagnosed, including 70 (30%) in children and 164 (69.6%) in adults. Among the 234 patients, 82 (35%) cases of ALL (43 ALL in children and 39 ALL in adults) and 145 (62%) cases are AML (121 cases in adults and 24 cases in child). Of the 82 cases of ALL, 59 (72%) cases are B-ALL and 23 (28%) cases of T-ALL. Very rare cases of biphenotypic AL were identified 7/234 (3%) cases. 01 cases of LpDC and 03 cases of AML to Cup Like that we have distinguished from the AML3 variants. The mean age of adult patients: 45 years  $\pm$  16, 25 (19 years -78 years), in children the median age: 5, 4 years  $\pm$  6.2 (7 months -18 years). The mean survival time 40.68 months for patients aged  $\leq$  60 years vs 15.87 months for patients aged  $>$  60 years;  $p = 0.01$ . The mean survival time is 24, 11 months for patients with a GB rate  $<$ 50G/L vs 11, 07 months for patients with a GB rate  $\geq$  50 G/L;  $p = 0.008$ . In the children's series: the incidence of ALL (61%) in children is significantly higher compared to AML (34%);  $p = 0.001$  and B-ALL (76%) are higher compared to T-ALL (23%);  $p < 0.001$ . Anemia is more common in B-ALL 94% vs 70% in T-ALL ( $p = 0.012$ ). Hyperleukocytosis  $>$  30 G /L is found in 36% of ALL vs 60% of T-ALL. Overall, the frequency of expression of antigenic markers shows a predominance of the following markers: HLADR, CD19, CD79a and CD10 in B-ALL, and MPOcyt, CD13, CD117 and CD33 in AML. Expression of CD15 has shown a significant impact on overall survival;  $p = 0,002$ . The mean survival time is 45 months for the CD15 + group vs 16 months for the CD15 (-) group with overall 5 year survival rates of 47% and 14% respectively. Unlike the AML children's series, the CD15 (-) and CD15 (+) group of children have an average survival of 18 months and 6 months respectively;  $p = 0, 04$ . In adult ALL T, the mean survival times are 56 and 17 months for CD4 + and CD4 (-) respectively;  $p = 0, 05$ . In T-ALL children the prognostic impact of CD2 and CD8 antigens has been observed. T-ALL CD8 (+) child patients have better survival than CD8 (-) groups;  $p = 0.01$ . Similarly, CD2 (-) patients have significantly better survival than CD2 (+) patients;  $p = 0, 03$ . The overall survival rates of the patient groups CD34 (+) / CD34 (-) and HLADR (+)/ HLADR (-) are low but survival means are better in the absence of CD34 and HLADR despite the statistical insignificance;  $p > 0, 05$ .

This work underlines the essential place of immunophenotyping, in addition to cytomorphological analysis, in the diagnosis and classification of AL, in recognizing rare entities and in guiding the prognosis by the expression or not of certain antigenic markers.

**Key words:** Acute leukemias, Acute lymphoid leukemias, Acute myeloid leukemias, Acute biphenotypic leukemias, FAB classification of acute leukemias, WHO classification of acute leukemias, Immunophenotyping, Flow cytometry, Antigenic markers, Overall survival, Mean time to overall survival.

**Supervisor:****Pr H.AIRECHE**

Hemobiology laboratory and blood bank  
Faculty of Medicine of Tizi Ouzou

**Author:****Dr F.KESSAL**

Hemobiology laboratory and blood bank  
Faculty of Medicine of Tizi Ouzou