

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE



ANNEE 1992

THESE N°

30/1

**ETUDE DES MARQUEURS DE MEMBRANE
DES CELLULES
DE LEUCEMIES AIGUES NON LYMPHOBLASTIQUES
(Interêt et modalités pratiques)**

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 135505 5

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenu après la soutenance du

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement le 19 juin 1992 à Limoges

par

Dominique SEMPAY épouse LARRICQ

Née le 23 Février 1963 à TALENCE (Gironde)

JURY

Monsieur le Professeur MALINVAUD
Madame le Professeur BORDESSOULE
Monsieur le Professeur PIVA
Mademoiselle le Professeur TIXIER
Madame le Docteur JULIA

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité

THESE MED LIMOGES 1992

130



Esc 3
Sib: 400880

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1992

THESE N° 30

**ETUDE DES MARQUEURS DE MEMBRANE
DES CELLULES
DE LEUCEMIES AIGUES NON LYMPHOBLASTIQUES
(Interêt et modalités pratiques)**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenu après la soutenance du

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement le 19 juin 1992 à Limoges

par

Dominique SEMPAY épouse LARRICQ

Née le 23 Février 1963 à TALENCE (Gironde)

JURY

Monsieur le Professeur MALINVAUD
Madame le Professeur BORDESSOULE
Monsieur le Professeur PIVA
Mademoiselle le Professeur TIXIER
Madame le Docteur JULIA

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur BONNAUD
- ASSESEURS : Monsieur le Professeur PIVA
Monsieur le Professeur COLOMBEAU

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ADENIS Jean-Paul	Ophthalmologie
ALAIN Luc	Chirurgie infantile
ARCHAMBEAUD Françoise	Médecine interne
ARNAUD Jean-Paul	Chirurgie orthopédique et Traumatologique
BARTHE Dominique	Histologie, Embryologie
BAUDET Jean	Clinique obstétricale et Gynécologie
BENSAID Julien	Clinique médicale cardiologique
BONNAUD François	Pneumo-Phtisiologie
BONNETBLANC Jean-Marie	Dermatologie
BORDESSOULE Dominique	Hématologie et Transfusion
BOULESTEIX Jean	Pédiatrie
BOUQUIER Jean-José	Clinique de Pédiatrie
BRETON Jean-Christian	Biochimie
CAIX Michel	Anatomie
CATANZANO Gilbert	Anatomie pathologique
CHASSAIN Albert	Physiologie
CHRISTIDES Constantin	Chirurgie thoracique et cardiaque
COLOMBEAU Pierre	Urologie
CUBERTAFOND Pierre	Clinique de chirurgie digestive
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	Pédiatrie
DENIS François	Bactériologie-Virologie
DESCOTTES Bernard	Anatomie
DESROGES-GOTTERON Robert	Clinique thérapeutique et rhumatologique
DUDOGNON Pierre	Rééducation fonctionnelle
DUMAS Michel	Neurologie
DUMAS Jean-Philippe	Urologie
DUMONT Daniel	Médecine du Travail
DUPUY Jean-Paul	Radiologie
FEISS Pierre	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale
GAINANT Alain	Chirurgie digestive
GAROUX Roger	Pédopsychiatrie
GASTINNE Hervé	Réanimation médicale
GAY Roger	Réanimation médicale
GERMOUTY Jean	Pathologie médicale et respiratoire
GUERET Pascal	Cardiologie et Maladies vasculaires
HUGON Jacques	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
LABADIE Michel	Biochimie
LABROUSSE Claude	Rééducation fonctionnelle
LASKAR Marc	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
LAUBIE Bernard	Endocrinologie et Maladies métaboliques
LEGER Jean-Marie	Psychiatrie d'adultes

LEROUX-ROBERT Claude
LIOZON Frédéric
LOUBET René
MALINVAUD Gilbert
MENIER Robert
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques
MOULIES Dominique
OLIVIER Jean-Pierre
OUTREQUIN Gérard
PECOUT Claude
PESTRE-ALEXANDRE Madeleine
PILLEGAND Bernard
PIVA Claude
RAVON Robert
RIGAUD Michel
ROUSSEAU Jacques
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre
TABASTE Jean-Louis
TREVES Richard
VALLAT Jean-Michel
VANDROUX Jean-Claude
WEINBRECK Pierre

Néphrologie
Clinique Médicale A
Anatomie pathologique
Hématologie
Physiologie
Pharmacologie
Neurochirurgie
Chirurgie infantile
Radiothérapie et Cancérologie
Anatomie
Chirurgie orthopédique et traumatologie
Parasitologie
Hépathologie-Gastrologie-Entérologie
Médecine légale
Neurochirurgie
Biochimie
Radiologie
Hépto-Gastro-Entérologie
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie-Obstétrique
Thérapeutique
Neurologie
Biophysique
Maladies infectieuses

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A JACQUES,

Pour l'amour que tu me donnes.
Pour tous tes sacrifices, pour la patience que tu as eu
pour taper ce mémoire.

A ANNA ma fille,

Grâce à toi je connais désormais le bonheur d'être
maman.

A MES PARENTS,

Pour tout ce que vous m'avez offert dans ma vie.
Vous avez représenté le moteur de mes études.
Je sais ce que ce travail représente pour vous, et je
souhaite que vous y trouviez le témoignage de ma
profonde affection.

A TOUTE MA FAMILLE

A CEUX QUI A UN MOMENT OU UN AUTRE M'ONT AIDEE DANS LA
REALISATION DE MES ETUDES.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR GILBERT MALINVAUD
PROFESSEUR DES UNIVERSITES D'HEMATOLOGIE
BIOLOGISTE DES HOPITAUX
CHEF DE SERVICE

Vous nous avez guidée dans l'apprentissage de la cytologie en
nous faisant partager votre savoir et votre rigueur.
Vous nous avez transmis le goût pour cette discipline.
L'honneur que vous nous faites en présidant ce jury est pour
nous l'occasion de vous témoigner notre profond respect.

A NOS JUGES,

MADAME LE PROFESSEUR DOMINIQUE BORDESSOULE
PROFESSEUR DES UNIVERSITES D'HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION

Dès le début vous nous avez montré votre intérêt pour ce mémoire.

Vous avez su donner de votre temps pour nous prodiguer des conseils.

Nous voulons vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail, et vous exprimer notre plus vive gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CLAUDE PIVA,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE LEGALE
MEDECIN DES HOPITAUX
CHEF DE SERVICE

Vous nous avez accueillie dans votre service dès notre
arrivée à Limoges, et nous avez conseillée dans le choix
de notre spécialité.

Vous nous faites l'honneur de nous juger.

Nous vous prions de trouver ici notre considération
respectueuse.

MADemoiselle LE PROFESSEUR MARIE TIXIER,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE BIOCHIMIE

Vous nous avez toujours réservé un accueil bienveillant
et une grande disponibilité.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites
de juger ce mémoire.

A MADAME ANNIE JULIA
MAITRE DE CONFERENCE UNIVERSITAIRE
PRATICIEN HOSPITALIER

Vous nous avez aidée dans nos travaux expérimentaux.
Nous vous remercions pour la confiance que vous nous
avez témoignée.

A MONSIEUR CLAUDE VERGER,

Vous m'avez fait partager votre connaissance et votre enthousiasme.

Vous avez consacré du temps à la mise au point des techniques immunoenzymologiques.

Vous m'avez toujours suivie dans la réalisation de ce travail.

Je sais que je vous dois beaucoup.

Soyez assuré de mon amitié.

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHRISTIAN DELPEYROUX

Pour son aide précieuse dans la réalisation des schémas.

A MONSIEUR JOEL MENU

Pour votre gentillesse et votre aide.

A TOUS CES MALADES, SUPPORT DE NOS ECRITS...

Qu'ils puissent trouver un jour l'apaisement de leurs souffrances.

ABREVIATIONS UTILISEES

LA : leucémie aiguë
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
LANL : leucémie aiguë non lymphoblastique
LAM : leucémie aiguë myéloïde
MPO : myéloperoxydase
RC : rémission complète
IF : immunofluorescence
IFI : immunofluorescence indirecte
CMF : cytométrie en flux
MGG : May-Grünwald-Giemsa
GEIL : groupe d'étude immunologique des leucémies

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I POPULATION ETUDIEE

I - Caractéristiques cliniques et biologiques
 initiales des patients étudiés

II - Traitement et devenir des patients

CHAPITRE II METHODES D'ETUDE

I - Le choix des anticorps monoclonaux

II - Etude par cytométrie de flux

III - Le marquage enzymologique : mise au point
 de la technique en APAAP au laboratoire

CHAPITRE III RESULTATS

CHAPITRE IV DISCUSSION

I - Intérêt du typage immunologique

II - Limites de la cytométrie en flux et
 alternative possible

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Les leucémies aiguës non lymphoblastiques (LANL) sont un groupe hétérogène de maladies impliquant les différentes lignées hématopoïétiques non lymphoïdes.

Les leucémies sont classées selon des critères morphologiques et cytochimiques. Le but des classifications est de rattacher la prolifération leucémique à une lignée cellulaire donnée et si possible à un stade de la différenciation cellulaire normale. La classification du groupe FAB (franco-américano-britannique), fondée sur de tels critères, est actuellement universellement adoptée par les centres hématologiques. Cependant, ce type de classification a certaines limites : nécessité de cytologistes expérimentés, discrimination entre lignées monocytaires et granuleuses dépendante de la révélation cytochimique de deux activités enzymatiques, difficultés à identifier certains types rares de leucémies.

La mise au point de la technique des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux par Köhler et Milstein (1975) a ouvert une nouvelle voie pour l'étude des leucémies aiguës. La cible de ces anticorps est une structure étroite d'une partie de l'antigène, dite épitope, et que reconnaît le site anticorps. Certains sont dirigés contre des structures d'antigènes déjà connues, comme les chaînes d'acides aminés des immunoglobulines, les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, la glycophorine, les glycoprotéines plaquettaires, etc... D'autres ont fait apparaître des structures jusqu'alors inconnues. Étudiés au cours de Workshops internationales, ils ont permis d'utiliser des groupes d'antigènes liés à la différenciation cellulaire hématopoïétique et nommés pour cela "Clusters de différenciation" (CD).

Cette étude des marqueurs immunologiques peut se faire de diverses façons : en immunofluorescence ou en immunoenzymologie, sur coupes de tissus congelés, sur cellules fixées ou sur suspensions cellulaires.

L'abord immunologique a grandement amélioré la classification des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) en introduisant des critères positifs de diagnostic, et en permettant de rattacher la prolifération blastique à des stades précis de la différenciation lymphoïde B ou T.

Les progrès sont moins rapides pour les leucémies aiguës non lymphoblastiques en raison de l'importante hétérogénéité des cellules médullaires.

L'objectif de notre travail est de faire le point sur l'étude des marqueurs des cellules de LANL, tant sur le plan des modalités techniques que sur le plan des résultats et données actuelles.

Nous essaierons de dégager l'intérêt de cette étude et nous apporterons notre expérience personnelle sur le typage immunoenzymologique des leucémies.

CHAPITRE I
POPULATION ETUDIEE

Nous avons sélectionné, entre avril 1987 et janvier 1992, quarante-neuf patients atteints de leucémie aïgue non lymphoblastique (LANL) diagnostiquée au laboratoire d'hématologie du centre hospitalier régional et universitaire de Limoges.

Il s'agit pour trente-neuf d'entre eux d'une LANL de novo, et pour les dix restants, d'une LANL survenant alors que le patient a déjà des antécédents hématologiques (tableau 3) :

- dysmyélopoïèse : cas 41, 42, 43, 44.
- syndrome myéloprolifératif : cas 45, 46, 47, 48.
- Kalher : cas 40.
- rechute chez une enfant de leucémie aiguë : cas 49.

La plupart d'entre eux présentent, au moment du diagnostic, un envahissement médullaire, par des cellules blastiques, d'au moins cinquante pour cent.

Dans tous les cas, le recueil médullaire en vue de l'immunophénotypage s'est fait avant traitement de façon à réaliser une étude cytofluorométrique dans les meilleures conditions. Le prélèvement a pu être traité dans les délais les plus brefs pour éviter l'altération des cellules.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous exposons les résultats de tests faits à partir de frottis médullaires destinés à explorer une technique de marquage immunoenzymologique.

Les études étant décalées dans le temps, seuls trois patients font partis de l'échantillon précédent.

Notre critère de choix est donc simple : il s'agit d'analyser tous les patients atteints de LANL au cours de cette période, sans distinction aucune, pour lesquels nous disposons de données immunologiques non ambiguës, caractérisant la seule population cellulaire maligne. En effet, certains malades, pour diverses raisons (dont l'impossibilité d'obtenir un nombre suffisant de cellules) n'ont pu être phénotypés correctement. Nous les avons exclus de notre étude.

Notre échantillon n'est donc, absolument pas représentatif des leucémies aiguës myéloblastiques diagnostiquées au centre hospitalier de Limoges. De plus il s'agit d'une population hétérogène en âge, en protocole thérapeutique, ce qui ne nous permet pas d'effectuer d'analyse statistique.

Nous avons préféré séparer en deux groupes ces quarante-neuf sujets (LANL de novo, LANL avec antécédents hématologiques) pour faciliter l'étude du devenir en fonction des marqueurs, connaissant le pronostic d'emblée défavorable de ces leucémies aiguës sur antécédents hématologiques.

Enfin ces leucoses sont classées selon la classification du groupe FAB (franco-américano-britannique) établie en 1976 et révisée en 1981 puis en 1985, dont nous rappelons dans le tableau 1 les éléments essentiels (1), (2), (3), (4), (5).

Le groupe FAB n'a pas encore adopté de façon officielle, le sous-type, ou classe, M0 ; bien que cette désignation apparaisse fréquemment dans la littérature (6). Il s'agit de leucémies aiguës indifférenciées morphologiquement, et négatives pour la réaction des myéloperoxydases. Elles sont identifiées comme leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), grâce à l'immunophénotypage ou, grâce à la démonstration en microscopie électronique de granules myéloperoxydases positifs.

Nous emploierons également ce terme de M0 pour certains de nos patients, selon les critères définis ci-dessus.

Avant de passer à l'étude immunologique nous allons exposer dans ce chapitre les données initiales pour chaque patient ainsi que le traitement et le devenir sachant que le suivi s'arrête au 31 janvier 1992.

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES LEUCEMIES AIGUES NON
LYMPHOBLASTIQUES SELON LE GROUPE FAB

TYPE	SIGNIFICATION
M1	plus de 90% des cellules médullaires non érythroïdes et non lymphoïdes sont des blastes de type I et/ou II.
M2	entre 30 et 90% des cellules médullaires non érythroïdes et non lymphoïdes sont des blastes de type I et /ou II. Fréquente dysgranulopoïèse.
M3	leucose promyélocytaire
M4	leucose myélomonocytaire, c'est à dire : leucose myéloïde aiguë avec des monocytes sanguins $> 5000/\text{mm}^3$ et/ou des cellules monocytaires médullaires comprises entre 20 et 80%.
M5	leucose aiguë monoblastique : plus de 80% des cellules non érythroïdes et non lymphoïdes sont des monoblastes. - M5a : pas de signe de maturation. - M5b : signes de maturation monocytaire
M6	erythroleucémies : - soit plus de 50% des cellules médullaires sont des érythroblastes au sein d'une moëlle dont plus de 30% des cellules non érythroïdes et non lymphoïdes sont des leucoblastes. - soit anomalies morphologiques majeures de la lignée érythroblastique au sein d'une moëlle rappelant celle des M1, M2, M4, ou M5.
M7	leucose à mégacaryoblastes. Critères de diagnostic stricts : _ blastose médullaire supérieure à 30 % _ identification exacte des cellules par des tests cytochimiques ou immunologiques. _ myélofibrose avec excès de mégacaryoblastes en voie de maturation

I CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES INITIALES DES PATIENTS ETUDIÉS :

A/ Données générales :

Le tableau 2 représente les données de base pour les 39 sujets chez lesquels est diagnostiquée une leucémie aiguë non lymphoblastique de novo.

Dans le tableau 3 apparaissent les autres patients pour lesquels les antécédents ont déjà été précisés.

Pour les cas 39 et 45 le diagnostic cytologique repose sur l'étude des blastes du sang périphérique.

Par ailleurs la richesse des étalements médullaires est normale dans tous les cas, sauf pour les cas 20 et 39 où l'interprétation fût difficile, la moelle recueillie étant très pauvre.

Dans l'ensemble de la population, au moment du diagnostic, un syndrome tumoral (essentiellement une splénomégalie) est retrouvé dans 30,6 % des cas, une anémie (hémoglobine < 10 g/100 ml) dans 70,7 % des cas, une hyperleucocytose supérieure à $100000/\text{mm}^3$ dans 16,6 % des cas et une thrombopénie inférieure à $50000/\text{mm}^3$ dans 41,6 % des cas.

Ces résultats sont tout à fait superposables à ceux collectés par le GEIL au 31 décembre 1990 (7).

B/ Analyse de la répartition selon le sexe, et selon l'âge et le sexe :

1) Au sein de la population totale :

_ Selon le sexe (figure 1) :
 population masculine = 29
 population féminine = 20

Au total on retrouve une légère supériorité des sujets de sexe masculin, 59,18 % de la population totale, par rapport aux sujets de sexe féminin avec 42,82 % de la population.

_ Selon la tranche d'âge et le sexe (graphe 1) :

L'âge moyen est de 59 ans et demi, avec des extrêmes de 14 et 85 ans.

La tranche d'âge la plus représentée pour les hommes est 60-69 ans avec 9 cas, puis 70-79 ans (7 cas), et à égalité, quatre cas pour les tranches 40-49 et 80-89 ans.

Chez les femmes, le pic de fréquence se situe entre 50 et 59 ans avec sept cas.

On remarque l'absence, dans cette population, de leucose aiguë non lymphoblastique dans la première décennie de la vie ainsi que dans la tranche allant de 20 à 29 ans. Un cas unique est retrouvé entre 10 et 19 ans; il s'agit d'une rechute de leucémie de l'enfant.

2) Chez les 39 patients avec LAM de novo :

- Selon le sexe (figure 2) :

La répartition est similaire avec 23 hommes, soit 58,97 % et 16 femmes, soit 41,03 % de la population totale.

- Selon la tranche d'âge et le sexe (graphe 2) :

De la même façon l'âge moyen est voisin : 60 ans.

Le pic de fréquence chez l'homme est décalé d'une tranche et se trouve entre 70 et 79 ans avec 6 cas, 5 cas pour la tranche 60-69 ans.

Chez la femme le pic reste dans l'intervalle 50-59 ans (5 cas).

3) Chez les 10 patients avec antécédents hématologiques (graphe 3) :

Il s'agit de 6 hommes et 4 femmes de 56 ans d'âge moyen. La baisse de l'âge moyen, dans ce sous-groupe, est liée à la présence d'un sujet de 14 ans.

Quatre hommes sur six sont dans la tranche 60-69 ans.

La moitié des femmes, dans celle allant de 50 à 59 ans.

Donc il n'y a pas de changement des pics de fréquence.

L'effectif est faible, mais on ne retrouve pas de sujets entre 20 et 39 ans ni entre 80 et 89 ans.

TABLEAU 2

DONNEES GENERALES

Cas	Classe FAB	AGE	SEXE	Sd.TUMO	Hb	Glob B	Plaq	% Blastés médullai.	% Blastés MPO pos	Estérasés ninh/inh
1	M1	55	M	N	6.2	2100	32000	70.0	70.0	ND
2	M1	39	M	P	11.9	360000	83000	96.0	62.0	P/P
3	M1	63	M	N	8.2	1300	80000	50.5	4.0	P/P
4	M1	32	F	P	9.4	12600	205000	89.0	85.0	P/P
5	M1	44	M	P	8.4	52800	6000	82.0	96.0	ND
6	M1	34	F	N	13.7	3700	203000	90.5	85.0	ND
7	M1	61	F	N	9.6	1600	80000	69.0	20.0	ND
8	M1	43	M	N	7.7	52000	1300	71.0	50.0	P/P
9	M1	53	F	N	8.0	87400	41000	93.0	93.0	ND
10	M1	49	F	N	11.2	2880	45000	94.0	96.0	P/P
11	M1	52	M	N	9.9	8100	211000	71.0	98.0	P/P
12	M1	71	M	N	8.7	58000	52000	98.0	73.0	ND
13	M1	80	M	N	7.4	800	7000	84.0	75.0	P/P
14	M1	75	M	N	14.0	52000	114000	82.5	95.0	P/P
15	M1	64	M	P	7.7	147000	9000	97.0	67.0	ND
16	M1	73	M	N	12.8	1900	231000	58.0	39.0	ND
17	M1	61	F	P	8.3	166000	53000	88.5	62.0	P/P
18	M1	70	M	N	8.5	289000	130000	87.0	50.0	ND
19	M1	80	M	P	10.9	51500	156000	84.0	49.0	P/P
20	M1	79	F	N	8.8	1000	321000	63.5	90.0	ND
21	M1	61	M	N	9.1	2100	71000	85.0	27.0	P/P
22	M2	38	F	N	9.4	14100	67000	56.0	90.0	P/P
23	M2	73	M	P	8.0	107000	69000	70.0	75.0	P/P
24	M2	77	M	N	9.7	900	42000	58.5	88.0	ND
25	M2	58	F	P	7.9	184000	23000	84.0	42.0	P/P
26	M2	64	M	P	12.0	16900	100000	73.6	50.0	P/P
27	M2	58	F	N	12.5	2800	301000	42.0	25.0	ND
28	M2	76	F	N	7.2	3000	329000	38.0	30.0	P/P
29	M2	85	M	N	8.5	36400	31000	61.5	94.0	P/P
30	M2	82	F	N	9.9	76900	70000	61.0	50.0	P/P
31	M2	75	F	N	10.8	1500	129000	42.0	95.0	P/P
32	M3	48	F	N	8.9	800	25000	90.5	ND	P/P
33	M3	50	F	N	7.0	7700	27000	88.0	ND	ND
34	M4	80	M	N	9.4	5000	119000	84.5	28.0	P/N
35	M4	55	M	P	10.4	76200	40000	88.0	98.0	P/N
36	M5	64	M	N	8.8	2800	31000	49.5	0.0	P/N
37	M5	43	M	P	10.2	20900	56000	84.0	27.0	P/P
38	M6	55	F	N	10.6	1200	45000	15.0	22.0	ND
39	M7	35	M	P	13.3	31200	231000			ND

TABLEAU 3

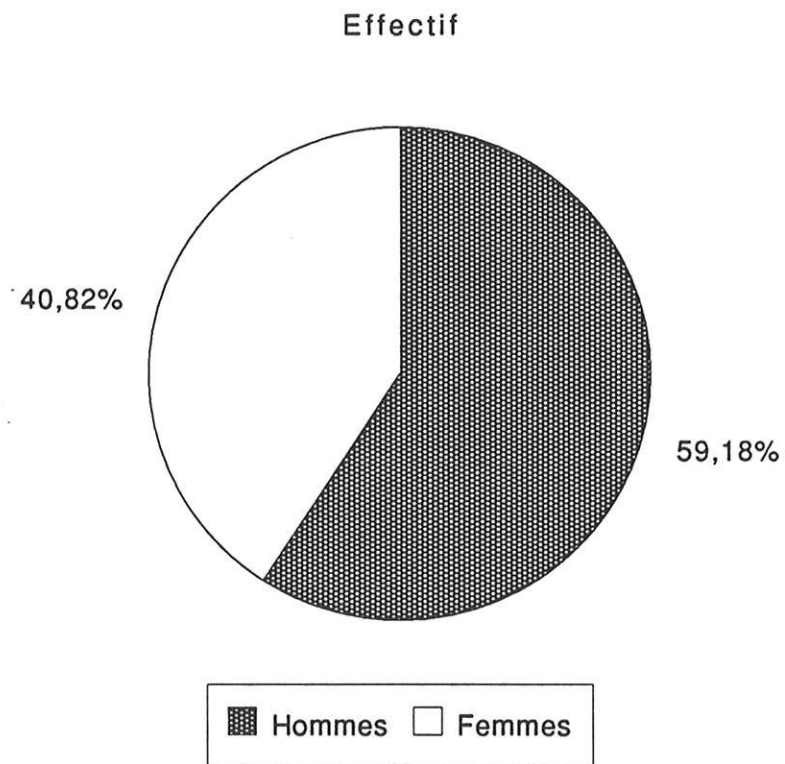
Cas	Classe FAB	AGE	SEXE	Sd TUMO	Hb	Glob B	Plaq	% Blastés médullai.	% Blastés MPO pos	Estérasés ninh/inh
40	M4	66	M	N	9.8	2500	53000	39.0	ND	ND
41	M5	76	M	P	8.5	89500	19000	74.5	0.0	P/N
42	M2	65	M	N	8.0	1700	21000	41.0	35.0	P/P
43	M2	64	M	N	8.4	22300	8300	56.0	50.0	P/P
44	M2	60	M	N	9.2	22000	496000	70.5	47.0	P/P
45	M2	50	F	P	8.6	2700	49000	ND		
46	M0	62	F	N	10.8	237000	151000	93.0	0.0	ND
47	M0	57	F	P	9.0	23800	31300	37.0	0.0	ND
48	M5	47	M	P	8.6	610000	139000	44.5	0.0	P/N
49	M0	14	F	N				94.5	95.0	ND

LEGENDE DES TABLEAUX 2 et 3

Sd TUMO	= syndrome tumoral, N : absence P : présence
Hb	= taux d'hémoglobine en g/100 ml
Glob B	= nombre de globules blancs ₃ / mm ³
PLaq	= nombre de plaquettes / mm ³
% blastes médullai	= pourcentage de blastes médullaires
% blastes MPO pos	= pourcentage de blastes positifs pour la réaction des myéloperoxydases (déterminée par une technique à la benzidine)
Esterases ninh/ inh	= * ninh : réaction des esterases utilisant le naphthol ASD acétate comme substrat. P : réaction positive; N : réaction négative; ND : réaction non déterminée. * inh : réaction des estérases inhibées par le fluorure de sodium. P : réaction positive; N : réaction négative; ND : réaction non déterminée.

Figure 1

REPARTITION SELON LE SEXE DANS LA POPULATION
TOTALE



Graphe 1

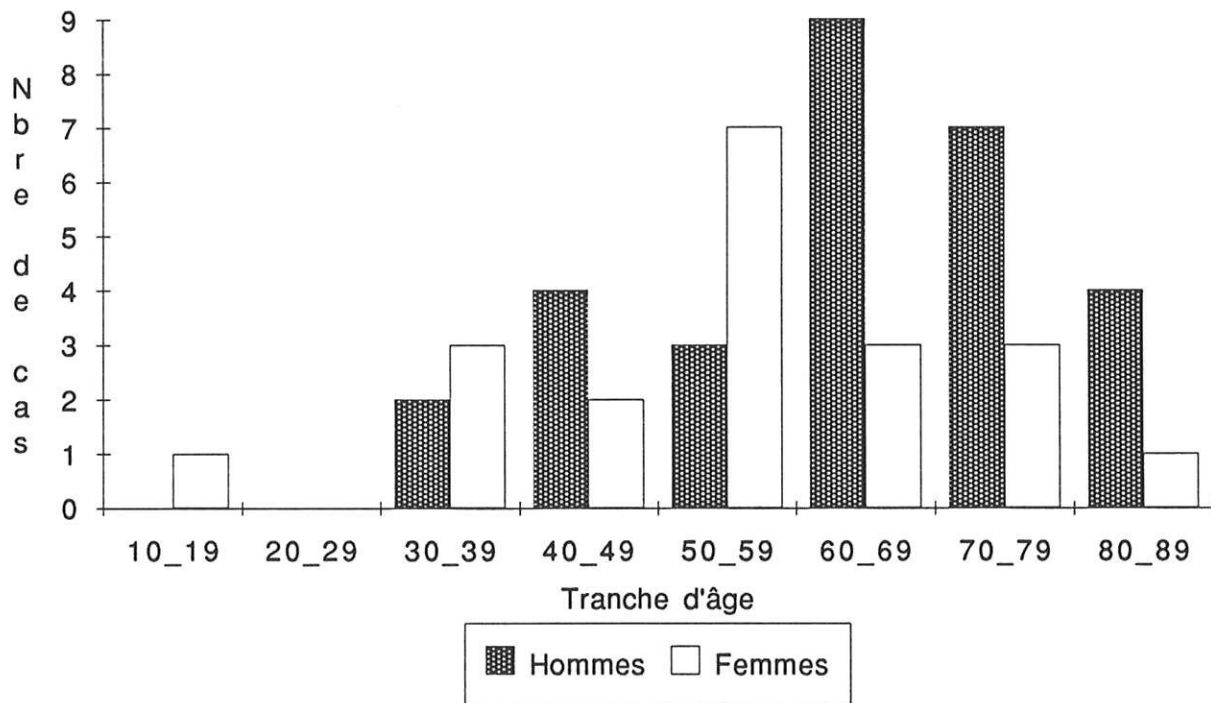
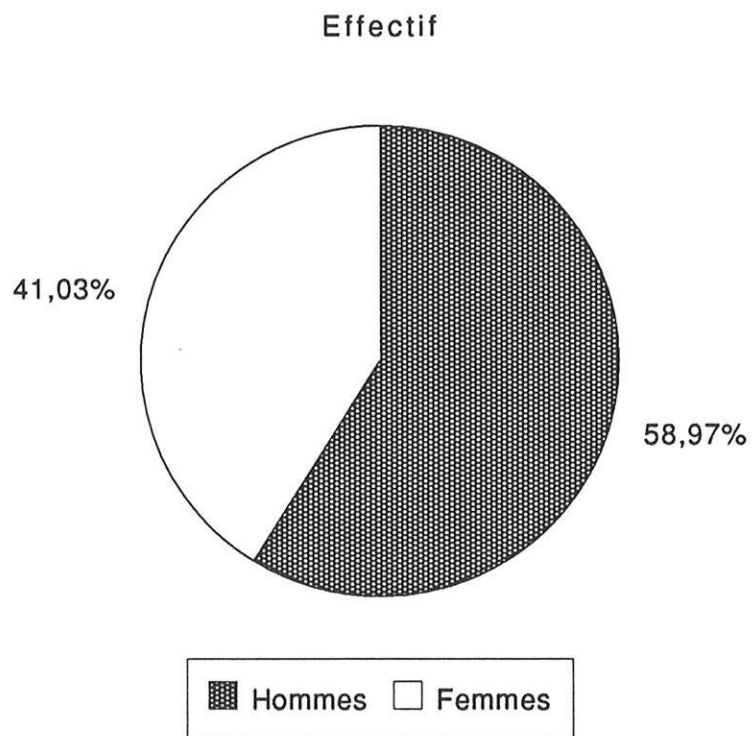
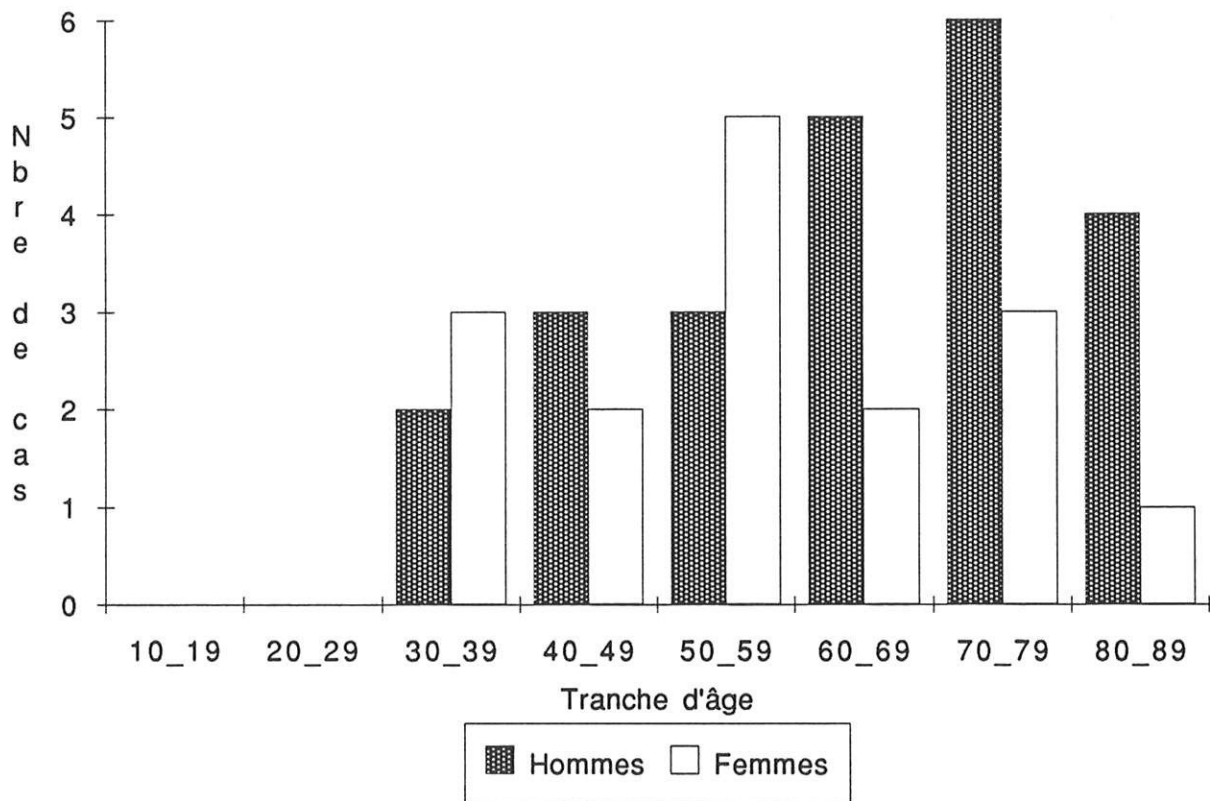
REPARTITION SELON LA TRANCHE D'AGE ET LE SEXE
DANS LA POPULATION TOTALE

Figure 2

REPARTITION SELON LE SEXE CHEZ LES LANL
DE NOVO

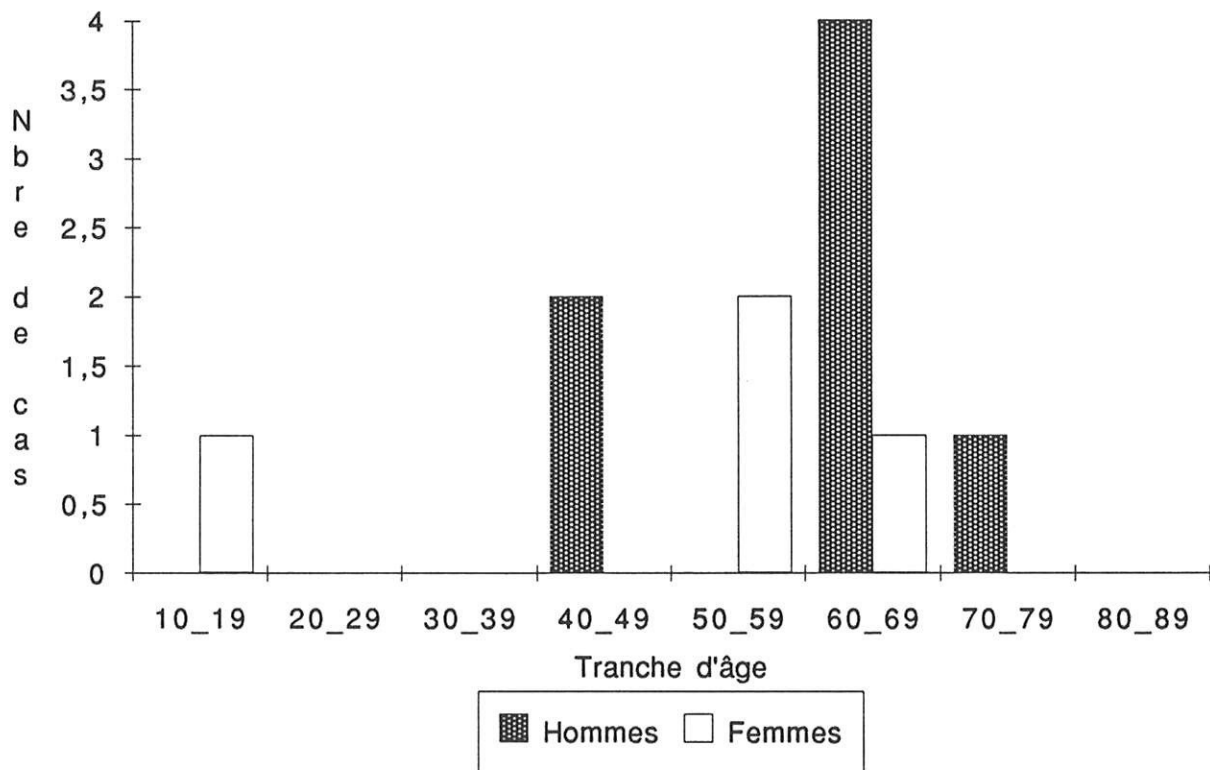


Graphe 2

REPARTITION SELON LA TRANCHE D'AGE ET LE SEXE
CHEZ LES LANL DE NOVO

Graphe 3

REPARTITION SELON LA TRANCHE D'AGE ET LE SEXE
CHEZ 10 PATIENTS AVEC ANTECEDENTS



C/ Répartition selon la classification morphologique du groupe FAB :

1) Population totale (figure 3) :

On remarque la prépondérance des M1 avec 42,9 % des cas, suivies des M2 avec 28,6 % des cas; et le faible effectif des M6 et M7 (2 % des cas pour chacune des classes).

Les résultats sont à considérer avec prudence étant donné le biais dans le recrutement que nous avons signalé au départ (critères de sélection favorisant le recrutement des M1 car population cellulaire riche en blastes).

2) LAM de novo (figure 4) :

La prépondérance des M1 est évidente : 53,8 % des cas. Notons l'absence de M0 dans ce groupe.

3) LAM avec antécédents (figure 5) :

Il faut remarquer ici l'absence de M3 et surtout de M1, qui prédominent dans le groupe précédent.

D'autre part on note l'apparition des leucoses cytologiquement peu différenciées, M0, chez ces patients ayant présenté des désordres hématologiques antérieurs. Les M0 représentent une fraction non négligeable avec 30 % des cas.

Figure 3

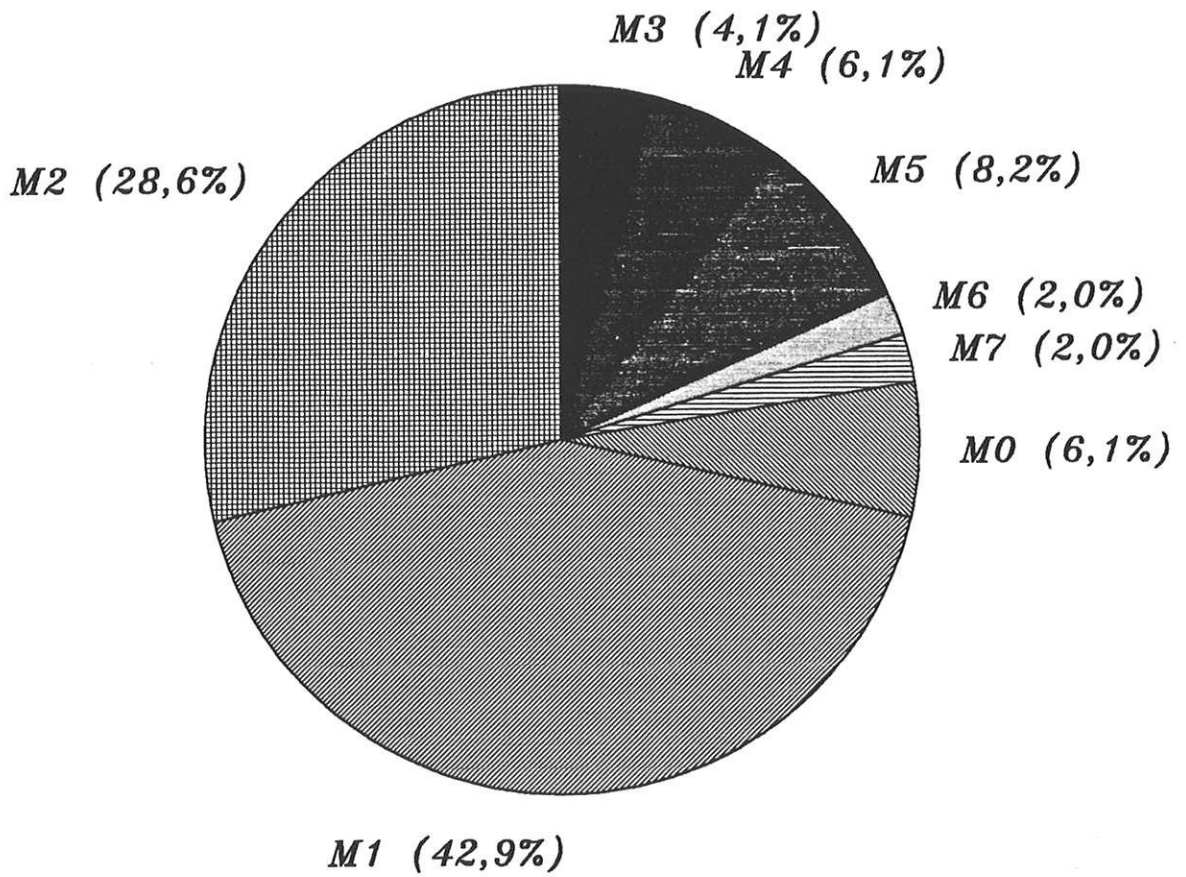
REPARTITION SELON LA CLASSE FAB DANS
LA POPULATION TOTALE

Figure 4

REPARTITION SELON LA CLASSE FAB CHEZ LES
LANL DE NOVO

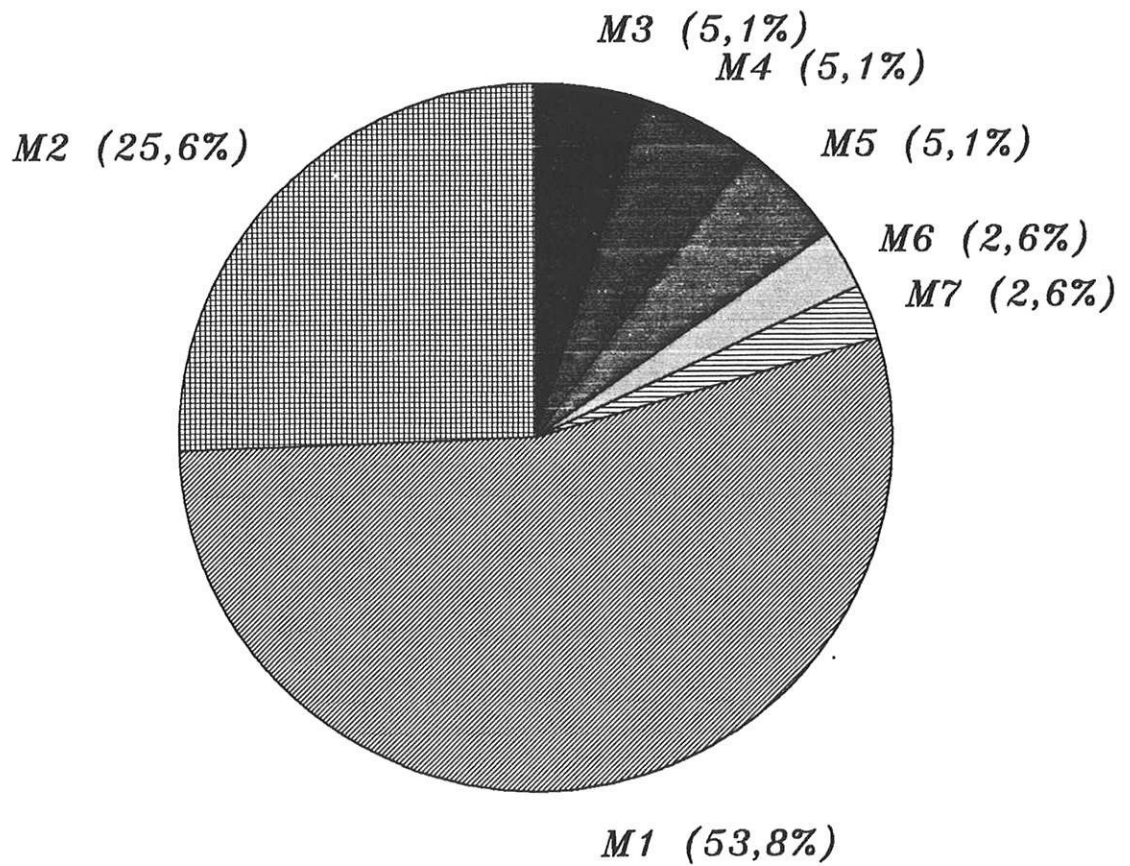
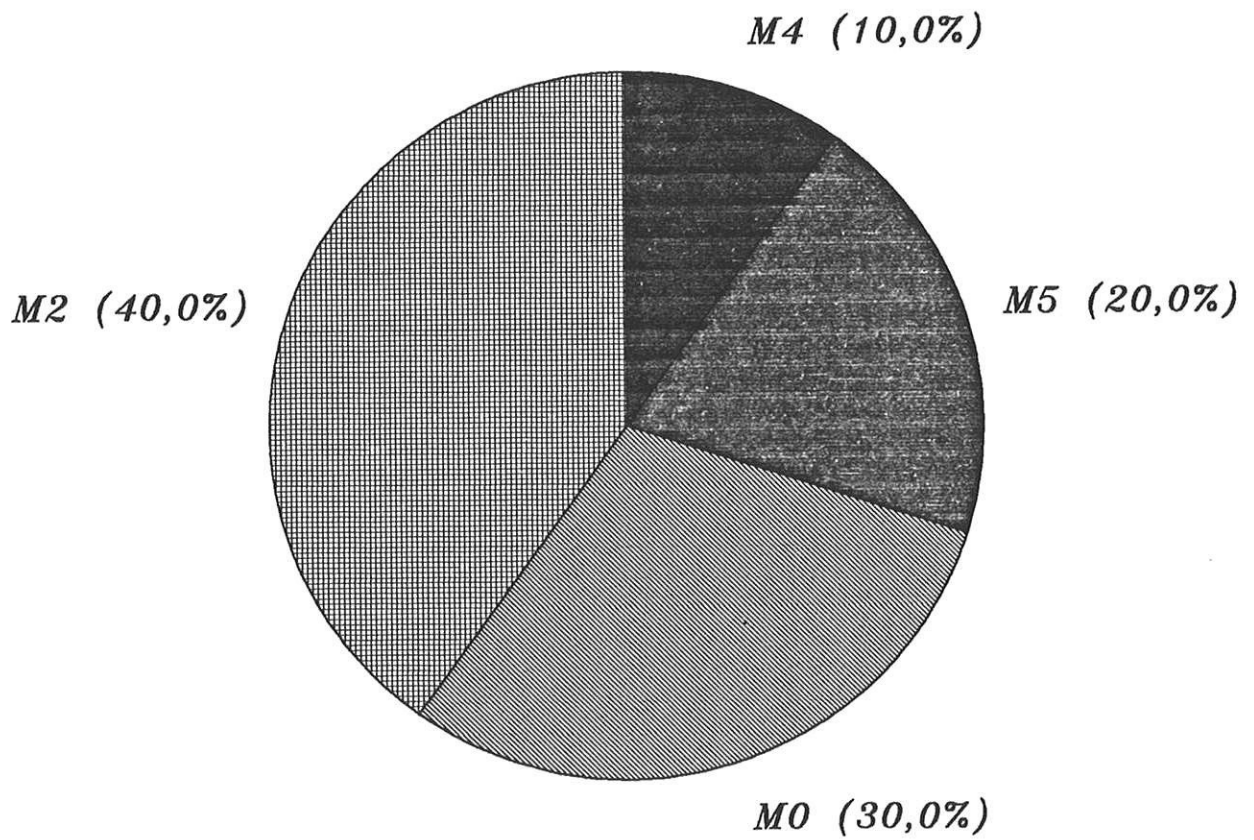


Figure 5

REPARTITION SELON LA CLASSE FAB CHEZ 10 PATIENTS
AVEC ANTECEDENTS



II TRAITEMENT ET DEVENIR DES PATIENTS (TABLEAU 4) :

Les thérapeutiques ont été regroupées en :

- protocole de chimiothérapie lourde de l'adulte
- protocole de chimiothérapie lourde du sujet âgé
- traitement palliatif.

Ceci sans tenir compte du type du protocole car l'étude s'échelonnant sur quatre ans, ces derniers sont extrêmement variés. Cette diversité explique l'impossibilité de conclure ultérieurement sur l'évolution de la maladie en fonction de tel ou tel marqueur. On ne pourra dégager que quelques tendances.

On connaît l'influence péjorative, sur le devenir, des leucémies aiguës sur désordre hématologique préexistant.

Elle semble vérifiée ici avec dans le premier groupe (39 patients de novo) 51,2 % des sujets en vie et 46 % décédés, versus 20 % en vie et 70 % décédés dans le deuxième groupe.

TABLEAU 4

TRAITEMENT ET DEVENIR DES PATIENTS

Cas	Protocole	Résultat après induction	Rechute	Etat à la date de point	Cause du décès
1	1	N		-1	E
2	1			-1	T
3	1	R		1	
4	1	R		-1	T
5	1	R		7	
6	1	R	N	-1	E
7	1	R		8	
8	1			-1	E
9	1	R		4	
10	1	R		7	
11	1	R		23	
12	2			-1	T
13	2	N		1	
14	1	R	N	-1	E
15	2			-1	E
16	2	R		2	
17	1			-1	T
18	1	R			
19	1	R		14	
20	3	N		10	
21	3			-1	T
22	1	N		8	
23	2	R		1	
24	2	R		11	
25	2	N		-1	E
26	2	R	R	-1	E3
27	1	R		22	
28	3	R		5	
29	3			-1	E
30	3			-1	E
31	3			-1	E
32	1	R		14	
33	1			-1	E
34	2			-1	E
35	1	R		13	
36	1	N		8	
37	1	R		19	
38	1	R		12	
39	1	R	R	-1	E3
40	3			-1	E
41	1			-1	E
42	1	N			
43	1			-1	T
44	3			-1	SR
45	3			7	
46				-1	
47	3			-1	E
48	1			-1	T
49	1	R			

LEGENDE DU TABLEAU 4 :

- protocole : 1 = chimiothérapie lourde de l'adulte
 2 = chimiothérapie lourde du sujet âgé
 3 = traitement palliatif
- résultat après induction : R = rémission complète
 N = pas de rémission complète
 l'absence de sigle R ou N signifie
 que le patient est décédé pendant
 l'induction
- rechute : R = rémission complète après traitement
 N = pas de rémission complète après
 traitement.
- état à la date de point : au 31 janvier 1992
 -1 = décédé
 de 1 à 23 = vivant en nombre de mois
- cause du décès : E = décès par échec thérapeutique
 T = décès par toxicité
 E₃ = décès par échec à la troisième rechute
 SR = décès sans rapport avec la maladie.

rappel : rémission complète = taux de blastes médullaires inférieurs à 5 % . Numération sanguine normale.

les cas 18 et 42 sont perdus de vue après la chimiothérapie d'induction. Le cas 46 est décédé avant la mise en route de tout traitement.

CHAPITRE II
METHODES D'ETUDE

I LE CHOIX DES ANTICORPS MONOCLONAUX

A/ Rappels : mise en place et définition des clusters de différenciation (8),(9).

Le projet d'organiser un atelier international sur les antigènes leucocytaires, a été proposé à la conférence de Vienne, sur les marqueurs des cellules leucémiques, en 1981.

En effet, à cette époque, les très nombreux résultats obtenus par différents groupes de recherche, ont montré l'énorme potentiel des anticorps monoclonaux pour la caractérisation des populations leucocytaires normales et malignes. Il était déjà clair que les acquisitions fondamentales et les implications cliniques permises par les anticorps monoclonaux seraient considérables mais, en même temps, un problème majeur apparaissait : celui du nombre rapidement croissant des anticorps et dans le futur d'une production qui ne pourrait aller qu'en s'accélération.

L'ignorance à l'époque, de la correspondance exacte des spécificités des différents anticorps utilisés, a été perçue comme un frein sur les progrès que cette technologie devait permettre. Bien plus, l'élaboration d'une cacophonie de nomenclatures individuelles rendait impossible un dialogue cohérent entre les chercheurs concernés. Il devenait donc nécessaire d'établir rapidement un système de nomenclature international.

C'est ainsi que naquit le premier atelier international sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains.

L'objectif étant la comparaison, par immunofluorescence (lecture en cytométrie de flux ou au microscope), des anticorps monoclonaux antileucocytaires et de leur réactivité au sein des populations leucocytaires.

Les résultats de ces études ont été révélés lors de la réunion finale à Paris, en novembre 1982. La méthode qui est apparue la plus appropriée pour analyser les résultats, a été basée sur la distance entre anticorps. La distance entre deux anticorps, pour une cellule cible, est la moyenne des différences absolues entre le pourcentage des cellules positives observé avec ces deux anticorps. On peut ainsi calculer la distance moyenne entre deux anticorps donnés, sur un type de cellule cible donné. Une fois que cette distance a été calculée pour chaque anticorps, l'étape suivante a été de trouver quels étaient les anticorps les plus proches, et quels étaient les anticorps les plus distants. Des calculs algorithmiques ont permis d'établir un arbre qui rassemble d'abord les deux anticorps les plus proches, puis le troisième anticorps dont la distance avec l'un de ces deux premiers est la plus faible, et ainsi de suite.

Une fois que chaque arbre a été calculé sur un type de cellule cible donné, celui-ci a été coupé et plusieurs groupes d'anticorps étaient ainsi obtenus. Le niveau de coupe était tel, que les anticorps inclus dans différents groupes avaient des distances suffisamment grandes, pour être sûr que leur réactivité soit significativement différente. Les anticorps inclus dans un même groupe formaient ce que l'on a appelé un cluster de différenciation (CD), et chacun des CD, s'est vu attribuer un numéro arbitraire.

Un CD regroupe donc des anticorps reconnaissant les mêmes entités moléculaires mais pas forcément le même épitope, ou des variants moléculaires qui ont une distribution tissulaire très semblable.

Système de nomenclature des antigènes de différenciation
leucocytaire:

CDn [cellule cible, P.M.] "AcM"

- CD : pour groupe de différenciation
- n : numéro arbitraire identifiant le CD
- cellule cible : cellule à laquelle on se réfère;
habituellement la population leucocytaire la plus représentative du CD
- P.M. : poids moléculaire, en kilodaltons, de la molécule dans sa forme correspondant à la cellule cible indiquée antérieurement.
- "AcM" : nom particulier de l'anticorps monoclonal du CD qui a servi à l'étude.

Oralement la désignation se limite à "CDn".

Depuis le premier atelier international en 1982, trois autres ont suivi; respectivement Boston : 1984, Oxford : 1986, Vienne : 1989. A chaque fois le nombre d'anticorps testés augmente... Actuellement soixante-dix-huit CD sont définis (10).

B/ Notre panel d'anticorps (tableau 5) (11), (12), (13) :

Il s'agit donc, pour chaque malade, de "typer" les cellules leucémiques, c'est à dire de tenter d'exprimer leur appartenance à telle ou telle lignée hématopoïétique et d'apprécier leur degré de maturation grâce à des anticorps monoclonaux. Ces données venant compléter l'étude cytologique et cytochimique.

Dans cette étude notre choix a été vaste. Ont été inclus : au moins un anticorps représentatif des différentes lignées, des anticorps témoins de maturation, d'autres de prolifération. Parmi tous ces anticorps, certains appartiennent à des CD bien définis; d'autres comme le CD9, CD7, CD5 et même CD10, posent encore quelques problèmes.

Précisons d'emblée que tous les patients n'ont pu être typés entièrement avec le panel complet, en raison de petits problèmes techniques dont au premier plan le faible nombre de cellules malignes recueillies.

Enfin dans cet exposé, tout comme dans la littérature, l'abréviation CD_n désigne tantôt l'antigène reconnu, tantôt les anticorps qui reconnaissent cet antigène.

TABLEAU 5 : ORIGINE ET NOM DES ANTICORPS MONOCLONAUX POUR CHAQUE CLUSTER ETUDIE

Cluster de différenciation	Nom de l'anticorps utilisé	Source
CD33	My9	COULTER
CD34	My10	BECKTON-DICKINSON
CD13	My7	COULTER
CD14	My4	COULTER
CD41	41a	IMMUNOTECH
CD2	IOT ₁₁	IMMUNOTECH
CD19	B ₄	COULTER
CD11b	IOM ₁	IMMUNOTECH
CD15	anti-leuM ₁	BECKTON-DICKINSON
CD16	ION ₂	IMMUNOTECH
CD9	IOB ₂	IMMUNOTECH
CD7	IOT ₇	IMMUNOTECH
CD5	BL1a	IMMUNOTECH
CD10	J ₅	COULTER
CD38	IOB ₆	IMMUNOTECH
CD71	IOA ₇₁	IMMUNOTECH

Le DR et la glycopherine A n'appartiennent pas à un cluster.

Les anticorps sont : I₂ pour le DR

Clone D2.10 pour la glycopherine A.

1) Deux anticorps fondamentaux pour le diagnostic des LANL :
CD33 et CD34

CD33 : (11a)

Les anticorps monoclonaux du cluster CD33 reconnaissent une glycoprotéine de 67 kilodaltons (KDa) (un seul épitope décrit), exprimée par les progéniteurs myéloïdes précoces et leurs équivalents leucémiques.

L'antigène CD33 reconnu, est restreint au compartiment hématopoïétique et à l'intérieur de celui-ci aux cellules myéloïdes.

On le retrouve donc exprimé par la cellule souche capable de produire des colonies mixtes (unités de granuleux, érythrocytes, monocytes et mégacaryocytes, c'est à dire la CFU-GEMM), par les progéniteurs des granuleux et des monocytes (CFU-GM), par les progéniteurs érythroïdes précoces (BFU-E) et les cellules mastocytaires.

Il est peu exprimé par les granuleux différenciés (absent des polynucléaires matures) et pas du tout par les cellules lymphoïdes. Par contre il est présent sur toute la lignée monocyttaire.

La majorité des patients atteints de LANL (>70 %) expriment le CD33 à la surface de leurs cellules, mais typiquement les lymphoblastes des LAL (leucémies aiguës lymphoblastiques) ou autre désordre lymphoïde ne l'expriment pas.

CD34 (11b):

Ici les anticorps reconnaissent une glycoprotéine transmembranaire de 105-120 KDa dont au moins trois épitopes sont définis.

L'antigène CD34 est restreint aux précurseurs immatures hématopoïétiques, à l'exception des cellules endothéliales capillaires. Ce qui fait seulement 1,5 % des cellules mononuclées médullaires.

Toutes les cellules hématopoïétiques formant des colonies sont CD34+. C'est à dire les progéniteurs unipotents (CFU-GM, CFU-Meg, CFU-Eo, BFU-E, CFU-ostéoclaste) et les progéniteurs multipotents (CFU-GEMM, cellule souche pluripotente). L'expression à un haut niveau sur ces cellules suggère que la vraie cellule souche lymphohématopoïétique doit être CD34+.

Le CD34 décroît rapidement avec la maturation cellulaire (exemple : CFU-E est CD34-).

Donc il semble que l'antigène CD34 soit un antigène témoin de maturation plutôt que de différenciation (c'est à dire plutôt spécifique d'un stade que d'une lignée).

Un grand pourcentage de leucémies aiguës sont CD34+ : environ 40 % des LANL, 60 % des LAL B, 1 à 5 % des LAL T. Les leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes sont CD34-.

2) Marqueurs de la lignée myéloïde : CD13 et CD14 .

CD13 (11c) :

La structure reconnue par ce cluster est une aminopeptidase N, de poids moléculaire 150-170 KDa. Trois épitopes sont définis. CD13 a été le premier CD myéloïde à être identifié au cours de la première "workshop". La distribution cellulaire et les propriétés biochimiques de la glycoprotéine CD13 suggère, qu'elle doit avoir un rôle physiologique important, non seulement sur les cellules myéloïdes, mais aussi sur les cellules des divers tissus qui portent le CD13. Une découverte récente dans la fonction de cette molécule, a montré que l'antigène CD13 est identique à l'aminopeptidase N, qui est une proéminente métalloprotéine de membrane impliquée dans le métabolisme des peptides par divers types cellulaires (macrophages, granuleux, intestin grêle, cellules du tube rénal, synapses du système nerveux central).

Les anticorps monoclonaux de ce cluster marquent les CFU-GM, les granuleux et monocytes à tous les stades de différenciation, ainsi que les myéloblastes pathologiques de la majorité des patients atteints de LAM.

CD13 n'est pas porté par les lymphocytes B ou T normaux.

Le gène correspondant à cette glycoprotéine a été cloné : il est localisé sur le chromosome 15.

CD14 (11d) :

La structure reconnue est ici une glycoprotéine de poids moléculaire de 55 KDa, ayant trois épitopes définis. Sa fonction est inconnue.

CD14 est un antigène de différenciation myéloïde exprimé essentiellement à la surface des monocytes et macrophages, beaucoup moins sur les granuleux et absent des cellules souches et cellules myéloïdes immatures.

Au sein de ce cluster, il existe une hétérogénéité de réactivité des anticorps, reconnaissant probablement des épitopes différents d'une même molécule.

3) Marqueur de la lignée plaquettaire : CD41 (11e)

Ces anticorps reconnaissent la glycoprotéine IIb/IIIa retrouvée sur les plaquettes et les mégacaryocytes (incluant aussi les mégacaryoblastes des patients atteints de LAM-M7). Cette structure antigénique est un complexe de molécules, calcium-dépendant, entre la glycoprotéine de 110 KDa : gp IIIa (CD61) et la glycoprotéine de 135 KDa : gp IIb.

Rappelons que la molécule reconnue par CD41 est un récepteur pour le fibrinogène, mais porte aussi le Von Willebrand factor, le collagène et la fibronectine (protéines cytoadhésives). Elle est réduite ou absente dans la thrombasthénie de Glanzmann.

CD41 marque aussi les cellules de Kuppfer du foie et la pulpe rouge splénique (sûrement à cause de la séquestration de plaquettes à leur niveau).

Enfin récemment, on a rapporté l'expression de cette gp IIb/IIIa sur la CFU-GEMM de l'homme.

4) marqueur de la lignée érythroblastique : l'anticorps antiglycophorine A (12)

La glycophorine A, sialoglycoprotéine majeure de la lignée érythroïde, est un marqueur de référence pour identifier les leucémies érythroïdes. Cette glycoprotéine, apparemment très spécifique de la lignée érythroïde, est exprimée sur les érythroblastes et les globules rouges mais non sur les progéniteurs.

5) Marqueur de la lignée lymphoïde T : CD2 (11f)

La molécule reconnue par CD2 est une glycoprotéine monomérique de 50 KDa. C'est un des premiers antigènes à apparaître sur les thymocytes. Il est présent aussi sur la majorité des cellules T matures périphériques et sur les cellules NK (natural killer). Autrefois défini comme le récepteur aux globules rouges de mouton, cette molécule apparaît maintenant avoir un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire et dans les processus d'activation des cellules T.

Le cluster CD2 est divisé en deux sous-groupes :

_ CD2 : tous les anticorps qui réagissent fortement avec les lymphocytes T au repos.

_ CD2R : anticorps réagissant faiblement avec les cellules T au repos, mais marquant des cellules T activées.

6) Marqueur de la lignée lymphoïde B : CD19 (11g)

L'antigène déterminé est une glycoprotéine transmembranaire de 90 KDa. La portion extra-cellulaire de la molécule contient deux ou trois domaines ressemblant aux immunoglobulines, montrant que l'antigène CD19 est un nouveau membre de la "super famille" des immunoglobulines.

L'antigène CD19 est le plus exprimé des marqueurs cellulaires B, apparaissant dès les premiers stades de différenciation.

On le retrouve donc à tous les stades de maturation, du pro-B au lymphocyte B, mais disparaît au cours du dernier stade de différenciation en plasmocyte.

95 % des LAL non-T expriment l'anticorps B4 du cluster 19. Les 5 % résiduels représentent des leucémies lymphoblastiques exprimant uniquement HLA-DR.

CD19 aurait aussi été observé au niveau des cellules blastiques de LAM à composante monocytaire (M4/M5).

7) Groupe d'anticorps reconnaissant des protéines fonctionnelles granulocytaires:

CD11b (11h) :

La molécule identifiée par CD11b fait partie d'une famille de glycoprotéines (CD11a, CD11b, CD11c) supportant en partie les réactions d'adhésions cellulaires des leucocytes humains. Ce sont des glycoprotéines apparentées structurellement, composées de sous-unités α distinctes, de 170 KDa pour CD11b, et d'une sous-unité commune β (CD18) de 95 KDa, unies par une liaison non covalente.

L'antigène CD11b est exprimé sur les polynucléaires, les macrophages et certaines cellules NK.

Il pourrait porter des ligands solubles (fraction iC_3b du complément, fibrinogène, facteur X de la coagulation) et promouvoir une série de fonctions incluant l'adhérence aux cellules endothéliales, la margination, la diapédèse, l'agrégation et le chimiotactisme.

CD15 (11j) :

La structure reconnue est le 3-fucosyl-N-acethylactosamine (3-FAL), oligosaccharide intégré dans des glycolipides ou glycoprotéines.

Elle est restreinte à la série myéloïde et se trouve sur les neutrophiles ou éosinophiles, mais pas sur les basophiles.

A des degrés variables, on la retrouve sur les monocytes. En dehors du système hématopoïétique, souvent appelée haptène-X, elle est largement répandue.

Son rôle dans la fonction cellulaire est inconnu; elle pourrait être impliquée dans la margination, la phagocytose et la migration cellulaire.

CD16 (11k) :

La molécule définie par CD16 a été décrite comme le récepteur de faible affinité au fragment Fc des immunoglobulines (Fc RIII); récepteur qui porte des immuns complexes d'IgG mais pas des monomères.

Elle est exprimée sur les cellules NK, les granuleux (éosinophiles ou neutrophiles) et les macrophages. Fc RIII est seul sur les cellules NK où il peut supporter le phénomène d'ADCC (cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante); il est associé au Fc RII (CD_{w32}) pour les granuleux et macrophages.

8) Autres clusters, moins spécifiques d'une lignée :

CD9 (11l) :

Ces anticorps monoclonaux reconnaissent une glycoprotéine de 24 à 30 KDa exprimée sur la membrane des plaquettes, des granuleux et monocytes.

On la retrouve également sur divers tissus ainsi que sur une portion extracellulaire de la kératine.

CD7 (11m) :

Polypeptide transmembranaire de 40 KDa.

Il apparaît tôt dans la différenciation des cellules T et est exprimé sur la majorité des lymphocytes T matures et immatures. Il se retrouve également sur une fraction des cellules NK et une petite sous population des cellules B.

C'est probablement un récepteur au fragment Fc des IgM.

CD5 (11n) :

Il correspond à une glycoprotéine monomérique de 67 KDa exprimée sur les thymocytes, la majorité des cellules T matures, des cellules T néoplasiques, des cellules de LLC (leucémie lymphoïde chronique) et une sous population de cellules B dans certains organes lymphoïdes.

L'expression de CD5 croît avec la maturation cellulaire T.

Sa fonction réelle reste à définir.

CD10 (11o) :

Le cluster 10 renvoie à l'antigène Calla (Common acute lymphoblastic leukaemia associated antigen).

C'est une glycoprotéine de 95-100 KDa. L'antigène Calla semblait, à l'origine, être un antigène tumoral spécifique des LAL non T non B. Plus tard le Calla était identifié sur les progéniteurs lymphoïdes normaux de la moëlle osseuse et du foie foetal. Récemment on l'a mis en évidence sur divers tissus.

Dans la lignée B, CD10 marque les cellules pro-B et pre-B.

Le Calla n'est pas exprimé dans toutes les LAL-B, il est retrouvé dans certaines LAL-T et certaines LAM.

Sa fonction est maintenant connue. C'est une endopeptidase neutre pouvant cliver des peptides et inactiver des hormones peptidiques.

9) Anticorps marquant des cellules activées :

CD38 (11p) :

L'antigène reconnu est une glycoprotéine de 45 KDa.

Il est retrouvé sur les cellules pre-B et au stade terminal de différenciation B : les plasmocytes.

Il marque également les cellules T immatures et les cellules T activées.

CD71 (11q) :

Dans ce cluster nous utilisons l'anticorps monoclonal IOA 71 décrit comme étant spécifique du récepteur de la transferrine (T_fR).

Les premiers anticorps contre ce récepteur sont connus depuis dix ans et assignés à un CD au cours de la troisième " workshop " à Oxford. En effet un bon nombre d'anticorps, groupés en CD, avaient des réactions croisées avec des cellules non leucocytaires. Aussi il n'y avait plus de raison pour ne pas regrouper les anticorps contre le récepteur de la transferrine dans un cluster.

Il a été convenu que ce serait le CD71.

CD71 marque des cellules en prolifération(52). Plutôt qu'un marqueur de la prolifération cellulaire, l'expression de l'antigène CD71 semble être régulée par le niveau de fer intracellulaire (nécessaire à la croissance) et non pas, par la prolifération en elle même.

10) L'anticorps I₂ anti HLA-DR (12) :

L'antigène d'histocompatibilité de classe II, DR, est exprimé sur la plupart des progéniteurs. Sa présence sur les CFU-GEMM les plus indifférenciées ainsi que sur les CFU-E est controversée.

En fait il ne s'agit pas à proprement parler d'un marqueur de progéniteurs puisque cet antigène est présent sur les monocytes et les lymphocytes B du sang.

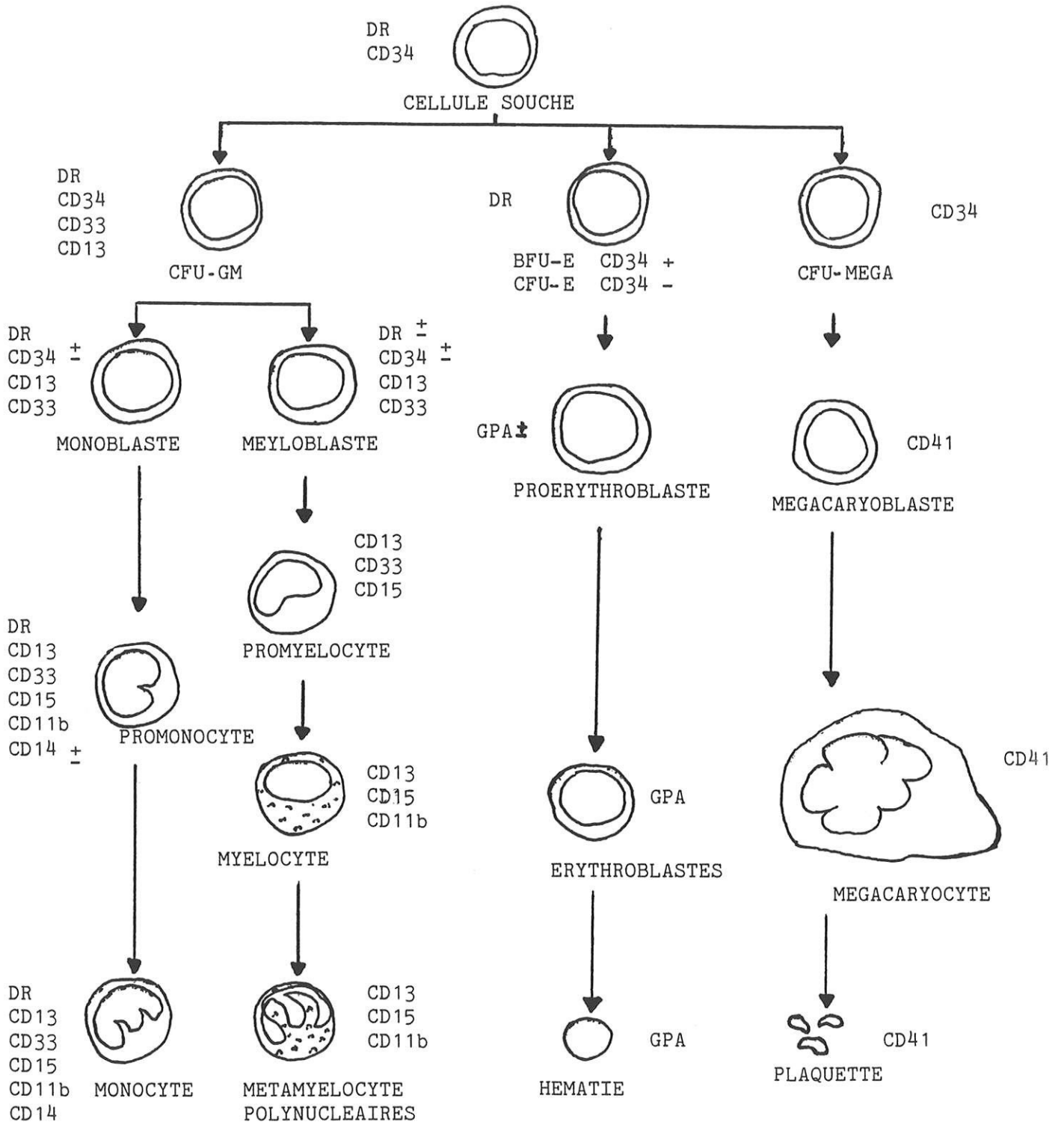
Cependant, son expression très différente d'une lignée à une autre, est un élément important dans le typage des leucémies.

En effet, cette expression est constante tout au long de la différenciation lymphocytaire B (à l'exception du plasmocyte) et de la différenciation monocyttaire.

Elle est inactivée au niveau du promyélocyte neutrophile pour la lignée granuleuse, du promégacaryoblaste pour la lignée plaquettaire, et très précocément au niveau de la CFU-E pour la lignée érythroïde. L'antigène DR est absent de la lignée T, sauf en tant que marqueur d'activation des cellules T matures et peut être des stades les plus indifférenciés de la lignée T.

C/ SYNTHESE SCHEMATIQUE : différenciations myéloïde et lymphoïdes normales.

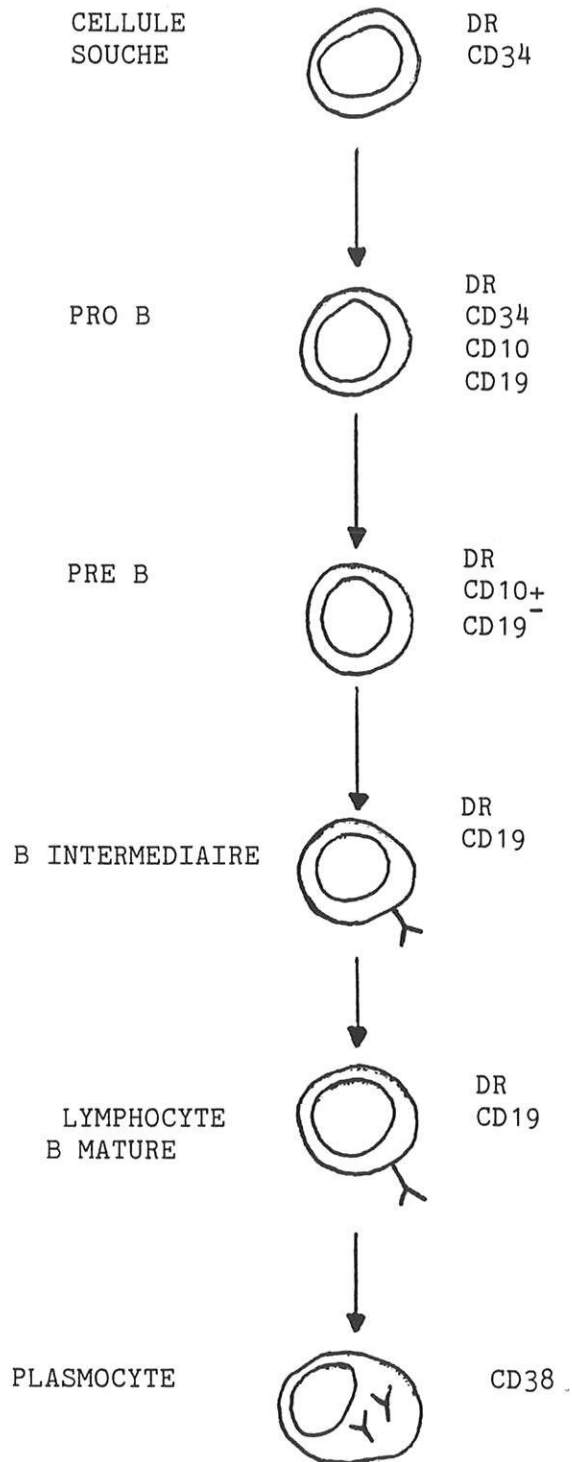
DIFFERENTIATION MYELOIDE NORMALE



GPA: glycoprophorine A BFU: burst forming unit MEGA: mégacaryocytes
 CFU: colony forming unit GM: granulocytes-macrophages
 CD: classe de différenciation E: érythroblastes

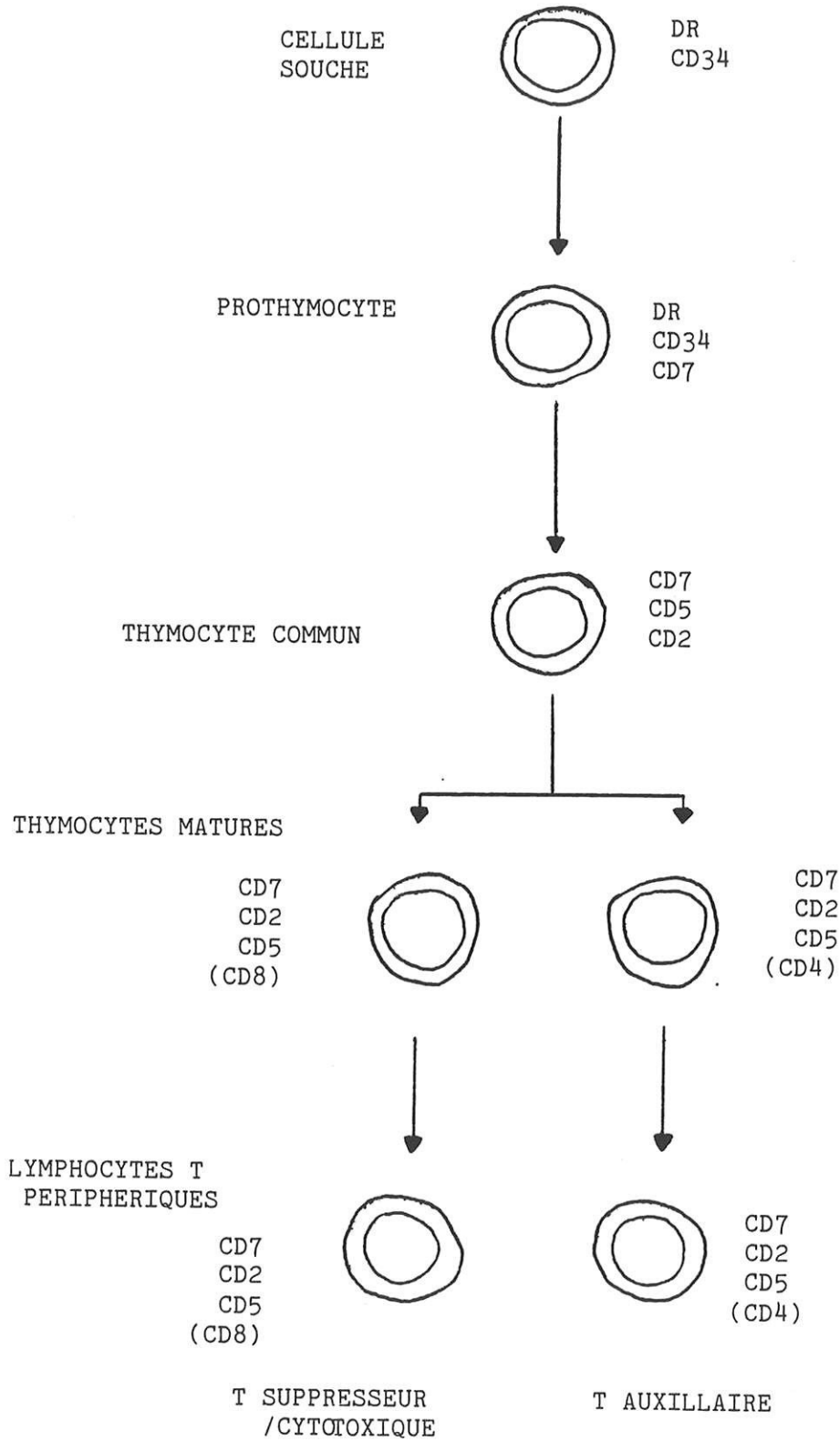
d'après M IMBERT (15b)

DIFFERENCIATION LYMPHOIDE B NORMALE



d'après M IMBERT (15b)

DIFFERENCIATION LYMPHOIDE T NORMALE



d'après M IMBERT (15b)

II ETUDE EN CYTOMETRIE DE FLUX :

A/ PRINCIPE : (14),(15a),(16),(17)

Il repose sur l'enregistrement de signaux lumineux émis lors du passage de cellules (ou particules) propulsées dans un flux devant une source lumineuse. Grâce à des photomultiplicateurs ces signaux sont transformés en signaux électriques. Un système électronique effectue la mise en forme et la conversion de ces signaux qui sont repris par l'informatique afin d'être rendus interprétables par l'utilisateur. Les mesures effectuées cellule par cellule permettent une représentation des résultats sous forme d'histogrammes de fréquence.

* Le centrage hydrodynamique :

c'est le premier temps. La suspension cellulaire est injectée dans une veine liquide, de forte section, qui ne peut s'écouler que par un orifice de faible diamètre. Les cellules sont entraînées par le liquide de veine dont le diamètre diminue. La vitesse augmente donc et à la sortie, les cellules défilent à raison de plusieurs milliers par seconde. Ce principe est schématisé sur la figure 6.

Le but de ce centrage est un positionnement précis du jet dans le faisceau laser. Il favorise l'orientation des particules. En jouant sur la dilution de l'échantillon cellulaire injecté et sur le diamètre de l'orifice de sortie, il est possible de faire passer les cellules une à une dans le faisceau lumineux.

* L'acquisition des données:

la source lumineuse généralement adoptée est un faisceau laser (entre autre pour ses qualités de grande brillance et de grande stabilité).

Lorsqu'une cellule, entraînée par le flux liquide, traverse le faisceau laser, elle émet un certain nombre de signaux lumineux qui seront utilisés comme source de données par le cytomètre. Ces signaux sont représentatifs de propriétés physiques ou biologiques des éléments cellulaires.

La diffusion lumineuse dans l'axe (FS=Forward Scatter) est recueillie par une photodiode. En effet une cellule traversant le faisceau laser diffuse une partie de la lumière reçue par la surface membranaire. Cette diffusion dans l'axe est essentiellement due à la diffraction de la lumière et est surtout liée à la taille cellulaire.

Une partie de la lumière du faisceau excitateur, traversant la membrane cellulaire, est à son tour diffusée par les organites intracellulaires dans toutes les directions de l'espace. Cette lumière est recueillie par un photomultiplicateur : on la nomme diffusion aux grands angles (SS=Right Angle Scatter). Elle est liée à l'hétérogénéité du contenu cellulaire (structure).

Si les cellules sont marquées par un fluorochrome, celui-ci est excité lors du passage devant la source lumineuse. Il naît une fluorescence de longueur d'onde supérieure à celle du faisceau excitateur.

L'intensité de la fluorescence émise sera fonction du nombre de molécules de fluorochrome fixées sur la cellule.

Ainsi les signaux lumineux émis pourront être séparés en fonction de leur direction (diffusion dans l'axe et diffusion aux grands angles) ou de leur longueur d'onde.

* Le traitement des données :

Les signaux lumineux qui viennent frapper un photomultiplicateur provoquent de la part de ce dernier la production d'un courant dont la tension dépend de la quantité de photons reçus. Ainsi la diffusion ou la fluorescence d'une cellule sera transformée en un signal électrique; pour être utilisés par le calculateur de l'unité informatique, ces signaux électriques doivent être digitalisés.

Ils sont donc pris en charge par un convertisseur analogique-digital qui va quantifier l'amplitude de chaque signal en un numéro de canal.

Les données reçues par l'unité informatique sont représentées sous forme d'histogrammes de distribution de fréquence, dont l'abscisse représente l'amplitude du paramètre étudié et l'ordonnée le nombre de cellules.

Si l'on combine sur une même représentation deux paramètres différents (direction et longueur d'onde des signaux) on obtient un histogramme biparamétrique ou cytogramme (schéma 1).

Dans le cas du cytogramme sanguin, on peut sélectionner une population cellulaire à étudier; par exemple les lymphocytes. Ceci grâce à la création sur l'écran d'une "fenêtre". Seules les données incluses dans la "fenêtre" seront prises en compte pour l'histogramme de fluorescence (schéma 2).

Dans le cas de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), fluorochrome le plus employé, la fluorescence émise est verte.

* Le tri cellulaire :

C'est une option sur les cytofluoromètres de haut de gamme. Le jet de fluide contenant les cellules est fractionné en fines gouttelettes par la vibration provoquée par un cristal piézoélectrique. Les gouttelettes passent ensuite dans un anneau de charge qui leur transmet une charge positive ou négative. Au passage dans un champs électrique, elles sont déviées à gauche ou à droite selon leur signe de charge; tandis que celles non chargées tombent tout droit.

Figure 6

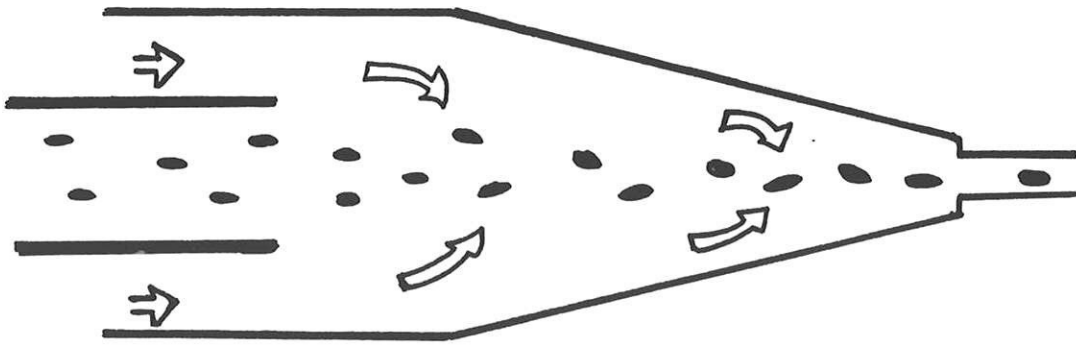
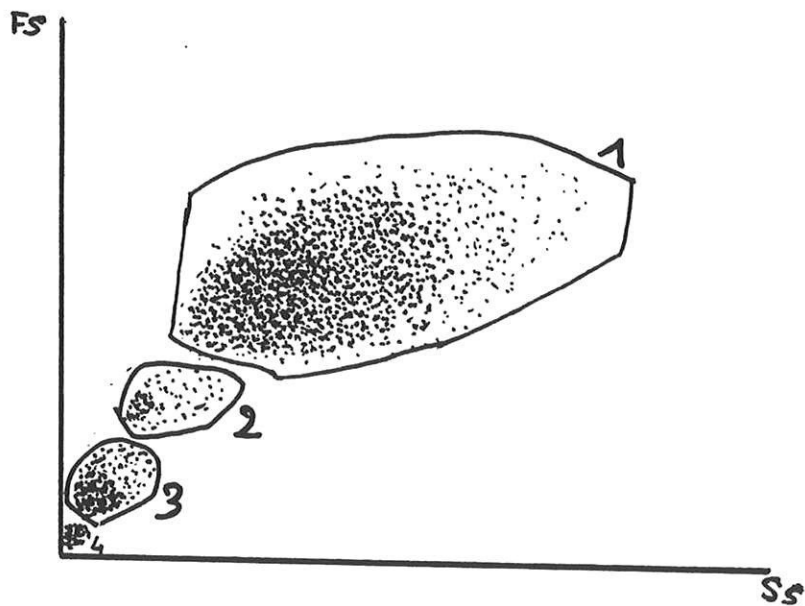


Schéma 1

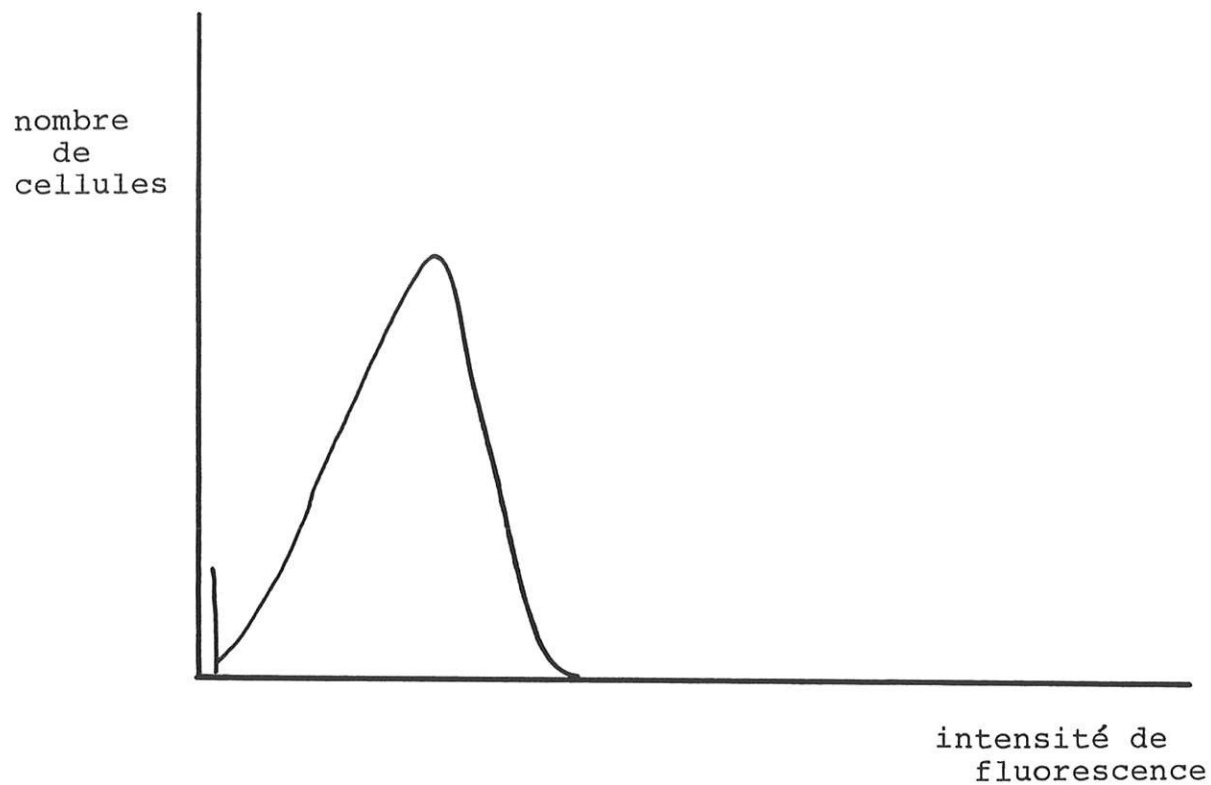
EXEMPLE DU CYTOGRAMME SANGUIN NORMAL



- 1: polynucléaires
- 2: monocytes
- 3: lymphocytes
- 4: débris d'hématies
et de plaquettes

Schéma 2

EXEMPLE D'UNE FENETRE LYMPHOCYTAIRE POUR LE
CD 3



Une équipe française de la Pitié-Salpêtrière (16) a étudié de façon précise le cytogramme médullaire obtenu par cytométrie de flux, à partir de quinze échantillons de moëlle osseuse normale. Les résultats obtenus sont comparables au cytogramme sanguin avec trois régions importantes; mais à l'intérieur de chacune d'elles, il semble y avoir une grande hétérogénéité des cellules médullaires, en ce qui concerne leur structure et leur taille, qui fait qu'il est possible de diviser en dix sous-groupes ces trois régions. Ces dix sous-groupes ont été isolés et il a été vérifié qu'ils étaient distincts morphologiquement.

L'étude de la répartition des antigènes de membrane (à partir de vingt anticorps monoclonaux marqués par un fluorochrome) a montré la corrélation avec la répartition des cellules médullaires dans les dix sous-groupes.

L'intérêt de cette technique d'analyse est multiple : rapidité, précision, sensibilité, objectivité, habilité à déceler des contaminants :

Les méthodes d'analyse permettent d'obtenir des données quantitatives et qualitatives portant sur la taille, l'aspect des cellules et l'intensité de la fluorescence émise par les constituants cellulaires marqués.

La cytométrie de flux a permis de mieux caractériser, grâce à leurs antigènes membranaires, les différentes lignées hématopoïétiques. Dans le cadre de l'étude des leucémies elle aide à la caractérisation des affections tumorales. Toutefois elle connaît certaines limites dans les cas suivants :

- _ nombre insuffisant de cellules.
- _ mélange de populations cellulaires avec moins de 50 % de blastes.
- _ et l'absence d'étude morphologique.

Nous verrons plus loin l'apport théorique des méthodes immunoenzymologiques sur ce dernier point.

B/ PRELEVEMENT ET TECHNIQUE DE MARQUAGE (13) :

La moëlle osseuse, prélevée au cours d'une ponction, est recueillie sur flacon hépariné (5 ml si possible).

Le prélèvement doit être traité le plus rapidement possible, dans les vingt-quatre heures maximum, pour éviter l'altération des cellules.

Les manipulations subséquentes étant relativement longues, il est également indispensable de prévenir le laboratoire de l'arrivée d'un prélèvement.

Dans un premier temps les cellules sont lavées dans 5 ml de tampon PBS (tampon phosphate salin), puis isolées sur milieu MSL stérile (milieu de séparation des lymphocytes) de densité $1,077 \pm 0,001$. L'anneau ainsi récupéré est centrifugé; le culot de centrifugation est lavé dans du HANK'S ou du RPMI (milieu RPMI 1640 avec hepes), solutions isotoniques tamponnées.

Le nouveau culot de centrifugation sert de préparation à la suspension cellulaire qui est ajustée à 10000 cellules par mm^3 avec du RPMI (comptage sur cellule de Malassez). Cette suspension servira également à la réalisation de disques de cytocentrifugation, qui colorés au May-Grünwald-Giemsa, permettront d'apprécier la ou les populations cellulaires présentes dans l'échantillon. Ce qui nous semble indispensable pour interpréter correctement les résultats du marquage.

La technique de marquage, en immunofluorescence indirecte (IFI), est réalisée sur une plaque creusée de puits où sont déposés les différents anticorps monoclonaux à la dilution appropriée donnée par chaque fabricant.

Le premier puit sert de témoin négatif (absence d'anticorps). Secondairement est déposé, dans tous les puits, 100 μl de la suspension cellulaire.

L'incubation dure 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité. Après rinçage en PBS-albumine, centrifugation, et deux nouveaux lavages, l'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris marqué à l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC) est déposé.

Les conditions d'incubation sont les mêmes que précédemment.

Enfin deux derniers rinçages, en PBS-albumine, et une centrifugation, permettent d'obtenir un culot final qui est incorporé à 1ml de paraformaldéhyde (PFA).

C/ LECTURE :

Elle peut être immédiate ou différée (les cellules sont fixées en PFA), à condition de garder les échantillons à l'obscurité.

Nous utilisons un cytomètre à flux de chez Coulter de type EPICS-PROFILE II.

L'analyse du témoin négatif constitue le premier temps. Cette analyse apporte deux types d'informations. La première permet de visualiser sur le cytogramme la répartition cellulaire et donc de créer des "fenêtres". Dans chaque "fenêtre" l'appareil étudie 5000 cellules. Prenons par exemple le cas d'une suspension cellulaire homogène de 95 % de blastes, la "fenêtre" 1 englobe la majeure partie de ces cellules (schéma 3).

Pour chaque anticorps testé on obtient un histogramme permettant de visualiser le type et l'intensité de fluorescence.

Si la suspension est inhomogène, plusieurs "fenêtres" sont dessinées en fonction des populations apparaissant sur le cytogramme (schéma 4).

La disposition au sein du cytogramme médullaire des populations cellulaires ainsi définies, c'est à dire des "fenêtres", confrontée aux données de la cytologie (contrôle de la suspension testée), permet de repérer approximativement la zone où se trouvent les blastes et donc dans cette "fenêtre" là, de noter la positivité ou négativité du marqueur.

En pratique les choses ne sont pas aussi simples car les cellules blastiques peuvent avoir une répartition identique, sur le cytogramme, à d'autres cellules ayant les mêmes caractéristiques de taille, de structure.

Ce qui explique dans les suspensions inhomogènes (50 % de blastes et moins) la difficulté de rattacher la fluorescence à ces seules cellules.

Il faut donc étudier très soigneusement les cellules de l'échantillon de départ; le résultat positif ou négatif d'un marqueur tiendra compte des différentes "fenêtres" et nous allons le voir de l'aspect du témoin.

Ce témoin est un marqueur de négativité. C'est la deuxième information qu'il nous apporte.

En effet un des problèmes majeurs reste la fixation non spécifique de l'immunoglobuline, marquée au fluorochrome, sur des structures cellulaires. Ce qui rend fluorescente une cellule qui n'a pas fixé d'anticorps, et constitue donc un faux positif. Pour pallier à ce problème, l'opérateur doit placer sur l'écran un (ou plusieurs) curseur(s) sur l'histogramme de fluorescence, qui délimite(nt) un seuil de positivité (schéma 5).

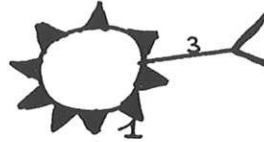
A partir de ce seuil, la fluorescence est reconnue spécifique de la réaction d'immunofluorescence indirecte décrite précédemment.

Le témoin est considéré comme très bon quand le pourcentage de cellules fluorescentes est inférieur à 2 % . Il est relativement fréquent dans les leucoses à composante monocytaire, de voir des fluorescences non spécifiques; les cellules blastiques pouvant posséder un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines (figure 7) :

Figure 7



LIAISON SPECIFIQUE



LIAISON NON SPECIFIQUE

- 1: antigène
- 2: anticorps monoclonal
- 3: immunoglobuline de souris marquée au fluorochrome

L'aspect des courbes positives, peut être quand à lui très variable, et des différences dans le calcul du pourcentage de cellules marquées sont relativement fréquentes suivant la position du curseur : page 67, aspect du témoin; page 68 et 69 aspect des courbes positives pour CD11b et DR.

"Fenêtres" et curseur(s) étant en place, chaque échantillon marqué avec un anticorps monoclonal est testé.

Dans notre étude, comme la majorité des auteurs, nous considérons qu'une réaction est positive pour un marqueur à partir de 20 % de cellules fluorescentes.

Schéma 3

CYTOGRAMME REPRESENTANT UNE POPULATION HOMOGENE

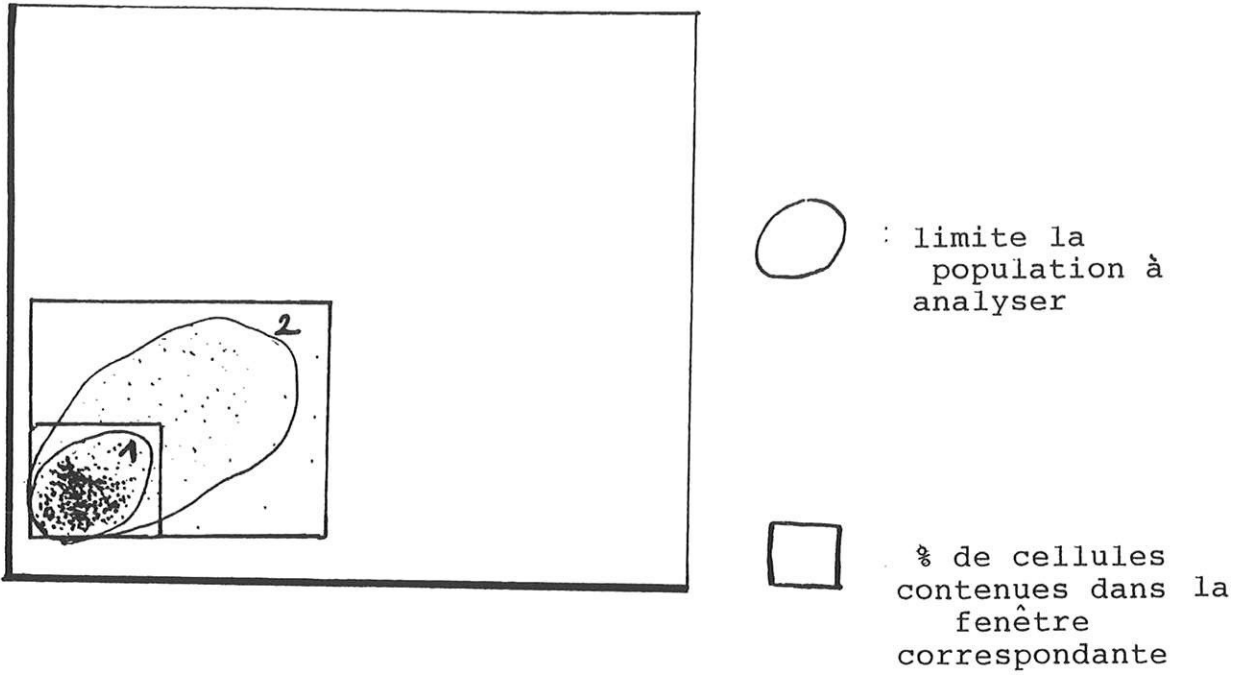


Schéma 4

CYTOGRAMME REPRESENTANT UNE POPULATION INHOMOGENE

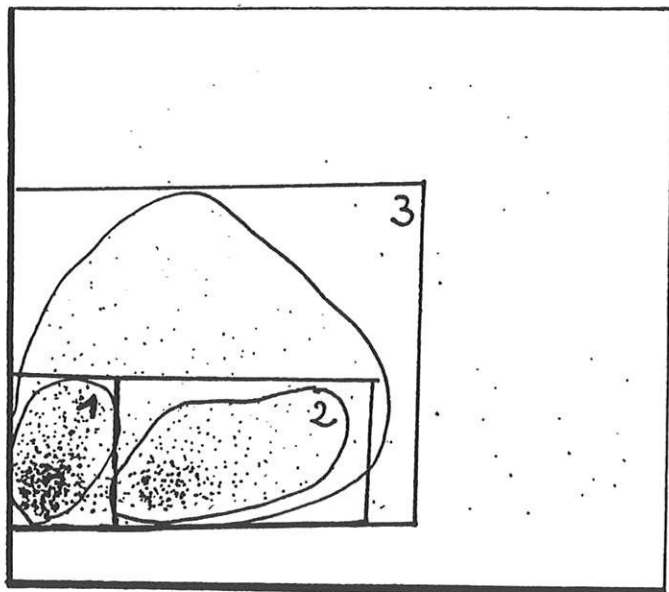
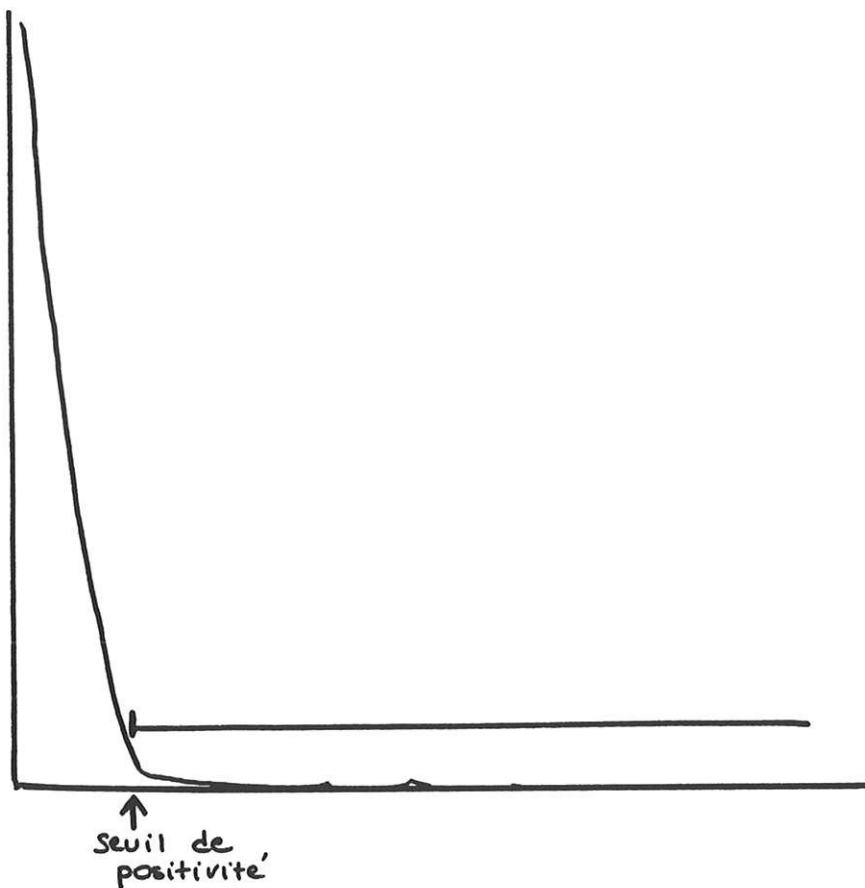


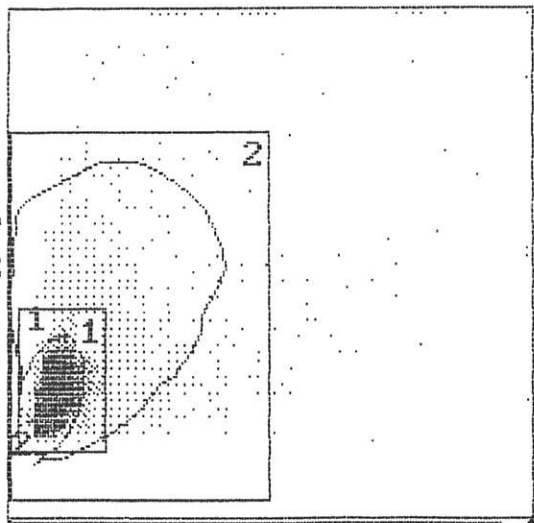
Schéma 5



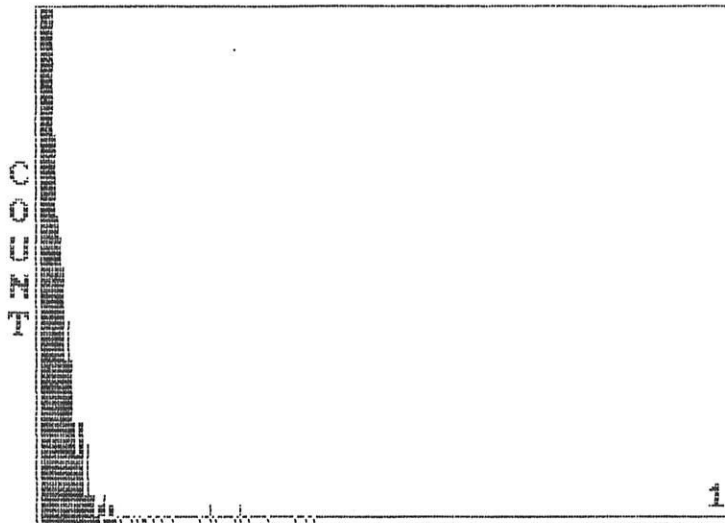
MISE EN PLACE D'UN CURSEUR SUR L'HISTOGRAMME
DE FLUORESCENCE DU TEMOIN

EPICS^(R) Profile Analyzer

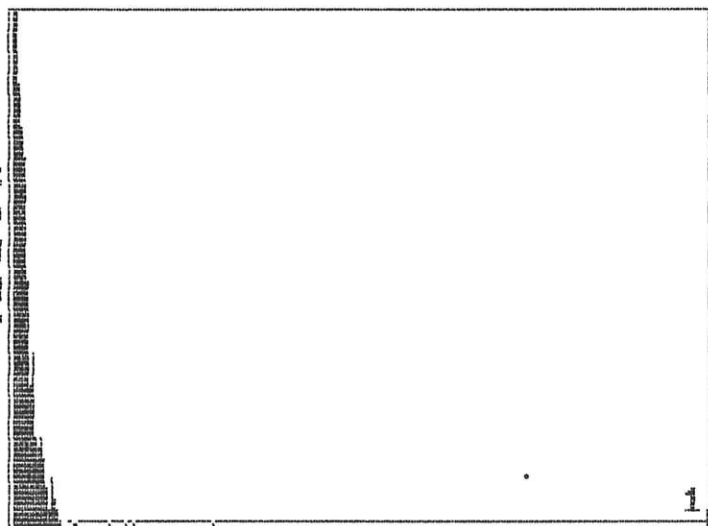
COULTER CYTOMETRY TEST RESULTS



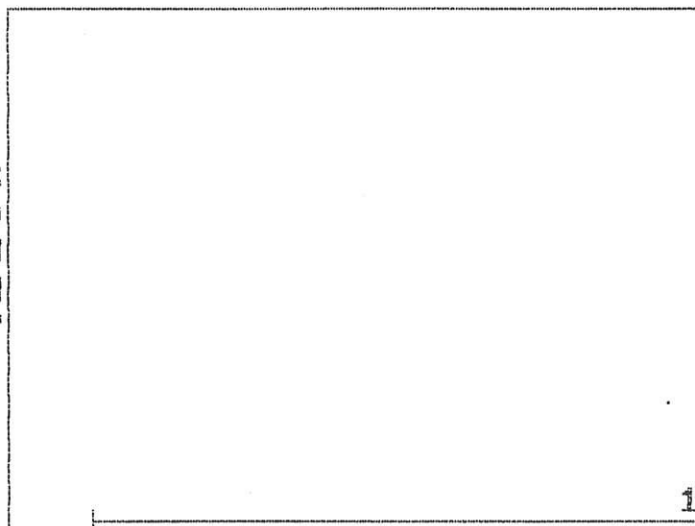
		SS						
		MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	X	1	11	5698	88.6	5.5	2.0	35.9
	Y	9	26			16.5	3.4	21.8
2	X	0	31	6363	98.9	6.3	3.4	29.5
	Y	3	48			17.4	5.0	22.0
4	X	0	63	0	0.0			
	Y	0	0					



		LFL1						
		MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1		0.234	1023.	29	0.5	0.610	0.248	2.77



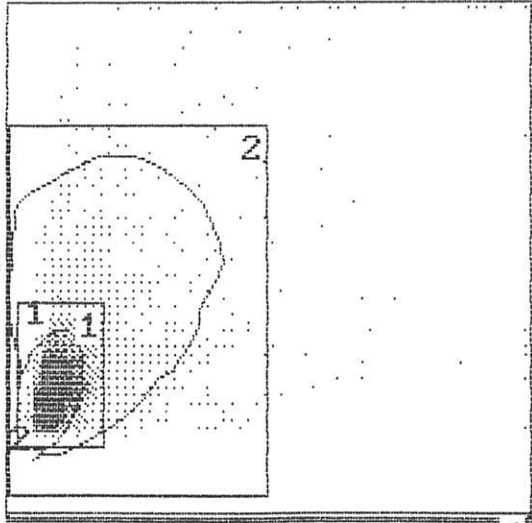
		LFL1						
		MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1		0.210	1023.	6	0.1	0.427	0.189	3.85



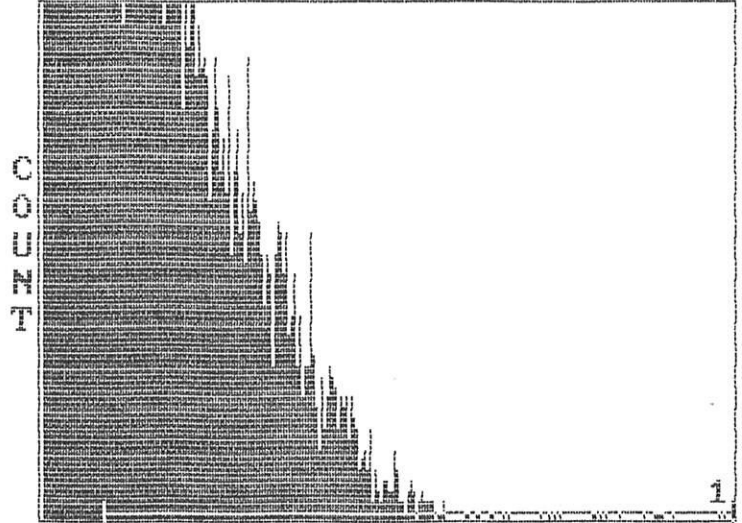
		LFL1						
		MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV

#16878
 9:00 a.m.
 7-Jan-92
 CONTROL FICO IG G1

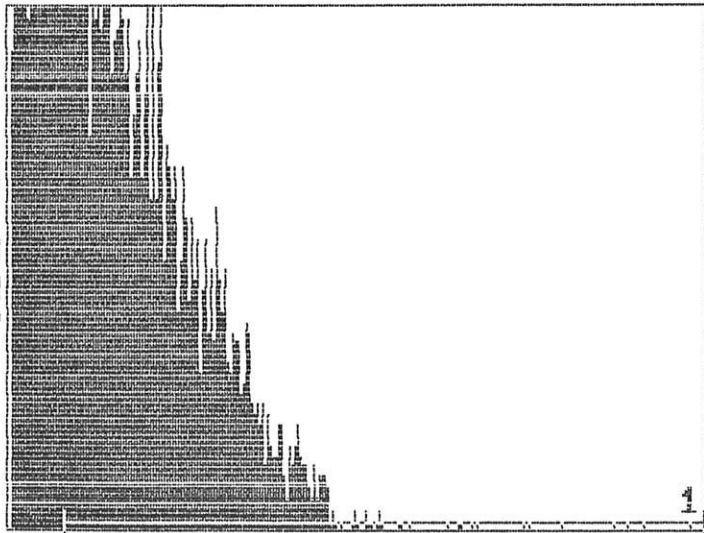
EPICS^(R) Profile Analyzer
 COULTER CYTOMETRY TEST RESULTS



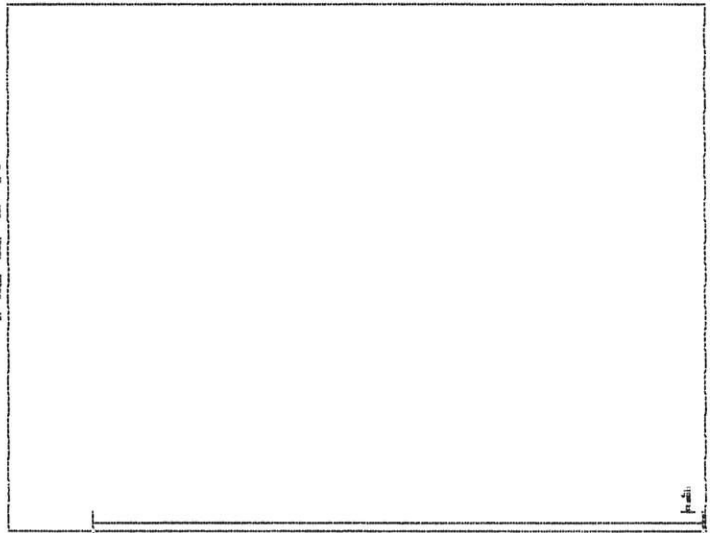
	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1 X	1	11	5787	87.9	5.7	2.0	39.5
1 Y	9	26			16.4	3.4	20.9
2 X	0	31	6516	99.0	6.4	3.4	40.8
2 Y	3	48			17.4	5.1	21.2
4 X	0	63	0	0.0			
4 Y	0	0					



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.234	1023.	3650	56.8	0.821	0.288	



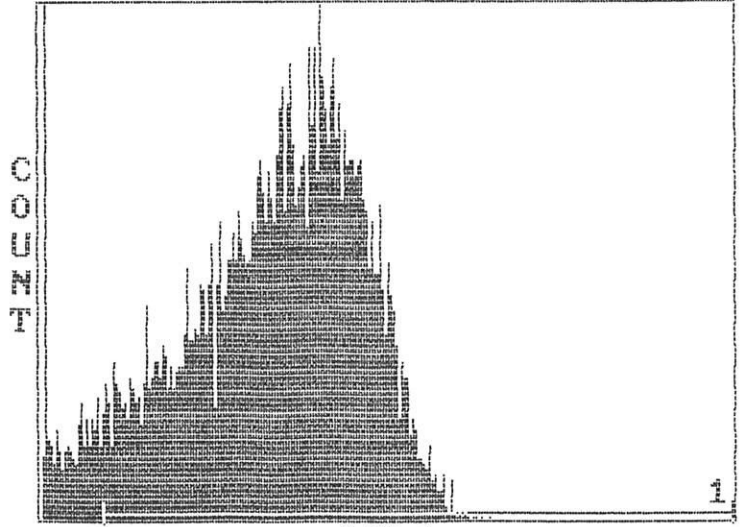
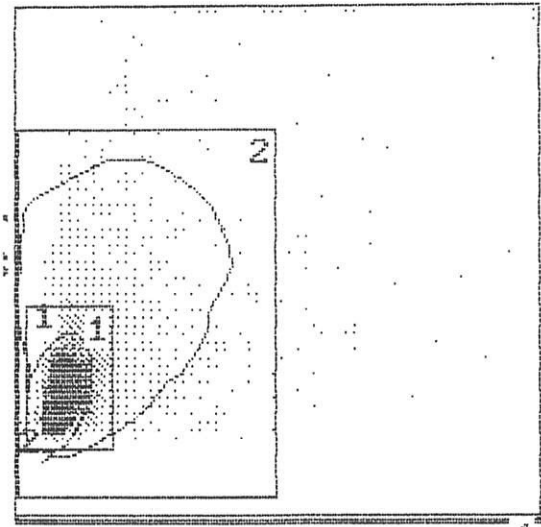
	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.210	1023.	2803	56.1	0.650	0.255	



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV

#16887
 9:07 a.m.
 7-Jan-92
 FICOLL CD11B

EPICS^(R) Profile Analyzer
 COULTER CYTOMETRY TEST RESULTS



SS

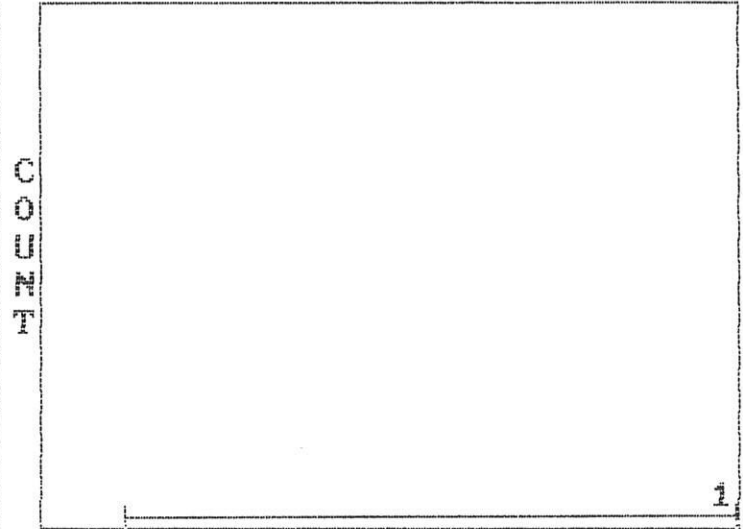
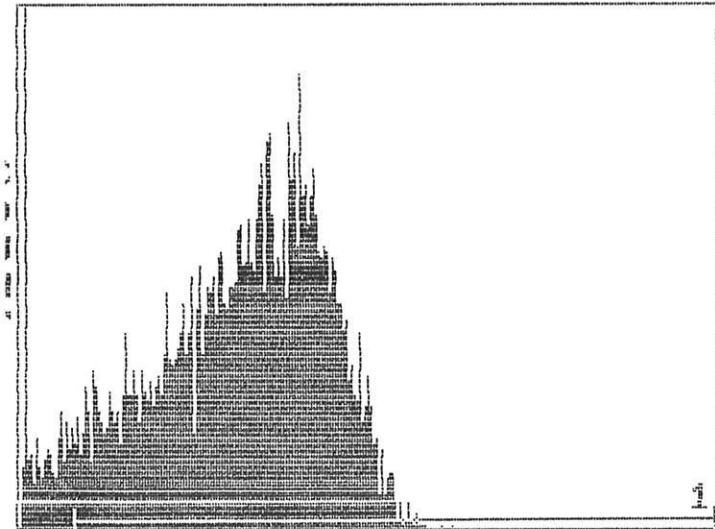
4

LFL1

1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1 X	1	11	5765	87.9	5.6	2.0	36.7
1 Y	9	26			16.5	3.4	20.0
2 X	0	31	6484	98.9	6.4	3.3	30.3
2 Y	3	48			17.5	5.2	20.1
4 X	0	63	0	0.0			
4 Y	0	0					

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.234	1023.	5828	91.3	2.422	0.291	18.0



LFL1

LFL1

1

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
1	0.210	1023.	4550	91.0	1.997	0.284	16.9

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	% HPCV
--	-----	-----	-------	---------	------	----	--------

#16890
 9:09 a.m.
 7-Jan-92
 FICOLL DR

III LE MARQUAGE ENZYMOLOGIQUE :

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE EN APAAP AU LABORATOIRE

(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)

Nous avons vu que l'inconvénient majeur des techniques en immunofluorescence réside dans l'impossibilité de corrélation avec la morphologie cellulaire; aussi bien lors de la lecture au microscope, que maintenant avec la généralisation des cytomètres en flux. En clair, l'oeil de l'observateur ne peut visualiser et identifier les cellules marquées.

Cet inconvénient, entre autre, a incité les chercheurs à persévérer dans la mise au point de techniques de marquage.

C'est à Strenberger (1971), que l'on doit le principe nouveau de l'emploi d'un second anticorps non marqué et d'un complexe immunologique comportant une molécule enzymatique et son anticorps spécifique comme troisième élément de la réaction.

La PAP méthode (conjugué peroxydase anti-peroxydase) voit son essor dans les années 70 (18). Le problème essentiel est celui de l'activité peroxydasique endogène qui peut être difficile à bloquer sans diminuer la sensibilité des réactifs marqués. Pour surmonter ces difficultés en particulier dans les tissus riches en peroxydase, Cordell en 1983, met au point le complexe immunologique phosphatase alcaline_anti-phosphatase alcaline et décrit la technique immunocytochimique dite en "APAAP". Les qualités de cette technique en font une alternative possible à l'utilisation de l'immunofluorescence. En hématologie elle peut se pratiquer sur divers échantillons (sang, moelle, LCR) qu'il s'agisse de frottis, de disques de cytocentrifugation, ou de coupe de tissu (moelle osseuse).

Plusieurs avantages ont été avancés, en faisant une technique de choix :

_ les échantillons peuvent être conservés avant tout traitement à -20°C pendant plusieurs mois sans altération antigénique.

_ Une fois traités, on peut les conserver de longues périodes, à température ambiante, en lumière normale, sans altération du marquage.

_ La technique préserve une visualisation optimale des détails cellulaires.

_ Un double marquage est possible en utilisant deux substrats enzymatiques différents.

_ Elle ne nécessite pas d'équipement particulier.

Plusieurs équipes ont, à ce jour, tenté une comparaison entre les résultats obtenus en immunofluorescence et ceux en APAAP. Ils semblent bons, tous CD confondus (CHEN 1986, ERBER 1986, NEUMAN 1986, HANSON 1987, DREXLER 1988, LY 1988, HERBER 1988).

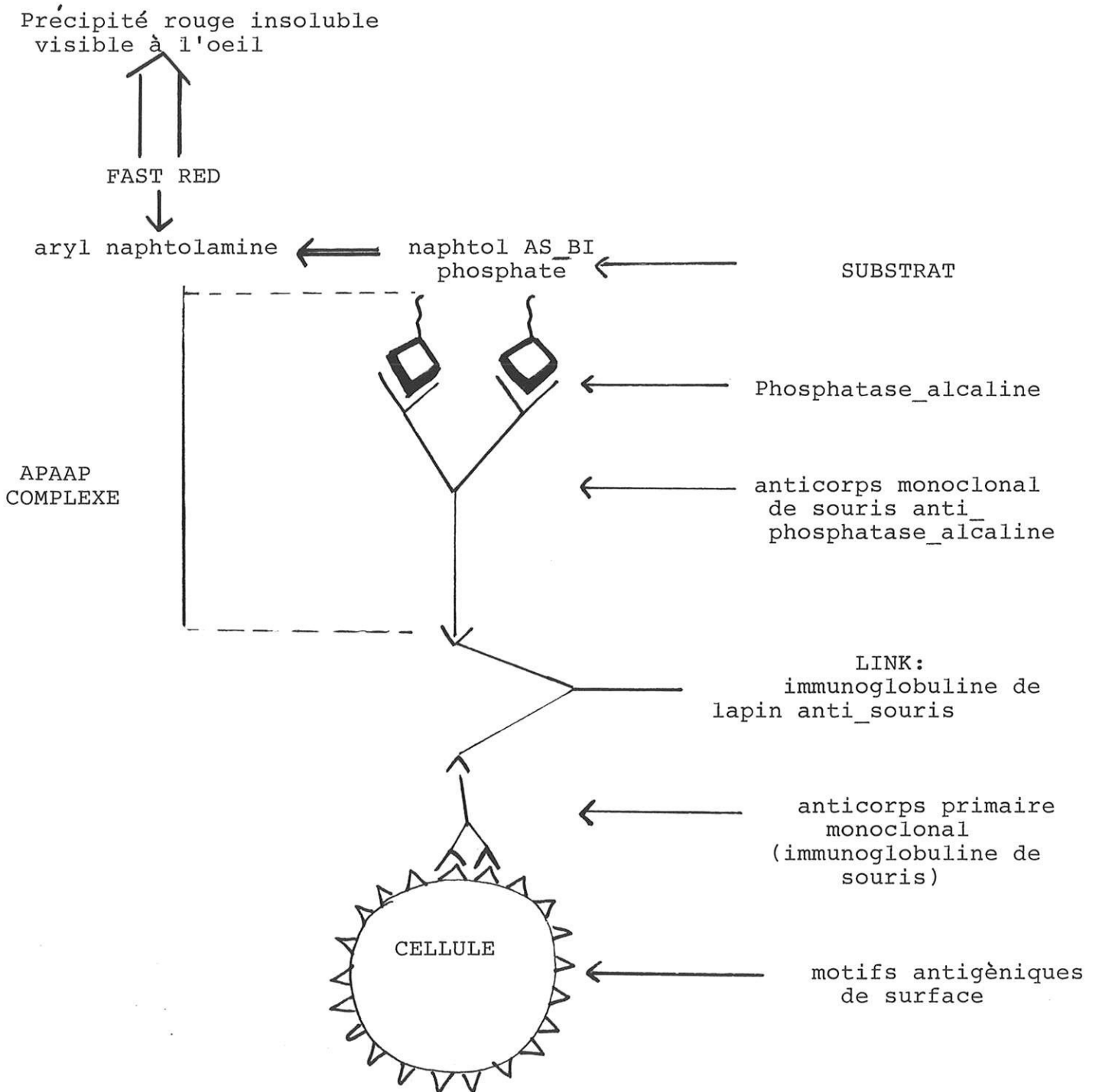
En ce qui nous concerne, nous avons voulu tester dans un premier temps la PAP méthode qui permet d'obtenir une coloration jaune marron des cellules réactives, mais nous avons noté l'interférence, difficile à bloquer, avec les peroxydases endogènes des cellules granuleuses. Ce qui nous a fait abandonner cette méthode au profit de la technique en APAAP.

Nous avons dans ce cas utilisé un kit APAAP de chez Dako (system 40 référence K670).

Malheureusement, là encore, nous nous sommes heurtés à des problèmes techniques multiples, dont nous reparlerons plus loin, tels l'importance de la qualité de confection des frottis, de la fixation, des lavages entre les différentes étapes, qui en font à nos yeux une technique longue (quatre heures environ pour tester 5 ou 6 anticorps) et délicate, difficilement accessible à la routine dans nos laboratoires.

Figure 8

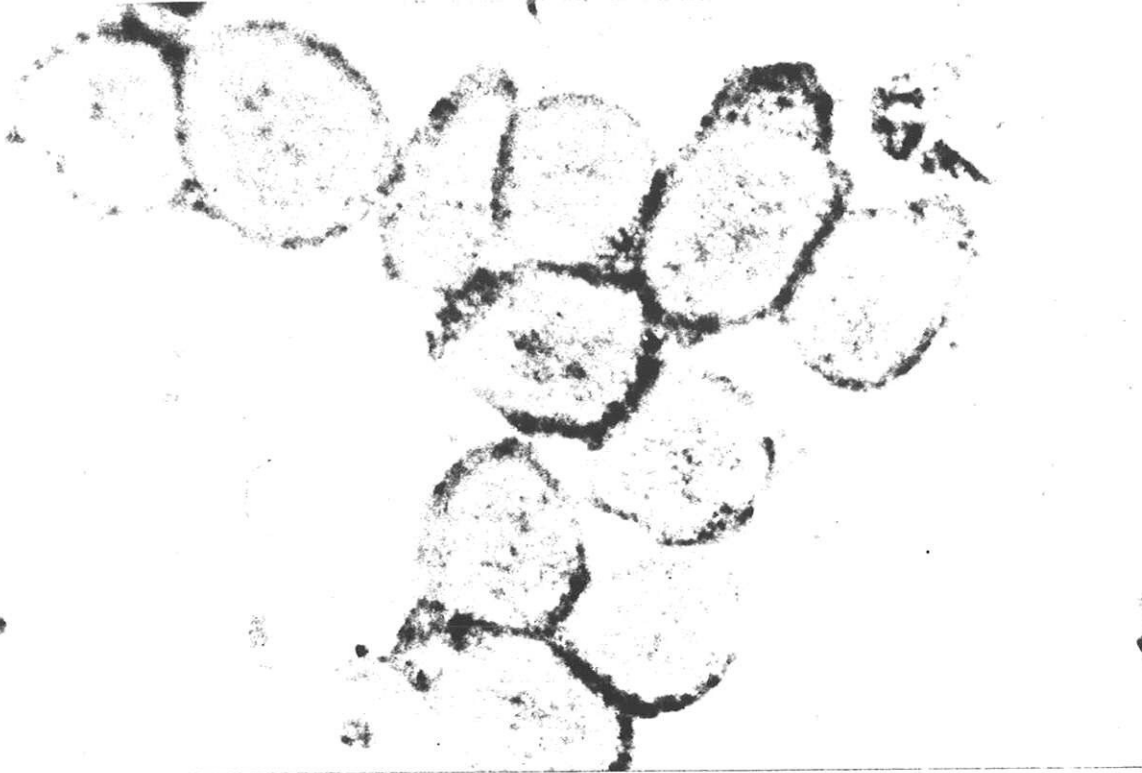
SCHEMA DE LA REACTION EN APAAP



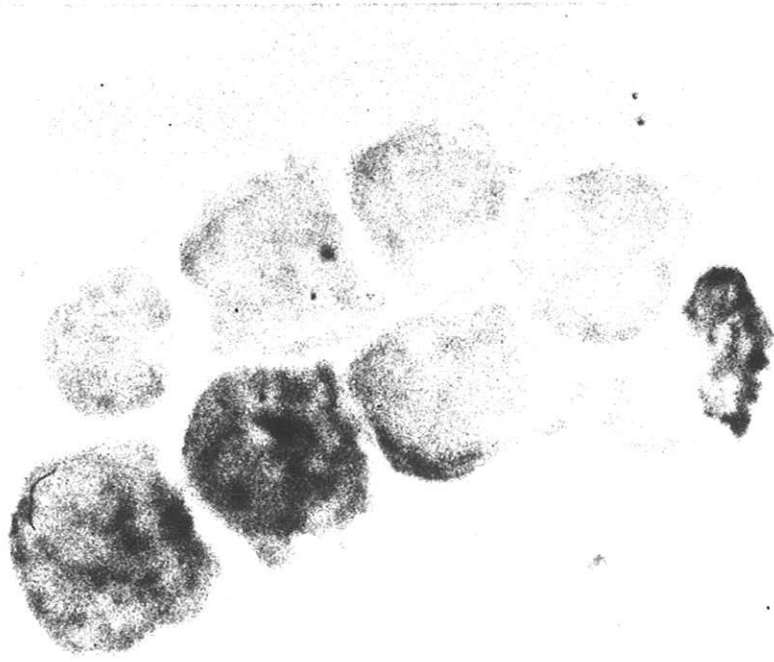
TECHNIQUE EN APAAP

- 1 : confection des frottis cellulaires sur lames propres et dégraissées.
- 2 : séchage à l'air ambiant pendant 2 à 3 heures.
- 3 : * envelopper les lames de papier aluminium et les placer à -20°C, si la technique est différée.
* Sinon fixer les frottis et les traiter immédiatement.
Agent fixateur = acétone pur (3 mn) ou mélange 50/50 acétone méthanol (1 mn).
- 4 : une fois fixées, placer les lames dans un bain de tampon tris salin (TBS) de pH égal à 7,6 pendant cinq minutes.
Tampon TBS : 6g de Tris (hydroxyméthyl aminométhane) + 8,766g de NaCl qsp ll. Amener le pH à 7,6 avec une solution d'acide chlorydrique.
- 5 : déposer l'anticorps primaire (monoclonal).
Incuber 30 mn minimum à la température du laboratoire en chambre humide.
NB : ne pas sécher les lames entre les différentes étapes.
- 6 : lavage en TBS (5 mn).
- 7 : déposer le Link (anticorps de lapin anti souris).
Mêmes conditions d'incubation (30 mn).
- 8 : lavage en TBS (5 mn).
- 9 : déposer le complexe APAAP.
Incuber de la même façon 30 mn.
Pendant ce temps préparer le substrat : 1 pastille contenant du naphtol AS-BI phosphate, du fast red et du levamisole est dissoute à l'abri de la lumière dans 2 ml de Tris-HCl.
- 10 : Lavage en TBS 5 mn.
- 11 : filtrer le substrat sur les lames et incuber 20 à 25 mn.
- 12 : lavage en TBS 5 mn.
- 13 : contre coloration à l'hématoxyline 3 mn, colore les noyaux.
- 14 : rinçage à l'eau distillée.
Une fois sèches monter les lames avec un milieu aqueux type glycerol gélatine.
Observer à l'objectif 100 en immersion.

REACTION POSITIVE EN APAAP POUR LE CD19



REACTION POSITIVE EN PAP



CHAPITRE III
RESULTATS

I RESULTATS DE L'ETUDE DES MARQUEURS EN
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE AVEC LECTURE EN
CYTOMETRIE DE FLUX :

Les tableaux 6, 7, 8 et 9 présentent pour chaque patient le résultat du marquage obtenu avec chaque anticorps testé.

Le niveau d'expression d'un antigène donné sur les cellules blastiques est très hétérogène. Rappelons que de façon arbitraire, nous avons fixé le seuil de positivité à 20 % de cellules fluorescentes. Par extension on considère comme positif, un marqueur exprimé sur plus de 20 % des cellules blastiques.

L'étude des marqueurs immunologiques en IFI a été réalisée sur les cellules médullaires, sauf dans 6 cas (25, 36, 40, 43, 45, 47) où elle a été faite sur les blastes du sang périphérique.

Légende :

susp cell = suspension cellulaire

NT = non testé

TB = très bonne

B = bonne

M = médiocre

Te = témoin

CDn + = réaction positive pour l'anticorps

CDn - = réaction négative pour l'anticorps

CDn ND = réaction non déterminée pour cet anticorps

A/ Expression des antigènes de différenciation en fonction de la classification FAB (tableaux 10 et 11) :

Les leucoses M6 et M7 ne sont pas reportées dans le tableau 10, puisque nous ne disposons dans chacune de ces deux classes que d'un seul cas; aussi l'expression des antigènes membranaires peut directement être appréciée sur les tableaux 6 et 7. Il en est de même pour la leucose M4 qui n'apparaît pas sur le tableau 11 et peut être appréciée sur les tableaux 8 et 9.

Pour chaque classe FAB, c'est à dire chaque colonne, apparaît deux nombres pour chaque anticorps testé. Celui de gauche représente le nombre de cas positif(s) pour cet anticorps, celui de droite le nombre de cas négatif(s).

Exemple : pour les M1 :

CD11B 6/13

soit 6 cas positifs pour CD11B

13 cas négatifs pour CD11B

total des cas : 21; donc il reste 2 cas non testés

B/ Expression des marqueurs myéloïdes principaux du DR et du CD34 dans les LANL :

graphe 4

C/ Réactivité comparée des marqueurs myéloïdes dans les M1-2-3 et M4-M5 :

graphe 5

D/ Expression des marqueurs lymphoïdes dans les LANL :

graphe 6

Les résultats dans le cadre de B/, C/, D/, sont obtenus sur la population totale (49 sujets). Au dessus de chaque colonne est indiqué l'effectif réel testé.

L'ensemble de ces résultats sera commenté et analysé dans le chapitre IV _ discussion, ainsi que les tableaux 10 et 11.

II RESULTAT OBTENUS EN APAAP :

A propos de trois patients inclus dans l'étude précédente :

	% de cellules positives en APAAP	% de cellules positives en IFI
<hr/>		
cas 3		
CD33	56	52
CD34	35	30
CD13	24,5	25
cas 12		
CD33	1	24,5
CD34	30	40,5
CD13	53,5	59,2
CD14	0	5,2
cas 16		
CD33	7	19,3
CD34	42	54
CD13	66	34,3

TABLEAU 6

Cas	Classe FAB	Susp. cell.	Te	CD33	CD34	CD13	CD14	CD41	ANTI GA
1	M1	NT	TB	+	+	+	-	+	+
2	M1	TB	M	+	N	P	-	-	-
3	M1	M	M	+	+	+	-	-	-
4	M1	B	TB	+	+	+	+	-	+
5	M1	TB	TB	-	-	-	-	-	-
6	M1	B	B	+	ND	+	+	ND	ND
7	M1	TB	TB	-	+	+	-	-	-
8	M1	B	TB	-	-	+	-	-	-
9	M1	TB	TB	+	-	-	-	-	-
10	M1	TB	TB	+	-	+	-	-	-
11	M1	B	B	+	ND	-	-	ND	ND
12	M1	TB	TB	+	+	+	-	-	-
13	M1	TB	TB	-	+	-	-	-	-
14	M1	TB	TB	+	+	+	-	-	+
15	M1	TB	TB	+	ND	+	+	ND	ND
16	M1	B	TB	-	+	+	-	-	-
17	M1	B	TB	+	-	+	-	-	-
18	M1	NT	B	+	ND	-	-	ND	ND
19	M1	TB	TB	+	+	+	+	ND	+
20	M1	B	B	+	-	+	-	ND	-
21	M1	B	M	+	ND	+	+	ND	ND
22	M2	M	B	+	+	-	-	-	-
23	M2	B	B	-	-	-	-	-	-
24	M2	M	B	-	+	ND	ND	ND	ND
25	M2	B	B	+	ND	ND	ND	-	-
26	M2	TB	TB	+	ND	+	+	ND	ND
27	M2	M	B	+	ND	+	+	ND	ND
28	M2	M	B	-	-	-	ND	ND	ND
29	M2	NT	B	+	-	+	+	-	-
30	M2	B	TB	-	-	+	+	-	-
31	M2	B	B	+	-	+	-	ND	-
32	M3	NT	B	+	-	+	-	-	-
33	M3	NT	B	-	-	+	-	-	-
34	M4	NT	TB	+	-	+	-	+	-
35	M4	NT	TB	+	+	+	+	ND	+
36	M5	M	B	+	-	-	-	ND	ND
37	M5	M	B	-	+	+	-	ND	ND
38	M6	M	TB	-	-	-	-	ND	+
39	M7	B	TB	+	ND	ND	ND	+	ND

TABLEAU 7

Cas	CD2	CD19	CD11b	CD15	CD16	CD9	CD7	CD5	CD10	ANTI-DR	CD71	CD38
1	-	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	-	+	+
2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
4	+	+	+	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	ND	+	-	-	-	+	+	ND
7	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
9	-	-	-	-	-	+	ND	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
12	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
14	+	-	-	-	-	+	ND	-	-	ND	+	+
15	-	-	-	-	-	+	+	-	ND	+	+	ND
16	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	ND
17	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	-	ND
19	+	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	+	+	+
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	-	-	-	+	-	+	ND	-	-	+	+	ND
22	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
23	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	-	-	-	-	-	+	ND	-	-	ND	+	ND
26	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+	-	ND
27	+	-	-	-	-	+	+	-	ND	+	+	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	-	+
29	-	-	+	-	-	+	ND	-	-	-	+	+
30	-	-	+	+	+	+	ND	-	-	ND	+	+
31	-	-	-	+	+	-	ND	-	ND	-	+	+
32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	ND
33	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
34	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
35	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	ND
36	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	ND	+	-	+
37	ND	ND	-	-	-	+	ND	ND	ND	+	-	ND
38	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
39	ND	ND	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	+	+	ND

TABLEAU 8

Cas	Classe FAB	Susp. cell.	Te	CD33	CD34	CD13	CD14	CD41	ANTI GA
40	M4	B	TB	+	+	+	+	-	-
41	M5	NT	B	+	-	+	+	+	-
42	M2	B	M	-	+	+	-	-	-
43	M2	B	M	+	-	+	-	+	-
44	M2	B	TB	+	+	+	-	+	+
45	M2	B	B	+	+	+	+	+	+
46	M0	NT	M	+	+	+	-	ND	-
47	M0	B	TB	-	+	+	-	+	ND
48	M5	B	B	+	-	+	+	ND	ND
49	M0	TB	TB	-	+	-	-	ND	-

TABLEAU 9

Cas	CD2	CD19	CD11b	CD15	CD16	CD9	CD7	CD5	CD10	ANTI-DR	CD71	CD38
40	-	-	-	-	-	+	ND	-	-	ND	-	ND
41	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND
42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
44	+	-	+	-	+	+	ND	-	-	+	+	+
45	-	-	ND	-	-	+	ND	ND	+	+	+	+
46	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	+	+
47	+	+	-	-	+	+	ND	+	+	ND	+	+
48	ND	ND	+	-	-	+	ND	ND	ND	+	+	ND
49	-	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	-	+	+

TABLEAU 10

CLASSE FAB

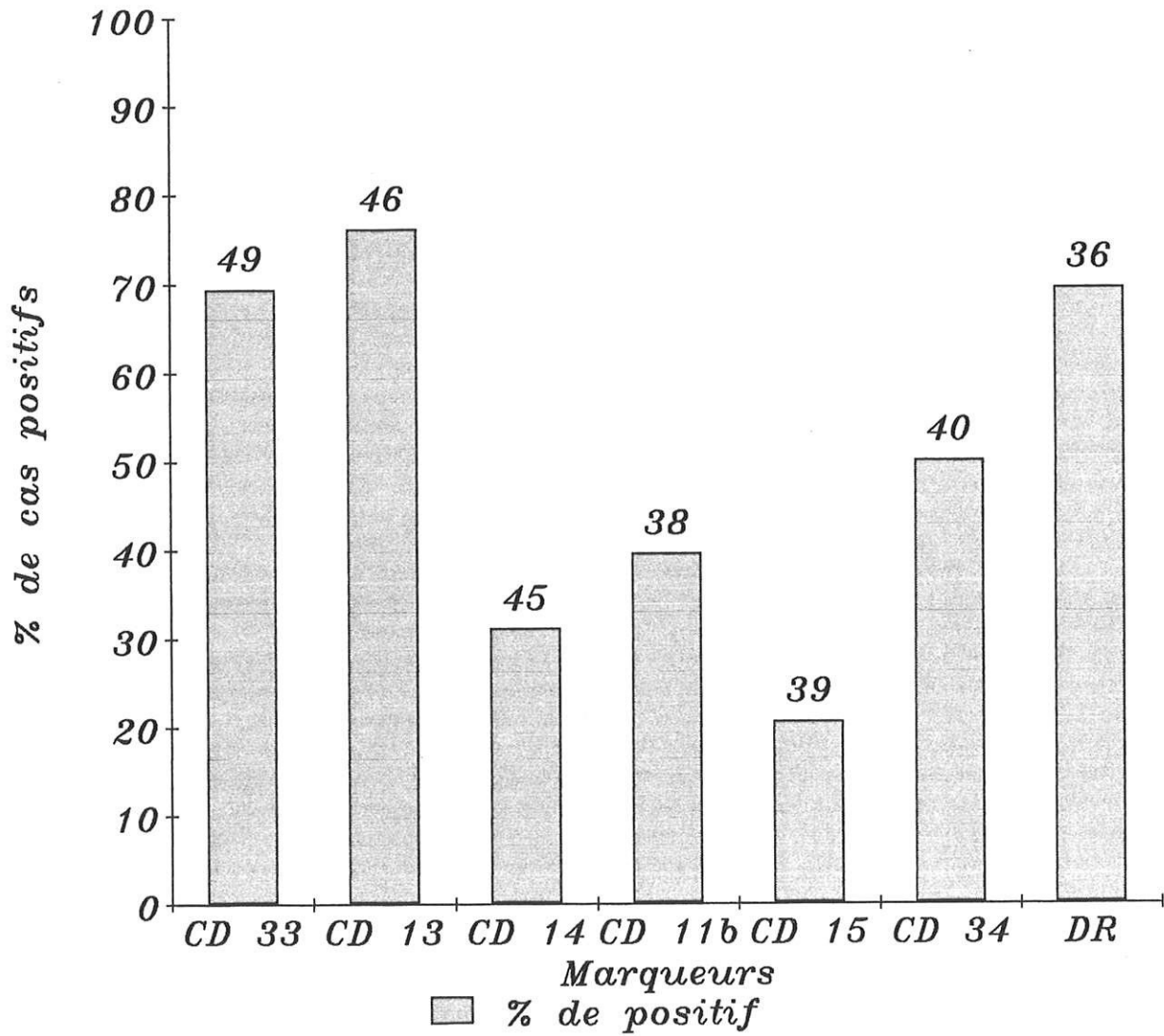
	M1	M2	M3	M4	M5
Total des cas :	21	10	2	2	2
CD 33	16/5	6/4	1/1	2/0	1/1
CD 34	9/8	2/5	0/2	1/1	1/1
CD 13	16/5	5/3	2/0	2/0	1/1
CD 14	5/16	4/3	0/2	1/1	0/2
CD 41	2/14	0/5	ND	1/0	0/1
ANTI GA	4/12	0/4	0/2	1/1	0/1
CD 2	4/16	1/6	0/2	0/1	0/1
CD 19	5/15	1/6	0/2	0/1	0/1
CD 11B	6/13	3/4	0/2	2/0	1/1
CD 15	2/16	3/4	0/2	1/1	1/1
CD 16	1/16	2/5	0/2	1/1	1/1
CD 9	12/6	5/4	2/0	2/0	1/1
CD 7	3/8	1/3	ND	0/1	0/1
CD 5	2/12	0/8	ND	0/1	0/1
CD10	1/12	0/5	ND	0/1	0/1
ANTI DR	11/5	4/3	0/2	2/0	2/0
CD 71	15/4	6/3	2/0	1/1	0/2
CD 38	13/0	5/1	ND	0/1	1/0

TABLEAU 11

CLASSE FAB

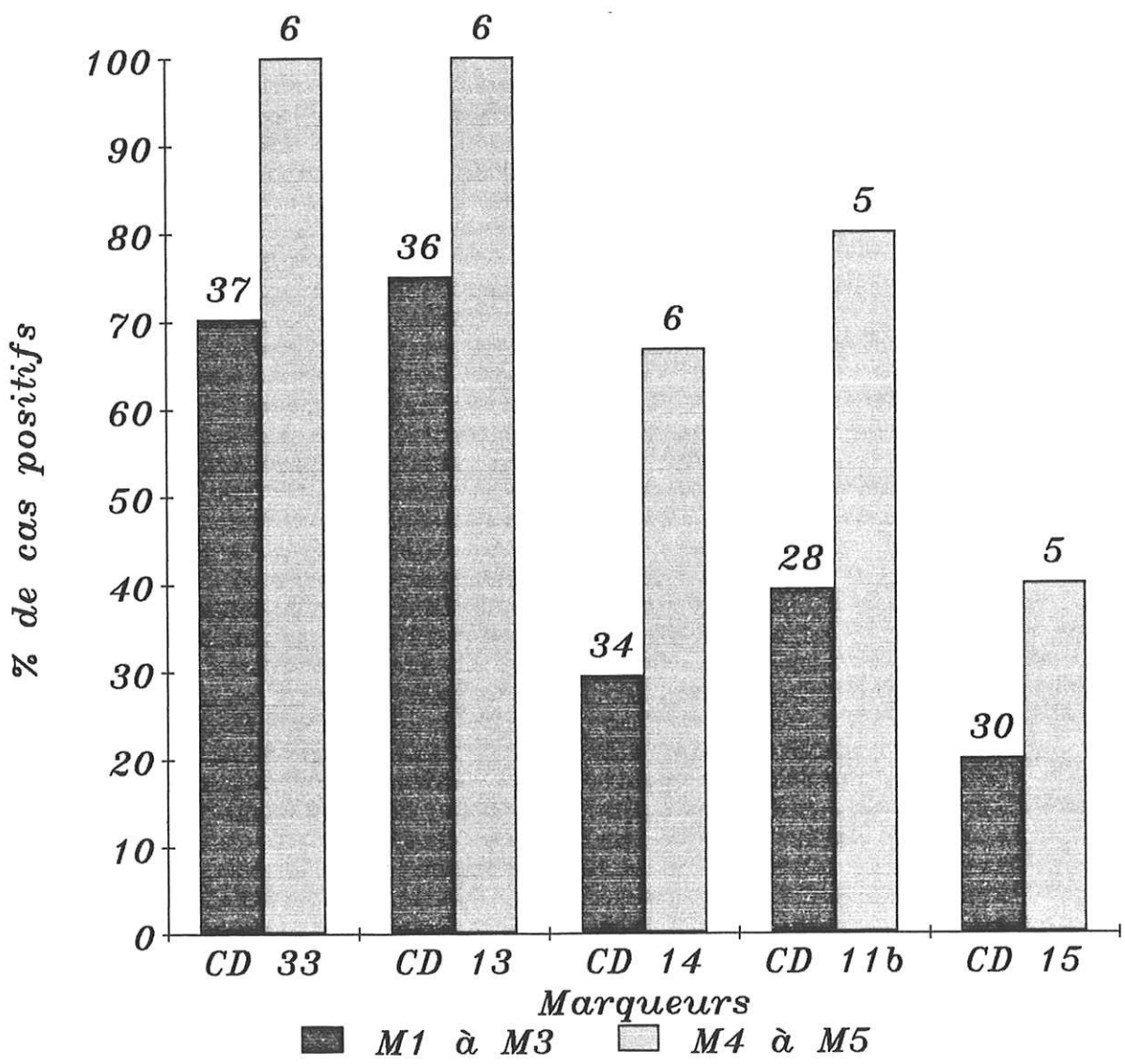
	M0	M2	M5
TOTAL DES CAS	3	4	2
CD 33	1/2	3/1	2/0
CD 34	3/0	3/1	1/1
CD 13	2/1	4/0	2/0
CD 14	0/3	1/3	2/0
CD 41	0/1	3/1	1/0
ANTI GA	0/2	2/2	0/1
CD 2	1/2	1/3	ND
CD 19	1/2	0/3	ND
CD 11B	0/2	2/0	1/0
CD 15	0/2	1/2	0/1
CD 16	1/1	1/2	0/1
CD 9	1/2	3/0	2/0
CD 7	ND	0/1	ND
CD 5	1/1	0/2	ND
CD 10	1/1	1/2	ND
ANTI DR	0/2	3/0	1/0
CD 71	3/0	3/0	1/1
CD 38	3/0	2/0	ND

Grappe 4

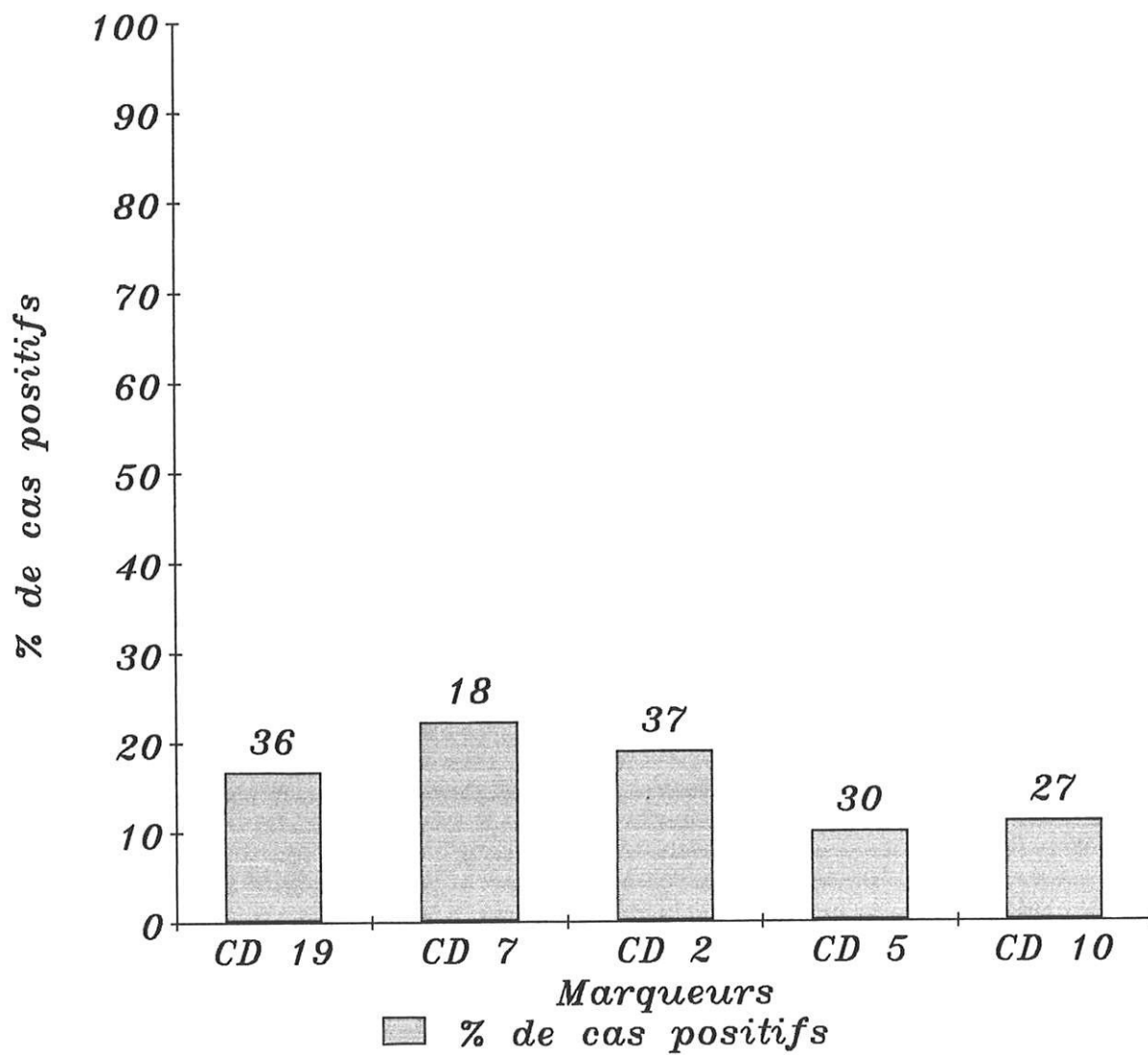
EXPRESSION DES MARQUEURS MYELOIDES DU DR ET DU CD34
DANS LES LANL

Graphe 5

REACTIVITE COMPAREE DES MARQUEURS MYELOIDES
DANS LES M1-2-3 ET M4-5



Graphe 6

EXPRESSION DES MARQUEURS LYMPHOIDES DANS LES
LANL

CHAPITRE IV

DISCUSSION

I INTERET DU TYPAGE IMMUNOLOGIQUE :

Le diagnostic des leucémies aiguës repose avant tout sur l'examen cytologique et cytochimique des cellules blastiques présentes dans la moëlle.

Toutefois, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) bénéficient largement de l'apport des anticorps monoclonaux pour leur classification. Le phénotype immunologique est donc dans ce cas pris en compte pour le choix thérapeutique. L'intérêt pronostique de l'étude immunologique est plus discuté actuellement. Certes, il apparaît que la classification immunologique distingue des formes de leucémies de gravité croissante (leucémies pré-B, leucémies T, leucémies lymphoblastiques exprimant des marqueurs myéloïdes, leucémies à cellules de Burkitt) mais, dans plusieurs études, les caractéristiques immunologiques de la leucémie ne semblent pas constituer un paramètre isolé qui s'ajouterait aux éléments classiques de gravité, tels que l'âge, le sexe, l'hyperleucocytose.

Le problème est différent en ce qui concerne les LANL. La classification FAB proposée en 1976, révisée en 1985 a amélioré considérablement l'approche nosologique de ces hémopathies puisque le taux de concordance entre cytologistes est actuellement supérieur à 95 %. La reproductibilité des critères de subdivision des LAM (M1 à M5) est moins bonne (60/70 %) en dépit de leur standardisation. Les principales discordances sont observées entre les sous-groupes M1 et M2 et les sous-groupes M1/M2 et M4.

Le typage immunologique des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) date de quelques années, mais l'on se heurte ici à la description de très nombreux anticorps monoclonaux capables de reconnaître les blastes de LAM. Leur spécificité est plus ou moins étroite, souvent encore mal définie (beaucoup reconnaissent les plasmocytes tumoraux dans les myélomes multiples par exemple), et les relations entre l'expression des antigènes identifiés et les caractéristiques des cellules leucémiques au diagnostic, ou, le devenir des malades après traitement sont encore confuses.

Des différentes études entreprises jusqu'à présent il naît certaines observations que nous allons reprendre et rattacher à notre étude, afin de dégager l'intérêt que peut apporter une étude des antigènes de membrane des cellules de leucémies aiguës non lymphoblastiques (LANL).

1) LAM bien caractérisées par la morphologie FAB :

L'étude immunologique conforte le diagnostic cytologique. En effet une LAM exprime au moins un marqueur myéloïde (29)(30). Dans notre étude, si l'on exclue les cas de M0, seulement 3 patients (cas 5, 28, et 38) chez lesquels on diagnostique par la cytologie une LAM, ne présentent aucun marqueur myéloïde positif (se référer au tableau 6 et 7).

Les cas 28 et 38 s'expliquent aisément. Le premier est analysé sur une suspension cellulaire de qualité médiocre, faite de 12 % de blastes seulement et en majorité de cellules érythroïdes et lymphoïdes. Ceci rend compte de la difficulté à "fenêtrer" la population maligne au cytofluoromètre et de rendre un résultat purement représentatif des antigènes de membrane de ces cellules.

Le deuxième cas correspond à une leucémie érythroïde, sur laquelle nous reviendrons, mais qui là aussi a été testée sur une suspension pauvre en blastes (15 %).

Il reste un cas particulier, le 5, leucémie myéloïde chez un homme de 44 ans avec hyperleucocytose et syndrome tumoral au diagnostic. Il n'y a aucune ambiguïté cytologique : la moëlle est envahie de petits myéloblastes de type I (82 % des cellules non érythroïdes et non lymphoïdes), présentant une réaction des myéloperoxydases fortement positive. Cela correspond à la classification M1 du groupe FAB.

Aucun problème technique de marquage n'a été signalé. Seuls sont positifs Le DR, Le CD71, le CD38 et surtout de façon très nette le CD7 avec 80 % des cellules marquées. CD7 est le cluster lymphoïde le plus retrouvé dans les LANL (31). Son expression dans ce cas semble inappropriée et correspondre à une infidélité de lignée. Mais nous n'avons pas d'explication claire à cette absence de marqueur myéloïde; le panel est-il suffisant pour tester toutes les LANL ?

Notons que le cas 23, étiqueté M2, est positif pour DR, CD11b et CD9 uniquement. L'association du DR et de l'antigène reconnu par CD11b paraît curieuse; DR diminuant avec la maturation des cellules myéloïdes normales alors que parallèlement CD11b est de plus en plus exprimé. Seule la série monocytaire fait coïncider ces deux marqueurs.

Il est parfois difficile de différencier une LAM-M2 d'une M4 (myélomonocytaire) mais la cytochimie montre en général une inhibition par le fluorure de sodium de la réaction des estérases sur une partie de la population blastique.

Dans le cas présent (se référer au tableau 2) la cytochimie n'est pas en faveur d'un processus impliquant la série monocytaire. Il faut bien se rappeler que ces anticorps sont définis grâce à un antigène, dont ils sont spécifiques, présent à la surface des cellules normales. Il se peut très bien qu'un clone de cellules malignes échappe à la régulation normale et présente un asynchronisme dans la maturation, coexprimant des marqueurs précoces et tardifs d'une lignée.

Au total sur nos 49 patients, un seul n'a vraiment pas de marqueur myéloïde, alors qu'un panel relativement large d'anticorps a été testé.

Il a été décrit dans la littérature des LAM uniquement DR+, mais le seul anticorps myéloïde utilisé était le My9 (32). Enfin une étude récente de Bradstock et collaborateurs (31) rapporte qu'environ 10% des LAM n'ont pas de marqueur myéloïde.

Les principales discordances entre cytologistes se situent dans la classification en M1 ou M2 ou entre M2 et M4. De nombreux auteurs ont cherché une corrélation entre l'immunophénotype et la classe FAB. Y-a-t-il un profil immunologique type, pour chaque classe FAB, qui pourrait aider le cytologiste dans les cas litigieux?

Les conclusions des différentes études restent confuses. Certains CD sont exprimés préférentiellement dans certains groupes FAB. Cependant il ne se dégage de celles-ci aucun consensus, et on peut se demander si cette recherche permanente de corrélations entre cytologie et immunologie a vraiment des chances d'aboutir.

Les premières séries de la littérature, utilisant un faible nombre d'anticorps, ne montraient aucune corrélation entre morphologie et immunologie. Quelques séries plus importantes (1), (13), (29), (30), (33), (35), (36), permettent de souligner quelques corrélations relatives entre cytologie et immunologie en distinguant:

_ les CD exprimés préférentiellement dans les LAM à composante monocytaire (M4-M5): essentiellement le CD14 dans les M5b et M4. CD11b serait également positif mais pas de façon constante.

Au sein du CD14 existe une hétérogénéité épitopique nette: exemple entre les anticorps My4 et MO2. Ceci peut expliquer les résultats divergeants selon les séries.

Dans notre étude (tableau 10 et 11), le CD14 est positif dans 4 sur 7 des LAM M4 et M5; alors que moins du tiers des LAM non M4 et non M5 exprime le CD14. Celui-ci est peu représenté dans le type M1 (5 cas sur 16) et pas du tout dans les 3 M0. Donc la présence d'une réaction positive pour le CD14 peut aider dans les cas difficiles sur le plan cytologique : CD14 est en faveur d'une différenciation monocyttaire.

_ les CD exprimés préférentiellement dans les LAM à composante granuleuse (M2-M3): essentiellement le CD15 (29).

L'anticorps anti-Leu M1 serait positif dans la majorité des M2 et négatif dans les M1 pour Neame et Soambounsrup (1), (36).

Pour Drexler (35) CD15 marquerait surtout les M2. Selon lui, et pour beaucoup d'autres auteurs, son expression dans les M3 serait beaucoup plus variable. En effet les anticorps du CD15 réagiraient avec les promyélocytes normaux portant l'haptène X, mais pas forcément avec les blastes de M3 qui peuvent être dépourvus de cet antigène.

Nous avons retrouvé 4 cas de M2 positives pour CD15 sur 7 testées, et simplement 2 M1 sur 16. Les deux leucémies aiguës promyélocytaires sont CD15-, ce qui tend à rejoindre l'étude de Drexler, sans toutefois pouvoir tirer de conclusion à propos de deux cas seulement.

_ les CD exprimés essentiellement dans les LAM immatures M1 et M0 (29), (30), (37), (38), (39):

c'est ici que se place le CD34, non pas spécifique d'une lignée (retrouvé aussi sur les blastes de LAL) mais témoin d'une immaturité cellulaire.

Pour beaucoup d'auteurs les blastes CD34+ sont le plus souvent dénudés des antigènes reconnus par CD33 et surtout ceux reconnus par CD15. Ce qui placerait le CD15 à l'opposé du CD34, comme témoin de maturité.

Rappelons nous la fréquence du CD15 dans les M2 comparée aux M1; elle conforte cette observation.

CD34 définit les classes cytologiques M1 et M0. Il est plus rarement retrouvé dans les M2.

Nos résultats (tableaux 10 et 11) s'orientent vers ces différentes études:

- _ 9 M1 sur 16 sont CD34+
- _ 3 M0 sur 3 sont CD34+
- _ sur les 9 M1 CD34+ , 6 sont encore CD33+; 8 sont testées en CD15 et seulement 1 (qui est CD33+) est CD15+

Donc CD34+ est essentiellement corrélé de façon négative avec CD15.

De toutes les études faites jusqu'à présent on ne peut définir de classification immunologique correspondant à la classification cytologique, mais simplement des tendances. Il est une classe FAB pourtant, la classe M3 (12), qui semble répondre au profil suivant:

33+ 13+ DR-

Le CD15, classiquement admis comme positif, est controversé actuellement.

A propos de nos deux M3: DR est négatif (-)

CD13 est positif (+)

1 est CD33+ / 1 est CD33-

(se reporter aux tableaux 6 et 7)

CD15 est négatif dans les deux cas, ce qui tend à rejoindre l'étude de Drexler (35) citée précédemment.

Si l'on fait la synthèse (tableau 12) il apparaît clairement que

_ CD13 et CD33 regroupent des anticorps pan-myéloïdes, reconnaissant des antigènes présents dans la plupart des LANL, tous types FAB confondus

_ les M4 et M5 sont plus souvent CD14+ que les M1, M2, ou M3

_ CD15 est fréquent dans les M2

_ CD34 est fréquent dans les M1 et les leucémies peu différenciées

_ les M3 sont classiquement DR-, 33+, 13+

TABLEAU 12 : d'après W. Vainchenker (12)
PHENOTYPES USUELS DANS LES LANL SUIVANT LE TYPE FAB

	M1	M2	M3	M4	M5a	M5b
CD13	+	+	+	+	+	+
CD14	-	-	-	+	-	+
CD15	-	±	±	+	+	+
CD33	+	+	+	+	+	+
CD34	+	±	-	-	+	-
DR	+	±	-	+	+	+

Mais la classification FAB ne s'arrête pas aux M5. Elle décrit des leucémies plus rares, leucémies à mégacaryoblastes et érythroleucémies, dont les phénotypes immunologiques sont moins étudiés.

Le cas 39 correspond à une M7. Le typage n'a pu être réalisé que sur les blastes du sang périphérique. La fibrose médullaire classique dans ce type de leucose a empêché toute aspiration. La positivité du CD41 sur ces cellules a conforté le diagnostic de leucémie à mégacaryoblastes déjà suspecté sur la cytochimie sanguine. Notons la positivité du DR et du CD33 décrite aussi par certains auteurs (41) dans ce type de leucose.

Toutefois CD41 ne semble pas absolument spécifique de la lignée plaquettaire, puisque nous le retrouvons sur 22% des LAM autres que M7. Le groupe d'étude immunologique des leucémies (GEIL) (7) note la positivité de ce marqueur sur les blastes de leucémies M4 ou M5 aux alentours de 10% . Par contre le CD42, divisé en deux clusters CD42a et CD42b reconnaissant des glycoprotéines plaquettaires (respectivement gp IX et gp Ib), semblerait plus spécifique de cette lignée plaquettaire. Le GEIL signale sa positivité dans moins de 5% des leucémies myélocytaires.

Les érythroleucémies (M6) sont rares, pas plus de 5 % des leucémies aiguës pour Greaves (42), sans qu'il y ait pour autant une explication claire à cela.

Pour Anderson (42) beaucoup de LAM-M6 seraient en fait diagnostiquées comme des M1 ou des LAL. Selon lui, 15 % des M1 pourraient être des leucémies érythroïdes car elles portent la glycophorine A (22 % des M1 de notre population sont positives pour ce marqueur).

La glycophorine A se retrouve uniquement à la surface des cellules érythroïdes, dans la moëlle osseuse normale. Elle apparaîtrait juste après le stade BFU et CFU-E, à peu près au moment où débute la synthèse d'hémoglobine (43).

Les leucémies glycophorine A positive, peuvent être des érythroleucémies ou des leucémies mixtes (une population d'érythroblastes jeunes et une population de myéloblastes ou mégacaryoblastes).

Plus récemment Cuneo (44) a étudié ces érythroleucémies d'un peu plus près, et en a défini quelques caractères immunologiques:

- _ présence de la glycophorine A, reconnue par un anticorps monoclonal dans la majorité des cas. Elle pourrait même être exprimée par certains blastes.

- _ CD33+, CD13+ chez la majorité des patients correspondant à la présence de blastes (voir la définition FAB du tableau 1).

- _ souvent CD34+ et DR-.

- _ parfois CD41 (sous-population exprimant le marqueur plaquettaire).

Notre seul cas de M6 (numéro 38), hormis la glycophorine A dans la limite de la positivité (20 % de cellules fluorescentes) répond peu à ce phénotype. Les CD13, 33, 34 sont négatifs. Le DR n'a pas été testé.

La négativité des marqueurs myéloïdes est liée très certainement au faible nombre de myéloblastes médullaires (15 %). Le clone leucémique est peut-être peu avancé dans la différenciation, les cellules exprimant peu la glycophorine A.

A propos de l'expression des marqueurs myéloïdes, du DR et du CD34 dans les LAM : graphe 4

Nous l'avons vu, une LAM exprime au moins un marqueur myéloïde, mais le plus souvent, plusieurs sont présents à la surface de la population maligne. Certains sont parfois très fréquents tous types FAB confondus.

Sur notre population totale ce sont les CD dits "pan-myéloïdes" qui sont le plus représentés :

- _ dans 75 % des cas pour CD13.

- _ dans 70 % des cas pour CD33.

L'antigène de classe II, DR, est lui aussi très représenté, dans 68 % des cas.

Plus loin, on trouve le CD34, positif dans 50 % des cas et le CD11b dans 40 % .

Le CD14 est positif dans 31 % des cas. CD15 est le petit dernier avec 20,4 % de LAM positives pour ce marqueur.

Drexler en 1987 (35) a publié le résultat d'une étude comparant la fréquence relative des anticorps myéloïdes et lymphoïdes exprimés dans les LANL.

Pour les CD myéloïdes :

CD33 (My9) positif dans 80 % des cas

CD13 (My7) positif dans 82 % des cas

CD14 (My4) positif dans 41 % des cas

CD15 (anti-leu M1) positif dans 64 % des cas

CD11b (Mol) positif dans 64 % des cas

Le DR apparaît dans 81 % des LANL.

La comparaison avec nos résultats, à anticorps identique au sein d'un cluster, montre une bonne corrélation pour CD13, CD33 et DR (80 % versus 75 % _ 82 % versus 70 % _ 81 % versus 68 %). Elle est encore relativement bonne pour CD14 (41 % versus 31 %) mais franchement mauvaise pour l'anticorps Leu M1 (CD15) (64 % versus 20,4 %).

Cet écart est probablement lié, à notre faible effectif, 39 LANL testées au lieu de 218 pour Drexler, ainsi qu'à notre recrutement : essentiellement composé de M1 qui expriment peu le CD15.

L'écart est manifeste aussi pour le CD11b (64 % versus 40 %) mais nous n'avons testé là aussi que 38 LANL en comparaison des 337 de Drexler.

Le graphe 5 compare la réactivité, dans les leucémies M1, M2 et M3 opposées aux leucémies M4 et M5, des anticorps des CD33, 13, 14, 11b, 15. Il met en évidence plusieurs choses :

_ Les M4 et M5 sont les LAM qui globalement expriment le plus tous ces marqueurs. Le moins représenté (CD15) l'est quand même dans 40 % des cas mais nous devons être très prudents car dans ce groupe M4 et M5 l'effectif est très réduit (6 cas maximum), et ce tableau est à considérer avec prudence.

_ Les M1, M2 et M3 expriment plus faiblement les CD14, 11b et 15 que 33 et 13.

_ CD13 et CD33 confirment leur statut de marqueurs "pan-myéloïdes".

Drexler (35) a obtenu sur des séries beaucoup plus grandes des résultats similaires.

Dans le chapitre II, nous avons exposé l'importance du couple d'anticorps (My9, My10) c'est à dire CD33 et CD34 pour le diagnostic des LANL. Nous avons voulu étudier la fréquence des diverses associations possibles entre ces deux clusters.

Association 33+ 34+ : 12 cas sur 40 testés soit retrouvée dans 30 % des cas (1 M0, 6 M1, 3 M2, 2 M4).

Sur ces 12 LAM, 10 sont aussi CD13+.

Association 34+ 33- : 8 cas sur 40 soit 20 % des LAM (3 M1, 2 M2, 1 M5, 2 M0).

Sur ces 8, 5 sont CD13+.

Association 34- 33+ : 14 cas sur 40 soit 35 % des LAM. La majorité sont aussi CD13+ (11 cas).

Association 34- 33- : 7 cas sur 40 soit 17,5 % des LAM, 2 sont CD13+, 4 CD13- et 1 est non testée.

Les quatre leucoses CD34-, 33-, 13- (cas N° 5, 23, 28 et 38) ont déjà été analysées au début de ce chapitre.

Autre association : 13+ 33+

46 testés et 27 positifs soit 58,5 % des LAM.

Les associations de marqueurs ne sont encore que peu étudiées; qu'il s'agisse de l'expression ou absence d'expression simultanée de certains marqueurs ou de l'expression d'un marqueur et de l'absence d'un autre. Certaines sont décrites dans la littérature. L. Campos (7) note la fréquence dans les LAM, de CD13+ CD15+. Nous ne la retrouvons que dans 16 % des cas, mais nous avons déjà discuté l'expression du CD15 faible dans nos LAM.

CD34+ CD15- est de mauvais pronostic, toujours pour Campos (39). Tucker (37) note une grosse association entre la coexpression de CD11b et CD11c et une mort précoce (moins de 2 mois).

Que peut-on attendre de ces associations ?

Si CD13 et CD33 sont les marqueurs les plus retrouvés dans les LANL, leur association est fréquente : 58,5 % des LANL de notre série. Nous ne pouvons conclure sur les associations 13+15+ ou 34+15-, décrites dans la littérature, notre effectif étant trop faible.

Si l'on considère les deux clusters fondamentaux pour le diagnostic des LANL, CD34 et CD33, la combinaison la plus fréquente dans notre étude est 34-33+ (35 % des cas); toutefois on rencontre avec une fréquence non négligeable l'association 33+34+, dans 30 % des cas.

L'intérêt de ces associations de marqueurs ne paraît peut-être pas évident de prime abord, mais il est nécessaire de poursuivre les recherches, sur des séries beaucoup plus grandes et surtout homogènes, pour éventuellement obtenir des conclusions sur le pronostic et le devenir des sujets.

Certaines LAM, bien caractérisées sur le plan cytologique, expriment des marqueurs habituellement liés à une autre lignée. Le phénomène de l'expression inappropriée d'antigènes habituellement liés à une autre lignée, est connu depuis longtemps, et décrit sous plusieurs termes (12) (31) :

_ Smith en 1983, parle d'infidélité de lignée, ce qui suggère un mécanisme.

_ Ben Bassat et Gale en 1984, parlent de biphénotypie, ce qui suggère deux populations.

_ Greaves parle de promiscuité de lignée en 1986.

La théorie très séduisante de l'infidélité de lignée, est actuellement controversée. Celle-ci reposait sur une conception globale de l'hématopoïèse : toutes les lignées hématopoïétiques proviennent d'une cellule souche pluripotente qui se détermine vers une seule lignée en inactivant les gènes spécifiques des autres lignées. Si l'on considère que la leucémogénèse peut impliquer une cellule souche pluripotente, le processus malin pourrait entraîner une erreur dans la programmation de ces cellules, qui aurait pour conséquence des expressions géniques inter-lignées.

En fait, le nombre de marqueurs réellement spécifiques d'une seule lignée, est très réduit; et la majorité des cas correspond à des asynchronismes dans la maturation leucémique avec coexpression, sur une même cellule, de marqueurs précoces et tardifs d'une lignée. Cependant, certains phénotypes ne peuvent être totalement expliqués par un asynchronisme de maturation.

Ces cas de multidifférenciation sont plus ou moins fréquents, allant de 10 à 30 % des leucémies aiguës étudiées.

Il faut tenir compte de la spécificité relative des antigènes et du nombre d'antigènes "infidèles" exprimés. Les vraies leucémies multiphénotypiques peuvent correspondre à la coexistence de deux populations, l'une ayant les caractères myéloïdes et l'autre les caractères lymphoïdes : "bilineage leukemia", ou bien à l'expression par une même cellule de caractères myéloïdes et lymphoïdes : population biphénotypique. Cette coexpression peut être vérifiée par une étude en double marquage:

Les leucémies multiphénotypiques incitent toujours à rechercher certaines anomalies caryotypiques, telle la présence d'un chromosome Philadelphie ou une translocation t(4,11).

Dans notre étude, sur 49 LANL, 31 ont pu être testées avec au moins un marqueur lymphoïde T et un marqueur B; 11 expriment au moins un marqueur B ou T; soit 35,4 % des LANL.

Le CD7 et CD2 (graphe 6) sont les marqueurs lymphoïdes les plus retrouvés : respectivement 22 % et 18,2 % des LANL (de novo et avec antécédents). CD7 est reconnu dans la littérature comme le marqueur lymphoïde le plus souvent associé aux LANL : 28,4 % selon Bradstock (31); 20 % pour Hedwig-Kasparu (45) qui l'associe dans 71 % des cas à une anomalie du chromosome 5, de mauvais pronostic.

Bradstock retrouve 11 % de LANL CD2 positif; 4,4 % positives pour CD19 et 1 % positive pour CD10.

Nos résultats divergent beaucoup concernant le CD19 et le CD10; or les anticorps monoclonaux utilisés sont identiques. Là encore, l'étude portait sur un effectif beaucoup plus important de 285 patients.

L'association, Calla + et marqueurs myéloïdes, a été décrite dans des leucémies à phénotype clairement monocytaire ou chez des leucémies à blastes basophiles, sans expression coordonnée à d'autres marqueurs lymphoïdes (12). Plus récemment le calla était associé à d'autres marqueurs lymphoïdes et un seul anticorps myéloïde.

Il faut savoir que certaines leucémies monocytaires ont un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, avec une très haute affinité pour les IgG₂ or, la plupart des anti-calla (CD10) appartiennent à la sous classe des IgG₂. Ceci peut expliquer des faux positifs.

Globalement l'expression des marqueurs lymphoïdes dans les LANL est faible, si on les prend isolément; par contre plus de 35 % des LANL expriment au moins un antigène lymphoïde soit presque une leucémie sur trois dans notre population.

Ce qui rend compte de la fréquence des multidifférenciations.

D'autre part l'expression du CD9, défini comme l'anticorps reconnaissant une glycoprotéine de 24 à 30 kDa présente sur la membrane de nombreuses cellules hématopoïétiques (pré-B, plaquettes, monocytes, cellules granuleuses), est relativement importante avec 76,7 % des cas positifs pour ce marqueur. Son expression ne paraît pas dominer dans tel ou tel groupe FAB, et étant peu spécifique d'une lignée on peut se demander l'intérêt à rechercher un tel marqueur. Pour le GEIL sa présence sur les cellules blastiques apparaît de bon pronostic en matière d'obtention de la rémission complète (7). Aussi est-ce là peut être le seul intérêt à le rechercher ?

Quant aux marqueurs de cellules activées, CD38 et CD71, ils sont eux aussi très représentés dans notre série avec 92 % des cas testés positifs pour CD38 et 71 % pour CD71.

L'antigène reconnu par CD71 (IOA 71) est assimilé au récepteur de la transferrine (TfR). Mais ici aussi persiste un doute sur la spécificité réelle de cet anticorps pour le TfR.

Kozlowski (52) a utilisé l'anticorps OKT9 pour mettre en évidence ce récepteur sur les blastes de LAM de 11 patients. L'importance de l'expression du récepteur de la transferrine à la surface des blastes serait corrélée à leur capacité proliférative.

En ce sens il serait plus représenté à la surface des cellules souches leucémiques.

Quoiqu'il en soit ces deux marqueurs ne nous apportent pas d'éléments essentiels pour le diagnostic des LANL.

Pour clore ce chapitre sur les LAM bien caractérisées sur le plan morphologique, il faut ajouter que la plupart des auteurs ont recherché également une corrélation entre l'immunologie et des données telles que l'âge, le taux d'hémoglobine, le chiffre de plaquettes ou le pourcentage de blastes médullaires, sans parvenir à leur fin (13) (29) (30) (37).

Seul L. Campos (29) met en évidence une relation entre l'expression du CD14 et l'hyperleucocytose, que nous ne retrouvons pas dans notre étude.

2) Intérêt du typage immunologique dans les leucoses peu différenciées ou indifférenciées :

C'est un point incontesté depuis plusieurs années, à savoir l'expression de certains antigènes reconnus par CD13, CD14, CD15 ou CD33, permet de considérer comme myéloblastique des leucémies cytologiquement indifférenciées (7) (15a) (40) (47).

J. M. Bennett (6) propose une classification de ces leucémies aiguës peu différenciées en M0, en les définissant de la façon suivante :

- _ grands blastes agranuleux, myéloperoxydase négatifs.
- _ marqueurs lymphoïdes négatifs.
- _ au moins un marqueur myéloïde positif : CD33 ou CD13

Sur les 10 cas qu'il a étudiés, tous étaient positifs pour CD33 ou CD13 au moins et souvent pour CD11b; dans 5 cas, CD7 était positif (marqueur lymphoïde non spécifique). Enfin la microscopie électronique confirme la présence de grains MPO+ dans les blastes.

D'autre part, ces leucoses M0 sont souvent CD34+ (38) (39) et DR+ (39) (48). DR n'est pas un marqueur de lignée; c'est un marqueur d'immaturation dans la série granulocytaire.

Il a été décrit dans la littérature des anticorps anti-myéloperoxydase (anti-MPO) (49) (50), très sensibles, spécifiques de la lignée myéloïde, qui reconnaîtraient aussi le précurseur des myéloperoxydases, inactif sur le plan enzymatique, et donc marqueraient des cellules cytochimiquement négatives pour la réaction des MPO. Ce qui pourrait aider au diagnostic des leucoses indifférenciées, séparant les myéloïdes

vraies (M0) anti-MPO positives, des indifférenciées vraies anti-MPO négatives.

Nous avons diagnostiqué 3 cas de leucémies indifférenciées. Deux sont positives pour CD13; parmi ces deux, une est aussi positive pour CD33; elles rentrent dans le groupe des M0. La troisième, cas numéro 49, est une leucémie mal définie chez une enfant qui fût étiquetée au début LAL, sur des critères ne faisant pas intervenir les marqueurs immunologiques. Elle fût reprise lors des rechutes en cytométrie de flux, qui révéla souvent un CD11b positif, sans marqueur lymphoïde. Le phénotype exposé ici est du type DR+ 34+ décrit par certains auteurs comme phénotype de cellule souche (39).

3) Intérêt de l'immunophénotypage pour le pronostic :

Les relations phénotype-pronostic sont de loin les plus intéressantes. Elles restent encore mal définies et justifient d'être poursuivies afin de déterminer des sous-groupes de patients à "plus haut risque". Le pronostic peut-être évalué sur:

- _ l'obtention de la rémission complète (RC)
- _ la durée de la RC et de la survie

Beaucoup d'études ont été publiées à ce jour. Les résultats sont difficiles à prendre en compte et à comparer car ils dépendent pour chaque étude, du traitement, du mode de phénotypage, et du seuil de positivité adopté pour un marqueur.

Nous leur accorderons donc, qu'une valeur relative.

L'obtention de la RC :

certains marqueurs auraient une influence péjorative :

- _ CD13 pour Pilkington (51)
 - Drexler (35)
 - Griffin (30)
 - Schwarzinger (46)
 - étude rétrospective du GEIL (13)

- _ CD14 pour Griffin (30)
 - Drexler (35)
 - Pilkington (51)

- _ CD34 pour Campos (29)
 - Borowitz (38)

- _ HLA-DR pour Griffin (30), contesté en 1988 par Swirsky (48)

Certaines associations prédiraient d'un faible taux de RC :

- _ DR+ 34+ pour Brito-Babapulle (39)
- _ 34+ 15- pour Campos (29)

CD15 pour Schwarzinger (46) et Campos (29) aurait une influence favorable sur le taux de RC.

Mais, en 1990, Tucker (37) démontre en étudiant le phénotype de 92 patients porteurs de LAM, l'absence de corrélation en terme de RC, pour CD13, CD14, et CD15!

Nous avons cherché une relation de type phénotype-pronostic uniquement dans notre groupe de LA de novo (se reporter aux tableaux 4, 8, et 9); sachant qu'une LA secondaire, des antécédents de syndrome myélodysplasique, une LA peu différenciée, constituent déjà des éléments de mauvais pronostic.

TAUX DE RC

Patients: CD13+	59%	versus 55% pour Griffin (30)
CD13-	70%	versus 73% pour Griffin (30)
CD14+	50%	versus 37% pour Griffin (30)
CD14-	59%	versus 69% pour Griffin (30)
CD34+	68,4%	versus 50% pour Campos (29)
CD34-	46,2%	versus 72% pour Campos (29)
CD15+	50%	versus 70% pour Campos (29)
CD15-	68%	versus 31% pour Campos (29)

A la lumière de ces résultats, se dégage une relation entre CD13 et l'obtention de la RC; celui-ci semblerait être un facteur de mauvais pronostic puisque 70% des patients CD13- vont en RC contre 59% des patients CD13+.

CD14 semble avoir la même influence sur la RC. Par contre, nous obtenons des résultats contradictoires pour CD34 et CD15, par rapport aux données de la littérature.

La durée de la rémission complète et de la survie :

CD34 aurait une influence péjorative pour L.Campos (29); DR pour Griffin (30).

Swirsky en 1988 (48) conteste l'influence péjorative sur l'obtention de la rémission complète, et sa durée, de l'antigène HLA-DR.

L'association CD11b+ CD11c+ serait de mauvais pronostic pour Tucker (37).

Enfin la durée de la rémission complète serait plus longue lorsque les cellules blastiques sont CD32+ (Tucker, 37).

Au sein de notre groupe de LA de novo, il est difficile d'étudier de façon isolée un marqueur et son influence sur le pronostic, car l'échantillon est trop disparate tant par rapport à l'âge (on connaît l'influence péjorative de l'âge supérieur à 60 ans), que par rapport aux traitements (protocoles variés). Une étude correcte ne peut s'envisager que sur une série suffisamment homogène pour tous ces paramètres et suffisamment grande. C'est ce que s'efforce de faire le groupe d'étude immunologique des leucémies en France, qui d'ores et déjà a dégagé quelques points importants:

* obtention de la RC :

diminue significativement avec CD34 puis CD19.

A l'inverse, l'expression de CD9 apparaît de bon pronostic.

* rechutes :

diminuent significativement avec CD18, CD36, CD33; par ordre d'importance décroissante.

* survie :

diminue significativement avec CD19, CD34, CD14; par ordre d'importance décroissante.

* dans les groupes FAB :

RC : CD19+ = mauvais pronostic dans les M5

CD13+ = mauvais pronostic dans les M4

Survie : CD14+ = bon pronostic dans les M5 et mauvais
dans les M3

CD33+ = bon pronostic dans les M5 et M2

N'ont actuellement, aucune influence sur le pronostic : CD15, CD16, DR, CD24, CD41, CD42, glycophorine A.

II LIMITES DE LA CYTOFLUOROMETRIE ET ALTERNATIVE POSSIBLE :

Nous l'avons écrit précédemment, la lecture en cytométrie de flux connaît des limites, qui paraissent difficilement contournables actuellement par cette seule méthode de lecture. Au premier plan, la nécessité de recueillir suffisamment de cellules pour tester un large panel d'anticorps. C'est là que l'on comprend l'importance du prélèvement médullaire en vue du typage : l'obtention de 5 ml de suc médullaire, même s'il est légèrement dilué, est une solution idéale pour l'opérateur et le confort du patient en lui évitant une seconde ponction si le typage n'a pu être complet et correct.

Le problème est plus délicat dans le cas de faibles populations blastiques comme on peut le rencontrer dans les M2 ou M4. La difficulté résidant ici dans le "fenêtrage" de la seule population maligne.

Nous avons également abordé le problème des fluorescences non spécifiques. Il importe d'avoir un bon témoin pour l'interprétation ultérieure.

Reste enfin les difficultés d'interprétation de certains résultats, en particulier dans les marquages de faible intensité.

La figure 9, montre un enregistrement dans une LAM (témoin et CD13) avec deux interprétations possibles :

_ la première (1) considère que la population maligne est homogène et prend en compte le léger déplacement du pic : réponse = 100 % de cellules CD13+

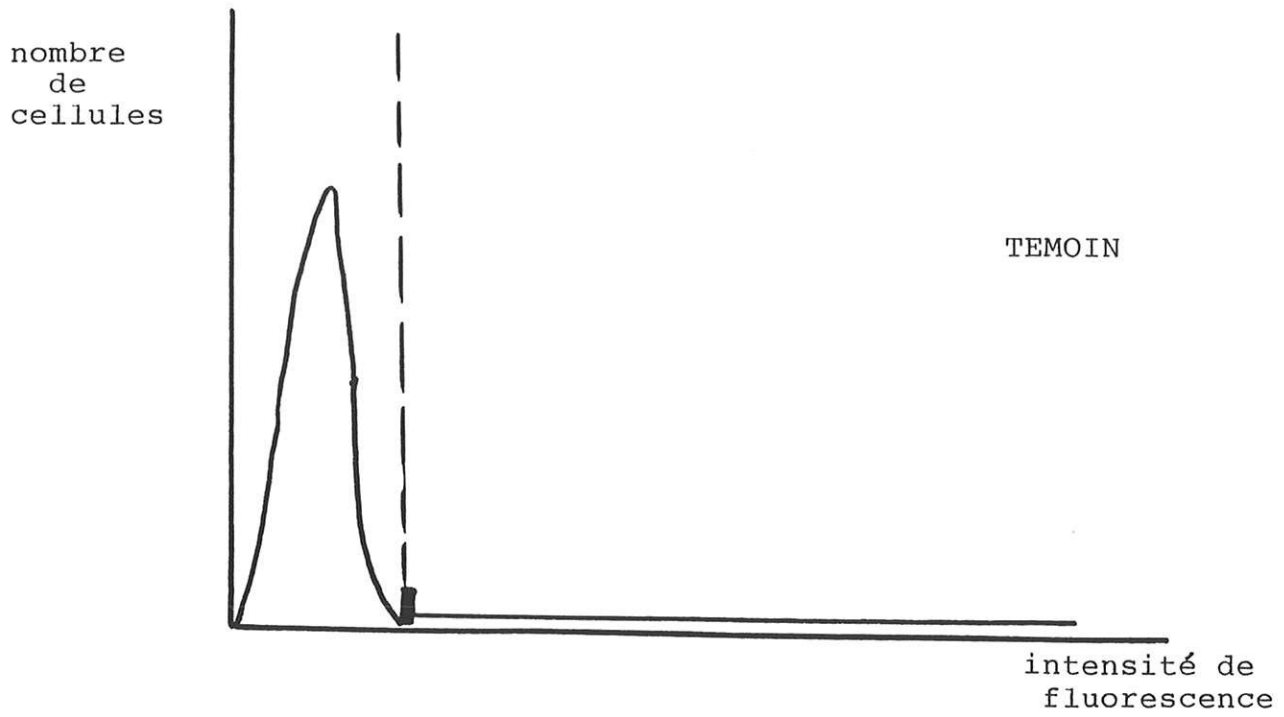
_ la deuxième (2) laisse en place le curseur tel qu'il a été défini à partir du témoin, et considère que la population maligne exprime le marqueur de façon partielle : réponse = 40 % de cellules CD13+

La deuxième interprétation est largement retenue.

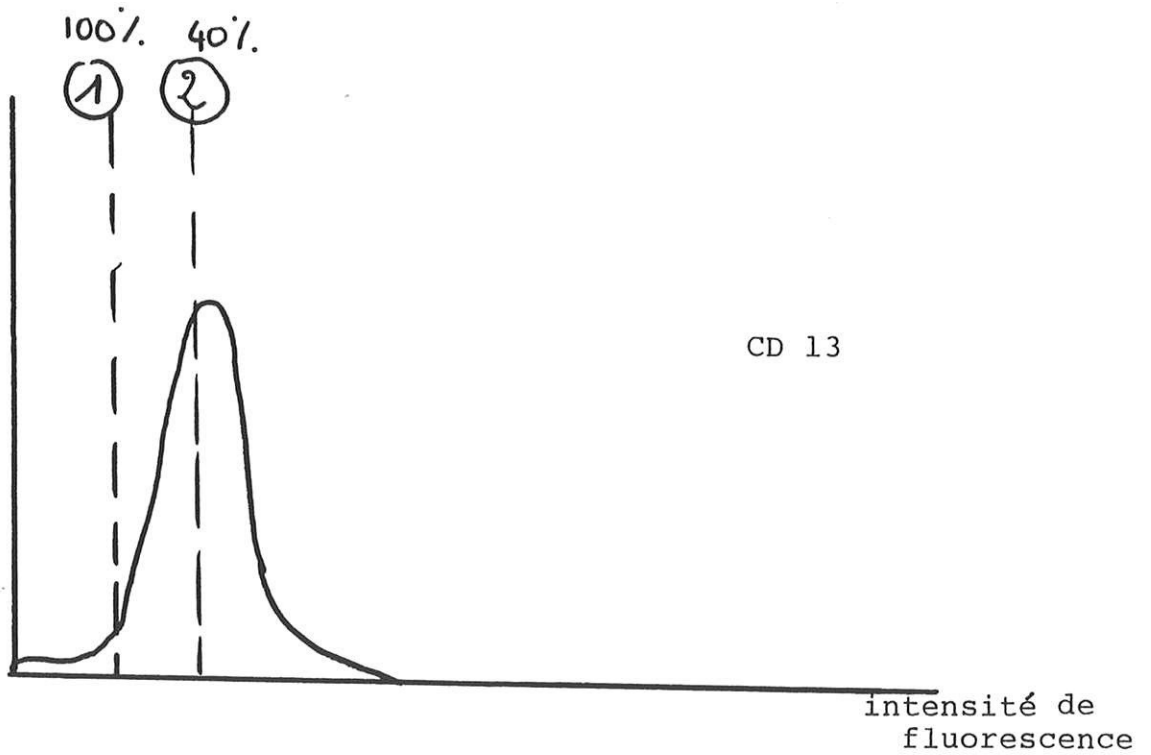
Pour pallier à ces problèmes nous avons voulu tester, sur des frottis médullaires faits à l'occasion du diagnostic de leucose aiguë lymphoblastique ou myéloblastique, la technique immunoenzymologique en "APAAP", présentée comme une alternative possible à l'immunofluorescence.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux résultats obtenus dans le cadre des LANL. Mais pour des raisons pratiques, étude faite entre octobre 1991 et mai 1992, seulement trois patients sont inclus dans notre analyse précédente (d'avril 1987 à janvier 1992).

Figure 9



nombre de cellules



A/ Mise au point au laboratoire de la technique en APAAP :

Elle fut longue et périlleuse. Mais nous obtenons actuellement des frottis correctement traités et lisibles. En effet, toutes les étapes de cette technique sont importantes, et au premier plan la confection et fixation des frottis.

_ Les frottis sanguins ou médullaires : ils doivent être d'une excellente qualité pour permettre une bonne conservation de la morphologie cellulaire.

Plusieurs éléments concourent à cet aspect. Il s'agit de l'utilisation de lames propres, correctement dégraissées, et d'un bon étalement des cellules qui ne doivent pas se chevaucher ou être agglomérées. Le séchage à l'air de ce frottis permet aux cellules de conserver leurs caractéristiques morphologiques et antigéniques. La pratique nous a appris que celui-ci doit être suffisant, d'une durée minimale d'une heure à température du laboratoire; deux à trois heures sont préférables.

Comme nous l'avons déjà exposé, ces frottis peuvent être conservés, enveloppés dans du papier d'aluminium à -20° celsius pendant de longues périodes, sans altération antigénique. Toute opération de décongélation-congélation étant évidemment proscrite.

Ceci correspond à notre expérience. Mais à l'inverse de ce qui est rapporté dans la littérature, il nous paraît préférable de fixer le frottis, une fois sec, avant la congélation, afin de préserver une morphologie optimale des cellules. De cette façon nous avons obtenu de meilleurs résultats.

_ La fixation est l'étape essentielle, sinon une des plus importante. Plusieurs types de fixation sont décrits : acétone pur, mélange acétone-méthanol à volume égal, mélange acétone-méthanol-formaldéhyde, tampon formol-acétone.

Nous les avons toutes testées pour finir par adopter celle qui donne (à notre avis) de meilleurs résultats, à savoir acétone pur 2 à 3 minutes à température ambiante.

Après séchage, soit les lames sont traitées immédiatement, soit stockées à -20° dans les conditions décrites ci-dessus. Une hémolyse est classique lors de l'immersion dans la solution tampon de rinçage. Les éléments nucléés ne sont pas altérés.

_ La réaction proprement dite : les différentes étapes sont exposées dans les méthodes d'étude.

Il est essentiel entre chaque étape, de bien rincer les lames dans un tampon Tris salin de pH 7,6; non seulement pour éliminer les impuretés mais aussi pour éviter la dessiccation des frottis entre les étapes qui pourrait altérer la réaction Ag-Ac.

Ces lavages doivent être répétés, deux ou trois, chacun d'environ trois minutes. Il est préférable d'agiter doucement les lames pendant le lavage, et de faire couler un peu de tampon directement sur la lame à la fin du rinçage.

En pratique, il est important aussi de vérifier que la zone du frottis à traiter ne retienne pas d'excès de tampon, ce qui entrainerait une répartition non uniforme du réactif suivant et donc des zones entièrement négatives à la lecture.

L'anticorps monoclonal peut être utilisé dilué, à la même dilution que celle utilisée pour le marquage en IF; cette dilution s'effectuant dans le tampon de rinçage.

Il est possible d'autre part, pour intensifier la réaction, de répéter les étapes 7 et 9 en réduisant la durée d'incubation de 30 à 10 minutes. Notre expérience nous montre que ce n'est pas nécessaire lorsque la procédure est correctement suivie. Lorsqu'il y a marquage, il est nettement visible microscopiquement sous forme d'un précipité rouge.

B/ Les résultats :

Plusieurs études se sont attachées à rechercher une corrélation entre marquage en IF et marquage enzymologique (19), (20), (24), (25), (28).

Globalement, tous CD confondus, la correspondance entre les deux techniques est bonne. Toutefois l'analyse CD par CD impose de nuancer cette affirmation. Pour Bernt Ly, les résultats les plus divergeants (dans les LAM) se voient avec le CD10. 10 sur 15 LAM étudiées sont CD10+ en APAAP, versus 2 sur 15 en IFI. Ces résultats seraient liés à la présence de l'antigène calla dans le cytoplasme de certains blastes de leucémie aiguë myéloïde. La technique immunoenzymologique en APAAP, de part la fixation qu'elle impose, entraîne une légère altération de la membrane cytoplasmique qui permet la liaison d'anticorps spécifiques sur des antigènes cytoplasmiques, et non pas uniquement à la surface cellulaire comme en IF.

Pour cet auteur il devient alors essentiel de combiner ces deux méthodes afin de déceler la nature intra ou extra-cytoplasmique des antigènes.

Pour M. Maynadie (28) les résultats en IF pour le CD33 (My9) sont plus élevés qu'en APAAP. Pour le CD14 la corrélation est parfaite, quelque soit l'anticorps monoclonal utilisé, pour les M1, M2 et M3, alors que les divergences apparaissent pour les M4 et M5 surtout en fonction de l'anticorps utilisé.

Nos résultats ont été exposés précédemment.

A propos de ces trois cas, la corrélation pour les CD myéloïdes est bonne.

Le pourcentage de cellules CD33+ en APAAP est, dans 2 cas, nettement inférieur : 7 versus 19,3; 1 versus 24,5. Mais si l'on considère qu'une réaction est positive à partir de 20 % de cellules fluorescentes en IF, dans les deux cas le CD33 est limite (une fois à la limite inférieure du seuil de positivité, une fois à la limite supérieure) et il devient superposable aux 7 et 1 % trouvés en APAAP, faibles eux aussi.

Une seule fois, cas numéro 3, le CD33 est légèrement supérieur en APAAP : 56 versus 52.

Pour CD34, CD13 et CD14, les résultats sont très légèrement inférieurs en APAAP, sauf une fois, CD13 pour le cas numéro 16.

D'une façon générale, les pourcentages de cellules positives sont légèrement inférieurs dans la technique immunoenzymologique pour des raisons qui paraissent simples. En effet en CMF le comptage s'effectue sur 5000 cellules pour chaque marqueur, alors qu'un observateur consciencieux examine 200 cellules en moyenne pour une lame "techniquée" en APAAP, voire 500 au maximum. De plus le pourcentage de positivité établi en APAAP reste subjectif, il dépend de l'observateur.

La technique de lecture en CMF est moins spécifique dans la mesure où elle peut prendre en compte des cellules non leucémiques marquées (problème du "fenêtrage" lors de suspensions inhomogènes que nous avons déjà évoqué). Enfin se pose le problème de l'adaptabilité d'anticorps monoclonaux, fabriqués pour l'IF, à une technique immunocytochimique.

Par ailleurs, nous avons remarqué une meilleure sensibilité des résultats obtenus en APAAP, lors de l'utilisation de marqueurs lymphoïdes sur des blastes de leucémie myéloïde, sans pouvoir y donner d'explication claire sauf en ce qui concerne l'antigène calla.

C/ Avantages et inconvénients des deux méthodes comparées :

La technique en APAAP est une technique initialement présentée comme la méthode de choix, permettant de combiner l'étude morphologique et l'étude immunologique d'une même cellule (on peut utiliser deux anticorps monoclonaux sur une même préparation, à condition d'employer deux substrats enzymatiques différents).

Notre expérience personnelle nous a permis de constater que dans les meilleurs des cas la morphologie cellulaire est conservée grossièrement, permettant de différencier la population leucémique des autres cellules mononuclées, mais sans en apprécier les détails cellulaires. Ce qui nécessite toujours un frottis coloré au MGG à l'appui. Cela reste néanmoins un avantage certain par rapport à l'IF et la lecture par automate, en permettant d'éviter les faux positifs (cellule non leucémique englobée dans la "fenêtre" étudiée).

Il est certain qu'un laboratoire ne possédant pas d'équipement particulier peut tout à fait, avec quelques anticorps monoclonaux et un microscope, typer une population leucémique, ou éventuellement adresser quelques frottis cellulaires fixés ou non à un laboratoire spécialisé qui réalisera le marquage immunoenzymologique.

Le typage en IF doit se faire sur le lieu de prélèvement.

Un autre avantage non négligeable réside dans la possibilité de conserver les prélèvements à -20° celsius, de longues périodes, avant de les traiter; alors que le marquage en IF doit être quasi-immédiat. Dans ce dernier la lecture peut être différée quelque peu si les échantillons sont conservés à l'obscurité, mais la fluorescence finit par s'atténuer.

Les frottis traités en APAAP se conservent indéfiniment et se relisent facilement à tout moment de l'évolution de la maladie. D'où l'avantage chez un sujet qui rechute de reprendre les lames initiales.

La revue de la littérature est dans l'ensemble très enthousiaste sur les performances de l'APAAP. Il nous paraît important de signaler quelques désavantages à son égard :

- _ une réalisation technique délicate et longue. A l'inverse, la mise en place d'une réaction d'IF est facile.

- _ l'impossibilité de réaliser en une seule fois un typage large car les problèmes de manipulation deviennent inévitables... Nous ne sommes pas limités dans le nombre d'anticorps à tester pour une lecture en CMF.

_ Le problème de la lecture qui reste subjectif; des variations nettes pouvant apparaître entre deux personnes lisant la même lame. Toutefois en ce qui concerne la lecture, l'interprétation des histogrammes de fluorescence en CMF est parfois délicate et elle aussi subordonnée à l'appréciation de l'opérateur, nous l'avons vu précédemment.

Il reste un avantage essentiel, celui du coût. L'investissement est minime comparé à la cytométrie de flux.

La généralisation des cytomètres en flux, ces dernières années, a rendu de précieux services dans ce domaine de l'immuno-hématologie, dont on peut difficilement se passer aujourd'hui bien que l'interprétation soit parfois difficile. En particulier la possibilité de tester un large panel d'anticorps, en un temps limité, sur un grand nombre de cellules, est irremplaçable.

Elle est notre méthode de choix, réservant la technique en APAAP à des circonstances bien particulières :

_ typage en dehors du lieu de prélèvement, nécessitant un transport de matériel.

_ population de richesse modérée en cellules blastiques, qui constitue une limite à la lecture en flux.

_ cas particulier des leucémies M7 où la confrontation morphologie/marquage immunologique est particulièrement intéressante.

_ évidemment l'absence de cytomètre de flux.

En "routine", la combinaison des deux techniques, IF avec lecture en flux et APAAP, ne se justifie que pour des échantillons cellulaires pauvres de façon à obtenir un phénotypage le plus complet possible. Les anticorps importants pour une LAM, CD33, CD13, CD14, CD34, seront faits si possible en IF et l'APAAP, qui nécessite peu de matériel médullaire, permettra par exemple d'étudier les marqueurs lymphoïdes sur ces blastes de LAM.

La conjonction d'un double marquage, pour un même anticorps, ne paraît pas essentielle si l'on a bien "fenêtré" la population maligne; seule l'IF est suffisante s'il n'y a pas d'ambiguïté. Dans le cas inverse, où l'on ne sait plus très bien qui marque quoi, ou dans les rares cas d'érythroleucémies ou de leucémies à mégacaryoblastes, il paraît judicieux de comparer les pourcentages de positivité obtenus en IF et en APAAP.

Pour les érythroleucémies, la glycophorine A, est testée dans les deux techniques permettant de voir si seuls les érythroblastes anormaux sont porteurs de cet antigène ou si les myéloblastes en sont également porteurs.

Pour les LAM-M7, de diagnostic cytologique difficile, l'étude du marqueur plaquettaire (CD41 ou autre) sur frottis, viendra compléter les données de l'IF.

CONCLUSION

L'immunophénotypage des cellules de leucémies aiguës non lymphoblastiques a t'il un intérêt ?

On peut répondre oui sans aucune hésitation dans tous les cas de diagnostic cytologique difficile :

- _ leucémie aiguë peu différenciée. La présence d'un ou plusieurs marqueurs myéloïdes permet de la classer en LANL.

- _ leucémie aiguë myéloïde de type M6 ou M7.

Dans tous ces cas il est intéressant d'utiliser un large panel d'anticorps monoclonaux, comme celui que nous utilisons de façon systématique actuellement.

Dans tous les autres cas, où le diagnostic cytologique est aisé, il importe pour l'instant de continuer cette étude, afin de renforcer la valeur des observations dégagées jusqu'à présent. Ce n'est qu'à long terme que l'on pourra juger de l'intérêt du phénotypage en dehors des problèmes de diagnostic :

- _ en particulier l'influence sur le pronostic de certains marqueurs.

- _ la signification des leucémies à phénotype complexe.

Pour cela un panel minimum d'anticorps monoclonaux doit être utilisé. Nous proposons l'étude :

- _ de CD34 et DR : marqueurs de progéniteurs.

- _ de CD33, CD13 et CD14 : marqueurs myéloïdes.

- _ de CD41 : marqueur plaquettaire, CD2 : marqueur lymphoïde T précoce et représenté aux différents stades de maturation de cette lignée, CD19 : marqueur lymphoïde B présent à pratiquement tous les stades de différenciation, et de la glycophorine A, marqueur érythroblastique. Tous ces anticorps étant destinés à reconnaître une anomalie phénotypique.

- _ enfin de CD11b, CD15 et éventuellement CD16, anticorps permettant d'évaluer la maturation cellulaire.

Nous laissons tomber :

- _ les anticorps reconnaissant des épitopes non spécifiques de lignée ou de maturation : CD9, CD7, CD5 et CD10.
- _ et ceux témoins de prolifération : CD38 et CD71.

Quant à l'apport des techniques immunoenzymologiques, certes dans de rares cas il est intéressant de confronter morphologie cellulaire et marquage, mais cette technique ne peut prétendre remplacer l'immunofluorescence et la lecture par automate.

N'oublions pas que l'étude immunologique doit être replacée dans un contexte général d'analyse des leucémies aiguës où elle ne reste qu'une étape.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — NEAME P.B, SOAMBOONSRUP P, BROWMAN G.P, MEYER R.M,
 BENGER A, WILSON W.E.C, WALKER I.R, SAEED N, McBRIDE
 J.A :
 Classifying acute leukemia by immunophenotyping : A
 combined FAB-immunologic classification of AML.
 Blood, 1986, 68, 6, 1355-62.

- 2 — BROWMAN G.P, NEAME P.B, SOAMBOOSRUP P :
 The contribution of cytochemistry and immunophenotyping
 to the reproducibility of the FAB classification in
 acute leukemia.
 Blood, 1986, 68, 4, 900-5.

- 3 — DICK F.R :
 Evolution of the french-american-british (FAB)
 proposals.
 A.J.C.P. 1991, 96, 2, 153-5.

- 4 — FLANDRIN G :
 Contribution de l'étude cytologique dans la
 classification des leucémies aiguës.
 Progrès en hématologie (10), 1990, chapitre7, 113-25.

- 5 — MALINVAUD G :
 Les leucoses aiguës.
 Atlas de cytologie des hémopathies malignes, chapitre
 II, 18-45.

- 6 — BENNETT J.M, CATOVSKY D, DANIEL M.T, FLANDRIN G, GALTON
 D.A.G, GRALNICK H.R, SULTAN C :
 Proposal for the recognition of minimally
 differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO).
 British Journal of Haematology, 1991, 78, 325-9.

- 7 _ SOLARY E, CASASNOVAS O, MAYNADIE M, CAMPOS L :
Le phénotype immunologique des LAM a t-il un intérêt ?
PROTOLAM, bilan du GEIL, janvier 1991.
- 8 _ BERNARD A, BOUMSELL L, HILL C :
Rapports des études communes par les chercheurs de
laboratoires participants au premier atelier
international sur les antigènes de différenciation
leucocytaire.
Leucocyte typing I, Springer-Verlag, 1984, 143-92.
- 9 _ BERNARD A, BOUMSELL L :
Les antigènes de différenciation leucocytaire
internationalement définis : les "clusters de
différenciation" des leucocytes humains.
Quo Vadis ? Cytofluorométrie et anticorps monoclonaux
pour le suivi des thérapeutiques, 1982, 89-97.
- 10 _ KNAPP W, DORKEN B, RIEBER P, SCHMIDT R.E, STEIN H :
CD antigens 1989
Blood, 1989, 74, (4), 1448-50.
- 11 _ KNAPP W, DORKEN B, GILKS W.P, RIEBER E.P, SCHMIDT R.E,
STEIN H, VON DEM BORNE A.E.G :
White cells differentiation antigens.
Leucocyte typing IV, 1989, Oxford university press.
- a _ PEIPER S.C, LE BOEUF R. D, HUGHES C.B, PRASTHOFER E.F,
BOROWITZ M.J, DEWUTTER-DAMBUYANT C, KATZ D.R, WALKER
W.S, ASHMUN R.A, LOOK A.T : Report on the CD33 cluster
workshop : biochemical and genetic characterization of
gp67. p 814-16.
- _ KOLLER U, PESCHEL CH : cluster report : CD33. p 812-3.

- b _ PESCHEL CH, KOLLER U : cluster report : CD34. p 817-29.
- c _ GADD S : cluster report : CD13. p 782-7.
- d _ GADD S : cluster report : CD14. p 787-9.
- e _ VON DEM BORME A.E.G, MODDERMAN P.W : cluster report :
CD41. p 997-9.
- f _ MEUER S.C : cluster report : CD2. p 270-83.
- g _ DORKEN B, MOLLER P, PEZZUTTO A, SCHATZ-ALBIEZ R, MOL
DEN HAUER G : B cell antigens. CD19. p34-46.
- h _ UCIECHOWSKI P, SCHMIDT R.E : cluster report : CD11.
p543-551.
_ LOCEY B.J., ROGERS C.M, TODD R.B : the role of
CD11/CD18 integrin molecules in neutrophil and monocyte
homotypic adhesion. p 555-8.
_ BUYON J.P, SLADE S.G, PERDUE R.A, WINCHESTER R.J :
CD11b/CD18 dependent homotypic neutrophil aggregation :
evidence for discrete adhesions and activation of the
molecule. p 560-2.
- j _ BETTELHEIM P : cluster report : CD15. p 798-9.
_ BALLE E.D, SCHWARZ L : reactivity of CD15 mAb with
normal and malignant myeloid cells and with
haematopoietic progenitor cells. p 805-6.
_ BUESCHER E.S, McILHERAN S.M, LIVESEY S.A, LINNER J.G,
SKUBITZ K.M : human granulocyte CD15 antigens
structural and functional studies. p 807-10.
- k _ SCHMIDT R.E, PERUSSIA B : cluster report : CD16. p 574-
7.

- l _ VON DEM BORME A.E.G, MODDERMAN P.W : cluster report :
CD9. p 989-10.
- m _ REITER C : cluster report : CD7. p 341-2.
- n _ REITER C : cluster report : CD5. p 331-2.
- o _ DORKEN B, MOLLER P, PEZZUTO A, SCHWARTZ-ALBEIZ R,
MOLDENHAUER G : B-cell antigens : CD10. p 33-4.
- p _ DORKEN B, MOLLER P, PEZZUTO A, SCHWARTZ-ALBEIZ R,
MOLDENHAUER G : B-cell antigens : CD38. p 86.
_ STAMENKOVIC I, STAUNTON J, SEED B : molecular cloning
of CD38. p 87.
_ SHARP N.A, CLEMENS M.J : increased expression of CD38
antigen during growth inhibition of Daudi cells by
interferon- α .
- q _ SCHWARTING R, STEIN H : cluster report : CD71. p 455-
60.
- 12 _ VAINCHENKER W :
Phénotypage immunologique des leucémies aiguës non
lymphoblastiques.
Progrès en hématologie (10), chapitre 4, p 51-76, 1990.
- 13 _ BASSOLEIL J.P :
Etude du phénotype immunologique de 113 leucémies
aiguës non lymphoblastiques collectées par le groupe
d'étude immunologique des leucémies.
Thèse médecine DIJON, 1988.

- 14 _ DEBRE P, MERLE-BERAL, AUTRAN B, BLANC C :
Cytométrie de flux : principes et principales
applications.
C. R. Soc. Biol., 1985, 179, 707-22.
- 15 Revue française des laboratoires, 1991, 218.
- a - JOUAULT H : apport de la cytométrie en flux à la
caractérisation des leucémies aiguës. p 79-84.
- b _ IMBERT M : marqueurs cellulaires des lignées lymphoïdes
et myéloïdes normales. p 37-43.
- 16 _ BLANC C, LEGAC E, BINET J.L, MICHEL A, DEBRE P, MERLE-
BERAL H :
Characterization of normal human bone marrow by flow
cytometry.
Nouv Rev Fr Hématol, 1991, 33, 231-5.
- 17 _ Méthodes en immunologie.
ASSIM, 1990, p 131 et 190.
- 18 _ STERNBERGER L.A,
immunocytochemistry.
Englewood Cliffs, NJ, Prentice hall Inc, 1974.
- 19 _ KUREC A.S, BALTRUCKI L, MASON D.Y, DAVEY F.R :
Use of the APAAP method in the classification and
diagnosis of hematologic disorders.
Clinics in laboratory medicine, 1988, 7, (4), 223-36.

- 20 _ LY B, BEISKE K, LARSEN N :
Immunological typing of acute leukemias :
immunoenzymatic staining of fixed cells compared with
immunofluorescence staining of unfixed cells in
suspension.
Eur J Haematol, 1988, 41, 147-55.
- 21 _ CORDELL J.L, FALINI B, ERBER W.N, GHOSH A.K, ABDULAZIZ
Z, MACDONALD S, PULFORD K.A.F, STEIN H, MASON D.Y :
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using
immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal
anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
The journal of histochemistry and cytochemistry, 1984,
32, (2), 219-29.
- 22 _ WAGNER L, WORMAN C.P :
Color-contrast staining of two different lymphocyte
subpopulations : a two-color modification of alkaline
phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase
complex technique.
Stain technology, 1988, 63, 129-36.
- 23 _ ERBER W.N, PINCHING A.J, MASON D.Y :
Immunocytochemical detection of T and B cell
populations in routine blood smears.
The lancet, 1984, may 12, 1042-5.
- 24 _ ERBER W.N, MYNHEER L.C, MASON D.Y :
APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for
phenotyping leukaemia.
The lancet, 1986, april 5, p 761-5.

- 25 _ SEWELL H.F, MILTON J.I, MACKENZIE R, KING D.J, DAWSON A.A, LESSELS S.E, BENNETT B, DAVIDSON R.L, WALKER F : Immunophenotyping of leukaemias by flow cytometry and APAAP : a two-year comparative analysis in hospital practice.
Disease Markers, 1988, 6, 221-9.
- 26 _ SEWELL H.F, MURDOCH G.J, KING D.J, DAWSON A.A, BENNETT B, DAVIDSON R.L, MILTON J.I, WALKER F : APAAP immunophenotyping of haematological malignancies. The lancet, 1986, april 26, p 980-1.
- 27 _ MOIR D.J, GHOSH A.K, ABDULAZIZ Z, KNIGHT P.M, MASON D.Y Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies.
British journal of haematology, 1983, 55, 395-410.
- 28 _ MAYNADIE M :
Mise au point de l'étude immunocytochimique des marqueurs des leucémies aiguës myéloïdes. Corrélations aux résultats de l'IFI et applications à l'étude du phénotype MDR.
Thèse médecine Dijon, 1989.
- 29 _ CAMPOS L, GUYOTAT D, ARCHIMBAUD E, DEVAUX Y, TREILLE D, LARESE A, MAUPAS J, GENTILHOMME O, EHRSAM A, FIERE D : Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia : correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy.
British journal of haematology, 1989, 72, 161-6.

- 30 _ GRIFFIN J.D, DAVIS R, NELSON D.A, DAVEY F.R, MAYER R.J,
SCHIFFER C, McINTYRE O.R, BLOOMFIELD C.D :
Use of surface marker analysis to predict outcome of
adult acute myeloblastic leukemia .
Blood, 1986, 68, (6), 1232-41.
- 31 _ BRADSTOCK K.F, KIRK J, GRIMSLEY P.G, KABRAL A, HUGHES
W.G :
Unusual immunophenotypes in acute leukaemias :
incidence and clinical correlations.
British journal of haematology, 1989, 72, 512-8.
- 32 _ CHAN L.C, PEGRAM S.M, GREAVES M.F :
Contribution of immunophenotype to the classification
and differential diagnosis of acute leukaemia.
The lancet, march 2, 1985, 475-9.
- 33 _ BENE M.C, BOUMSELL L, VANNIER J.P, GARAND R, SOLARY E,
FAURE G, BERNARD A :
Immunologic analysis of a thousand cases of acute
leukemia.
Nouv Rev Fr Hemato (1989) 31: 133-6
- 34 _ AVNSTROM S, RALFKIAER E, HANSEN N.E, NISSEN N.I:
High-risk AML evidenced by a monoclonal antibody.
Eur J Haematol 1988; 41: 156-62.
- 35 _ DREXLER H.G :
Classification of acute myeloid leukemias- A
comparison of FAB and immunophenotyping.
Leukemia, vol 1, no 10 (october), 1987: 697-705.
- 36 _ KRAUSE J.R, PENCHANSKY L, CONTIS L, KAPLAN M.D :
Flow cytometry in the diagnostic of acute leukemia.
A.J.C.P, vol 89, no 3, 341-6.

- 37 _ TUCKER J, DOREY E, GREGORY W.M, SIMPSON A.P.F, AMESS A.L, LISTER T.A, HORTON M.A :
Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome.
Hematological Oncology, vol 8, 47-58 (1990).
- 38 _ BOROWITZ M.J, GOCKERMAN J.P, MOORE J.O, CIVIN C.I, PAGE S.O, ROBERTSON J, BIGNER S.H :
Clinicopathologic and cytogenic features of CD34 (My10) positive acute nonlymphocytic leukemia.
A.J.C.P, vol 91, no 3, 265-70.
- 39 _ BRITO-BABAPULLE F, PULLON H, LAYTON D.M, ETCHES A, HUXTABLE A, MANGI M, BELLINGHAM A.J, MUFTI G.J :
Clinicopathological features of acute undifferentiated leukaemia with a stem cell phenotype.
British journal of haematology, 1990, 76, 210-4.
- 40 _ RAGHAVACHAR AN, EIERMANN T.H, BARTRAM C.R, KUBANEK B, THIEL E :
Reactivity of the myeloid panel mAb in acute undifferentiated leukaemia.
White cells differentiation antigens leucocyte typing IV, Oxford university press, 1989.
- 41 _ CHOATE J.J, DOMENICO R, MCGRAW T.P, FAREED J, MOLNAR Z, SCHUMACHER H.R :
Diagnosis of acute megakaryoblastic leukemia by flow cytometry and immunoalkaline phosphatase techniques.
A.J.C.P, 1988, 89, (2), 247-53.

- 42 _ GREAVES M.F, SIEFF C, EDWARDS P.A.W :
Monoclonal antiglycophorin as a probe for
erythroleukemias
Blood, 1983, 61, (4), 645-51.
- 43 _ GAHMBERG C.G, JOKINEN M, ANDERSSON L.C :
Expression of the major sialoglycoprotein (glycophorin)
on erythroid cells in human bone marrow.
Blood, 1978, 52, (2), 379-87.
- 44 _ CUNEO A, VAN ORSHOVEN A, MICHAUX J.L, BOOGAERTS M,
LOUWAGIE A, DOYEN C, DAL CIN P, FAGIOLI F, CASTOLDI G,
VAN DEN BERGHE H :
Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in
erythroleukaemia : evidence for multilineage
involvement and identification of two distinct
cytogenetic-clinicopathological types.
British journal of haematology, 1990, 75, 346-54.
- 45 _ KASPARU H, KOLLER U, KRIEGER O, NOWOTNY H, TUCHLER H,
LUTZ D :
Significance of gp40/CD7 or TdT positivity in AML
patients.
White cells differentiation antigens, leucocyte typing
IV, Oxford university press, 1989.
- 46 _ SCHWARZINGER I, VALENT P, KOLLER U, MAROSI C, SCHNEIDER
B, HAAS O, KNAPP W, LECHNER K, BETTELHEIM P :
Prognostic significance of the immunological marker
profile in de novo acute myeloid leukaemia.
White cells differentiation antigens, leucocyte typing
IV, Oxford university press, 1989.

- 47 _ MATUTES E, POMBO DE OLIVEIRA M, FORONI L, MORILLA R,
CATOVSKY D :
The role of ultrastructural cytochemistry and
monoclonal antibodies in clarifying the nature of
undifferentiated cells in acute leukaemia.
British journal of haematology, 1988, 69, 205-11.
- 48 _ SWIRSKY D.M, GREAVES M.F, GRAY R.G, REES J.K.H :
Terminal deoxynucleotidyl transferase and HLA DR
expression appear unrelated to prognosis of acute
myeloid leukaemia.
British journal of haematology, 1988, 70, 193-8.
- 49 _ VAN DER SCHOOT C.E, DAAMS G.M, PINKSTER J, VET R, VON
DEM BORNE A.E.G :
Monoclonal antibodies against myeloperoxidase are
valuable immunological reagents for the diagnosis of
acute myeloid leukaemia.
British journal of haematology, 1990, 74, 173-8.
- 50 _ IMAMURA N, TANAKA R, KAJIHARA H, KURAMOTO A :
Analysis of peroxidase-negative acute unclassifiable
leukemias by monoclonal antibodies. 1. Acute
myelogenous leukemia and acute myelomonocytic leukemia.
Eur J Haematol, 1988, 41, 420-8.
- 51 _ PILKINGTON G.R, WOLF M.M, MATTHEWS J.P, GRIFFITHS J.D,
COOPER I.A, FORSTER D.C, JOSE D.G :
Correlation of CD surface antigen phenotype with FAB
subtype, remission induction (CR), and survival in AML
patients.
White cells differentiation antigens, leucocyte typing
IV, Oxford university press, 1989.

52 _ KOZLOWSKY R, REILLY I.A.G, SOWTER D, ROBINS R.A, RUSSEL
N.H :

Transferrin receptor expression on AML blasts is
related to their proliferative potential.

British journal of haematology, 1988, 69, 275-80.

**TABLE
DES MATIERES**

INTRODUCTION	13
CHAPITRE I _ POPULATION ETUDIEE	16
I Caractéristiques cliniques et biologiques initiales des patients étudiés	20
A/ Données générales	20
B/ Analyse de la répartition selon le sexe et selon l'âge et le sexe	21
C/ Répartition selon la classification morphologique du groupe FAB	30
II Traitement et devenir des patients	34
CHAPITRE II _ METHODES D'ETUDES	37
I Le choix des anticorps monoclonaux	38
A/ Rappels : mise en place et définition des clusters de différenciation	38
B/ Notre panel d'anticorps	41
C/ Synthèse schématique	51
II Etude en cytométrie de flux	55
A/ Principe	55
B/ Prélèvement et technique de marquage	61
C/ Lecture	62
III Le marquage enzymologique : mise au point de la technique en APAAP au laboratoire	70
CHAPITRE III _ RESULTATS	75
I Résultats de l'étude des marqueurs en immunofluorescence indirecte avec lecture en cytométrie de flux	76
II Résultats obtenus en APAAP	78

CHAPITRE IV _ DISCUSSION	87
I Intérêt du typage immunologique	88
1) LAM bien caractérisées par la morphologie FAB	89
2) Intérêt du typage immunologique dans les leucoses peu différenciées ou indifférenciées	103
3) Intérêt de l'immunophénotypage pour le pronostic	104
II Limites de la cytofluorométrie et alternative possible	108
A/ Mise au point au laboratoire de la technique en APAAP	111
B/ Les résultats	113
 CONCLUSION	 118
 BIBLIOGRAPHIE	 121
 TABLE DES MATIERES	 134

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 20

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Les leucémies aiguës lymphoblastiques bénéficient largement de l'apport des anticorps monoclonaux pour leur classification. Le typage immunologique des leucémies aiguës non lymphoblastiques se heurte à l'existence de très nombreux anticorps monoclonaux de spécificité plus ou moins étroite.

Nous avons étudié le phénotype immunologique de 49 sujets porteurs de leucémie aiguë non lymphoblastique, à partir d'un panel de 18 anticorps monoclonaux et grâce à une réaction d'immunofluorescence indirecte avec lecture en cytométrie en flux. Parallèlement, nous avons testé une technique immuno-enzymologique, sur frottis médullaires, utilisant le complexe phosphatase alcaline-anti-phosphatase alcaline.

Nos résultats s'orientent vers ceux décrits dans la littérature. Le couple CD33, CD34 apparaît fondamental pour le diagnostic des leucémies aiguës non lymphoblastiques, et plusieurs possibilités d'association de ces deux marqueurs sont rencontrées dans ces leucoses. Nous avons noté la fréquence des multidifférenciations.

La technique immunoenzymologique sur frottis médullaire est intéressante dans quelques cas bien particuliers et ne peut prétendre remplacer les réactions d'immunofluorescence avec lecture par automate.

Nous proposons un choix d'anticorps monoclonaux pour l'analyse immunologique fonction des résultats de l'étude cytologique.

Mots Clés

Marqueurs

Membrane

Leucémie aiguë

Leucémie aiguë non lymphoblastique