

# LISTE DES ABREVIATIONS

|               |                                                                         |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>APC</b>    | : Allo Phyco Cyanine                                                    |
| <b>AREB-T</b> | : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos en Transformation            |
| <b>B</b>      | : Lymphocyte B                                                          |
| <b>CD</b>     | : Cluster de Différentiation                                            |
| <b>CIVD</b>   | : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée                               |
| <b>CMF</b>    | : Cytométrie en flux                                                    |
| <b>EDTA</b>   | : Acide Ethylène Diamine Tétracétique                                   |
| <b>EGIL</b>   | : Groupe Européen de caractérisation Immunologique des Leucémies aiguës |
| <b>EIAS</b>   | : Epine Iliaque Antéro-Supérieure                                       |
| <b>EIPS</b>   | : Epine Iliaque Postéro-Supérieure                                      |
| <b>FAB</b>    | : Français, Américain, Britannique                                      |
| <b>FITC</b>   | : Fluorescéine Isothiocyanate                                           |
| <b>FSC</b>    | : Forward Scatter                                                       |
| <b>HLA</b>    | : Human Leucocyte Antigen                                               |
| <b>L.A</b>    | : Leucémie aiguë                                                        |
| <b>LAL</b>    | : Leucémie aiguë lymphoïde                                              |
| <b>LAM</b>    | : Leucémie aiguë myéloïde                                               |
| <b>MGG</b>    | : May Grunwald Giemsa                                                   |
| <b>MPO</b>    | : Myéloperoxydase                                                       |
| <b>OMS</b>    | : Organisation Mondiale de la Santé                                     |
| <b>PE</b>     | : Phycoérythrine                                                        |
| <b>Per CP</b> | : Protéine de chlorophylle de peridine                                  |
| <b>RT-PCR</b> | : Real Time-Polymerase Chain Reaction                                   |
| <b>SMD</b>    | : Syndrome myélodysplasique                                             |
| <b>SMP</b>    | : Syndrome myéloprolifératif                                            |
| <b>SSC</b>    | : Side scatter                                                          |
| <b>T</b>      | : lymphocyte T                                                          |
| <b>Tdt</b>    | : Terminal deoxynucleotidyl transférase                                 |

# LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1</b> : Processus multi étape de la leucémogénèse.....                                                                                                                                       | 6  |
| <b>Figure 2</b> : Images de leucémies aiguës myéloïdes : LAM0/LAM1/LAM2.....                                                                                                                           | 10 |
| <b>Figure 3</b> : Images de leucémies aiguës myéloblastiques : LAM3/LAM4/LAM5 .....                                                                                                                    | 11 |
| <b>Figure 4</b> : Images de leucémies aiguës myéloïdes : LAM6/LAM7.....                                                                                                                                | 11 |
| <b>Figure 5</b> : Images de leucémies aiguës lymphoïdes (LAL1/LAL2/LAL3) .....                                                                                                                         | 12 |
| <b>Figure 6</b> : Image du compteur automatique de cellules Sysmex XT2000i (Sysmex corporation<br>Kobe Japon).....                                                                                     | 23 |
| <b>Figure 7</b> : Image de cellules positives à la MPO (Kit de coloration RAL diagnostics) .....                                                                                                       | 25 |
| <b>Figure 8</b> : Etapes de la ponction médullaire iliaque chez un enfant.....                                                                                                                         | 25 |
| <b>Figure 9</b> : Image du cytomètre de flux FACS Calibur Becton Dickinson (Unité<br>d'Immunologie/HALD).....                                                                                          | 26 |
| <b>Figure 10</b> : Représentation schématique du cytomètre en flux .....                                                                                                                               | 27 |
| <b>Figure 11</b> : Population blastique en cytométrie de flux.....                                                                                                                                     | 31 |
| <b>Figure 12</b> : Démarche de lecture des Plots (Cas de LAM).....                                                                                                                                     | 32 |
| <b>Figure 13</b> : Répartition des patients selon le sexe .....                                                                                                                                        | 33 |
| <b>Figure 14</b> : Images cytologiques des sous types FAB observés chez nos patients .....                                                                                                             | 36 |
| <b>Figure 15</b> : Image de blastes après coloration à la MPO : Lymphoblastes (MPO négative<br>flèches rouges) le polynucléaire neutrophile et les deux myélocytes servant de<br>témoins positifs..... | 37 |
| <b>Figure 16</b> : Images de blastes après coloration à la MPO myéloblastes (MPO+) présence de<br>grains rouges vif (flèches rouges) .....                                                             | 37 |
| <b>Figure 17</b> : Exemple de profil d'un patient avec LAM .....                                                                                                                                       | 39 |
| <b>Figure 18</b> : Exemple de profil d'un patient avec LAL T mature (T-IVb).....                                                                                                                       | 40 |
| <b>Figure 19</b> : Exemple de profil d'un patient avec LAL BI (pro-B)<br>[CD10-/IgM-/CD19+/CD22+/kappa-lambda-].....                                                                                   | 40 |
| <b>Figure 20</b> : Exemple de profil d'un patient avec LAL BIII (pré B)<br>[CD10+/IgM-/CD19+/CD22+/kappa-lambda-].....                                                                                 | 41 |

# LISTE DES FIGURES

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau I</b> : Caractéristiques immunophénotypiques des LAM.....                                        | 14 |
| <b>Tableau II</b> : Classification immunophénotypique des leucémies aiguës lymphoïdes B selon<br>EGIL.....  | 15 |
| <b>Tableau III</b> : Classification immunophénotypique des leucémies aiguës lymphoïdes T selon<br>EGIL..... | 15 |
| <b>Tableau IV</b> : Système de score de l'EGIL pour les leucémies aiguës biphénotypiques [20] .             | 16 |
| <b>Tableau V</b> : Panels d'anticorps monoclonaux utilisés dans notre série .....                           | 28 |
| <b>Tableau VI</b> : Répartition des patients selon l'âge. ....                                              | 33 |
| <b>Tableau VII</b> : Données cliniques de nos patients.....                                                 | 34 |
| <b>Tableau VIII</b> : Données de l'hémogramme de nos patients .....                                         | 35 |
| <b>Tableau IX</b> : Les différents types cytologiques (FAB) retrouvés dans notre série. ....                | 38 |
| <b>Tableau X</b> : Les immunophénotypiques retrouvés chez nos patients .....                                | 38 |

# SOMMAIRE

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION.....                                                               | 1  |
| PREMIERE PARTIE : Généralités sur les leucémies aiguës .....                    | 3  |
| 1. DEFINITIONS .....                                                            | 4  |
| 1.1. Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). ....                              | 4  |
| 1.2. Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) .....                               | 4  |
| 2. EPIDEMIOLOGIE.....                                                           | 4  |
| 3. PHYSIOPATHOLOGIE .....                                                       | 5  |
| 4. LES CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE.....                                         | 6  |
| 4.1. Syndrome d'insuffisance médullaire .....                                   | 6  |
| 4.2. Syndrome tumoral.....                                                      | 7  |
| 5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....                                                   | 8  |
| 5.1. Hémogramme.....                                                            | 8  |
| 5.2. Myélogramme .....                                                          | 9  |
| 5.3. Immunophénotypage.....                                                     | 12 |
| 5.4. Etude cytogénétique et biologie moléculaire .....                          | 16 |
| 6. CLASSIFICATION DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS)<br>DE 2008 ..... | 17 |
| DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....                                     | 20 |
| 1. PATIENTS ET METHODES .....                                                   | 22 |
| 1.1. Type et cadre d'étude.....                                                 | 22 |
| 1.2. Critères d'inclusion .....                                                 | 22 |
| 1.3. Critères de non inclusion .....                                            | 22 |
| 1.4. Population d'étude .....                                                   | 22 |
| 1.5. Paramètres étudiées.....                                                   | 22 |
| 1.6. Recueil des données.....                                                   | 23 |
| 1.7. Considérations éthique.....                                                | 23 |
| 1.8. Méthodes d'Analyses.....                                                   | 23 |
| 1.8.1. La Numération.....                                                       | 23 |
| 1.8.2. Le myélogramme .....                                                     | 25 |
| 1.8.3. Cytométrie en flux .....                                                 | 26 |
| 1.9. Marquage extracellulaire : Lyse avec lavage.....                           | 30 |
| 1.10. Marquage intra cytoplasmique : Lyse avec lavage .....                     | 30 |
| 1.11. Analyse des données .....                                                 | 32 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 2. Résultats .....             | 33 |
| 2.1. Epidémiologie .....       | 33 |
| 2.2. Données cliniques .....   | 34 |
| 2.3. Données biologiques ..... | 35 |
| 2.3.1. Hémogramme .....        | 35 |
| 2.3.2. Medullogramme.....      | 36 |
| 2.4. Immunophénotypage.....    | 38 |
| 3. DISCUSSION .....            | 42 |
| CONCLUSIONS .....              | 43 |
| REFERENCES.....                | 43 |
| ANNEXES .....                  | 43 |

# INTRODUCTION

Les leucémies aiguës (L.A) sont un ensemble de processus malins impliquant un précurseur médullaire lymphoïde ou myéloïde et aboutissant à un ensemble hétérogène de maladies avec acquisition d'anomalies génétiques.

Leurs diagnostics selon la classification OMS de 2008 se basent sur des données cliniques, cytologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques.

Au Sénégal une enquête rétrospective portant sur une période de dix ans (Janvier 1997 à Décembre 2006) au niveau des services de pédiatrie des 4 hôpitaux de référence de Dakar[1] (Centre hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR), l'Hôpital Aristide Le Dantec (HALD), l'Hôpital Principal de Dakar (HPD), et l'Hôpital Général de Grand Yoff (HOGGY) faisait état d'une prévalence hospitalière moyenne des leucémies aiguës de l'enfant de 0,1% (0,27% pour HALD) .

Ce diagnostic au Sénégal a longtemps été basé uniquement sur la cytologie et la cytochimie qui trop souvent présentent des limites. Les techniques immunophénotypiques d'après les dernières recommandations de l'OMS, se présentent comme un outil complémentaire à la cytologie et indispensable au diagnostic de ces leucémies aiguës. Ainsi, devant le souci de mieux affiner nos diagnostics et partant des recommandations de l'OMS de 2008 nous nous sommes fixé comme objectif de rechercher les profils cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës en milieu pédiatrique.

**PREMIERE PARTIE :**  
**Généralités sur les leucémies aiguës**

## **1. DEFINITIONS**

Les leucémies aiguës (L.A) constituent un ensemble d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale dans la moelle osseuse de précurseurs de cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur différenciation, les blastes [2].

On distingue deux grands groupes : Les leucémies aiguës lymphoblastiques et les leucémies aiguës myéloblastiques.

### **1.1. Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).**

Elles représentent plus de trois quart des leucémies aiguës et restent la forme de cancer de l'enfant la plus fréquente (30-35% des cancers en pédiatrie) [3, 4, 5]. Dans ce groupe on note les LAL de la lignée B et de celles de la lignée T.

Chez l'enfant, les LAL de la lignée B sont prédominantes (80%) avec une incidence globale qui varie selon les pays. Leur pic de fréquence se situe entre 2 et 6 ans, surtout dans les pays occidentaux. Les LAL-T prédominent chez les enfants plus âgés et restent rares avant 5ans.

### **1.2. Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)**

La LAM s'observe surtout chez l'adulte (90 % des cas au-delà de 20 ans). Sa fréquence croît avec l'âge, la moitié des cas étant diagnostiquée après l'âge de 60 ans.

## **2. EPIDEMIOLOGIE**

Les leucémies aiguës sont des maladies rares, survenant à une fréquence d'environ 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants et à 90 % chez l'adulte. Cependant, les leucémies aiguës représentent l'affection maligne la plus fréquente à l'âge pédiatrique d'environ 30% [5] de l'ensemble des cancers de l'enfant avec une incidence de 4,02/100000 personnes.

Chez l'enfant 80% des leucémies aiguës sont de type lymphoblastique, survenant à tout âge mais avec un pic de fréquence situé entre 2-6 ans. Les leucémies aiguës myéloblastiques représentent 15 à 20% des cas et la répartition est assez homogène dans les différentes classes d'âge.

La fréquence des leucémies aiguës de l'enfant au Mali, est de 21/100 hémopathies malignes avec une incidence de 1,5 nouveaux cas en moyenne par an [6].

En Côte d'Ivoire, cette fréquence est de 23,86/1000 malades et 16 nouveaux cas en moyenne par an [6]. En France elle est de l'ordre de 3 pour 100.000 habitants par an. [7] [8].

### 3. PHYSIOPATHOLOGIE

Au cours de la leucémie aigue, il y'a une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologiques normaux, et qui se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique, avec blocage de la différenciation cellulaire ou hiatus de maturation.

Ce blocage de la maturation est source d'une accumulation de cellules blastiques dans la moelle osseuse responsable de la défaillance de l'hématopoïèse normale et par conséquent du tableau clinique révélateur de la pathologie. [9]

Ce phénomène de leucémisation peut survenir à n'importe quel stade de l'hématopoïèse, depuis la cellule souche pluripotente jusqu'aux précurseurs déjà bien engagés dans une lignée précise. Quelque soit le stade où survient la leucémisation on aura une prolifération de cellules monomorphes. [10]

La leucémie se développe dans la moelle osseuse, mais peut également s'étendre au sang (d'où la présence de blastes circulants dans certaines leucémies) ou à d'autres organes non hématopoïétiques (peau, gencives, système nerveux central) ce qui est responsable du syndrome tumoral. [11].

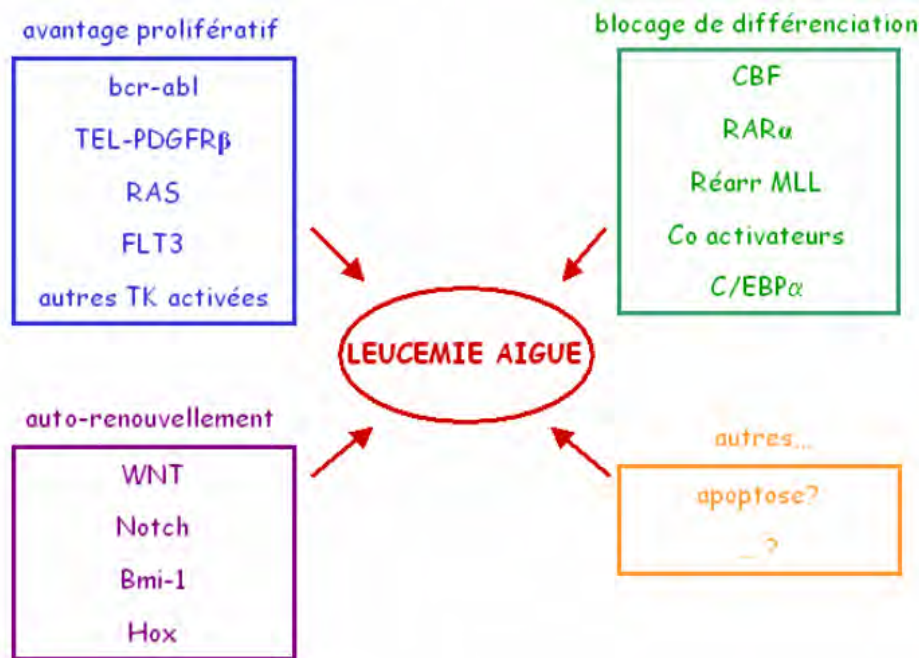
L'accumulation des cellules leucémiques ne provient pas seulement d'une prolifération importante, mais bien plus d'une perte de la capacité de la différenciation totale pour arriver à des cellules matures, ce qui donne aux cellules leucémiques un avantage de survie lié à un échappement à l'apoptose.

Le développement d'une leucémie aiguë résulte de la conjonction de plusieurs événements génétiques [12-13].

Selon le « *two-hit model* » de Gilliland [14], les événements oncogéniques clés qui vont conduire à la leucémie sont divisés en deux classes d'anomalies génétiques (**Figure 1**):

- **Évènements de type I** conférant un avantage prolifératif et/ou une résistance à l'apoptose du clone malin. Les gènes mutés dans cette catégorie, sont des acteurs clés des voies de signalisation intracellulaire (récepteurs de tyrosine kinase *FLT3*, *RAS*, *c-KIT*). Ces anomalies ont conduit à la mise en évidence d'anomalies de la transduction du signal intracellulaire des cellules leucémiques.

- **Évènements de type II** induisant un blocage de différenciation cellulaire impliquant principalement des facteurs de transcription, mutés ou le plus souvent impliqués dans des translocations chromosomiques récurrentes (*AML1-ETO*, *PML-RAR $\alpha$* .)[15, 16].



**Figure 1** : Processus multi étape de la leucémogénèse [14]

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 sa survenue.

#### 4. LES CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE

Elles sont très variables vu la diversité syndromique, allant de la découverte fortuite sur un hémogramme de routine à des tableaux compliqués. Les différents symptômes rencontrés peuvent être regroupés en un syndrome tumoral en rapport avec la prolifération blastique et en un syndrome d'insuffisance médullaire.

##### 4.1. Syndrome d'insuffisance médullaire

L'insuffisance médullaire est liée à l'accumulation clonale de cellules blastiques sécrétant des cytokines inhibitrices de l'hématopoïèse au niveau de l'espace médullaire aboutissant à un défaut de production des lignées normales par la moelle leucémique. Le tableau clinique comporte de façon plus ou moins complète : un syndrome anémique, un syndrome infectieux et un syndrome hémorragique.

#### ➤ **Le syndrome anémique**

Il se manifeste à l'examen clinique par une pâleur cutanéomuqueuse d'importance variable, d'apparition progressive ou brutale en cas d'hémorragie associée et une asthénie importante, assez fréquemment inaugurale. En outre elle associe selon le degré, une dyspnée d'effort voire de repos, des vertiges, des palpitations, des crises d'angor et un souffle systolique fonctionnel à l'auscultation [15].

#### ➤ **Un syndrome infectieux**

Il est présent dans la moitié des cas, se manifestant par une fièvre modérée avec ou sans foyer cliniquement décelable et ne régressant pas sous antibiothérapie. Les sites infectieux les plus fréquents sont la bouche (mucites), la sphère ORL (angines parfois ulcéronécrotiques, otite), la peau (abcès), la région périnéale et le poumon. Parfois, la fièvre n'est pas de cause infectieuse, mais spécifique de l'hémopathie, on parle de fièvre leucémique qui disparaît après le début de traitement chimiothérapique [16, 17].

#### ➤ **Un syndrome hémorragique**

Le plus souvent dû à une thrombopénie centrale, parfois de consommation (coagulation intravasculaire disséminée) en cas de LAM3 mettant en jeu le pronostic vital.

La thrombopénie peut être responsable en dessous d'un certain seuil, de purpura, d'ecchymoses (en particulier aux points de ponction veineuse), de saignements muqueux, d'épistaxis ou de gingivorragies [16].

### **4.2. Syndrome tumoral**

Le syndrome tumoral est plus fréquent dans la LAL (quasi-constant) que dans la LAM (50% des cas), et il est la conséquence de la masse tumorale leucémique. Dans la LAM il est présent surtout dans les formes myélomonocytaires LAM4, et monoblastiques LAM5, il est habituellement absent dans les formes promyélocytaire LAM3.

L'hypertrophie des organes hématopoïétiques se manifeste par la splénomégalie qui est fréquente, de volume modéré, parfois associée à une hépatomégalie, et des adénopathies diffuses, symétriques et indolores.

### ➤ **Adénopathies**

Les adénopathies superficielles (cervicales, inguinales, axillaires...) sont davantage observées dans les LAL (80 % des cas). Les adénopathies profondes (médiastinales, abdominales responsable de douleur et individualisable à l'échographie) sont très évocatrices de LAL de type T et peuvent occasionner un syndrome compressif. Les LAL de type Burkitt s'accompagnent fréquemment d'une masse maxillo-faciale ou ganglionnaire abdominale de croissance rapide.

### ➤ **Splénomégalie**

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

### ➤ **Hépatomégalie**

Une hépatomégalie associée peut se rencontrer dans 50 % des LAL et un peu moins souvent dans les types M4 et M5.

### ➤ **Autres atteintes**

Un syndrome de leucostase rencontré dans les formes hyperleucocytaires des LAM et se traduisant par des phénomènes thrombotiques (occlusion des artérioles cérébrales et pulmonaires par les agrégats blastiques) ou hémorragiques (en particulier intracérébraux) de même que des atteintes neuro-méningée et osseuse ont également été rapportées.

## **5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE**

### **5.1. Hémogramme**

L'hémogramme permet très souvent de donner une orientation diagnostique en cas de suspicion de leucémie aiguë, il est de ce fait demandé en premier lieu devant des signes cliniques la faisant suspecter.

Son profil reflète le degré de répression de l'hématopoïèse normale résiduelle et de la présence ou non de cellules blastiques circulantes. En effet leur absence est possible et n'exclut pas le diagnostic d'une leucémie aiguë.

Il oriente le diagnostic devant une anémie normochrome normocytaire arégénérative constante, d'intensité variable et le plus souvent inférieure à 8g/dl. Cette anémie est rarement isolée, elle est accompagnée dans 90% des cas d'une thrombopénie qui peut être d'intensité variable et d'une hyperleucocytose souvent très blastique, ou d'une leucopénie qui ne doit pas empêcher la réalisation du myélogramme.

## **5.2. Myélogramme**

C'est l'examen-clé qui permet de confirmer le diagnostic de la leucémie aigue, elle est effectuée après une ponction et étalement sur des lames de verre de suc médullaire du patient. Il permet la réalisation d'une étude cytologique, immunophénotypique, cytogénétique et de biologie moléculaire.

Il existe une proportion de blastes, par définition supérieure ou égale à 20% des éléments médullaires faite de cellules hématopoïétiques immatures au rapport nucléo-cytoplasmique élevé, au noyau à chromatine lâche et porteur d'un ou plusieurs nucléoles. L'hématopoïèse normale résiduelle est nettement diminuée voir pratiquement absente en cas de blastose médullaire proche de 100 %.

Le diagnostic des variétés cytologiques se fait grâce à :

### **- La coloration du frottis médullaire par**

- Le MGG (May Grunwald Giemsa) qui nous permet de faire une étude morphologique et numérique qui sera complété par d'autres colorations concernant essentiellement la cytochimie.
- La recherche de l'activité myéloperoxydasique (MPO), qui est effectuée en complément de la coloration au May Grunwald Giemsa, utile en cas de diagnostic cytologique difficile, permettant ainsi d'affirmer le caractère lymphoïde ou myéloïde des blastes.

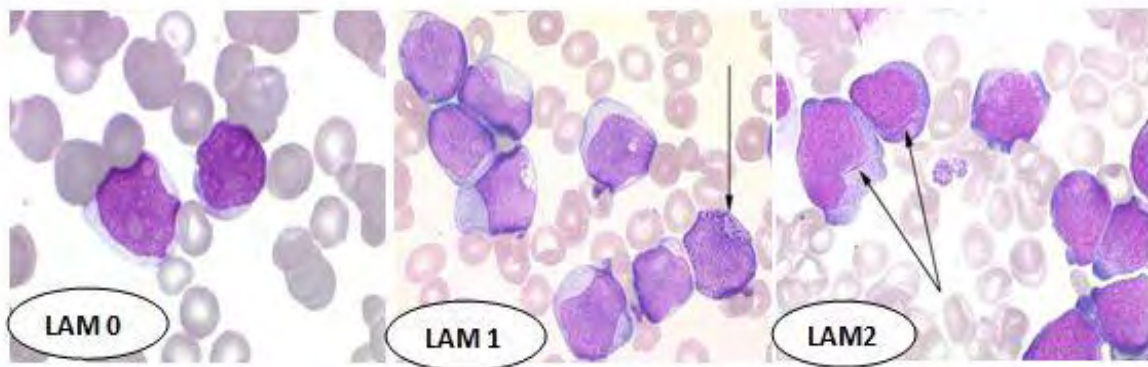
### **- La classification cytologique du groupe Franco-Américano-Britannique (FAB)**

Le schéma de la classification originale proposé par le groupe coopératif Français, Américain et Britannique (FAB) divise les leucémies aigues myéloblastiques en huit sous-types et les leucémies aigues lymphoblastiques en trois sous-types. Cette classification des LAL et des LAM est basée uniquement sur la morphologie et l'affinité cytochimique des blastes.

### ➤ Les leucémies aigues myéloïdes

La classification FAB distingue huit variétés de LAM, classées de M0 à M7 :

- **LAM 0:** LAM avec différenciation granuleuse minimale (plus de 90 % de blastes indifférenciés à cytoplasme basophile sans granulations ni corps d'Auer, la réaction de la myéloperoxydase est négative) ;
- **LAM 1:** LAM sans maturation (plus de 90 % de blastes avec absence de maturation granuleuse ou maturation inférieure à 10 %, la réaction de la myéloperoxydase est positive dans plus de 3 % des blastes) ;
- **LAM 2:** LAM avec maturation (les blastes représentent 20 à 90% des cellules médullaires, souvent granuleux avec des corps d'Auer, une maturation granuleuse coexiste, représentant 10 à 70 % des éléments, la réaction de la myéloperoxydase est positive) (**Figure 2**)



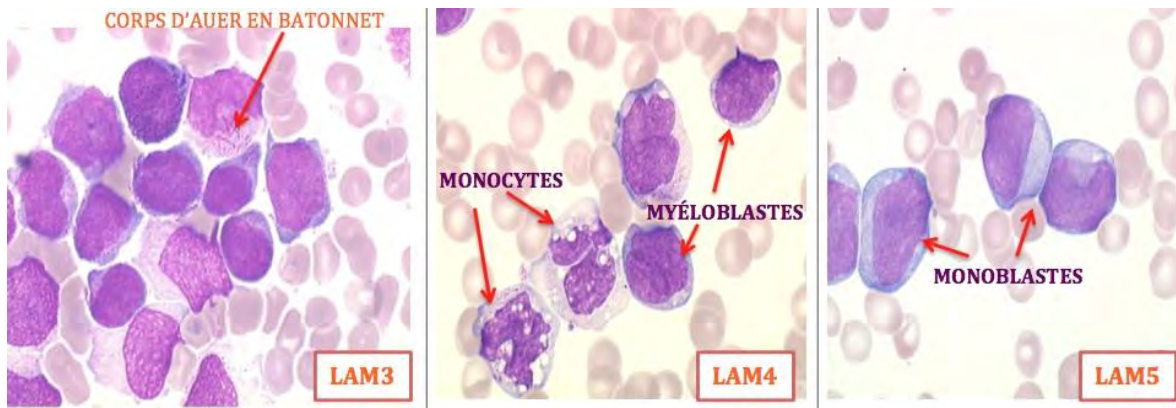
**Figure 2 :** Images de leucémies aigues myéloïdes : LAM0/LAM1/LAM2

Présence de fines granulations LAM1 (flèche noire) / Présence de bâtonnet d'Auer dans la LAM2 (flèche noire)

- **LAM 3:** LA promyélocytaire (plus de 20 % de blastes ayant la morphologie de promyélocytes anormaux, avec de très nombreuses granulations et, souvent, de nombreux corps d'Auer, réalisant un aspect de corps d'Auer en fagots. À côté de la forme classique de LAM3, il existe une forme variante ou LAM3v qui est au contraire microgranulaire ou hypogranulaire, avec des noyaux bilobés caractéristiques, la réaction de la myéloperoxydase est très positive dans les deux formes) ;
- **LAM 4:** LA myélomonocytaire avec un contingent myéloblastique et un contingent monocytaire représentant 20 à 80 % des cellules médullaires, dont l'identification quelques fois difficile est confirmée par la réaction des estérases. La réaction de la

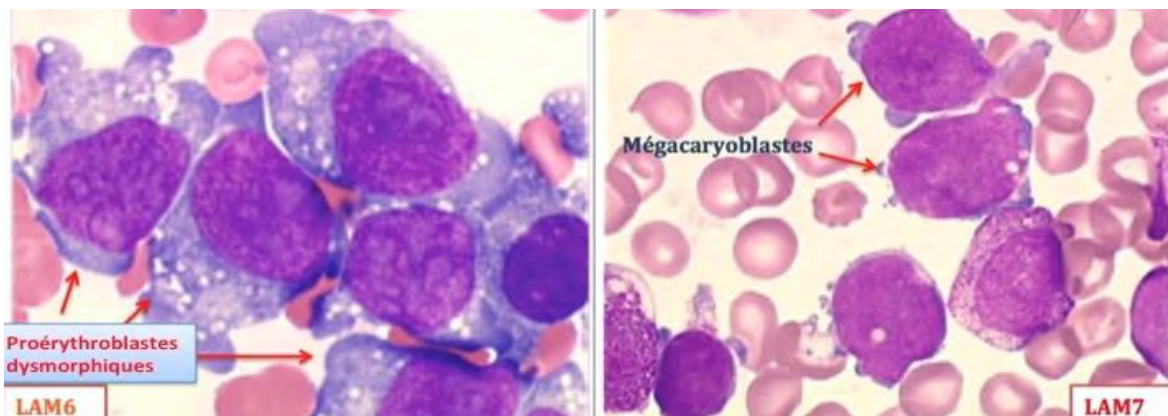
myéloperoxydase est positive. Une variété dite à « différenciation éosinophile » est caractérisée par une maturation granuleuse comportant des éosinophiles anormaux) ;

- **LAM5:** LA monocyttaire avec plus de 90 % de cellules de la lignée monocyttaire, qui sont soit peu différenciées : monoblastes (variété M5a),  
Soit plus différenciées : pro-monocytes et monocytes (variété M5b). La réaction de la myéloperoxydase est négative mais l'acétate estérase et le butyrate estérase sont positives (**Figure 3**)



**Figure 3 :** Images de leucémies aigues myéloblastiques : LAM3/LAM4/LAM5

- **LAM 6:** Erythroleucémie (hyperplasie érythroblastique représentant plus de 50 % des éléments médullaires avec parfois des dystrophies : mégaloblastose, fragmentation nucléaire, vacuolisation du cytoplasme, ponctuations basophiles. Un excès de myéloblastes représentant plus de 20 % des éléments et une maturation granuleuse avec des anomalies: dégranulation, hyposegmentation des polynucléaires) ; il existe deux formes: 6a et 6b.
- **LAM 7:** LA à Mégacaryoblastes (infiltration en général partielle, les blastes sont des cellules mégacaryocytaires plus ou moins différenciées représentant plus de 20 % des éléments médullaires. La réaction de la myéloperoxydase est négative) (**Figure 4**).

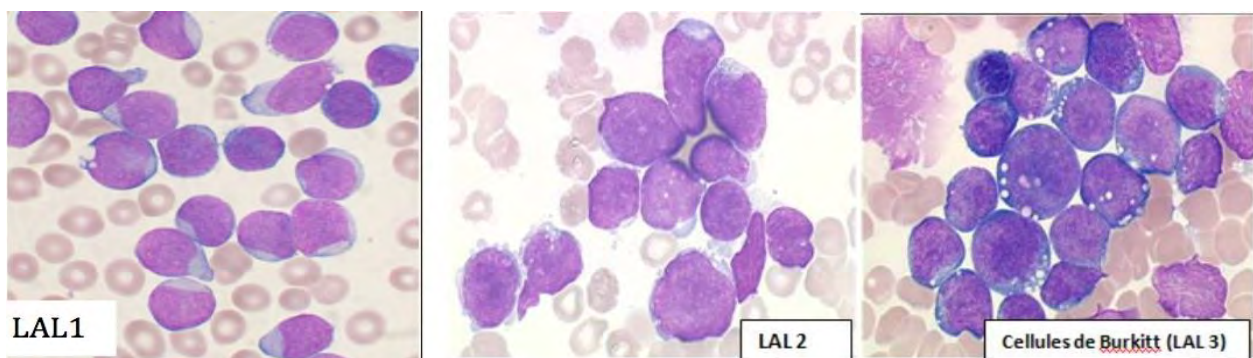


**Figure 4 :** Images de leucémies aigues myéloïdes : LAM6/LAM7

### ➤ Leucémies aiguës lymphoïdes

Elle reconnaît trois sous-types de LAL (L1, L2, L3) :

- Les LAL de **type L1** sont constituées par une population homogène de blastes de petite taille au noyau régulier, peu ou pas nucléolé et au cytoplasme réduit à une couronne péri nucléaire ;
- Les LAL de **type L2** comportent une hétérogénéité de forme et de taille des blastes, des noyaux nucléolés parfois irréguliers, un cytoplasme plus étendu ;
- Les LAL de **type L3** (LAL de type Burkitt) ont une morphologie caractéristique. Ce sont des cellules régulières de taille moyenne, au cytoplasme très basophile, souvent criblé de vacuoles (**Figure 5**).



**Figure 5** : Images de leucémies aiguës lymphoïdes (LAL1/LAL2/LAL3)

### 5.3. Immunophénotypage

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) permet d'étudier à haut débit, par immunofluorescence, toute préparation cellulaire en suspension et en premier lieu le sang. Il se présente comme un outil majeur dans la démarche diagnostique des leucémies aiguës, en complément de l'analyse cytologique, notamment grâce à sa mise en œuvre rapide. Il permet de déterminer l'appartenance à une lignée cellulaire et de préciser le niveau de différenciation pour identifier et/ou préciser le diagnostic des diverses formes de LA (classification WHO 2008 des LA).

Certaines structures cellulaires peuvent également être mises en évidence directement, sans anticorps. Il peut avoir un rôle pronostique par la mise en évidence d'un phénotype corrélé à des anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires ;

Il peut permettre d'identifier la présence de certains marqueurs au sein des blastes en vue d'une utilisation d'une thérapeutique ciblée par anticorps monoclonaux. Il permet en outre de détecter le profil antigénique aberrant des blastes pouvant se révéler utile pour suivre la maladie résiduelle.

➤ **La classification immunophénotypique du Groupe Européen de caractérisation Immunologique des Leucémies aiguës (EGIL)**

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

Cette classification propose de classer les leucémies aiguës en se basant uniquement sur l'immunophénotype et toute sa puissance réside sur le fait qu'elle propose des critères standardisés définissant une leucémie aiguë comme myéloïde, lymphoïde T, lymphoïde B ou biphénotypique. Elle permet également de distinguer les LA biphénotypiques des LAM avec expression aberrante de marqueurs lymphoïdes de même que les LAL avec expression aberrante de marqueurs myéloïdes.

➤ **Règles d'interprétation selon l'European Group for Immunological characterization of Leukemia (EGIL) (tableaux I, II, III et IV)**

✓ **LAL de la lignée lymphoïde B**

- La positivité d'au moins deux marqueurs B : CD19/CD22/CD79a
- Et la négativité d'au moins trois des marqueurs T : CD3/CD2/CD5/CD7/CD8
- Et la négativité des marqueurs myéloïdes : CD13/CD33/CD117/MPO

✓ **LAL de la lignée lymphoïde T**

- La positivité du CD3
- La négativité d'au moins deux marqueurs B : CD19/CD22/CD79a
- Et la négativité d'au moins trois des marqueurs myéloïdes : CD13/CD33/CD117/MPO

Il n'existe pas de classification aussi stricte pour les LAM mais certains marqueurs sont assez caractéristiques (**Tableau I**).

**Tableau I** : Caractéristiques immunophénotypiques des LAM

| EGIL           | M0 | M1, M2 | M3 | M4   | M5 | M6   | M7 |
|----------------|----|--------|----|------|----|------|----|
| <b>MPO</b>     | -  | +      | +  | +    | ±  | +    | -  |
| <b>CD2</b>     | ±  | ±      | ±  | ± éo | -  | -    | -  |
| <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>CD65</b>    | -  | ±      | ±  | ±    | ±  | -    | -  |
| <b>CD71</b>    | +  | +      | +  | +    | +  | ++/+ | ±  |
| <b>CD117</b>   | +  | +      | ±  | ±    | ±  | +    | ±  |
| <b>Glyco-A</b> | -  | -      | -  | -    | -  | +    | -  |
| <b>HLA-DR</b>  | ++ | +      | -  | +    | +  | ±    | ±  |
| <b>CD33</b>    | ±  | +      | +  | +    | +  | ±    | ±  |

**Tableau II :** Classification immunophénotypique des leucémies aigues lymphoïdes B selon EGIL. [20]

| EGIL  | Autres classifications | Marqueurs communs                                                   | Autres marqueurs                         |
|-------|------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| B-I   | Pro B                  | CD19+ ; CD79a+<br>CD22+ (s ou c) au moins deux des marqueurs<br>DR+ | TdT+ ; CD10-<br>cIgM-<br>slg- (κ ou λ)   |
| B-II  | B commune              |                                                                     | TdT+ ; CD10+<br>cIgM-<br>slg- (κ ou λ)   |
| B-III | Pre B                  |                                                                     | TdT+ ; CD10+<br>cIgM+<br>slg- (κ ou λ)   |
| B-IV  | B mature               |                                                                     | TdT- ; CD10+/-<br>cIgM+<br>slg+ (κ ou λ) |

**Tableau III :** Classification immunophénotypique des leucémies aigues lymphoïdes T selon EGIL. [20]

| EGIL  | Equivalent « physiologique » | Marqueurs communs   | Autres marqueurs                                                                                                                            |
|-------|------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-I   | Pro T                        | CD3+<br>CD7+<br>DR+ | Aucun                                                                                                                                       |
| T-II  | Pré T                        |                     | CD2+;CD5+/-;CD1a-;sCD3-                                                                                                                     |
| T-III | T cortical                   |                     | CD2+;CD5+;sCD3-;CD4+;CD8+;CD1a+                                                                                                             |
| T-IV  | T mature                     |                     | <b>T-IVa:</b><br>CD2+;CD5+;CD3+;<br>TCR α/β+;CD4+ ou CD8+; CD1a-<br><br><b>T-IVb:</b><br>CD2-;CD5+;CD3+; tdT+<br>TCR γ/δ+ ;CD4-;CD8-; CD1a- |

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

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

Les LA biphénotypiques seul l'examen par cytométrie de flux est susceptible d'identifier les phénotypes de la leucémie aiguë. Les blastes co-expriment des marqueurs myéloïdes et lymphoïdes B et/ou T. En 1995, l'EGIL présentait les critères de classification de L.A avec expression de marqueurs biphénotypiques. Le système de score de l'EGIL est fondé sur la présence d'un certain nombre d'antigènes ayant différents niveaux de pondération. L'assignation à une lignée nécessite un score strictement supérieur à 2 (**tableau IV**).

**Tableau IV** : Système de score de l'EGIL pour les leucémies aiguës biphénotypiques [20]

| Score     | Marqueurs B            | Marqueurs T               | Marqueurs myéloïdes           |
|-----------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 2 points  | CD79a<br>cIgM<br>cCD22 | CD3<br>Anti TCR           | Anti-MPO                      |
| 1 point   | CD19<br>CD20<br>CD10   | CD2<br>CD5<br>CD8<br>CD10 | CD13<br>CD33<br>CD65<br>CD117 |
| 0,5 point | TdT<br>CD24            | TdT<br>CD1a<br>CD7        | CD14<br>CD15<br>CD64          |

#### 5.4. Etude cytogénétique et biologie moléculaire

L'examen cytogénétique est devenu un élément fondamental de la prise en charge des leucémies aiguës, surtout des LAL, contribuant à en démontrer pour cette dernière l'hétérogénéité. Un caryotype est réalisé sur les cellules blastiques médullaires ou sanguines, permettant de rechercher des anomalies numériques (hyperdiploïdie...) et qualitatives (translocations...) des chromosomes. La valeur pronostique de certaines anomalies caryotypiques est reconnue et prise en compte dans les indications thérapeutiques.

Les techniques de biologie moléculaire, de plus en plus modernes, permettent :

- de confirmer la clonalité des cellules leucémiques en retrouvant un réarrangement soit des gènes codant pour le récepteur de l'antigène (lignée T), soit de ceux codants pour la synthèse des immunoglobulines (lignées B, à partir du stade II de maturation),
- de mettre en évidence des translocations chromosomiques non trouvées au caryotype,
- de rechercher des amplifications ou des délétions de régions codantes,
- d'évaluer quantitativement, après la mise en route du traitement, la maladie résiduelle (ensemble des cellules malignes persistant dans l'organisme et non détectables par les techniques morphologiques classiques).

## **6. CLASSIFICATION DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS) DE 2008**

La nouvelle classification de 2008 des leucémies aiguës proposée par l'OMS intègre des données génétiques et cliniques aux données morphologiques et immunophénotypiques déjà utilisées dans les précédentes classifications du groupe FAB et du groupe EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias). Ainsi sont prises en considération la valeur pronostique de certaines anomalies génétiques, qui est désormais bien établie, et l'existence d'un traitement cytotoxique antérieur ou d'un antécédent de myélodysplasie qui conditionne le devenir de l'affection. La classification OMS établit le seuil de la blastose à 20 %. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré que le pronostic des patients dont la blastose se situait entre 20 et 30 % était similaire à celui des LAM avec un taux de blastes supérieur à 30 %. Ainsi les AREB-T disparaissent de la classification des syndromes myélodysplasiques pour faire partie de celle des leucémies aiguës. La mise en évidence d'anomalies génétiques spécifiques de certains types de leucémies a abouti aux nouvelles propositions de l'OMS qui sont fondées sur :

- l'intégration des anomalies génétiques récurrentes
- la prise en considération de la dysmyélopoïèse ou des antécédents de syndrome myélodysplasique.
- la prise en considération des antécédents thérapeutiques (chimiothérapie ou radiothérapie). Cette notion de caractère secondaire d'une leucémie aiguë est totalement nouvelle. Ceci permet d'insister sur le caractère pronostique défavorable des LAM secondaires par rapport aux LAM *de novo*.

Quatre groupes principaux sont ainsi reconnus pour les LAM.

➤ **LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes :**

- LAM avec t (8; 21) (q22; q22) ; RUNX1-RUNX1T1. Cette entité est apparentée sur le plan morphologique à la LAM 2. La présence de blastes avec un corps d'Auer piqué dans le noyau est pathognomonique de cette translocation.
- LAM avec t (15; 17) (q22; q12); PML-RAR $\alpha$ . Cette translocation est caractéristique de la leucémie aiguë à promyélocytes (LAM 3).
- LAM avec éosinophiles médullaires anormaux et anomalies sur le chromosome 16 : inv. (16) (p13; q22) ou t (16; 16) (p13; q22) ; CBF $\beta$ -MYH11. L'inversion du 16 est ainsi une anomalie caractéristique de la LAM4 à éosinophiles.
- LAM avec anomalies chromosomiques 11q23 (MLL)

➤ **LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies**

- faisant suite à un SMD ou SMD/SMP
- ou présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des SMD ou présentant une dysplasie sur plus de 50 % des cellules d'au moins 2 lignées.

➤ **LAM post-chimiothérapie** quel que soit le traitement

➤ **LAM sans spécificité particulière** : LAM de la classification FAB

Dans le cadre des LAL, la classification OMS actualise la classification FAB en tenant compte des éléments de la morphologie, de l'immunophénotype, des caractères cytogénétiques et du tableau clinique. Elle ajoute également la notion d'envahissement primaire d'un site ganglionnaire ou extra nodulaire en introduisant le terme de lymphome/leucémie lymphoblastique, en effet lorsqu'un patient présente une masse nodulaire et des lymphoblastes dans la moelle osseuse, la distinction entre une leucémie et un lymphome devient arbitraire. L'étude cytogénétique étant désormais indispensable au pronostic et décisionnelle sur la nature du traitement, l'OMS prend en compte les anomalies spécifiques à certaines entités. C'est ainsi qu'elle a classé les LAL en :

➤ **Leucémie aiguës / lymphomes lymphoblastiques B**

- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B sans autre spécification
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec anomalies cytogénétiques récurrentes :
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(9; 22) (q34; q11.2) ; BCR-ABL1
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(v; 11q23); MLL réarrangé
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(12; 21) (p13; q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hyperdiploïdie
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hypo diploïdie
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(5; 14) (q31; q32) IL3-IGH
  - Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(1; 19) (q23; p13.3) TCF3 - PBX1

➤ **Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique T**

Elle présente une catégorie unique, quel que soit l'immunophénotype et le caryotype.

## **DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## ❖ Objectifs de l'étude

Etant confronté trop souvent à l'insuffisance des données cliniques et cytologiques dans le diagnostic des leucémies aiguës et partant des recommandations de l'OMS, nous nous sommes fixés comme objectifs :

### ➤ Objectif général

Déterminer les types de profils cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës en milieu pédiatrique.

### ➤ Objectifs spécifiques

- Décrire les différents types morphologiques de leucémies aiguës observés
- Mettre en place un protocole d'immunophénotypage des leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloblastiques
- Décrire les profils immunophénotypiques des leucémies aiguës

## **1. PATIENTS ET METHODES**

### **1.1. Type et cadre d'étude**

Nous avons effectué une étude prospective et descriptive sur une période de 06 mois (02 février au 30 juillet 2014) qui s'est déroulée au sein des services d'Onco-pédiatrie, de l'unité d'immunologie et du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Aristide le Dantec de Dakar.

### **1.2. Critères d'inclusion**

Ont été inclus dans cette étude, tout patient admis au niveau du service d'Onco-pédiatrie pour une suspicion de leucémie aigue avec une blastose sanguine supérieure à 10%.

### **1.3. Critères de non inclusion**

N'ont pas été inclus les patients qui avaient une blastose sanguine inférieure à 10% et ceux qui étaient sous traitement.

### **1.4. Population d'étude**

Notre population d'étude était constituée de patients admis au niveau du service d'Onco-pédiatrie pour une leucémie aigue confirmée au medullogramme et qui n'étaient pas encore sous traitement.

### **1.5. Paramètres étudiées**

Nous avons étudié les paramètres:

- Epidémiologiques : âge et sexe ;
- Cliniques : fièvre, douleurs osseuses et syndrome tumoral : hépatomégalie, splénomégalie et/ou d'adénopathies superficielles ;

#### **❖ Biologiques**

- Hémogramme : Leucocytose, le taux d'hémoglobine, le VGM, la CCMH, le taux de plaquettes et le pourcentage de cellules blastiques périphériques,
- Medullogramme : taux de cellules blastiques.
- Cytochimie: coloration à la myéloperoxydase sur cellules périphériques ou médullaire.
- Immunophénotypage des blastes au niveau périphérique.

## **1.6. Recueil des données**

Les données ont été recueillies à l'aide d'une fiche d'enquête. Les données cliniques ont été collectées à partir du dossier médical des patients avec l'accord du médecin traitant et les données biologiques après traitement des échantillons au sein du laboratoire d'hématologie et de l'unité d'immunologie de HALD.

## **1.7. Considérations éthique**

Pour chaque enfant, nous avons obtenu le consentement éclairé du parent ou du tuteur.

## **1.8. Méthodes d'Analyses.**

### **1.8.1. La Numération**

#### **❖ Etapes pré-analytiques**

Les prélèvements ont été réalisés au niveau des services cliniques de l'Onco-pédiatrie de l'hôpital Aristide Le Dantec où a été recueilli 5ml de sang dans un tube contenant l'anticoagulant EDTA. L'hémogramme a été effectué le même jour.

#### **➤ Principe de la numération**

Compteur automatique de cellules Sysmex XT 2000i de Sysmex corporation Kobe Japon.

Le compteur automatique de cellules Sysmex XT2000i (**Figure 6**) est un appareil de numération cellulaire utilisant deux technologies : la technique de l'impédance (principe Coulter) et la technique de diffraction optique.



**Figure 6** : Image du compteur automatique de cellules Sysmex XT2000i (Sysmex corporation Kobe Japon)

## ➤ **Coloration du frottis à la myéloperoxydase (MPO)**

### ✓ **Principe**

En présence d'alpha naphthol et de peroxyde d'hydrogène, les granulations myéloperoxydasiques des cellules forment avec la pyronine un complexe insoluble, rouge vif. Les noyaux des leucocytes sont colorés en bleu par l'hématoxyline de Mayer (**Figure 7**).

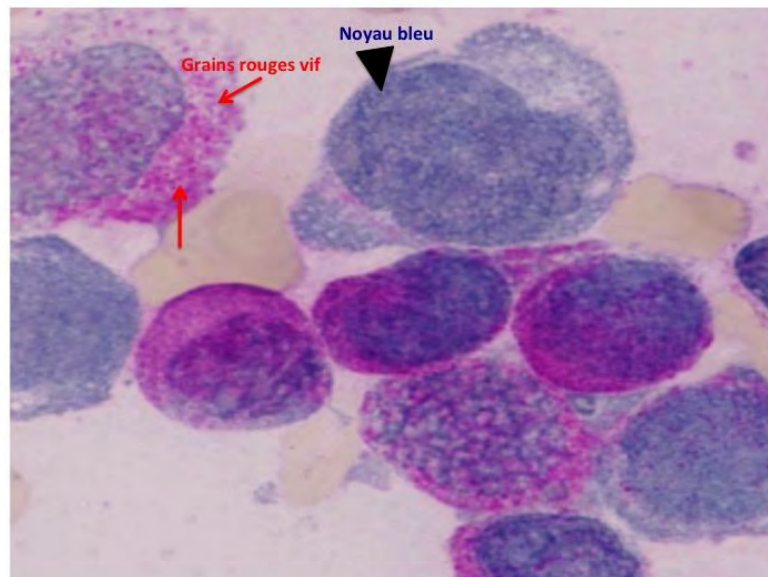
### ✓ **Matériels et réactifs.**

Lames, formol-éthanol, pyronine, alpha-naphthol, eau oxygénée et hématoxyline de Meyer

### ✓ **Technique de coloration à la MPO:**

- Fixer le frottis **1minute** avec le mélange formol-éthanol
- Laver à l'eau du robinet puis sécher à l'air
- Préparer le colorant des peroxydases dans le flacon mélangeur
  - Solution alcoolique d'alpha naphthol **1ml**
  - Solution de pyronine **4ml**
  - Peroxyde d'hydrogène (**1 goutte**)
- Colorer avec le colorant des peroxydases pendant **3mn**
- Laver à l'eau de robinet puis sécher à l'air
- Couvrir avec l'hématoxyline de Mayer pendant **3mn**
- Rincer à l'eau de robinet (indispensable pour différencier l'hématoxyline) pendant **3mn**
- Sécher à l'air

Réaliser la coloration parallèlement avec une lame de sang normal comme témoin. Les granulations peroxydasiques vont apparaître rouge vif, les noyaux des leucocytes bleu et les hématies beige clair (**Figure 7**).



**Figure 7**: Image de cellules positives à la MPO (Kit de coloration RAL diagnostics)

### 1.8.2. Le myélogramme

#### ❖ Principe

C'est un acte médical qui consiste à aspirer, une petite quantité de moelle au niveau du sternum (adulte) ou de la crête iliaque antérieure ou postérieure (**Figure 8**) chez l'enfant à l'aide d'un trocart et d'une seringue et à faire une étude morphologique et numérique des cellules médullaires.



HALD 2014

**Figure 8**: Etapes de la ponction médullaire iliaque chez un enfant

C'est l'examen clé au diagnostic des leucémies aiguës car permet la réalisation d'une étude cytologique, cytogénétique et de biologie moléculaire. Il permet de confirmer le diagnostic, déjà pratiquement certain devant la présence d'une importante blastose sanguine circulante. Le diagnostic des variétés cytologiques se fait grâce à la classification FAB après étude morphologique et numérique du frottis médullaire coloré au MGG (May Grunwald Giemsa), qui sera complétée éventuellement par la coloration à la myéloperoxydase.

### 1.8.3. Cytométrie en flux

Le cytomètre en flux FACS Calibur BD (**Figure 9**) quatre couleurs a été utilisée. C'est un appareil disposant de plusieurs systèmes :



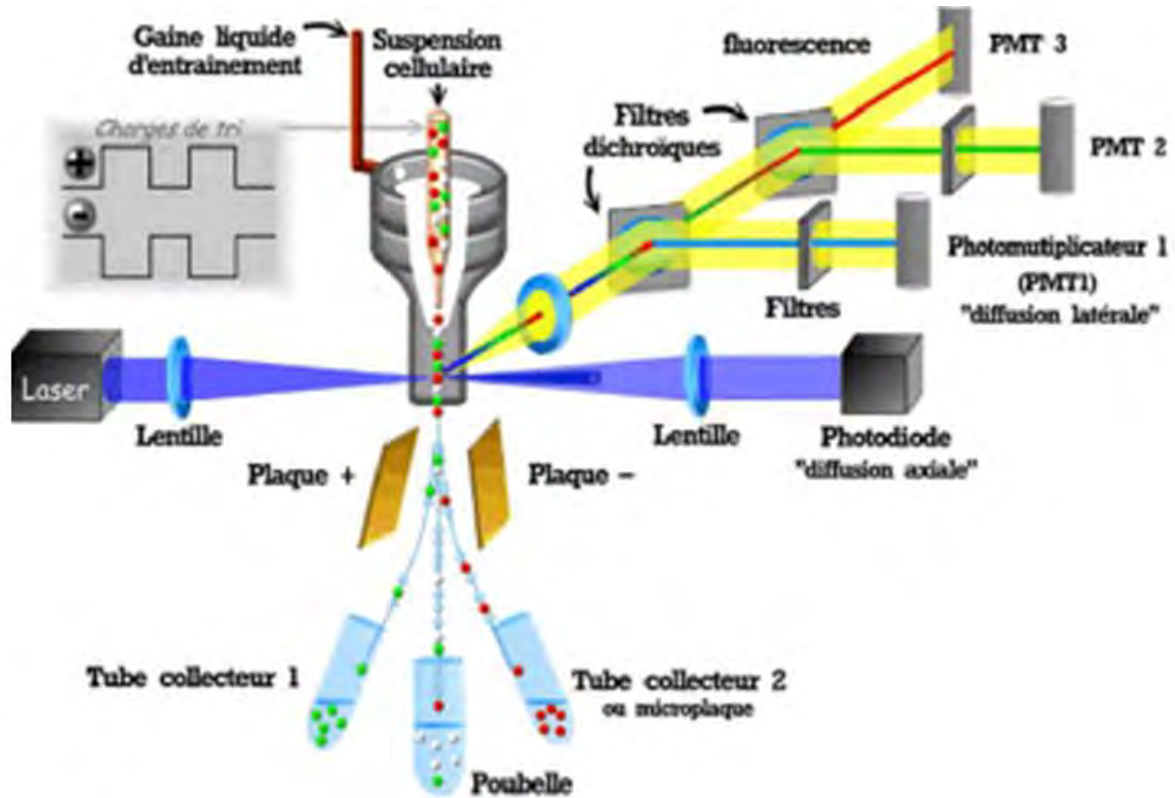
**Figure 9** : Image du cytomètre de flux FACS Calibur Becton Dickinson (Unité d'Immunologie/HALD)

#### ❖ Composants (Figure 10)

Les composantes d'un Cytomètre de flux sont:

- Un **système fluide** permettant la séparation et l'alignement des particules mais aussi le tri et le flux laminaire (vitesse d'analyse).
- Un **système optique** constitué de sources lumineuses, de détecteurs, de filtres et de miroirs dichroïdes pour la séparation spectrale.
- Un **système électronique** pour la collection et l'analyse des signaux optiques ; l'affichage des données ; le contrôle des sources lumineuses, des détecteurs et du tri.

- Un **système d'analyse des données** permettant l'analyse et l'affichage des ces dernières, l'analyse multi-variée, l'identification des sous populations et la quantification des éléments cellulaires.



**Figure 10** : Représentation schématique du cytomètre en flux

#### ❖ Principe

La cytométrie de flux, se définit comme étant la mesure (métrie) des propriétés d'une population cellulaire (cyto) qui se déplace dans une gaine de liquide (flux). Les cellules analysées qui sont en suspension vont passer, une à une, à travers un faisceau lumineux « le laser » et le cytomètre va alors détecter la capacité d'une cellule à diffracter la lumière incidente et à émettre une fluorescence. La lumière diffusée ainsi que la fluorescence émise par chaque cellule vont être captées par des détecteurs et transmises à un ordinateur. Les données récoltées seront analysées grâce à un logiciel pour les présenter sous forme d'histogrammes ou de graphiques.

❖ **Les anticorps monoclonaux utilisés: Anticorps de lignée**

Les marqueurs les plus spécifiques pour déterminer l'appartenance d'une cellule à une lignée cellulaire ont été utilisés. Nous avons utilisé les panels suivants avec pour chaque tube quatre couleurs au maximum (**tableau V**).

**Tableau V :** Panels d'anticorps monoclonaux utilisés dans notre série

| PANELS                     |        | FITC   | PE     | Per CP | APC  |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|------|
| ORIENTATION                | TUBE 1 |        | CD22   | CD3    | CD45 |
|                            | TUBE 2 | HLA-DR | CD34   | CD79a  | CD45 |
| LEUCÉMIE AIGUE MYELOIDE    | TUBE 1 | CD33   | CD38   | CD117  | CD45 |
|                            | TUBE 2 | CD14   | CD11c  | CD45   |      |
| LEUCÉMIE AIGUE LYMPHOIDE B | TUBE 1 | CD10   | IgM    | CD45   | CD19 |
|                            | TUBE 2 | Kappa  | Lambda | CD45   | CD19 |
| LEUCÉMIE AIGUE LYMPHOIDE T | TUBE 1 | CD5    | CD7    | CD3    | CD45 |
|                            | TUBE 2 | CD2    | CD3    | CD8    | CD45 |

AlloPhycoCyanine (**APC**) émet une fluorescence à **660nm**

Protéine de Chlorophylle de Périidine (**Per CP**) émet une fluorescence à **678 nm**

Fluorescéine Iso ThioCyanate (**FITC**) émet une fluorescence à **519nm**

Phycoérythrine (**PE**) émet une fluorescence à 578 nm

**T** : pour lymphocytes et **TB** : pour lymphocytes B

### ❖ **Contrôle de qualité interne**

Pour assurer le bon déroulement d'une analyse par cytométrie en flux, il a été essentiel d'inclure des contrôles appropriés qui nous ont permis d'évaluer et de contrôler le chevauchement spectral et la liaison non spécifique des réactifs.

Pour cela nous avons procédé à :

#### ➤ **Une optimisation des paramètres du cytomètre**

- Ajuster les détecteurs SSC et FSC
- Ajuster le seuil du FSC afin d'éliminer les débris cellulaires
  - Délimiter (« gating ») la population d'intérêt (cellules mononuclées ou billes marquées). Ceci permet de veiller à ce que les paramètres de fluorescence soient ciblés pour cette population d'intérêt.

#### ➤ **Un réglage des détecteurs FL1 et FL2**

Ces ajustements permettent de placer la population négative dans le coin inférieur gauche du cadran (ou plot) ce qui laisse suffisamment de place pour les points positifs sur les axes x et y.

#### ➤ **Faire une compensation si nécessité il y'a**

Cette étape permet de corriger un chevauchement spectral. On peut faire une compensation entre FL1-%FL2 et FL2-%FL1 en utilisant des lymphocytes marqués ou avec des billes *Calibrite* (tube mixte de billes).

### ❖ **Protocole de marquage (Laboratoires Becton Dickinson)**

#### ➤ **Matériels et réactifs**

Centrifugeuse, micropipettes (3µl, 50µl et 1000µl) et pipette de transfert

Solution de lyse, solution de perméabilisation cellulaire (Facs permeabilizing), liquide de gaine (facs flow).

Anticorps monoclonaux anti-CD pour le marquage immunophénotypique

#### ➤ **Technique de marquage:**

L'échantillon est mis en contact avec le panel d'anticorps marqués et les étapes qui suivent ont été respectées selon qu'on réalise un marquage intracellulaire ou un marquage de surface.

### **1.9. Marquage extracellulaire : Lyse avec lavage**

Préparer les tubes

- Distribuer 1 µl (anti CD45) et 3 µl autres anticorps
- Distribuer 100 µl de prélèvement de sang
- Incuber 15 min à température ambiante et à l'obscurité
- Ajouter 2 ml de Lyse (dilué au dixième en eau distillée)
- Passer au vortex 2mn
- Incuber 10 min à température ambiante et à l'obscurité
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/mn température ambiante
- Vider le surnageant par retournement
- Ajouter 2 ml de Facs flow
- Passer au vortex 2mn
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/mn
- Vider le surnageant par retournement
- Ajouter 500 µl de Facs flow
- Les tubes sont prêts pour la lecture sur le Cytomètre

### **1.10. Marquage intra cytoplasmique : Lyse avec lavage**

- Préparer les tubes
- Distribuer 3 µl d'anticorps de surface
- Distribuer 100 µl de prélèvement
- Incuber 15 min température ambiante obscurité
- Ajouter 2 ml de Lyse (dilué au dixième en eau distillée)
- Passer le tube au vortex pendant 2mn
- Incuber 10 min température ambiante obscurité
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min
- Vider le surnageant par retournement
- Ajouter 500 µl de FACS permeabilising (dilué en eau distillée)
- Passer au vortex pendant 2mn
- Incuber 10 min température ambiante obscurité
- Ajouter 2 ml de Facs flow
- Passer au vortex
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min

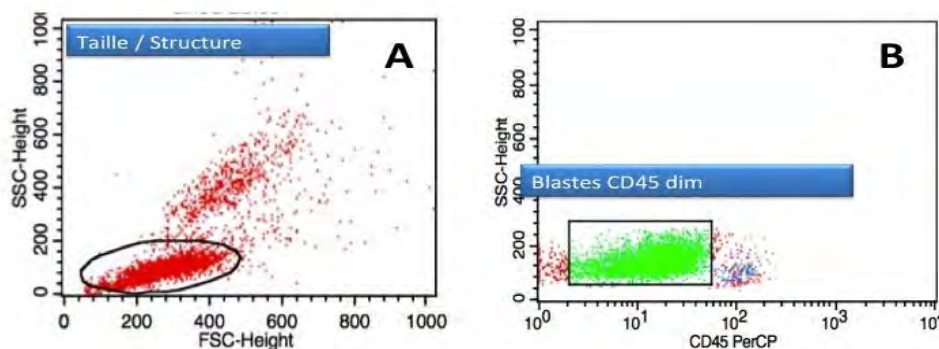
- Vider le surnageant par retournement (reste environ 100 µl de volume)
- Distribuer 3µl d'anticorps intra cytoplasmiques
- Incuber 30 min température ambiante obscurité
- Ajouter 2 ml de Facs flow
- Passer au vortex pendant 2mn
- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min
- Vider le surnageant par retournement
- Ajouter 500µl de Facs flow et lecture sur le Cymomètre

### ❖ Acquisition

Les prélèvements ont été traités par le cytomètre en flux FACS Calibur Becton Dickinson avec le logiciel Cell Quest pro. Le nombre d'évènements analysés était égal à 10000. L'analyse est réalisée selon le fenêtrage (gating) suivant : A représente la zone des mononuclées sur le cytogramme granularité (SSC) / taille (FSC) ; B représente la zone des blastes avec faible expression du CD45 sur le cytogramme SSC/CD45 (**Figures 11 et 12**). Nous avons gaité B à partir de A et les autres marqueurs à partir de B.

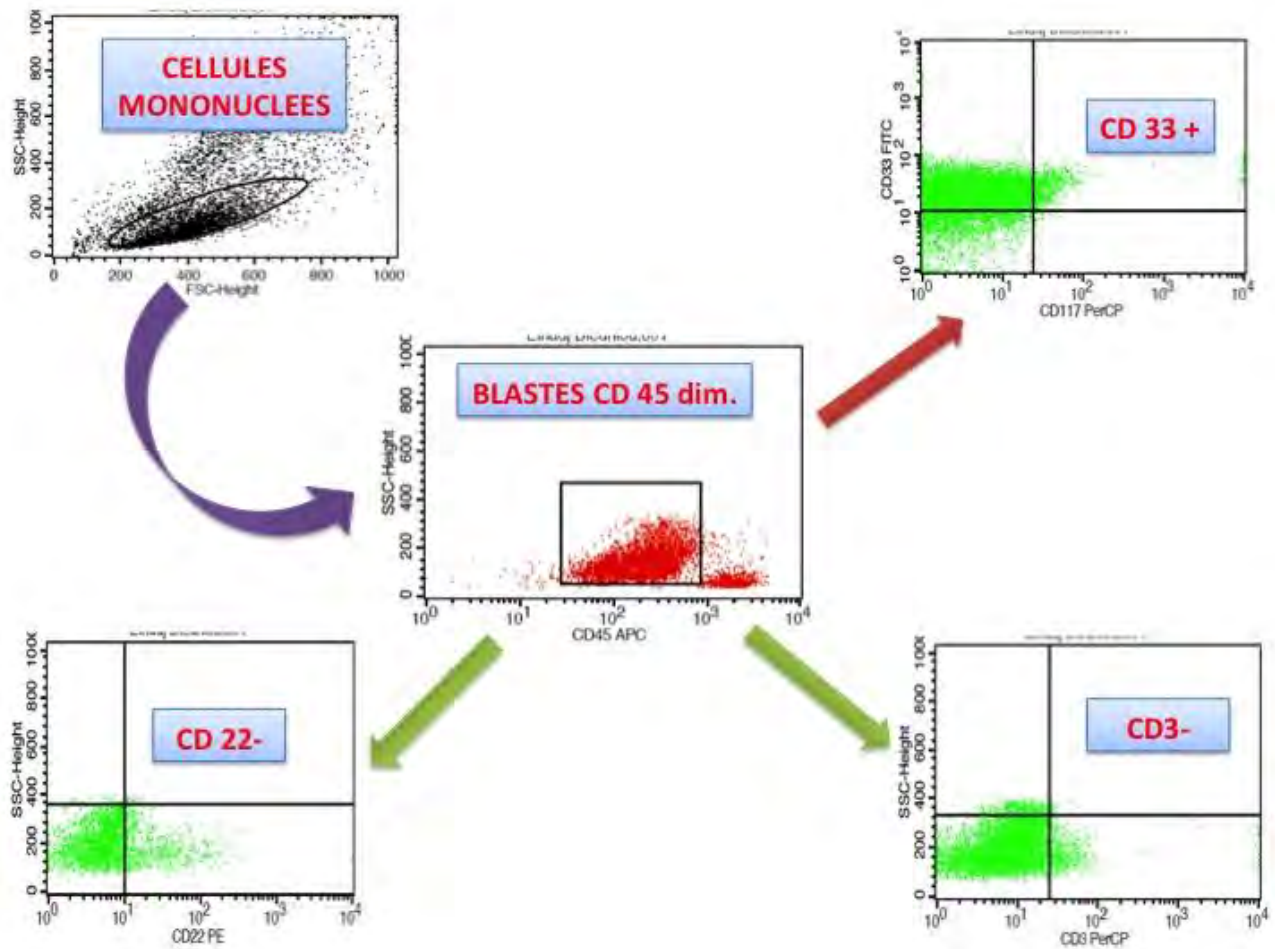
Les valeurs numériques des signaux sont analysées grâce à l'unité informatique du cytomètre. L'affichage simultané des paramètres FCS, SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur l'écran sous forme de point : c'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes.

Il est possible de distinguer différentes populations d'intérêt et de tracer le contour de la population à étudier en excluant d'une part les débris sur les critères de petite taille et de petite granularité et d'autre part les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt, ainsi délimitée (encerclée), appelée « gate » ou fenêtre, est la population cellulaire homogène. Le marqueur évalué a été considéré comme négatif lorsque le gate était inférieur à  $10^1$ , faible lorsqu'il était entre  $10^1$  et  $10^2$  et positif lorsqu'il était supérieur ou égal à  $10^2$ .



**Figure 11:** Population blastique en cytométrie de flux





**Figure 12:** Démarche de lecture des Plots (Cas de LAM)

### 1.11. Analyse des données

Les données ont été saisies et analysées sur Excel 2007. Nous avons ensuite effectué une description de la population d'étude puis à l'analyse des paramètres cliniques et biologiques.

## 2. Résultats

Au terme des six mois d'étude, nous avons recruté 30 patients.

### 2.1. Epidémiologie

#### ❖ Age

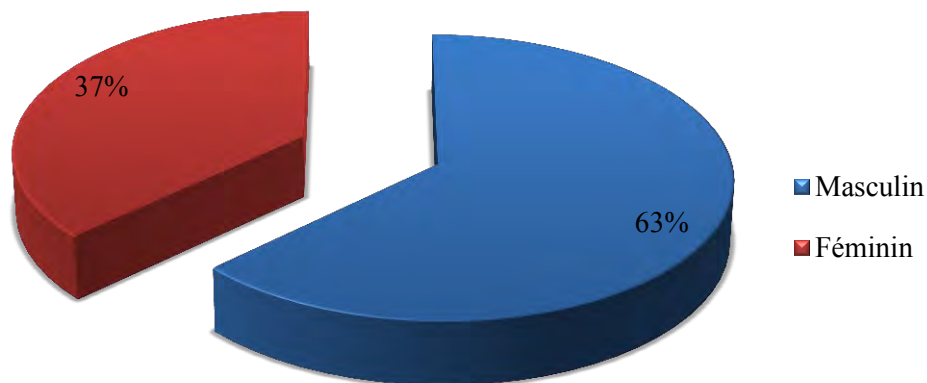
Sur les 30 patients recrutés, 13 étaient âgés de moins de huit ans et la moyenne d'âge était de 11,5 ans avec des extrêmes de 1 à 15 ans (**Tableau VI**).

**Tableau VI** : Répartition des patients selon l'âge.

| Tranches d'âge | Nombre | Taux (%) |
|----------------|--------|----------|
| < 8 ans        | 13     | 43       |
| 8 - 10 ans     | 06     | 20       |
| Plus de 10 ans | 11     | 37       |
| Total          | 30     | 100      |

#### ❖ Sexe

Le sexe masculin était plus représenté avec 63% avec un sex-ratio de 1,7 (**Figure 13**).



**Figure 13** : Répartition des patients selon le sexe

## 2.2. Données cliniques

La fièvre a été notée chez 12 patients et des douleurs osseuses signalées chez onze autres (37%). Un syndrome tumoral à type d'hépatomégalie de splénomégalie et d'adénopathies superficielles a été observé chez 87% des patients (**tableau VII**).

**Tableau VII** : Données cliniques de nos patients

| Signes cliniques  |                                   | Nombre de Patients | Fréquence (%) |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------|
| Fièvre            |                                   | 12                 | 40            |
| Douleurs osseuses |                                   | 11                 | 37            |
| Syndrome tumoral  | Hépatomégalie (HMG)               | 8                  | 26            |
|                   | Splénomégalie (SMG)               | 8                  | 26            |
|                   | Adénopathies superficielles (ADP) | 26                 | 87            |
|                   | HMG/SMG/ADP                       | 5                  | 17            |

## 2.3. Données biologiques

### 2.3.1. Hémogramme

#### ❖ Numération

Les données de la numération sont représentées dans le tableau ci-dessous (**tableau VII**):

**Tableau VIII** : Données de l'hémogramme de nos patients

| Paramètres         | Intervalles de valeurs   | Nombre | Fréquences (%) |
|--------------------|--------------------------|--------|----------------|
| Leucocytes (G/L)   | > 100                    | 9      | 30             |
|                    | 50 - 100                 | 6      | 20             |
|                    | < 50                     | 15     | 50             |
| Plaquettes (G/L)   | 150 - 450                | 5      | 17             |
|                    | 50 - 150                 | 7      | 23             |
|                    | < 50                     | 18     | 60             |
| Hémoglobine (g/dl) | < 8                      | 21     | 70             |
|                    | 8 - 10                   | 9      | 30             |
| Type d'anémie      | Hypochrome microcytaire  | 6      | 20             |
|                    | Normochrome normocytaire | 21     | 70             |
|                    | Macrocytaire             | 3      | 10             |

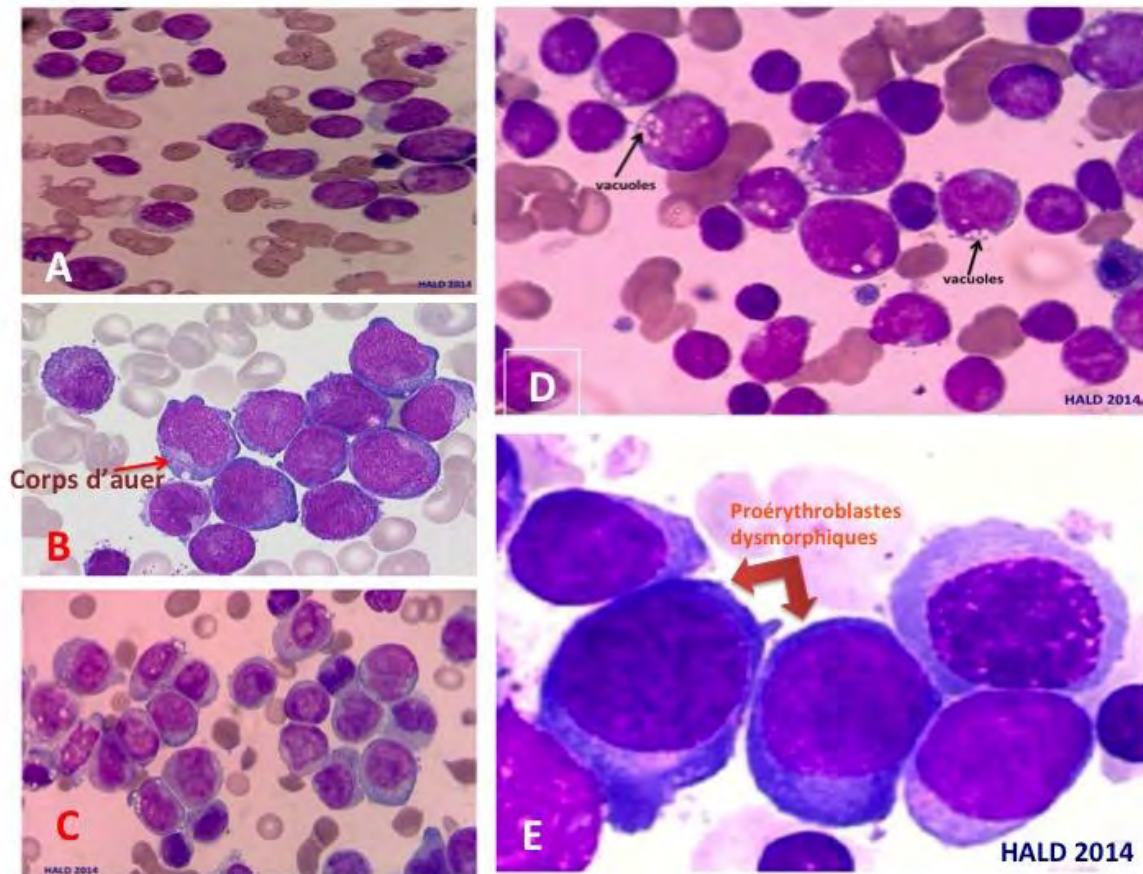
Une hyperleucocytose majeure était notée chez un tiers de nos patients et une thrombopénie sévère chez 60%.

Une anémie a été retrouvée chez la totalité de nos patients et cette dernière était profonde chez la majorité (70%) avec un taux d'hémoglobine qui était inférieur à 8g/dl. Cette anémie était normochrome normocytaire dans la grande majorité des cas (21 patients).

### 2.3.2. Medullogramme

#### ❖ Aspect du frottis médullaire au MGG

Les cellules observées étaient de taille petite à moyenne souvent grande avec un rapport nucléocytoplasmique élevé, une chromatine lâche laissant souvent apparaître des nucléoles. Cependant on note des caractéristiques distinctives permettant de les classer selon les sous types FAB, comme le montre l'image ci-après (**Figure 14**).



**Figure 14** : Images cytologiques des sous types FAB observés chez nos patients

**A=LAL** : Blastés de taille petite à moyenne

**B=LAM2** : présence d'un bâtonnet d'Auer

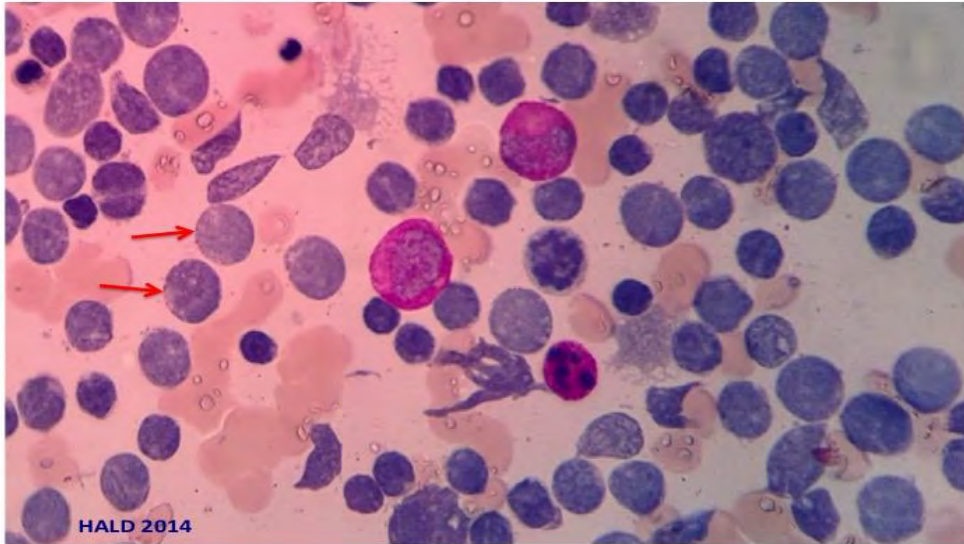
**C=LAM5** : monoblastes à cytoplasme basophile et souvent vacuolé

**D=LAL** type Burkitt avec présence de nombreux vacuoles cytoplasmiques (flèche noire)

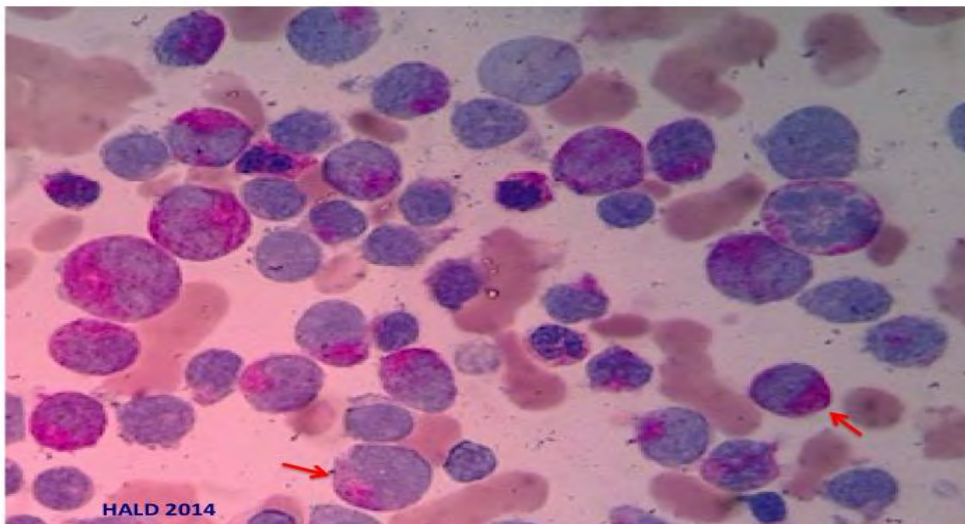
**E=LAM6** : proérythroblastes dysmorphiques (flèche rouge)

### ❖ Aspect de la coloration à la MPO

La coloration à la MPO est déterminante dans certaines situations pour différencier un myéloblaste d'un lymphoblaste (**Figure 15, 16**)



**Figure 15 :** Image de blastes après coloration à la MPO : Lymphoblastes (MPO négative flèches rouges) le polynucléaire neutrophile et les deux myélocytes servant de témoins positifs



**Figure 16 :** Images de blastes après coloration à la MPO myéloblastes (MPO+) présence de grains rouges vif (flèches rouges)

### ❖ Les types (FAB) de leucémies aigues observées chez nos patients

Après une étude morphologique et numérique des frottis médullaires et selon les recommandations du groupe coopératif FAB, les profils cytologiques ci-après ont été retrouvés chez nos patients (**tableau IX**).

**Tableau IX** : Les différents types cytologiques (FAB) retrouvés dans notre série.

| Types FAB de leucémies aigues | Nombre | Fréquences (%) |
|-------------------------------|--------|----------------|
| LAM0 ou LAM1                  | 1      | 3,3            |
| LAM2                          | 9      | 30,2           |
| LAM4Eo ou LAM5                | 1      | 3,3            |
| LAM5                          | 1      | 3,3            |
| LAM6                          | 1      | 3,3            |
| LAL                           | 15     | 50             |
| LAL type Burkitt              | 1      | 3,3            |
| LAL ou LAM0                   | 1      | 3,3            |
| Total                         | 30     | 100            |

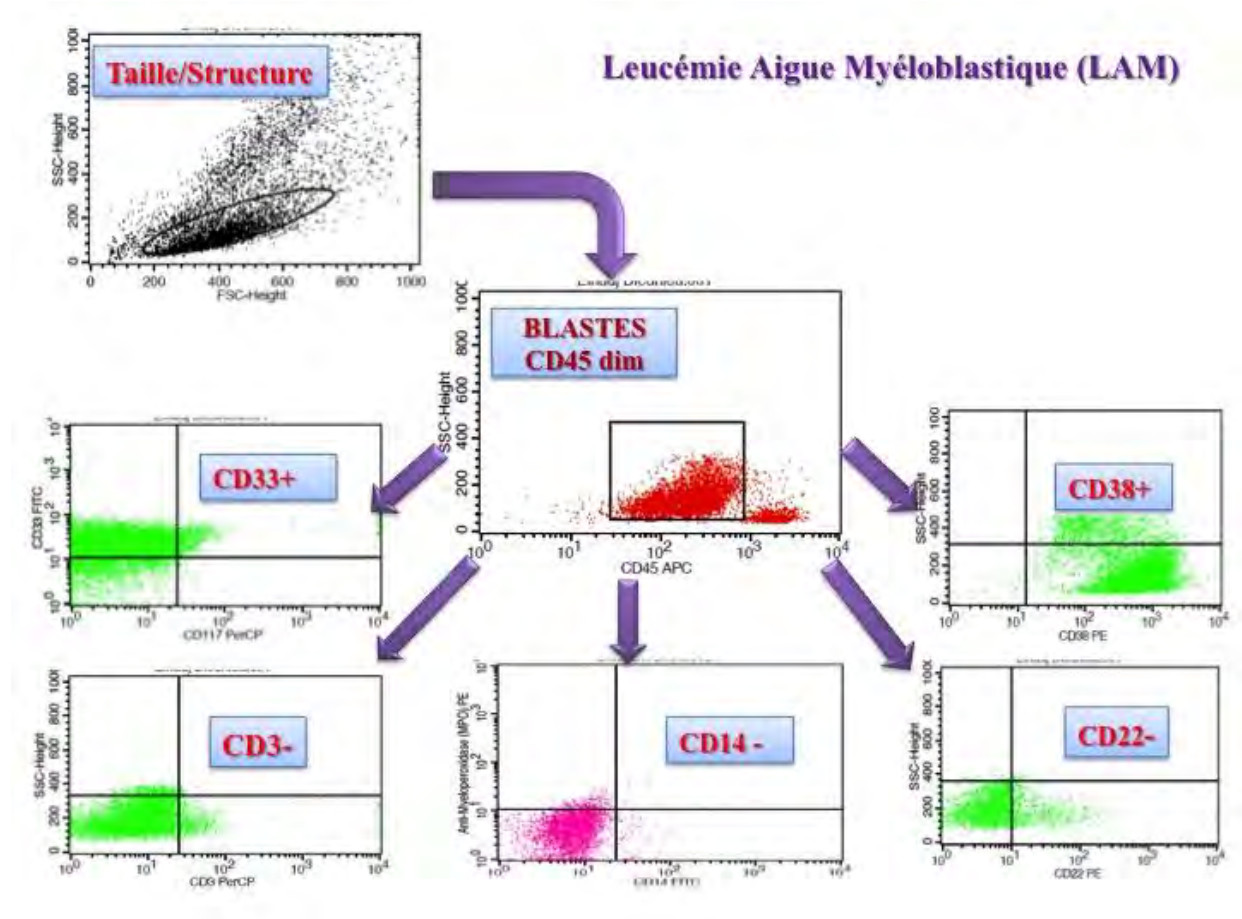
## 2.4. Immunophénotypage

### ❖ Les différents immunophénotypes (EGIL) de leucémies aigues retrouvés chez nos patients

**Tableau X** : Les immunophénotypiques retrouvés chez nos patients

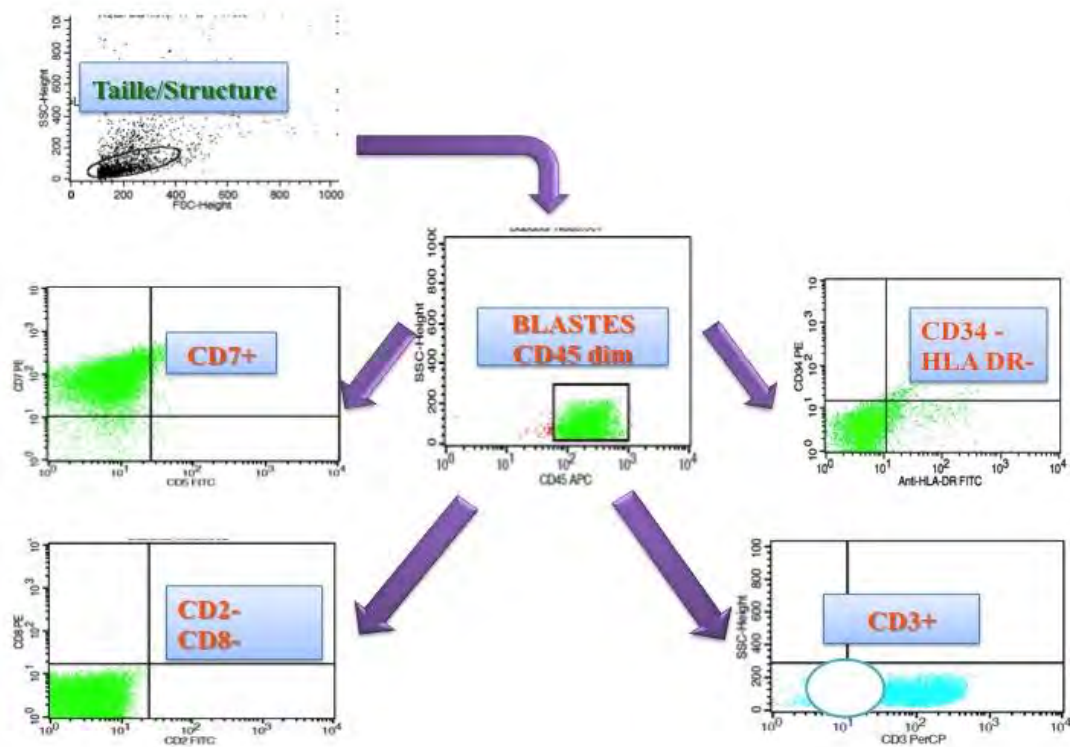
| Immunophénotypiques   | Nombre | Fréquence (%) |
|-----------------------|--------|---------------|
| LAM                   | 13     | 43,5          |
| LAL T mature (T-IV b) | 1      | 3,3           |
| LAL BI (pro-B)        | 8      | 26,6          |
| LAL BIII (pre B)      | 8      | 26,6          |

Les leucémies aigues myéloblastiques étaient retrouvées chez près de 44% de nos patients, huit cas de LAL à cellules pro-B , un cas de LAL T mature et huit autre cas de LAL à cellules pré-B. Ces profils étaient déterminés après un fenêtrage à partir des populations blastiques (CD45dim ou faible). (**Figures17, 18, 19 et 20**).



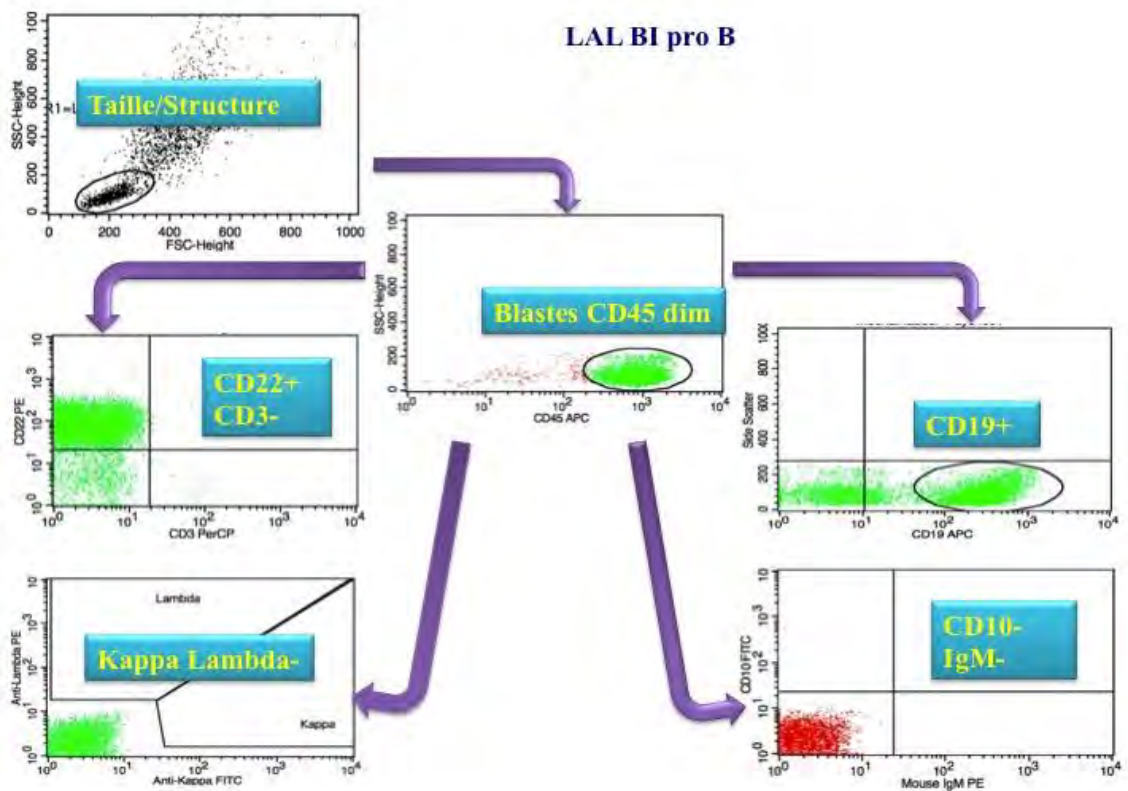
**Figure 17 :** Exemple de profil d'un patient avec LAM

[CD33+/CD38+/CD14-/CD3-/CD22-]



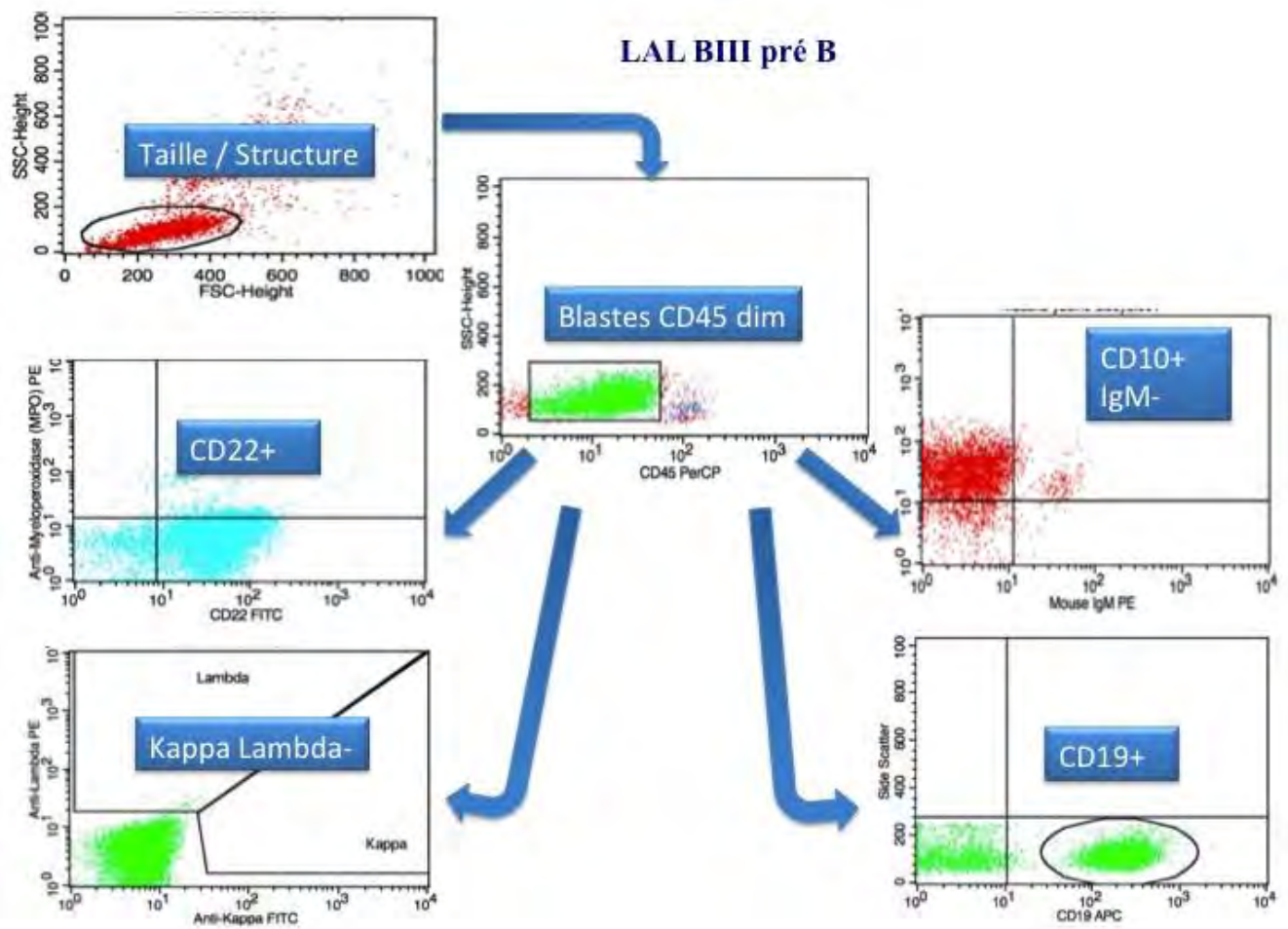
**Figure 18** : Exemple de profil d'un patient avec LAL T mature (T-IVb)

[CD3+/CD7+/CD2-/CD8-]



**Figure 19** : Exemple de profil d'un patient avec LAL BI (pro-B)

[CD10-/IgM-/CD19+/CD22+/kappa-lambda-]



**Figure 20 :** Exemple de profil d'un patient avec LAL BIII (pré B)  
[CD10+/IgM-/CD19+/CD22+/kappa-lambda-]

### 3. DISCUSSION

Les leucémies aigües constituent un ensemble de processus malins impliquant un précurseur médullaire lymphoïde ou myéloïde, associé à une dérégulation des programmes cellulaires fondamentaux avec apparition d'anomalies génétiques acquises. En plus du syndrome tumoral, le syndrome d'insuffisance médullaire peut être révélateur. Une anémie importante en est un signe habituel, donnant lieu à une asthénie profonde. Le diagnostic d'une leucémie aigüe se base sur des arguments cliniques, cytologiques et cytochimiques qui trop souvent sont limités d'où recours à l'immunophénotypage, qui d'après la dernière classification de l'OMS de 2008, est un outil indispensable au diagnostic, à la classification, au pronostic, et à l'évaluation du traitement des leucémies aigües.

Au Sénégal, le diagnostic des leucémies aigües a longtemps était basé uniquement sur la cytologie puis il y'a eu l'apport de la cytochimie. Devant un nombre considérable de cas de leucémies aigües où la cytologie et la cytochimie n'ont pas pu nous aider à déterminer le phénotype, nous avons jugé nécessaire d'intégrer l'immunophénotypage par cytométrie en flux. Pour ce faire nous avons effectué cette étude prospective et descriptive qui a duré six mois. Elle portait sur une série de patients recrutés en Onco-pédiatrie sur la base d'une blastose périphérique supérieure ou égale à 10%.

L'âge moyen de notre population d'étude était de 11,5 ans avec des extrêmes de 1 et 15 ans et cette même tranche d'âge a été retrouvée dans l'étude de Bellaoui et collaborateur au Maroc [21]. L'âge est un facteur pronostic important et la leucémie est de mauvais pronostic pour les enfants de moins d'un an et ceux de plus de dix ans [22,23].

La majorité des patients de notre série était dans les classes d'âge des moins de huit ans (43%) suivi des plus de dix ans (37%) Le sexe masculin était plus représenté avec sex-ratio qui était égal à 1,7 conformément aux données de la littérature où une prédominance masculine a toujours été rapportée [24, 25, 29,31].

Les leucémies aigües sont caractérisées par l'association à des degrés divers de signes qui témoignent à la fois d'une infiltration tumorale ainsi que d'une insuffisance médullaire. Ces signes sont des éléments d'orientation à l'endroit du clinicien vers la suspicion de cette pathologie. Des douleurs osseuses ne sont pas rares dans ce cas et sont évoquées devant une localisation atypique de douleurs articulaires résistantes aux traitements habituels. Ces douleurs osseuses ont été notées chez onze patients, soit 37% de notre série, taux plus important que celui retrouvé (7%) par Braham-Jmili et coll en Tunisie [24].

Le syndrome tumoral est révélé par une hypertrophie des organes hématopoïétiques telle que les adénopathies pouvant être localisées à divers endroits : cervicales, médiastinales, inguinales, sous-maxillaires ; de splénomégalie et/ou d'hépatomégalie. En effet divers organes peuvent être infiltré par les cellules leucémiques, ce qui augmente leur taille et contrarie leur bon fonctionnement. Un syndrome tumoral a été noté chez la quasi totalité de nos patients et les adénopathies superficielles constituaient le signe le plus constant car présentes chez 87% de notre série. Ce chiffre est proche de ceux retrouvés par plusieurs auteurs qui ont remarqué que ce signe est attendu dans 60 à 80% des cas de leucémies aigues [26].

Les caractéristiques biologiques sont la résultante de l'envahissement médullaire par le clone blastique au détriment des autres lignées hématopoïétiques. Comme cela a été montré par certaines études [25], nous avons retrouvé chez nos patients une anémie normochrome normocytaire arégénérative dans 70% des cas associée à une hyperleucocytose, une thrombopénie et la présence de blastes au niveau sanguin. Des études menées en Côte d'ivoire par Inwoley et coll et en Tunisie (Braham-Jmili et coll) trouvaient respectivement des taux de 73 et 55 % de blastes périphériques [25,28]. Cependant il faut remarquer qu'il y avait une proportion non négligeable (5%) de patients qui présentaient une anémie hypochrome microcytaire, probablement due à des déficits en fer.

Une étude cytologique conjointe du sang et de la moelle nous a permis grâce aux recommandations du groupe coopératif Franco-Américano-Britannique de classer les leucémies aigues de notre série. C'est ainsi que nous avons individualisé treize cas de LAM (43,4%) dont une LAM0/1 ; un cas de LAM4 ou 5 ; un cas de LAM5 ; un cas de LAM6 ; neuf cas de LAM2 et seize cas de LAL (56,6%) dont quinze cas de LAL1/2 et un cas de LAL de type Burkitt. Chez un patient la MPO n'a pas été déterminante pour classer un cas en LAL ou LAM0. La LAL est essentiellement une pathologie de l'enfant dont 75% surviennent chez les moins de six ans. Cette répartition cytologique des leucémies aigues de l'enfant observée dans notre série est inhabituelle. Ce résultat que nous avons constaté devrait cependant être vérifié sur une étude de plus grande envergure avec un échantillonnage plus important. Braham Jmili et coll trouvaient dans leur étude en Tunisie 68,5% de LAL et 20% de LAM tandis que Inwoley et coll en Côte d'ivoire donnaient les chiffres de 30,7% et 69,3% respectivement de LAL et LAM [25,28].

Une autre étude réalisée au Mali par l'équipe de Togo B. [29] avait trouvé les taux de 80% pour les LAL et 20% pour les LAM ce qui est une répartition habituelle observée dans les leucémies aiguës de l'enfant comme l'ont montré les travaux des équipes de Kebriaei et de Lewis [30, 31]. La LAL étant environ 5 fois plus fréquente que la LAM chez l'enfant [32,33].

Dans notre série les LAM2 était plus fréquente car retrouvée chez 9 patients (30%), les autres types de LAM ont été retrouvés à raison d'un cas pour chacun sauf les LAM3 et les LAM7 qui n'ont pas été retrouvées. D'autres études menées ailleurs sont fait état de taux de LAM2 de 28% au Maroc, 17% en Tunisie [31] et 15% en cote d'ivoire [28].

Les LAL1/2 ont été majoritaires dans les LAL avec un taux de 93,7% comparativement aux études Marocaine et Tunisienne où des taux respectifs de 84 et 97% ont été enregistrés [25,28]. La cytologie ne nous permettant pas de déterminer les sous types de LAL, décisif dans la conduite d'une bonne prise charge des patients, nous avons eu recours à l'immunophénotypage par cytométrie en flux.

L'immunophénotypage est un examen complémentaire de la cytologie permettant d'affirmer le caractère lymphoïde ou myéloïde des cellules blastiques et de connaître les différents stades de maturation des blastes grâce aux marqueurs qu'ils expriment.

Chez un patient où la cytologie n'a pas pu nous aider à distinguer une LAM0 d'une LAL, le phénotype immunologique a permis d'objectiver finalement une LAL portant ainsi le nombre de LAL de notre série à dix sept dont 94% sont de type B. Ceci confirme l'intérêt incontestable de l'immunophénotypage dans le diagnostic des leucémies aiguës avec blastes indifférenciés. Ce taux est plus important comparé à celui trouvé dans l'étude de l'EGIL (80%) sur une série de 581 LAL de l'enfant en France [31]. Cette différence pourrait être expliquée par notre faible cohorte.

Sur les dix sept cas de LAL, l'immunophénotypage nous a révélé 8 cas (27%) de LALB-I (pro-B), 8 cas de LALB-III (pré-B) et un cas de LALT mature (T-IVb). En Tunisie Braham Jmili et coll trouvaient des taux de 7% de LALB-II et 73% de LALB-III [25]. En Côte-d'Ivoire Inwoley et coll avaient trouvé 17% de LALB-I et 33% de LALB-III [28].

Le diagnostic des leucémies est basé sur les données cliniques, cytologiques et cytochimiques. Or il existe plusieurs cas où ces approches ne permettent pas de poser le diagnostic.

Avec l'avènement de l'immunophénotypage, il est devenu possible, dans la plupart de ces cas, de trancher quant à l'origine de la lignée cellulaire néoplasique en prolifération ou de confirmer un diagnostic déjà posé. Il a permis d'identifier les leucémies multiphénotypiques ou indifférenciées qui ne peuvent être diagnostiquées que par cette approche. Il permet en outre d'établir une classification immunophénotypique dont le potentiel pronostic est en cours d'évaluation.

# **CONCLUSIONS**

Cette étude avait pour objectif principal de déterminer les types de profils cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës de l'enfant. Dans notre série on avait observé une répartition inhabituelle des cas avec une augmentation des LAM comparée à ce qui est rapporté dans de nombreux travaux où les LAL sont cinq fois plus retrouvés que les LAM. Cependant ce constat devra être vérifié par une étude de longue durée sur un nombre de cas plus important. L'immunophénotypage nous a permis de classer les LAL selon leur profil immunologique, important pour une bonne prise en charge des patients.

L'intégration des données génétiques recommandée par la nouvelle classification de l'OMS de 2008 reste très difficile dans notre contexte marqué par un déficit du plateau technique. Ceci remet sur la table la nécessité de mutualiser les moyens et les connaissances dans le souci de mieux faire face aux défis posés par le diagnostic des leucémies aiguës.

Si le diagnostic d'une leucémie aigue se base sur des arguments cytologiques et cytochimiques, la cytométrie en flux y est d'un apport considérable car fournissant des informations complémentaires pour mieux définir les différentes entités des leucémies aiguës dans un intérêt diagnostic, pronostic et thérapeutique.

# **REFERENCES**

- 1- Fréquence hospitalière et évolution des leucémies aiguës de L'Enfant à Dakar.  
[http://www.researchgate.net/publication/264731408\\_Frquence\\_hospitalire\\_et\\_volution\\_de\\_s\\_leucmies\\_aigues\\_de\\_lenfant\\_\\_Dakar](http://www.researchgate.net/publication/264731408_Frquence_hospitalire_et_volution_de_s_leucmies_aigues_de_lenfant__Dakar) [consulté 17 Nov. 2015].
- 2- **Ching-Hon Pui** Childhood leukemia Cambridge University Press 1999
- 3- **Lewis B. Silverman**, MD Acute Lymphoblastic Leukemia in Infancy Pediatr Blood Cancer 2007; 49: 1070–1073
- 4- **Conter V, Rizzari C, S Sala and all** Acute Lymphoblastic Leukemia Orphanet Encyclopedia Creation date: December 2004
- 5- **M.Fournier A.Lambilliotte** Rôle du biologiste dans le diagnostic et le suivi des LAL de l'enfant .Ann. Biol. Clin 1998 56 :343-7
- 6- **Diallo Aly .D, Baby M, Dembele . A K**, les hémopathies malignes de l'enfant : aspects épidémiologiques dans le service d'hématologie oncologie du point G, Bamako, Mali (1996-2003).Mali med ; 2008 ; 4 : 63-67.
- 7- **Gneproust M.** Drépanocytose et leucémie: elles font des ravages.  
<http://fratmat.info/> consulté le 17 mars 2014.
- 8- **Christian. B** Leucémies aiguës lymphoblastiques Publié le : 20 décembre 2004.
- 9- **Quessar A., N. Hda\*, M. Lamchaheb, S et coll.** Leucémies aiguës myéloblastiques au Maroc: profil cytogénétique à propos de 532 cas REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES –novembre 2009 – supplément N°416
- 10- **Larsen C.** Physiopathologie des leucémies aiguës : des avancées significatives Bull Cancer vol. 94, n° 10, octobre 2007
- 11- Masterpod. univ-rennes La leucémogénèse IMMUNO-HEMATO FONDAMENTALE et PATHOLOGIQUE. Octobre 2008

- 12- **Gueyffier F.** Modèle physiopathologique de la leucémie aiguë lymphoblastique UMR 5558 : Evaluation et Modélisation des effets Thérapeutiques .Université Claude Bernard - Lyon1
  
- 13- **Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al.** Genome wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007, 446 : 758-64
  
- 14- **Mullican SE, Zhang S, Konopleva M, et al.** Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and NR4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nature Med*2007, 13: 735.
  
- 15- **Llopis L.** Molecular biology and prognostic value in acute myloid leukemia. *Hématologie*, 2009. **15**(6): 426-43.
  
- 16- **Gilliland D.G.** Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol*, 2002. **39**(4 Suppl 3): 6-11.
  
- 17- **Leucémogénèse.**  
[http://esante.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20081120011424gacLeucEmogEnEse\\_2-10.ppt](http://esante.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20081120011424gacLeucEmogEnEse_2-10.ppt) -Consulté le 11/08/2014.
  
- 18- **Wiernik PH. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds.** Cancer principles and practice of oncology. Philadelphia: JB Lippincott 2000:1809-1835
  
- 19- **Liesner RJ, Goldstone AH.** ABC of clinical haematology: the acute leukaemias. *Br Med J* 2001; 314: 733-743
  
- 20- **Valensi F.** Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2003. **13- 018-G-05**: 7 pages.
  
- 21- **Bellaoui H, Khattab M, El Hansali M, et coll.** Etude du profil immunologique des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant au Maroc:Interet de l'étude de la coexpression du CD34 et CD10.Biologie et santé 2003;vol 3, N°1
  
- 22- **GAY-GUERINET j.** Facteurs de réponse dans les leucémies aiguës myéloblastiques traitées par azacytidine –Thèse méd. lille2 2012

- 23- **Warren Alperstein, MD; Mary Boren, MD; and Jennifer L. McNeer**, Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: From Diagnosis to Prognosis PEDIATRIC ANNALS • Vol. 44, No. 7, 2015
  
- 24- **Braham-Jmili N, Sendi-Senana, Khelif A, Saad A**. Leucémies aiguës myéloïdes en Tunisie: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques et classification OMS.J. Afr.Cancer 2010; 2:25-32
  
- 25- **Braham-Jmili N, Souguir S, Yacoub S, Khelif A**, Etude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques: analyse de 152 cas par cytométrie en flux. Ann Biol Clin, 2009;67(5): 543-51
  
- 26- **Adonis-Koffy L.Y, Sawadogo D, Koffi G, Touré P**, Leucémie aiguë lymphoblastique chez un nourrisson africain de 4 mois. Medecine d’afrique noire: 1999,46(8/9)
  
- 27- **Sebahoun G**. Anémies caractérisation, mécanisme, orientation diagnostic: Sebahoun G. ed Hematologie Clinique. Paris: Amette 2005:45-8
  
- 28- **Inwoley A.K, Sawadogo D, Mizero L**. Apport de l’immunophénotypage dans le diagnostic et le pronostic des leucémies aiguës à Abidjan, Cote d’ivoire.Bull Soc Pathol Exot, 2004, 97, 5,319-322
  
- 29- **Togo B, Traore F, Togo A P, Togo P**, et coll. Epidemiologie et pronostic des cancers pédiatriques au CHU Gabriel –Touré de Bamako (Mali); Médecine et santé tropicales 2014;245:73-77
  
- 30- **Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA**.Acute Lymphoblastic leukemia, Diagnosis and classification. Brest Pract Res Clin Heamatol. 2002; 15:597-621
  
- 31- **Lewis B. Silverman, MD**.Acute Lymphoblastic Leukemia in Infancy Pediatr. Blood Cancer 2007; 49:1070–1073
  
- 32- **Dicko AA**. Les hémopathies malignes dans le service de médecine interne à l’hôpital national du point G. Thèse, Med. Bamako, 1996;n°47

- 33- Richard G, Bene M. C.** A new approach of acute lymphoblastic leukemia immunophenotype classification: 1984-1994 the GEIL experience. Leukemia and lymphoma, 1994, 13, Suppl: 1-5

# **ANNEXES**

## FICHE D'ENQUETE

### PROTOCOLE D'IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES EN PEDIATRIE

#### ETAT CIVIL

NOM :

PRENOMS :

DATE DE NAISSANCE :

SEXE :

N° PATIENT :

DATE DU DIAGNOSTIC DE LA LEUCEMIE AIGUE :

#### BILAN MEDICAL

**1-ATCD familiaux:**

**2-ATCD particuliers:**

**3-Bilan médical initial (avant traitement)**

- Poids :
- Fièvre :
- Douleurs osseuses ou arthralgies:
- Taille :

**4-Clinique.**

- Ganglions :
- Hépatomégalie :
- Splénomégalie :
- Médiastin :
- Atteinte testiculaire :
- Autres atteintes cliniques (à préciser) :
- Signes hémorragiques : si oui à préciser :
  - Purpura cutané :
  - Hémorragie muqueuse (buccale, nasale...)
  - Hémorragie au point de ponction
  - Hémorragie cérébro-méningée :

**5-Atteinte neurologique:**

## BILAN BIOLOGIQUE

### 1- NFS au diagnostic

:

GB:

Blastes (sang):

Poly. Neutro :

Poly. Eosino:

Poly. Baso:

Lympho:

Mono:

Autres cellules:

VGM :

CCMH :

Hb :

Plaquettes :

TCMH :

**Commentaire sur le frottis :**

### 2-Groupage sanguin

**Groupe :**

**Rhésus :**

### **3-Myélogramme**

Dureté de l'os :

Aspiration :

Richesse moelle :

**Lignée mégacaryocytaire :**

#### **Lignée granuleuse**

Myéloblastes :

Promyélocytes :

Myélocytes :

Métamyélocytes :

Poly. Neutrophiles :

Poly. Basophiles :

Poly. Eosinophiles :

#### **Lignée érythroblastique**

Proérythroblastes :

Erythroblastes basophiles :

Erythroblastes polychromatophiles :

Erythroblastes acidophiles :

#### **Lignée lympho-Monocytaire**

Lymphoblastes :

Lymphocytes :

Plasmocytes :

Monoblastes :

Monocytes :

#### **Cytochimie :**

**MPO :**

**Estérases :**

**Classe FAB :**

#### 4-Immunophénotypage

|                                             | Marqueurs           | Expression | Valeur absolue | pourcentage | Commentaires |
|---------------------------------------------|---------------------|------------|----------------|-------------|--------------|
| Marqueurs d'immaturité                      | CD45 <sup>LOW</sup> |            |                |             |              |
|                                             | CD34                |            |                |             |              |
|                                             | HLA-DR              |            |                |             |              |
| Marqueurs lymphoïdes B                      | CD10                |            |                |             |              |
|                                             | CD19                |            |                |             |              |
|                                             | CD20                |            |                |             |              |
|                                             | CD22                |            |                |             |              |
|                                             | CD79a               |            |                |             |              |
|                                             | Kappa/Lambda        |            |                |             |              |
|                                             | SIgM                |            |                |             |              |
| Marqueurs lymphoïdes T                      | CD4                 |            |                |             |              |
|                                             | CD3                 |            |                |             |              |
|                                             | CD5                 |            |                |             |              |
|                                             | CD7                 |            |                |             |              |
|                                             | CD8                 |            |                |             |              |
| Marqueurs myéloïdes                         | MPO                 |            |                |             |              |
|                                             | CD14                |            |                |             |              |
|                                             | CD33                |            |                |             |              |
|                                             | CD117               |            |                |             |              |
|                                             | CD38                |            |                |             |              |
| Interprétation du profil immunophénotypique |                     |            |                |             |              |

Tableau récapitulatif des données épidémiologiques et cytologiques des patients

| Patients | SEXE | AGE | BLASTES<br>moelle | MPO | CYTOLOGIE<br>(FAB) | PNENOTYPAGE                                                        | CLASSIFICATION<br>(EGIL) | CONCLUSION   |
|----------|------|-----|-------------------|-----|--------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------|
| P1       | M    | 9   | 80                | POS | LAM5               | CD22+/CD79a/CD3-<br>/CD14+/CD33+/CD117+ /CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P2       | M    | 6   | 40                | POS | LAM2               | CD22+/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34-/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P3       | F    | 7   | 80                | POS | LAM2               | CD22+/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117-/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P4       | F    | 4   | 22                | NEG | LAM6               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117-/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P5       | M    | 10  | 76                | POS | LAM2               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117-/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P6       | M    | 9   | 57                | POS | LAM2               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P7       | M    | 15  | 38                | NEG | LAL3               | CD10+/IgM+/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34-/HLA-DR+  | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P8       | M    | 9   | 56                | NEG | LAM0 ou<br>LAL     | CD10+/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22 +/CD34-/HLA-DR+ | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P9       | M    | 1   | 90                | NEG | LAL2               | CD10+/IgM+/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3- CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+ | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P10      | F    | 14  | 80                | POS | LAM2               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P11      | M    | 3   | 34                | NEG | LAL                | CD10+/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+  | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P12      | F    | 3   | 86                | NEG | LAL                | CD10+/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3+/CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR- | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P13      | F    | 14  | 37                | NEG | LAL2               | CD10+/IgM+/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+ /CD34+/HLA-DR- | BIII (pré-B)             | LAL B mature |
| P14      | F    | 13  | 91                | POS | LAM2               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR+             | LAM                      |              |
| P15      | M    | 5   | 81                | POS | LAM2               | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-                                            | LAM                      |              |

|     |   |    |    |     |              |                                                                     |              |                |
|-----|---|----|----|-----|--------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|
|     |   |    |    |     |              | /CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR-                                         |              |                |
| P16 | M | 2  | 71 | POS | LAM5 ou M4eo | CD22-/CD79a-/CD3-<br>/CD14+/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR-              | LAM4         |                |
| P17 | F | 3  | 35 | NEG | LAL          | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+   | BI (pro-B)   | LAL B immature |
| P18 | M | 11 | 62 | NEG | LAL          | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+   | BI (pro-B)   | LAL B immature |
| P19 | F | 15 | 75 | POS | LAM0 ou M1   | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR+              | LAM          |                |
| P20 | M | 11 | 89 | NEG | LAL          | CD7+/CD2-/CD79a-/CD8-/CD3+/CD22-<br>/CD5-/CD34-/HLA-DR+             | T IV-b       | LAL T mature   |
| P21 | F | 9  | 30 | NEG | LAL          | CD10+/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+   | BIII (pré-B) | LAL B mature   |
| P22 | M | 10 | 50 | POS | LAM2         | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117+/CD34+/HLA-DR-              | LAM          |                |
| P23 | M | 5  | 60 | NEG | LAL1         | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+   | B I (pro-B)  | LAL B immature |
| P24 | F | 12 | 38 | NEG | LAL1         | CD10-/IgM-/CD19-/Kappa-Lambda-<br>/CD79a+/CD3-/CD22-/CD34-/HLA-DR-  | B I (pro-B)  | LAL B immature |
| P25 | M | 13 | 89 | NEG | LAL          | CD10-/IgM-/CD19-/Kappa-Lambda-/CD3-<br>CD79a+/CD22-/CD34+/HLA-DR+   | B I (pro-B)  | LAL B immature |
| P26 | M | 11 | 98 | NEG | LAL          | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/ CD34+/HLA-DR+  | B I (pro-B)  | LAL B immature |
| P27 | M | 4  | 36 | NEG | LAL          | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD79a-/CD3+/CD22+/ CD34-/HLA-DR+ | B I (pro--B) | LAL B immature |
| P28 | M | 2  | 79 | NEG | LAL2         | CD10+/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34-/HLA-DR+   | BIII (pré-B) | LAL B mature   |
| P29 | F | 3  | 87 | NEG | LAM2         | CD22-/CD79a-/CD3-/CD14-<br>/CD33+/CD117-/CD34+/HLA-DR+              | LAM          |                |
| P30 | M | 14 | 74 | NEG | LAL1         | CD10-/IgM-/CD19+/Kappa-Lambda-<br>/CD3-CD79a-/CD22+/CD34+/HLA-DR+   | B I (pro-B)  | LAL B immature |

## **RESUME**

### **Introduction**

La leucémie aiguë est un ensemble de processus malins impliquant un précurseur médullaire lymphoïde ou myéloïde, associé à une dérégulation des programmes cellulaires fondamentaux avec apparition d'anomalies génétiques acquises. Au Sénégal, son diagnostic a longtemps été basé sur la cytologie avec la classification du French American British (FAB) puis compléter par celle utilisant le phénotype immunologique du Groupe européen de caractérisation immunologique des leucémies aiguës (EGIL). La classification actuelle de 2008 proposée par l'OMS intègre des données génétiques et cliniques aux données morphologiques et immunophénotypiques déjà utilisées dans celle du FAB et de l'EGIL.

### **Objectif**

L'objectif de cette étude est de rechercher les profils cytologique et immunophénotypique de patients atteints de leucémies aiguës et colligés en oncopédiatrie.

### **Méthodologie**

Il s'agissait d'une étude prospective et descriptive sur 6 mois allant du 02 février au 30 juillet 2014 et qui a eu pour cadre les services d'onco-pédiatrie, l'unité d'immunologie et le laboratoire d'hématologie de l'hôpital Aristide le Dantec de Dakar. Trente patients ont été colligés, admis en oncopédiatrie pour une leucémie aiguë confirmée par un médullogramme et chez lesquels l'immunophénotypage par cytométrie en flux (FACS calibur Becton Dickinson USA) a été réalisé. Pour ce faire nous avons utilisé un panel d'orientation (anticorps monoclonaux anti marqueurs de lignée couplés à des fluorochromes) puis un autre panel permettant un ciblage au mieux de la lignée concernée. Les données ont été saisies et analysées sur Excel 2007. Nous avons ensuite procédé à une description de la population d'étude puis à l'analyse des paramètres cliniques et biologiques.

### **Résultats**

L'âge moyen était de 11,5 ans avec des extrêmes de 1 an à 15 ans et un sex-ratio de 1,7. Des douleurs osseuses ont été notées chez 37 % des patients. Un syndrome tumoral a été présent chez presque tous nos patients avec 87% de cas d'adénopathies superficielles. Plus de trois quarts des patients avaient présenté une hyperleucocytose et une thrombopénie. Une anémie avait été notée chez la totalité de nos patients et cette dernière était profonde chez la majorité (70%) avec un taux d'hémoglobine qui était inférieur à 8g/dl. Cette anémie a été normochrome normocytaire dans la grande majorité des cas (21 patients). L'examen morphologique par le médullogramme a permis de noter selon les critères FAB 13 cas de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) dont 9 LAM2, 1 LAM0 ou 1, 1 LAM4 ou 5, 1 LAM5 et un 1 LAM6, 16 cas de Leucémie aiguë lymphoblastique dont 15 LAL1/2 et 1 LAL3 et 1 cas où la cytochimie n'a pas permis d'objectiver une LAL ou LAM0. D'après le phénotype immunologique et selon les critères de l'EGIL ont été retrouvés 13 cas de LAM, 1 cas de LAL T mature (TIV), 8 cas de LAL BI (proB) et 8 cas de LAL BIII (preB).

### **Conclusion**

Si le diagnostic d'une leucémie aiguë se base sur des arguments cytologiques et cytochimiques, la cytométrie en flux y est d'un apport considérable car fournissant des informations complémentaires pour mieux définir les différentes entités des leucémies aiguës dans un intérêt pronostic et thérapeutique.