

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2015

2015 TOU3 1703

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
SPECIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 25 Novembre 2015

Par Laurie POLESZCZUK

**Apport de l'immunophénotypage par cytométrie en flux
dans la classification morphologique des leucémies
aiguës myéloïdes**

DIRECTEUR DE THÈSE : Monsieur le Docteur Michaël Peres

JURY :

Monsieur le Professeur Christian Recher	Président
Monsieur le Professeur Pierre Sié	Assesseur
Madame le Docteur Véronique De Mas	Assesseur
Monsieur le Docteur Michaël Peres	Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2014

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. CLAUD	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. DUFFAUD
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. ARNE JL
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER G.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. GOUZI		
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU		
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER		
Professeur Honoraire	M. PASCAL		

Professeurs Émérites

Professeur LARROUY	Professeur JL. ADER
Professeur ALBAREDE	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur CONTÉ	Professeur L. LARENG
Professeur MURAT	Professeur F. JOFFRE
Professeur MANELFE	Professeur J. CORBERAND
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR J.	Thérapeutique
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU H	Hématologie, transfusion
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT D.	Neurologie
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUGAT R. (C.E)	<i>Cancérologie</i>
M. CARRIE D.	Cardiologie
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DEGUINE O.	O. R. L.
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE O.	Anesthésiologie
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.
M. IZOPET J. (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale
M. LANGIN D.	Nutrition
M. LAUQUE D. (C.E)	Médecine Interne
M. LIBLAU R. (C.E)	Immunologie
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie
M. MALAVAUD B.	Urologie
M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique
Mme MOYAL E.	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie
M. OLIVES J.P. (C.E)	Pédiatrie
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PERRET B (C.E)	Biochimie
M. PRADERE B. (C.E)	Chirurgie générale
M. RASCOL O.	Pharmacologie
M. RECHER Ch.	Hématologie
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie
M. RIVIERE D. (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile
M. SALLES J.P.	Pédiatrie
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON N.	Médecine Légale
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie

P.U. - P.H.
2ème classe

Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. BIRMES Ph.	Psychiatrie
M. BROUCHET L.	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BUREAU Ch	Hépto-Gastro-Entéro
M. CALVAS P.	Génétique
M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. CHAIX Y.	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER S.	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. COGNARD C.	Neuroradiologie
M. DE BOISSEZON X.	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. FOURNIÉ P.	Ophtalmologie
M. GAME X.	Urologie
M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie et réanimation chir.
Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. LAUWERS F.	Anatomie
M. LEOBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. MAZIERES J.	Pneumologie
M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. OLIVOT J-M	Neurologie
M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE J.	Neurologie
M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. PAUL C.	Dermatologie
M. PAYOUX P.	Biophysique
M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. PERON J.M.	Hépto-Gastro-Entérologie
M. RONCALLI J.	Cardiologie
M. SANS N.	Radiologie
Mme SAVAGNER F.	Biochimie et biologie moléculaire
Mme SELVES J.	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie

P.U.

M. OUSTRIC S.	Médecine Générale
---------------	-------------------

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Ph.	Pédiatrie
M. ALRIC L.	Médecine Interne
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL J.F.	Physiologie
Mme BERRY I.	Biophysique
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
M. BUSCAIL L.	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie
M. CARON Ph. (C.E)	Endocrinologie
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme COURTADE SAIDI M.	Histologie Embryologie
M. DELABESSE E.	Hématologie
Mme DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DIDIER A.	Pneumologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. GALINIER M.	Cardiologie
M. GERAUD G.	Neurologie
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention
Mme HANAIRE H. (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LARRUE V.	Neurologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie
M. LEVADE T.	Biochimie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophthalmologie
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses
M. PLANTE P.	Urologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile
M. RITZ P.	Nutrition
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie
M. ROSTAING L (C.E).	Néphrologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU H.	Radiologie
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD J.M.	Pharmacologie
M. SERRANO E. (C.E)	O. R. L.
M. SOULIE M.	Urologie
M. SUC B.	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLE F.	Chirurgie Infantile
Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. ARBUS Ch.	Psychiatrie
M. BERRY A.	Parasitologie
M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique
M. COURBON	Biophysique
M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DELORD JP.	Cancérologie
M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STOWHAS I.	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD R.	Cancérologie
M. HUYGHE E.	Urologie
M. LAFOSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX B.	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW J.	Dermatologie
M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. OTAL Ph.	Radiologie
M. ROLLAND Y.	Gériatrie
M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. TACK I.	Physiologie
M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. VERGEZ S.	O.R.L.
Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique

M.C.U. - P.H.

M. APOIL P. A.	Immunologie
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie
M. BIETH E.	Génétique
Mme BONGARD V.	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL S.	Nutrition
Mme CASSAING S.	Parasitologie
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY N.	Immunologie
Mme COURBON	Pharmacologie
Mme DAMASE C.	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie
Mme DELMAS C.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DE-MAS V.	Hématologie
M. DUBOIS D.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale
M. DUPUI Ph.	Physiologie
Mme FILLAUX J.	Parasitologie
M. GANTET P.	Biophysique
Mme GENNERO I.	Biochimie
Mme GENOUX A.	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDI S.	Biochimie
Mme HITZEL A.	Biophysique
M. IRIART X.	Parasitologie et mycologie
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale
M. KIRZIN S	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique
Mme LE TINNIER A.	Médecine du Travail
M. LOPEZ R.	Anatomie
M. MONTOYA R.	Physiologie
Mme MOREAU M.	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD F.	Physiologie
Mme PRERE M.F.	Bactériologie Virologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie
Mme RAGAB J.	Biochimie
Mme RAYMOND S.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY F.	Biochimie
Mme SAUNE K.	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES S.	Réanimation
M. SOLER V.	Ophthalmologie
M. TAFANI J.A.	Biophysique
M. TREINER E.	Immunologie
Mme TREMOLLIERS F.	Biologie du développement
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie Orthopédique
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire

M.C.U. - P.H

Mme ABRAVANEL F.	Bactério. Virologie Hygiène
M. BES J.C.	Histologie - Embryologie
M. CAMBUS J.P.	Hématologie
Mme CANTERO A.	Biochimie
Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie
Mme CASSOL E.	Biophysique
Mme CAUSSE E.	Biochimie
M. CHASSAING N	Génétique
Mme CLAVE D.	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN L.	Cytologie
M. CORRE J.	Hématologie
M. DEDOUIT F.	Médecine Légale
M. DELPLA P.A.	Médecine Légale
M. DESPAS F.	Pharmacologie
M. EDOUARD T	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Y.	Médecine du travail
Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique
Mme GALINIER A.	Nutrition
Mme GARDETTE V.	Epidémiologie
M. GASQ D.	Physiologie
Mme GRARE M.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET S.	Nutrition
Mme INGUENEAU C.	Biochimie
M. LAHARRAGUE P.	Hématologie
M. LAIREZ O.	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE B.	Biostatistique
Mme MAUPAS F.	Biochimie
M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme PERIQUET B.	Nutrition
Mme NASR N.	Neurologie
Mme PRADDAUDE F.	Physiologie
M. RIMAILHO J.	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES M.	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET A.	Pharmacologie
M. TKACZUK J.	Immunologie
M. VALLET P.	Physiologie
Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie

M.C.U.

M. BISMUTH S.	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT ME	Médecine Générale
Mme ESCOURROU B.	Médecine Générale

Maitres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr STILLMUNKES A.
Dr BRILLAC Th.
Dr ABITTEBOUL Y.
Dr CHICOULAA B.

Dr BISMUTH M
Dr BOYER P.
Dr ANE S.

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Christian Recher, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Chef de Service d'hématologie à l'IUCT.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je vous remercie de votre confiance et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail et vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

À Monsieur le Professeur Pierre Sié, Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Chef de Service du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse.

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail en m'accueillant dans votre laboratoire trois semestres durant. Vous me faites maintenant l'honneur d'accepter de le juger, je vous prie d'accepter l'expression de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance.

À Madame le Docteur Véronique De Mas, Maître de Conférence des Université- Praticien Hospitalier.

Je vous remercie pour votre gentillesse, pour votre disponibilité, et pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises au cours de mon internat. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Michaël Peres, Assistant Hospitalo-Universitaire.

Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté de reprendre la direction de cette thèse au pied levé. Je te remercie pour ta disponibilité, pour ton soutien, pour tes nombreuses relectures, et pour tout ce que tu m'as appris.

À Monsieur le Docteur François Vergez,

Tu m'as fait l'honneur de me confier ce sujet de thèse et d'accepter de l'encadrer. Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils précieux et ton soutien pendant la réalisation de cette thèse, d'autant plus appréciables que intercontinentales.

Je remercie également Madame Marie-Laure Nicolau-Travers, ingénieur, pour avoir assuré le recueil des données de cytométrie, pour sa gentillesse et sa grande efficacité.

À tous mes co-internes au cours de ces quatre années d'internat, en particulier à Anne-So ma néo-toulousaine préférée, si franche et si honnête, je suis très contente d'avoir pu te rencontrer grâce à cet internat ; la promo Toulousaine, Sandrine, Jérôme Bubu, Brice, John-athan, Ludo et Romain, on a bien rigolé quand même! Les belles rencontres, Christophe mon co-parisien, Vincent, Laura, Louis, Arnaud, Carole, Barnabé, Agnès, Thomas, Julien et tant d'autres. Aux internes Gourjadiens de ce semestre d'hiver Castrais, complètement fou et délirant !

À mes parents qui m'ont beaucoup soutenue, surtout en cette fin d'internat. Merci pour tout votre amour.

À mon petit frère jumeau et à ma grande sœur, que je suis contente de retrouver après mon exil toulousain, pour que l'on passe plus de temps ensemble.

À mon amour chéri, sol de mi vida, caballero de mi corazón. Comment te dire... Absolument rien n'aurait été possible sans toi. J'ai tellement hâte de devenir ta femme ! J'ai tellement hâte de commencer notre vraie vie ensemble !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
I. INTRODUCTION	5
1.1 DÉFINITION	6
1.2 HEMATOPOÏÈSE ET MYÉLOPOÏÈSE NORMALES	6
1.3 ÉPIDÉMIOLOGIE	10
1.4 FACTEURS ÉTIOLOGIQUES	10
1.5 PHYSIOPATHOLOGIE	11
II. CLASSIFICATIONS DES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES	13
2.1 CLASSIFICATION FAB (14)	14
LAM 0 ou LAM avec différenciation minimale	14
LAM 1 ou LAM sans maturation	15
LAM 2 ou LAM avec maturation	15
LAM 3 ou leucémie aiguë promyélocytaire	15
LAM 4 ou leucémie aiguë myéломonocytaire	16
LAM 5 ou leucémie aiguë monoblastique / monocytaire	16
LAM 6 ou LAM à composante érythroblastique prédominante	17
LAM 7 ou LAM mégacaryoblastique.....	18
2.2 CLASSIFICATION OMS(1)	19
Classification OMS 2008	20
III. DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE DES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES	21
3.1 ASPECTS CLINIQUES	22
Signes d'insuffisance médullaire	22
Signes de prolifération tumorale.....	23
Complications.....	23
3.2 HÉMOGRAMME	25
3.3 MYÉLOGRAMME	27
3.4 CYTOCHIMIE	32
Cytochimie de la myéloperoxydase (MPO)	32
Cytochimie des butyrates estérases.....	33

3.5 CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	35
3.5.1 Principe de l'immunophénotypage en cytométrie en flux.....	35
3.5.2 Identification des différentes lignées cellulaires.....	36
3.5.3 Identification des blastes leucémiques.....	38
3.5.4 Marqueurs d'immaturation ou de différenciation.....	38
3.5.5 Détermination de la lignée des blastes.....	39
3.5.6 Classification de l'EGIL.....	42
3.5.7 Immunophénotypage et classification FAB:.....	42
3.6 CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE.....	45
3.6.1 Classification pronostic du MRC (Medical Research Council) (67).....	46
3.7 DIAGNOSTICS DIFFÉRENTIELS.....	47
3.7.1 Devant une blastose sanguine.....	47
3.7.2 Devant une blastose médullaire.....	47
3.8 TRAITEMENT.....	49
IV. LA CYTOMÉTRIE EN FLUX PEUT-ELLE REMPLACER LA CYTOCHIMIE POUR LA CLASSIFICATION FAB DES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES.....	51
4.1 OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....	52
4.2 PATIENTS.....	54
4.3 ANALYSE MORPHOLOGIQUE.....	55
4.4 ANALYSE EN CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	57
4.5. RESULTATS.....	59
4.5.1 Cytochimie.....	59
4.5.2 Cytométrie en flux.....	60
V. DISCUSSION.....	80
VI. CONCLUSION.....	84
BIBLIOGRAPHIE.....	87
ANNEXES.....	99

LISTE DES ABREVIATIONS

ANBE	Alpha Naphtyl Butyrate Estérase
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
BCR	B Cell Receptor
BUT	Butyrate estérase
CBF	Core Binding Factor
CD	Cluster de Différentiation
CFU	Colony Forming Unit
CIVD	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CMF	Cytométrie en Flux
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemia
EPO	Erythropoïétine
FAB	Franco-Americano-Britannique (classification)
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FLT3	FMS-Like Tyrosine Kinase 3
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Hb	Hémoglobine
HLA	Human Leukocyte Antigen
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
LA	Leucémie Aiguë
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoïde

LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MO	Moelle osseuse
MPO	Myélopéroxydase
MRC	Medical Research Council
NK	Natural Killer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCA	Analyse en Composantes Principales
PCR	Polymerase Chain Reaction
RC	Rémission Complète
ROC	Receiver Operating Characteristic
Se	Sensibilité
SP	Sang Périphérique
Spe	Spécificité
SCF	Stem Cell Facteur
Siglec	Sialic acid-binding immunoglobulin-like Lectin
TPO	Thrombopoïétine
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive

I. INTRODUCTION

1.1 DÉFINITION

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des maladies hématopoïétiques clonales caractérisées par la prolifération d'un précurseur myéloïde qui s'accumule dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes et par une altération de l'hématopoïèse normale.

Pour parler de leucémie aiguë (LA), le taux requis de blastes dans le sang périphérique et dans la moelle est de 20% (1) ; un pourcentage plus bas peut se voir dans les cas de LAM avec mutation connue ou dans le cas des leucémies aiguës érythroblastiques. Le pourcentage de blastes est obtenu après comptage des éléments nucléés sauf dans le cas des leucémies aiguës érythroïdes dans lesquelles le pourcentage de blastes est basé sur les cellules non érythroïdes.

Les leucémies aiguës constituent une urgence à la fois diagnostique et thérapeutique. Elles nécessitent d'effectuer, en parallèle et très rapidement, la recherche et la prise en charge de complications ainsi que l'identification de la maladie en vue d'adapter le traitement au patient et au type de leucémie. Ce sont des maladies qui peuvent rapidement engager le pronostic vital si elles ne sont pas traitées (2).

1.2 HEMATOPOÏÈSE ET MYÉLOPOÏÈSE NORMALES

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes permettant un remplacement continu et contrôlé des cellules sanguines à partir d'une cellule souche hématopoïétique. L'hématopoïèse comprend deux branches : la lymphopoïèse qui intéresse les cellules dites lymphoïdes ou lymphocytes et la myélopoïèse qui aboutit à la production des cellules myéloïdes, c'est à dire les globules rouges, les polynucléaires, les monocytes et les plaquettes.

Chaque jour sont générés environ 200×10^9 globules rouges avec une demi-vie de 120 jours, 125×10^9 plaquettes avec une demi-vie de 8 jours et 50×10^9 leucocytes avec une demi-vie allant de 8 heures pour les polynucléaires neutrophiles à des mois ou des années pour certaines sous-populations lymphocytaires (3).

L'hématopoïèse s'effectue essentiellement dans la moelle osseuse. Jusqu'à l'âge de 5 ans, tous les os ont une activité hématopoïétique. Par la suite l'hématopoïèse se limite aux os plats : sternum, côtes, vertèbres, bassin et crâne (4).

La moelle osseuse hématopoïétique se compose de trois compartiments (Image 1) :

- Le compartiment de différenciation : il est occupé par 10^6 à 10^7 cellules souches dites totipotentes capables d'auto-renouvellement qui sont à l'origine des cellules souches primitives ou CFU (Colony Forming Unit) c'est à dire capables de s'auto renouveler et de se différencier vers toutes les lignées hématopoïétiques.
- Le compartiment des progéniteurs contenant des cellules progénitrices déterminées pour une lignée, capables de proliférer en se différenciant sous l'effet de facteurs de croissance. Ces cellules vont perdre progressivement leur capacité d'auto renouvellement au fur et à mesure qu'elles se différencient.
- Le compartiment de maturation dans lequel se trouvent les précurseurs, premières cellules morphologiquement reconnaissables au sein de chaque lignée. Ces cellules en voie de maturation subissent une différenciation structurale aboutissant à un type cellulaire unique et sont incapables de se diviser. A la fin de ce processus, les cellules traversent la barrière médullaire et se retrouvent dans la circulation sanguine.

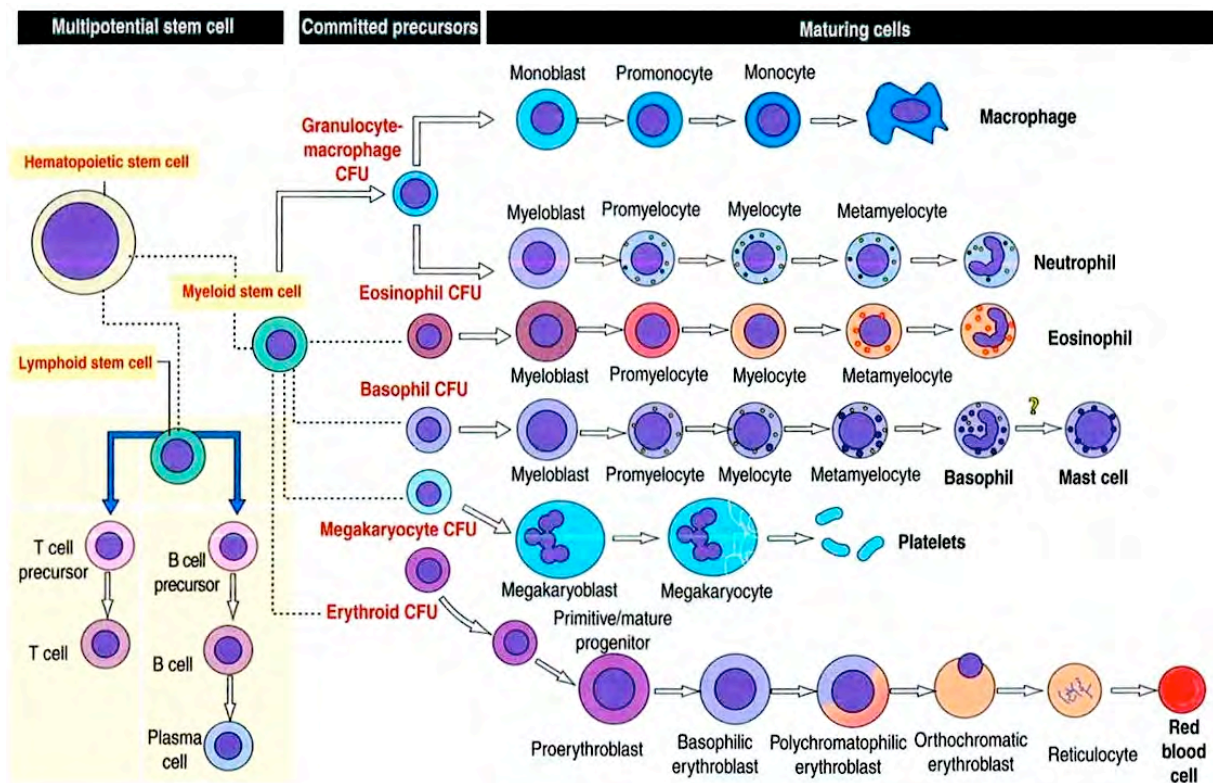


Image 1: Hématopoïèse humaine (5)

L'hématopoïèse est soumise à un contrôle et une régulation à tous les niveaux. Les éléments régulateurs sont au nombre de trois :

- Le « microenvironnement » médullaire : Il procure aux cellules souches les conditions anatomiques et intercellulaires satisfaisantes pour assurer l'hématopoïèse. Le tissu de soutien sécrète des matrices extracellulaires et des facteurs de croissance. Les matrices extracellulaires permettent l'adhésion des cellules souches, en particulier grâce au collagène.
- Les vitamines et oligo-éléments : certaines vitamines, comme la vitamine B12 et l'acide folique, sont nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire. D'autres, comme le fer, sont nécessaires à la fabrication des protéines spécifiques de lignées, comme la synthèse de l'hémoglobine.

- Les facteurs de croissance médullaires : Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des substances (glycoprotéines) agissant comme des hormones. Certaines font partie de la famille des cytokines et des interleukines (IL). Ces molécules reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. Selon le lieu d'application au cours de l'hématopoïèse, il existe trois grands types de facteurs de croissance :
 - Les facteurs de promotion : ce sont principalement des cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-4, l'IL-6 et le facteur de croissance médullaire SCF. Les facteurs de promotion augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire et sensibilisent les cellules souches « totipotentes » à l'action des autres facteurs de croissance.
 - Les facteurs multipotents : ce sont principalement l'interleukine 3 (IL-3) et le facteur de croissance des cellules Granuleuses et des Macrophages : le GM-CSF. Ces facteurs agissent sur les cellules souches les plus immatures après sensibilisation par les facteurs de promotion. Ils permettent la survie et la différenciation des cellules souches.
 - Les facteurs restreints : Ils agissent sur les cellules souches engagées ou progéniteurs et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs.
 - Le G-CSF permet la maturation des polynucléaires neutrophiles,
 - Le M-CSF permet la maturation des monocytes,
 - L'interleukine 5 (IL-5) permet la maturation des polynucléaires éosinophiles,
 - L'interleukine 4 (IL-4) permet la maturation des polynucléaires basophiles,
 - L'interleukine 6 (IL-6) et la thrombopoïétine (TPO) permettent la maturation des mégacaryocytes en plaquettes,
 - L'érythropoïétine (EPO) stimule la production de globules rouges.

1.3 ÉPIDÉMIOLOGIE

En France, les leucémies aiguës représentaient 1% de l'ensemble des cancers en 2012. Les LAM peuvent se déclarer à n'importe quel âge, mais on observe une augmentation de l'incidence totale et une augmentation de la proportion de LAM parmi les LA avec l'âge. L'âge médian de survenue se situe autour de 65 ans. Dans les LAM de l'enfant, le pic d'incidence apparaît dans les premières années de vie puis diminue jusqu'à l'âge de 4 ans et l'incidence reste ensuite relativement constante jusqu'à l'âge adulte (6). On observe ensuite une augmentation au cours de l'âge adulte, période au cours de laquelle 70%-80% des leucémies aiguës diagnostiquées sont des LAM, avec un pic marqué chez les personnes âgées. Cette augmentation d'incidence est expliquée par l'augmentation des LAM secondaires à une myélodysplasie alors que l'incidence des LAM de novo reste approximativement constante pour tous les groupes d'âge (7).

1.4 FACTEURS ÉTIOLOGIQUES

Dans la majorité des cas, les leucémies aiguës n'ont pas de cause connue et surviennent chez des sujets jusque-là en bonne santé. Il est important de souligner que le terme de LAM regroupe un ensemble hétérogène de maladies qui diffèrent par la cause, l'âge de survenue, la clinique et le pronostic. Certains facteurs de risque sont néanmoins identifiés (8):

- Une exposition à des rayonnements ionisants (accidentelle ou thérapeutique), à des produits chimiques : benzènes et solvants dérivés, hydrocarbures aromatiques ;
- Des antécédents de chimiothérapie, notamment par certains alkylants, inhibiteurs de topo-isomérase-II (comme les anthracyclines et l'étoposide), antimétabolites (comme la fludarabine) ;

- Certaines anomalies génétiques constitutionnelles : trisomie 21, neurofibromatose de type I (maladie de Recklinghausen), maladie de Fanconi, déficits immunitaires congénitaux ;
- Des maladies hématologiques préexistantes : syndromes myélodysplasiques, néoplasies myéloprolifératives (leucémie myéloïde chronique, maladie de Vaquez, thrombocytémie essentielle, myélofibrose primitive), anémie aplasique, et hémoglobinurie paroxystique nocturne

1.5 PHYSIOPATHOLOGIE

Les LAM se développent après accumulation (par mécanisme génétique héréditaire, influences environnementales, hasard ou combinaison de tout cela) de translocations spécifiques, mutations et autres altérations génétiques.

Schématiquement, les principaux mécanismes moléculaires en cause sont :

- L'activation transcriptionnelle d'un gène. Exemple : activation de AML1 dans les LAM avec t(8 ;21). AML1 code pour une sous-unité du facteur de transcription *AML1-CBF β* (9) impliqué dans la différenciation de la lignée myéloïde et en particulier dans l'activation des promoteurs de l'IL 3 et du GM-CSF.
- La création d'un gène de fusion avec expression d'un ARN et d'une protéine de fusion ayant des propriétés leucémogènes. Exemple : translocation t(15 ;17) des LAM3 créant un gène de fusion entre le gène RAR, localisé en 17q24, codant pour un des récepteurs de l'acide rétinoïque, et le gène PML, situé en 15q24, entraînant ainsi la synthèse d'une protéine de fusion responsable du blocage de différenciation caractéristique des LAM3 (10).

- La double mutation ou délétion d'un gène suppresseur de tumeur. Exemple : altération des deux copies du gène RB dans 15 à 30% des LA, essentiellement dans les LAM4 et 5.

Ces anomalies moléculaires sont à l'origine de l'accumulation de cellules leucémiques grâce à une capacité de prolifération accrue et au blocage de la capacité de différenciation conférant aux cellules tumorales un avantage de survie (échappement à l'apoptose).

Mutations Classe 1 (Prolifération)	Mutations Classe 2 (Blocage de différenciation)
<i>FLT3</i>	<i>PML-RARA</i>
<i>KIT</i>	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>
<i>RAS</i>	<i>CBFB-MYH11</i>
<i>PTPN11</i>	<i>MLL fusions</i>
<i>JAK2</i>	<i>CEBPA</i>

Tableau 1 : Mutations de Classe 1 et de Classe 2 dans les LAM (8,11)

Les cellules leucémiques vont également inhiber la différenciation des cellules blastiques normales en cellules matures par la sécrétion de différentes chimokines (12).

L'accumulation des cellules blastiques au niveau de la moelle et des organes explique les manifestations cliniques d'insuffisance médullaire et le syndrome tumoral.

II. CLASSIFICATIONS DES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES

Les LAM regroupent un ensemble d'entités très hétérogènes nécessitant la mise en place d'une classification consensus. Deux classifications sont utilisées pour définir le sous type de LAM (13): la classification FAB (French-American-British) et la plus récente classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé).

2.1 CLASSIFICATION FAB (14)

Dans les années 1970, un groupe d'experts Français, Américains et Anglais a divisé les LAM en sous types, M0 à M7, en se basant d'une part sur la nature de la cellule à partir de laquelle s'est développée la leucémie et d'autre part sur le degré de maturation cellulaire.

Cette classification se base donc sur l'observation de frottis médullaire au microscope après coloration au May-Grünwald-Giemsa.

Cette analyse cytologique est couplée à une analyse cytochimique qui permet soit de confirmer l'origine myéloïde des cellules leucémiques en cas d'activité myéloperoxydase > 3%, et/ou de distinguer une origine monocytaire des blastes dans les LAM 4 et LAM 5 grâce à la réaction des estérases (15).

LAM 0 ou LAM avec différenciation minimale

Les blastes sont agranulaires avec une morphologie très indifférenciée ressemblant à de petits lymphoblastes avec souvent un aspect de « miroir à main ». Ils ne présentent pas de différenciation en cytochimie : myéloperoxydase et estérase sont négatives. L'origine myéloïde des blastes est affirmée par l'immunophénotypage (16,17) (positivité des marqueurs CD13, CD33 ou CD117). Elles sont souvent associées à la mutation du gène AML1/RUNX1.

LAM 1 ou LAM sans maturation

Le pourcentage de blastes excède 90% et il n'y a pas de maturation significative. Les blastes n'ont pas ou peu (<10 % des cellules) de maturation granuleuse (quelques granulations et/ou corps d'Auer). L'appartenance à la lignée myéloïde est confirmée en cytochimie par la réaction des myéloperoxydases qui est positive dans ≥ 3 % des blastes. Elles n'ont pas de caractéristiques caryotypiques ou moléculaires associées.

LAM 2 ou LAM avec maturation

Il existe une maturation granuleuse avec ≥ 10 % de cellules matures granulocytaires (promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes ou neutrophiles) mais < 20% de cellules monocytaires. Les blastes présentent habituellement des corps d'Auer cytoplasmiques. La présence de dysplasie associée est fréquente. Il existe un sous-type cytologique particulier souvent associé à la translocation t(8;21)(q22;q22) (9), avec des myéloblastes de plus grande taille et comportant de nombreuses granulations azurophiles et parfois un bâtonnet d'Auer isolé et de grande taille. Ces blastes peuvent exprimer les antigènes CD19 et CD56.

LAM 3 ou leucémie aiguë promyélocytaire

Les blastes de LAM 3 ont une morphologie caractéristique avec un cytoplasme souvent riche en granulations et donc une morphologie proche des promyélocytes. Il existe toutefois deux formes de LAM 3 : la forme classique LAM3-FAB qui a une présentation leucopénique ou normoleucocytaire et qui présente des blastes hypergranulaires ayant comme particularité de contenir de très nombreux corps d'Auer qui s'organisent en fagots dans le cytoplasme ; la forme variante LAM3v-FAB est à l'inverse souvent hyperleucocytaire avec des blastes pauvres ou dépourvus de granulations. En pratique plus la leucocytose est importante plus les cellules sont hypogranuleuses. Quel que soit l'aspect cytologique, la cytochimie de la myéloperoxydase est fortement positive dans tous les blastes.

Ce sous-type de LAM a pour autre caractéristique d'être presque constamment associé à un syndrome de défibrination et constitue de ce fait une urgence diagnostic. Ce type de LAM est caractérisée par la présence d'une translocation t(15;17)(q22;q12) qui doit être recherché par cytogénétique ou par hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour confirmer le diagnostic.

LAM 4 ou leucémie aiguë myélomonocytaire

LAM caractérisée par la prolifération de précurseurs neutrophiles et de précurseurs monocytaires. Les critères sont d'une part un pourcentage de blastes dans lequel on inclut les promonocytes $\geq 20\%$ dans le sang ou dans la moelle, d'autre part un pourcentage de neutrophiles et précurseurs neutrophiles $\geq 20\%$ et un pourcentage de monocytes et précurseurs monocytes $\geq 20\%$ dans la moelle. La cytochimie et l'immunophénotypage par cytométrie en flux sont utiles pour confirmer l'implication des deux lignées. La cytochimie retrouve d'une part le composant myélocytaire avec une réaction de myéloperoxydase positive et d'autre part elle permet d'identifier les éléments à différenciation monocytaire (monocytes et promonocytes) grâce à une réaction butyrate-estérase positive. Les leucémies aiguës myélomonocytaires sont souvent hyperleucocytaires. Il existe une forme particulière de LAM 4 qui se caractérise par la présence d'éosinophiles morphologiquement anormaux dans la moelle (absent ou très rares dans le sang). Ces LAM 4 avec éosinophiles anormaux (LAM 4Eo) sont associées à une anomalie chromosomique typique, l'inversion du chromosome 16 (p13;q22)(p13;q22) ou son équivalent, la translocation t(16;16)(p13;q22). Les formes hyperleucocytaires de LAM 4Eo sont particulièrement à risque d'atteinte méningée.

LAM 5 ou leucémie aiguë monoblastique / monocytaire

Dans les deux cas il existe une prolifération monocytaire avec $> 80\%$ de cellules leucémiques appartenant à la lignée monocytaire : monoblastes, promonocytes, monocytes. On distingue toutefois deux sous-groupes morphologiques :

Les leucémies aiguës monoblastiques ou LAM 5a peu différenciées dans laquelle il existe > 80 % de monoblastes parmi les cellules d'origine monocyttaire et les leucémies aiguës monocyttaires ou LAM 5b avec différenciation dans laquelle la majorité des cellules sont des promonocytes ou des monocytes (<80% de monoblastes). La distinction est morphologique et ne présente pas d'importance majeure sur le plan clinique. En cytochimie la réaction de butyrate-estérase est positive alors que la myéloperoxydase est négative. Le tableau clinique typiquement associé est marqué par une hyperleucocytose, un syndrome tumoral avec hypertrophie gingivale et atteinte cutanée notamment, des troubles métaboliques avec hypokaliémie et insuffisance rénale. L'atteinte méningée n'est pas rare à la rechute. Ce tableau peut être également celui des LAM 4 et peut se compléter dans les cas les plus sévères d'un syndrome de leucostase, d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et d'un syndrome de lyse tumorale.

LAM 6 ou LAM à composante érythroblastique prédominante

Il en existe deux types : l'érythroleucémie ou LAM érythroïde/myéloïde dans laquelle il existe un composant érythrocytaire avec $\geq 50\%$ de précurseurs érythroblastiques parmi l'ensemble de la population nucléée et un composant myéloblastique avec $\geq 20\%$ de myéloblastes parmi la population non érythroblastiques ; la leucémie érythroïde pure, elle, correspond à une prolifération tumorale composée de $\geq 80\%$ d'érythroblastes dans la moelle osseuse sans composant myéloblastique significatif. En règle générale, elles sont souvent associées à des cytopénies sanguines, des signes de dysmyélopoïèse et des anomalies chromosomiques complexes.

Le diagnostic de leucémie érythrocytaire pure est difficile car les érythroblastos peuvent ressembler fortement à des cellules de leucémie de Burkitt, de leucémie mégacaryocytaire, ou à d'autres néoplasies. L'immunophénotypage est essentiel à la description de la lignée.

LAM 7 ou LAM mégacaryoblastique

Elles sont définies par un pourcentage de blastes $\geq 20\%$ parmi lesquels $>50\%$ appartiennent à la lignée mégacaryocytaire. Les blastes sont peu différenciés et négatifs pour la myéloperoxydase, ils peuvent facilement être confondus avec des lymphoblastes. L'immunophénotypage a un apport important dans le diagnostic par la positivité des marqueurs comme les glycoprotéines IIb/IIIa (CD41, CD41b, CD61). Cette leucémie est souvent associée à une fibrose médullaire, ce qui peut empêcher l'aspiration médullaire et donc l'étude morphologique et l'immunophénotypage rendant le diagnostic encore plus difficile.

Cette classification basée sur la lignée cellulaire est toujours utilisée en routine pour le diagnostic initial lorsque les données sur le sous-type biologique spécifique ne sont pas disponibles, notamment dans les cas des LAM 3 promyélocyaires. La LAM 3 possède la particularité de présenter un tableau clinique typique, avec un syndrome hémorragique cutanéomuqueux franc parfois dramatique (hémorragie intracrânienne) liée à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et une activation aberrante de la fibrinolyse. Il s'agit donc d'une urgence thérapeutique imposant un diagnostic en urgence (dans les heures suivant l'admission) afin de débiter un traitement spécifique et d'éviter un risque de décès rapide (18). La classification FAB est également toujours utilisée dans les cas de LAM sans spécificité particulière de la classification OMS (19), c'est à dire les cas de LAM a) sans anomalie cytogénétique ou moléculaire récurrente, b) sans antécédent de chimiothérapie, c) sans dysplasie multilignée impliquant la majorité des cellules, d) sans anomalie cytogénétique de type myélodysplasie, et e) sans association avec un syndrome de Down.

2.2 CLASSIFICATION OMS(1)

Le développement des méthodes de cytogénétiques, de l'immunophénotypage puis de la biologie moléculaire a mis en évidence l'existence d'anomalies récurrentes d'importance pronostique majeure (20). L'OMS a souhaité intégrer ces anomalies récurrentes dans une nouvelle classification en 2001, révisée en 2008.

Cette classification basée sur le regroupement de maladies comportant les mêmes anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires permet la détermination des traitements de consolidation de la rémission et la détermination du pronostic à long terme.

Classification OMS 2008

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec translocation t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- LAM avec inversion du chromosome 16 (inv(16)(p13.1q22)) ou translocation t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
- LAM promyélocytaire avec t(15;17)(q22;q12); PML-RAR α
- LAM avec translocation t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
- LAM avec translocation t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
- LAM avec inversion du chromosome 3 (inv(3)(q21q26.2)) ou translocation t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
- LAM (mégacaryoblastique) avec translocation t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
- Entité provisoire : LAM avec mutation de NPM1
- Entité provisoire : LAM avec mutation de CEBPA

LAM associées à des anomalies de type myélodysplasie

LAM thérapies-induites

LAM sans spécificité particulière

- LAM avec différenciation minimale
- LAM sans maturation
- LAM avec maturation
- Leucémie aiguë myélo-monocytaire
- Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire
- Leucémie aiguë érythroïde
 - leucémie aiguë érythroïde pure
 - érythroleucémie, érythroïde et myéloïde
- Leucémie aiguë mégacaryoblastique
- Leucémie aiguë basophile
- Panmyélose aiguë avec myélofibrose

Sarcome myéloïde

Proliférations myéloïdes liée au syndrome de Down (trisomie 21)

- Myélopoïèse anormale transitoire
- Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down

Néoplasie à cellules dendritiques blastiques plasmacytoïdes

III. DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE DES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES

3.1 ASPECTS CLINIQUES

Il n'existe pas de signe spécifique de leucémie aiguë. En effet les signes cliniques sont très variables en fonction du degré d'envahissement médullaire par les cellules blastiques, de leur nombre et de leurs caractéristiques chimiques et moléculaires. De fait, le mode de révélation initial est représenté par un spectre pouvant aller du bilan d'une asthénie à un tableau beaucoup plus grave d'insuffisance médullaire profonde (infections, anémie, hémorragies) et d'infiltrats tissulaires (hyperleucocytoses) (21).

Les manifestations cliniques comprennent des signes d'insuffisance médullaire, des signes de prolifération tumorale, des complications métaboliques et le syndrome de leucostase.

Signes d'insuffisance médullaire

Ils sont le résultat de l'insuffisance de production d'éléments sanguins normaux par la moelle. On décrit :

- Un syndrome anémique dans 90 à 95% des cas, avec asthénie, pâleur, dyspnée, tachycardie; ces signes sont d'autant plus importants que l'anémie est profonde.
- Un syndrome infectieux avec notamment des infections bactériennes traînantes ou des infections fongiques, dont la gravité est liée au taux bas des polynucléaires neutrophiles.
- Un syndrome hémorragique présent dans 90% des leucémies aiguës ; il se manifeste par des hémorragies cutanées (pétéchies, hématomes, purpura), muqueuses (gingivorragies, épistaxis) particulières par leur caractère spontané ou déclenché par un traumatisme minime. La présence de grands hématomes ou de saignements prolongés aux points de ponction doit faire évoquer une CIVD qui est une urgence thérapeutique.

Signes de prolifération tumorale

Les manifestations tumorales sont moins fréquentes que dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. Elles résultent des localisations leucémiques. Elles regroupent :

- Une hypertrophie des organes hématopoïétiques avec des adénopathies surtout superficielles, une hépatomégalie, une splénomégalie.
- Des manifestations bucco-pharyngées, notamment l'infiltration gingivale par les blastes, saignant au contact, très évocatrice de leucémie monoblastique.
- Une atteinte cutanée, spécifique, fréquente dans les LAM notamment dans la forme monoblastique M5. Il s'agit de nodules violacés ou placards fermes enchâssés dans le derme, indolores.
- Une tumeur localisée (chlorome ou sarcome granulocyttaire) pouvant virtuellement intéresser tous les organes extra-hématopoïétiques.
- Des manifestations neurologiques, rares, plutôt lors des phases évolutives (rechute) ou tardives de la maladie. Les localisations du système nerveux central sont responsables de céphalées, de rachialgies, de paralysie des nerfs crâniens (nerfs facial ou oculo-moteurs), d'une hypoesthésie de la houppe du menton (atteinte du V3, du noyau), un flou visuel (nerf ophtalmique) ou une atteinte du nerf sciatique.

Complications

Plusieurs cas de figure imposent une prise en charge diagnostique et thérapeutique en urgence :

- Signes de complications métaboliques : Les cellules tumorales sont capables d'induire spontanément des complications métaboliques liées à la libération massive de produits de lyse cellulaire (syndrome de lyse tumorale) ;
- Un syndrome de défibrination lié à la libération de facteurs cellulaires à activité procoagulante. On observe cliniquement un syndrome hémorragique sévère

(vastes hématomes, hémorragies viscérales) témoin d'une CIVD ou d'une fibrinolyse ;

- Un syndrome d'hyperviscosité ou de leucostase : la présence de blastes sanguins peut être massive dépassant 100 Giga/l. Un tel envahissement sanguin blastique engendre des troubles de la microcirculation et de la perfusion tissulaire. Ceci est particulièrement redouté dans les LAM à composante monocyttaire (22) ou dans les LAM CD56+ (23). On peut alors observer:
 - Une défaillance respiratoire aiguë avec œdème pulmonaire lésionnel. La leucostase pulmonaire est accompagnée d'une détresse respiratoire, d'hypoxie, et d'un aspect de pneumopathie alvéolo-interstitielle à la radiographie pulmonaire.
 - Une leucostase cérébrale génératrice d'anoxie cérébrale, de trouble de la conscience, convulsions, ataxie, nystagmus et troubles sensoriels. La complication la plus redoutable est l'hémorragie intracérébrale.

3.2 HÉMOGRAMME

Il est anormal dans la très grande majorité des cas et permet souvent à lui seul d'évoquer le diagnostic.

La numération sanguine met en évidence :

- Une anémie quasi constante. De modérée à très sévère (5-13 g/dL), elle est arégénérative (réticulocytes bas), normochrome normocytaire, sans anomalie morphologique des hématies le plus souvent.
- Une numération leucocytaire très variable. On peut observer tous les cas de figure, de la leucopénie franche (< 1G/L) sans blastes circulants, jusqu'à l'hyperleucocytose majeure (100-500 G/L), constituée essentiellement de cellules tumorales et imposant une prise en charge diagnostique et thérapeutique en urgence. L'hyperleucocytose est présente dans 50% des cas mais est supérieure à 100 G/L dans seulement 20% des cas et le plus souvent dans un contexte de LAM M4 ou M5 (24).
- Une thrombopénie très fréquente, parfois majeure (< 10 G/L). Elle peut être liée à une insuffisance de production et/ou à une consommation excessive par un mécanisme de coagulation intravasculaire disséminée, imposant la réalisation d'un bilan d'hémostase. Dans quelques cas, le nombre de plaquettes est normal voire augmenté mais le syndrome hémorragique reste possible (thrombopathie).

La formule leucocytaire est une étape clé dans la démarche diagnostique :

- Un pourcentage de blaste circulant > 20% évoque d'emblée une leucémie aiguë.

- Il existe souvent une neutropénie liée à un défaut de production, avec parfois agranulocytose (< 0.5 G/L) nécessitant une prise en charge en urgence. Parfois le nombre de polynucléaires neutrophiles est normal ou augmenté, grâce à la persistance d'une maturation résiduelle du clone tumoral.
- Il faut toujours rechercher une dysgranulopoïèse morphologique, avec anomalies superposables à celles des syndromes myélodysplasiques (hyposegmentation nucléaire, hypogranulation).
- Un excès de granulocytes basophiles ou une hyperéosinophilie sont possibles, dans le cadre des variants morphologiques.
- Une hypermonocytose est observée dans les LAM à composante monocyttaire.
- Les lymphocytes sont en nombre habituellement normal pour l'âge.

3.3 MYÉLOGRAMME

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

L'examen microscopique de frottis médullaires colorés au May-Grünwald-Giemsa pose le diagnostic de LAM en montrant une infiltration médullaire avec un pourcentage de blaste supérieur ou égal à 20%.

Le myélogramme montre habituellement une moelle richement cellulaire. La moelle est pauvre dans < 10% des cas, et une biopsie ostéo-médullaire est alors nécessaire. Les mégacaryocytes sont en général absents ou très rares, en parallèle de la thrombopénie.

Il faut ensuite définir le pourcentage de blastes. Pour le diagnostic de LAM, les blastes incluent les myéloblastes, monoblastes et mégacaryoblastes. Les promonocytes sont des équivalents de blastes dans tous les types de LAM et les promyélocytes sont des équivalents de blastes uniquement dans les leucémies aiguës promyélocytaire. Les érythroblastes sont inclus dans le pourcentage de blastes seulement dans les leucémies aiguës érythroblastiques « pures » (25).

La définition des sous-types FAB dépend ainsi de la reconnaissance des cellules et de leur classification au microscope, ce qui est subjectif et est source de discordance entre les observateurs. Il existe de nombreux atlas de cytologie (26–29) très détaillés pour la reconnaissance des différents types cellulaires.

La morphologie du noyau cellulaire est le point le plus critique dans l'identification des cellules blastiques : les blastes montrent une chromatine finement dispersée plutôt que condensée. D'autres caractéristiques nucléaires sont utiles à l'évaluation des blastes comme la taille, les nucléoles et la configuration nucléaire. Les caractéristiques cytoplasmiques sont très utiles dans la détermination de la lignée : les myéloblastes présentent de fines granulations cytoplasmiques peu abondantes

ou la présence de corps d'Auer, les mégacaryoblastes des bourgeonnements cytoplasmiques, les érythroblastes une basophilie profonde et des vacuoles cytoplasmiques.

On observe donc différents aspects cytologiques :

- Les myéloblastes (30) sont classiquement des cellules de taille moyenne à grande, à faible rapport nucléo-cytoplasmique. Elles présentent un noyau excentré à chromatine lâche et peut montrer un ou plusieurs nucléoles proéminents. Leur cytoplasme est basophile et peut contenir des granulations azurophiles et/ou des corps d'Auer (Image 2 et 3). On observe par ailleurs des dysplasies sur les cellules matures granulocytaires avec absence de granulations secondaires cytoplasmiques et anomalies de segmentation des noyaux qui apparaissent uni ou bilobés (pseudo Pelger-Huet)

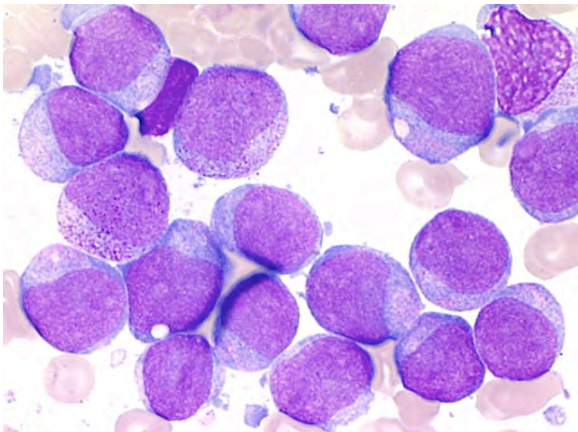
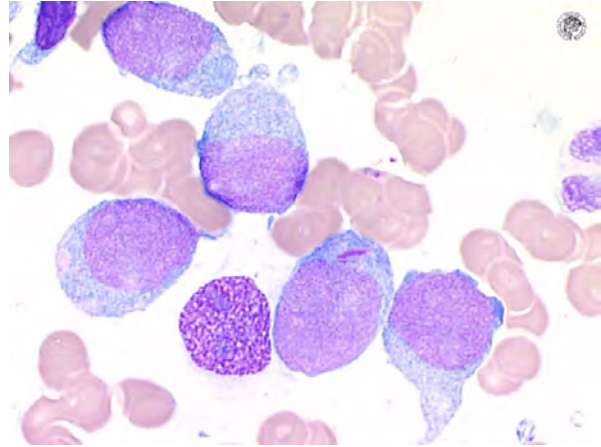


Image 2 (31) : Myéloblastes

Image 3 (31) : Myéloblaste
avec un corps d'Auer



- Dans la leucémie aiguë promyélocytaire classique, les blastes présentent souvent un noyau caractéristique bilobé ou réniforme. Le cytoplasme est rempli de granules azurophiles, parfois coalescentes, allant jusqu'à masquer la visibilité du noyau. Dans quelques cellules les granulations sont plus fines et certaines contiennent un corps d'Auer, ressemblant à des myéloblastes. La caractéristique est que quelques cellules contiennent de très nombreux corps d'Auer, jusqu'à 50, organisés en fagots (Image 4). Dans la forme microgranulaire ou hypogranulaire, les granulations cytoplasmiques sont rares ou absentes. En pratique plus la leucocytose est importante plus les cellules sont hypogranuleuses.

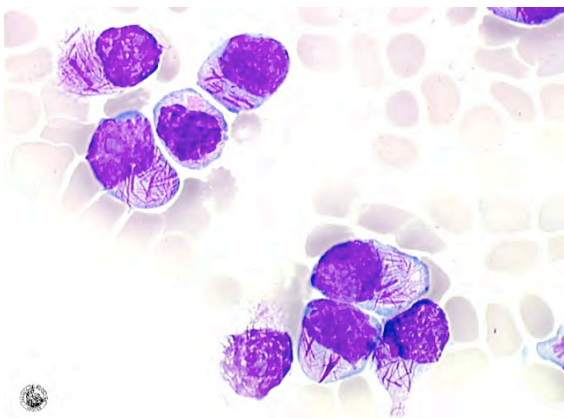
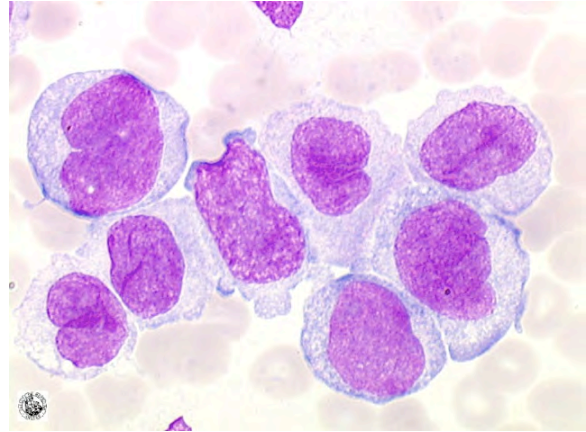


Image 4 (31) : Myéloblastes montrant
des corps d'Auer organisés en fagots

- Les monoblastes sont des cellules de grande taille avec un noyau central rond ou oblong et un cytoplasme abondant. Il peut exister un nucléole proéminent. Le cytoplasme est basophile ou gris-bleu et peut présenter des bourgeonnements. Il existe de fines granulations cytoplasmiques (Image 5).

Image 5 (31) : Monoblastes et promonocytes



- Les promonocytes eux montrent un début de lobulation nucléaire et une perte de la basophilie du cytoplasme (Images 5 et 6).

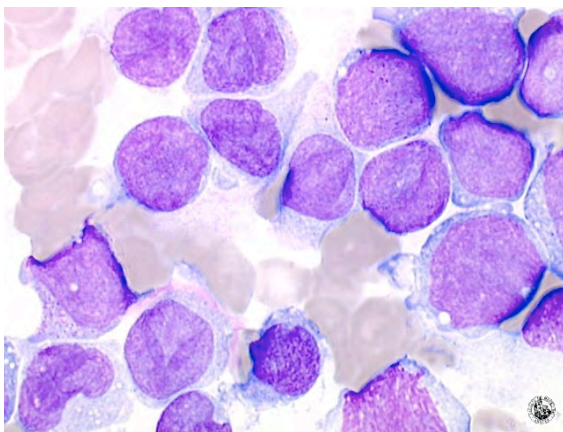
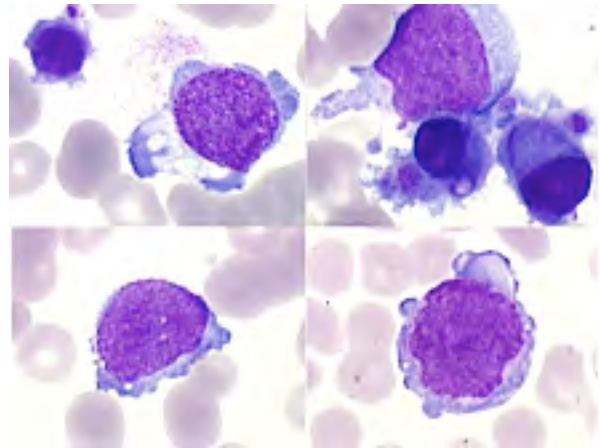


Image 6 (31) : Myéloblastes et promonocytes

- Les mégacaryoblastes sont des cellules de taille réduite ou moyenne, avec rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le cytoplasme est basophile, souvent dépourvu de granulations, et peut montrer des bourgeons ou pseudopodes qui ressemblent à des plaquettes (Image 7).

Image 7 (31) : Mégacaryoblastes



- Les proérythroblastes sont parfois morphologiquement proches de leur contrepartie normale, parfois totalement indifférenciés (Image 8), et seules les techniques immunophénotypiques ou ultrastructurales précisent le caractère proérythroïde.

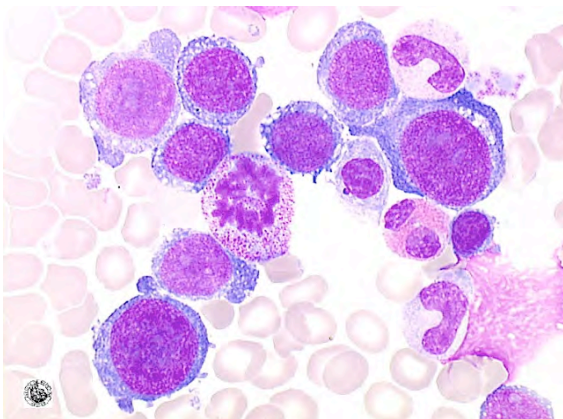


Image 8 (31) : Blastés évocateurs de proérythroblastes

3.4 CYTOCHIMIE

Les colorations de cytochimie donnent des informations sur la nature de la lignée impliquée et sur le degré de maturation.

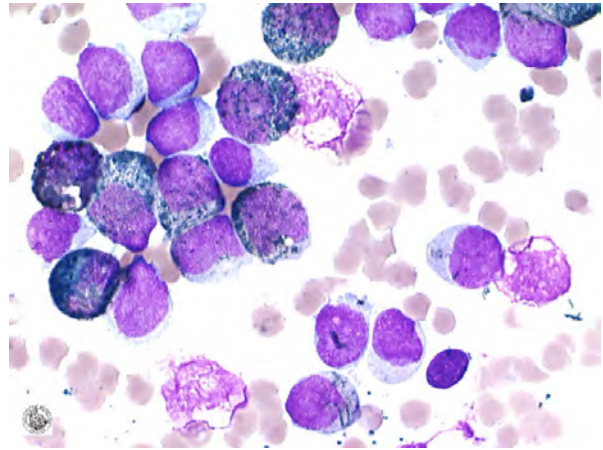
Cytochimie de la myéloperoxydase (MPO)

Cette coloration permet de confirmer la nature myéloïde granulocytaire des blastes qui ne présentent pas de granulations ou de corps d'Auer au MGG (32). La peroxydase est une enzyme qui dégrade le perhydrol et oxyde la benzidine qui précipite sous forme de granulations marron – vert (Image 9). Cette coloration est spécifique des lignées granulocytaires, éosinophiles et monocytaires.

Les myéloblastes montrent plutôt une positivité focale avec des granulations regroupées à un pôle du cytoplasme. Les monoblastes, quand ils sont positifs, montrent de fines granulations dispersées. Les granulations éosinophiles sont uniformément et fortement positives à la MPO. Les promyélocytes normaux et leucémiques montrent quant à eux un cytoplasme rempli de granulations trapues. Au niveau des cellules matures, neutrophiles et métamyélocytes, les granulations sont moins épaisses.

Cette coloration est donc particulièrement utile pour distinguer rapidement une leucémie myéloblastique sans maturation ou avec maturation minimale d'une leucémie aiguë lymphoblastique. Elle permet également de rechercher une dysgranulopoïèse avec déficit en MPO au niveau des neutrophiles matures.

Image 9 (31) : Cytochimie de la
myéloperoxydase



Cytochimie des butyrates estérases

Cette coloration permet de reconnaître les cellules de la lignée monocytaire (33–35). L'enzyme butyrate estérase hydrolyse l'alpha naphthyl butyrate, ce qui produit une coloration rouge brun (Image 10).

La positivité est nette dans les cellules de la lignée monocytaire, alors que les myéloblastes et lymphoblastes sont négatifs. L'estérase spécifique (butyrate estérase) est d'autant plus positive que la différenciation monocytaire est évidente. Cette technique permet ainsi de faire la différence entre les LAM 4 et les LAM 5.

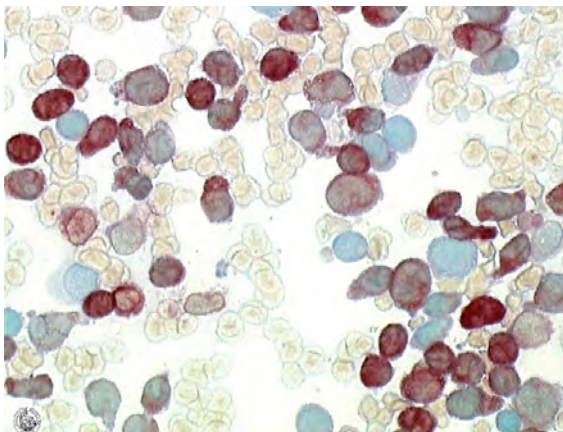


Image 10 (31) : Cytochimie de la butyrate
estérase

Il existe de nombreux modes de colorations différents. Il s'agit de techniques manuelles, rapides et peu chères, depuis longtemps utilisées dans le diagnostic des LA (36) mais qui présentent comme principaux inconvénients l'absence de contrôle, la dégradation des réactifs, la variabilité inter-opérateurs (37).

3.5 CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux est une étape majeure de la stratégie diagnostic des LAM, en complément de l'analyse cytologique, notamment grâce à sa rapidité et son accessibilité.

L'immunophénotypage par cytométrie en flux permet en effet de déterminer l'appartenance à une lignée cellulaire (38), et de préciser le niveau de différenciation pour identifier et/ou préciser le diagnostic des diverses formes de LA. Il permet également de détecter les leucémies aiguës biphénotypiques ; il peut avoir un rôle pronostique (39) par la mise en évidence d'un phénotype corrélé à des anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires (40,41); il permet d'identifier la présence de certains marqueurs au sein des blastes en vue d'une utilisation d'une thérapeutique ciblée par anticorps monoclonaux ; il permet de détecter le profil antigénique aberrant des blastes pouvant se révéler utile pour suivre la maladie résiduelle (42).

3.5.1 Principe de l'immunophénotypage en cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste en l'analyse d'une suspension cellulaire concentrée en un flux unique qui passe à travers une source lumineuse. La lumière diffusée et émise est ensuite mesurée par plusieurs détecteurs. Les paramètres obtenus correspondent aux caractéristiques physiques des cellules : la dimension et la granularité des cellules sont déterminées en fonction de la dispersion lumineuse frontale et latérale (respectivement FSC et SSC). La caractérisation des cellules est rendue encore plus précise par l'utilisation d'anticorps marqués par un fluorochrome qui permet l'identification de composants cellulaires. Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée. La lumière fluorescente émise est ensuite canalisée par des filtres adaptés et les signaux sont récoltés par un assortiment de détecteurs.

Au cours du processus de différenciation et de maturation des cellules hématopoïétiques se produisent des mécanismes de régulation génique qui résultent en l'expression de différentes protéines en fonction du stade de maturation. L'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des molécules fluorescentes va permettre d'étudier les modifications de l'expression de ces glycoprotéines par les cellules médullaires au cours de leur développement à l'aide de la cytométrie en flux. Il est ainsi possible d'étudier la maturation des cellules d'une lignée en partant des marqueurs exprimés par les cellules les plus matures pour aller vers la cellule la plus jeune. L'analyse de la coexpression de ces antigènes et de leurs niveaux d'expression va ainsi permettre d'obtenir un schéma corrélé au processus de maturation cellulaire

3.5.2 Identification des différentes lignées cellulaires

Toutes les cellules hématopoïétiques expriment le CD45 au cours de leur développement. L'expression du CD45 va persister sur les leucocytes tout au long de leur vie à l'exception des plasmocytes tandis que les érythrocytes et les plaquettes perdent l'expression de ce marqueur au cours de leur différenciation.

En regardant le niveau d'expression du CD45 en association avec le SSC, on peut identifier les différentes lignées cellulaires (43) (Image 11):

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

- Enfin, les cellules granuleuses sont caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45.

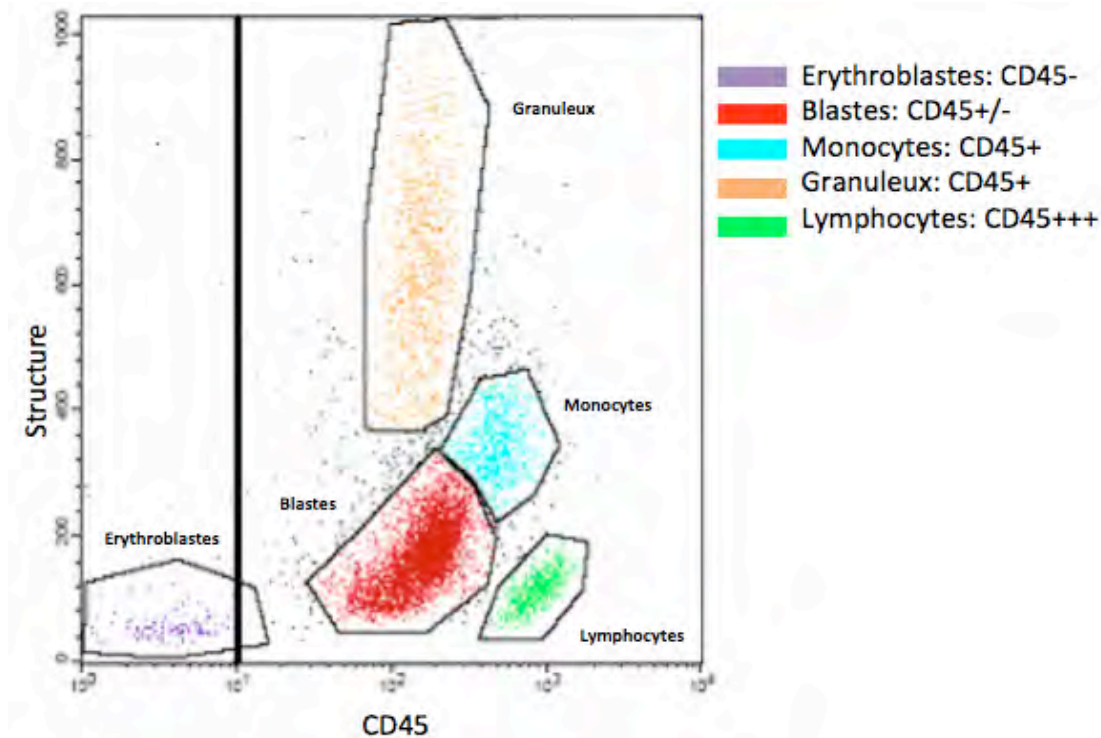


Image 11 : Histogramme CD45/SSC

Comme les cellules blastiques ont une plus faible expression de CD45 que les cellules hématopoïétiques normales, l'identification des blastés peut se faire grâce à l'histogramme CD45/SSC (44). Toutefois, on note parfois une localisation plus atypique des blastés sur l'histogramme CD45/SSC, en particulier dans les LAM3, où les blastés peuvent se retrouver dans la zone des polynucléaires, et dans les LAM5, où les monoblastés et promonocytes peuvent chevaucher la zone des monocytes. En cas de dégranulation importante de la lignée granulocytaire, on peut aussi observer une baisse de l'intensité du SSC sur les polynucléaires. Ces atypies peuvent rendre difficile la distinction des blastés des autres populations leucocytaires sur l'histogramme CD45/SSC.

3.5.3 Identification des blastes leucémiques

L'analyse des données fournies par la cytométrie en flux a permis de montrer que les cellules leucémiques montrent un profil différent d'une cellule normale en cours de maturation. Il persiste des analogies avec le profil de maturation d'une cellule normale, permettant de définir le stade de maturation auquel la cellule s'est arrêtée, mais on peut observer différents types d'anomalies permettant de distinguer une cellule blastique normale d'une cellule leucémique.

On peut observer trois types d'anomalies :

- Absence d'expression de marqueurs présents normalement à un stade de maturation donné pour la lignée dont est issue la cellule leucémique ;
- Niveau d'expression anormal d'un marqueur présent pour un stade de maturation donné ;
- Expression de marqueurs d'autres lignées non exprimés normalement par les cellules de la lignée dont sont issues les cellules leucémiques.

3.5.4 Marqueurs d'immaturité ou de différenciation

Deux marqueurs dits marqueurs d'immaturité sont utiles pour repérer les cellules souches hématopoïétiques (45):

- Le CD34 est une molécule d'adhésion cellulaire exprimée par de nombreuses cellules progénitrices dont les cellules souches lymphoïdes et hématopoïétiques. Il est exprimé dans la plupart des cas de LAM (42%) (46).
- HLA-DR est une protéine exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, c'est à dire les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules T activées. HLA-DR est une protéine hétérodimérique transmembranaire composée de deux sous-unités, alpha et beta.

Elle joue un rôle important dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 (47).

3.5.5 Détermination de la lignée des blastes

Il existe peu de marqueurs spécifiques d'une lignée. Selon l'EGIL (European Group for Immunological characterization of Leukemias), la mise en évidence de certains marqueurs par les cellules leucémiques va permettre de les assigner à la lignée dont elles sont issues. On utilise pour ce faire un panel d'anticorps constitué des marqueurs les plus spécifiques de chaque lignée hématopoïétique et de marqueurs d'immaturité ou de maturation (48).

cytCD79a*, cytCD22*, CD19*, CD10, CD20	Lignée lymphocytaire B
cytCD3*, CD2, CD5, CD7, CD8, CD1, sCD3, CD4, TCR	Lignée lymphocytaire T
CyMPO*, cytCD13* ou CD13*, CD33*, CD117*, CD14, CD15, CD65, CD11b, CD64	Lignée myéloïde
CD41*, CD42*, CD61*	Lignée plaquettaire
Glycophorine A*, CD36*	Lignée érythroïde
* Marqueurs les plus spécifiques de chaque lignée	

Tableau 2 : Marqueurs spécifiques de lignée

Ainsi une cellule leucémique appartient à la lignée myéloïde si :

- Elle exprime au moins deux marqueurs myéloïdes : CD13 / CD33 / CD117 / CyMPO
- Elle n'exprime pas plus de deux marqueurs lymphoïdes B ou T :
 - Marqueurs lymphoïdes B : CD19 / CD22 / CyCD79a
 - Marqueurs lymphoïdes T : CyCD3 / CD2 / CD5 / CD7 / CD8

Les cellules leucémiques des LAM expriment généralement des antigènes caractéristiques de la différenciation neutrophile et monocyttaire comme le CD13, CD15, CD33, CD64, CD117 et la MPO.

- La molécule la plus précoce attestant de l'engagement d'une cellule souche CD34+HLA-DR+ dans la lignée myéloïde est l'enzyme MPO intracytoplasmique. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme exprimée à différents degrés dans quasiment toutes les cellules myéloïdes. Elle est intracytoplasmique, localisée à l'intérieur des phagosomes et est impliquée dans la génération de peroxyde d'hydrogène (49). C'est le marqueur précoce le plus sensible et spécifique pour l'identification des myéloblastes (50).
- Trois autres antigènes peuvent aussi être considérés comme des marqueurs précoces : le CD13, CD33 et CD117, souvent observés ensemble à la surface des blastes myéloïdes.
 - Le CD13 est une metalloprotéase qui est exprimée par les progéniteurs granulocytaires et monocytaires précoces ainsi que par les cellules matures de ces lignées. Ce marqueur est exprimé par la majorité des cas de LAM (95%) (51)
 - Le CD33 est une molécule d'adhésion impliquée dans les interactions entre cellules. Elle est exprimée par les myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et monocytes et par les cellules blastiques de la majorité des LAM (91%) (51).

- CD117, récepteur tyrosine kinase, est le récepteur du facteur de cellule souche (CSF). Il est codé par l'oncogène c-kit. Il est exprimé jusqu'à 4% par les cellules mononucléées de la moelle osseuse normale, incluant les myéloblastes, cellules érythrocytaires primitives, quelques mégacaryoblastes et par les cellules mastocytaires. Il est également exprimé par les cellules blastiques dans 30 à 100% des cas de LAM (52,53).

Comme mentionné ci-dessus, les cellules leucémiques peuvent exprimer des marqueurs aberrants appartenant à une autre lignée. Les antigènes lymphoïdes souvent exprimés dans les LAM sont le CD7, CD2 et CD19.

Les cellules engagées dans une différenciation myéloïde, en fonction du signal émis par les facteurs de croissance hématopoïétiques de leur microenvironnement, vont ensuite se différencier en monocytes ou granulocytes puis, en cas de différenciation granulocytaire, en polynucléaires neutrophiles, basophiles ou éosinophiles. Ces cellules bien différenciées morphologiquement, peuvent toutes exprimer la majorité des marqueurs décrits ci-dessus.

Les marqueurs les plus caractéristiques des neutrophiles sont CD15 et CD65.

CD14 serait plus spécifiquement exprimé par les monocytes (54).

Deux autres types cellulaires, bien que très rarement à l'origine de leucémie, font également partie du groupe myéloïde dans la classification FAB : les érythroblastes et les mégacaryocytes.

- Ces cellules n'expriment pas la MPO et acquièrent des antigènes de différenciation spécifiques très tôt.
- Les antigènes les plus caractéristiques des érythroblastes sont le CD36 et les glycophorines (55,56).
- Les mégacaryocytes expriment les chaînes d'intégrines CD41 et CD61 d'abord en intracytoplasmique puis à la surface cellulaire (57).

Dans le cas des LA indifférenciées, aucun marqueur spécifique de lignée lymphoïde ou myéloïde n'est exprimé mais les cellules leucémiques sont CD34+/CD45low.

3.5.6 Classification de l'EGIL

L'EGIL a défini un score immunophénotypique en attribuant des points à certains marqueurs jugés utiles pour le diagnostic des hémopathies malignes. Ces valeurs vont de 2 points pour les marqueurs les plus spécifiques d'une lignée à 0.5 points pour les marqueurs les moins spécifiques (58).

Ce travail a été réalisé pour mieux définir la notion de leucémie biphénotypique. On peut parler de leucémie biphénotypique si l'analyse des marqueurs exprimés par les cellules blastiques permet d'obtenir un score supérieur à 2 pour plusieurs lignées. En dessous de ce score, on devra parler de variants lymphoïdes en cas d'expression de marqueurs de la lignée lymphoïde par les cellules d'une LAM.

Le tableau ci-dessous reprend les points accordés aux différents marqueurs par l'EGIL pour définir l'appartenance d'une cellule leucémique à une lignée.

Score	Lignée lymphoïde B	Lignée lymphoïde T	Lignée myéloïde
2	cytCD79a, cytCD22, cytlgM	CD3, TCR	MPO
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CD65, CD117
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64

Tableau 3 : Score diagnostic EGIL

3.5.7 Immunophénotypage et classification FAB:

Du fait des nombreux aspects morphologiques de la lignée myéloïde, la mise en place d'une classification immunophénotypique (59) est très difficile. Il y a eu plusieurs tentatives pour établir une corrélation entre la classification FAB et des sous-groupes immunologiques mais aucun phénotypique spécifique de chaque groupe FAB n'a pu être identifié (60–62). On observe toutefois des associations fréquentes (Tableau 4).

	M0	M1, M2	M3	M4	M5	M6	M7
MPO	-	+	+	+	+/-	+	-
CD2	+/-	+/-	+/-	+/- (Eo)	-	-	-
CD4	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD7	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD11c	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-
CD13	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
CD19	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
CD33	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
CD34	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD36	-	-	-	+	+	+	+
CD56	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
CD41	-	-	-	-	-	-	+
CD42a	-	-	-	-	-	-	+
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+/-	+	+	-	-
CD65	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
CD71	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD117	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-
Glyco-A	-	-	-	-	-	+	-
HLA-DR	++	+	-	+	+	+/-	+/-

Tableau 4 : Principaux marqueurs exprimés dans les sous-types de LAM selon la classification FAB

Les phénotypes les plus spécifiques sont l'association M4/M5 avec l'expression de CD14 et de CD64 et l'association M3 avec l'absence d'expression de CD34 et d'HLA-DR (63).

3.6 CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

Les techniques cytogénétiques conventionnelles et moléculaires sont maintenant intégrées dans le panel des analyses indispensables au diagnostic des leucémies aiguës.

La cytogénétique inclut le caryotype conventionnel qui examine l'ensemble des chromosomes obtenus à partir de cellules leucémiques en métaphase (64).

- Le prélèvement est mis en culture 24 à 48h en présence d'un facteur mitogène. La culture est ensuite bloquée en métaphase à l'aide d'un poison du fuseau. Après un choc hypotonique, les chromosomes sont colorés, classés et analysés.
- L'établissement du caryotype correspond à une classification standard des chromosomes humains par paires, en fonction de leurs tailles et de la position du centromère.

Le caryotype est complété par des techniques d'hybridation avec des sondes fluorescentes (FISH). Cette technique utilise des sondes spontanément fluorescentes permettant une recherche plus ciblée et ne dépend pas de la division cellulaire.

Enfin, l'analyse par PCR recherche des marqueurs chromosomiques spécifiques au niveau moléculaire.

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

Des mutations sont connues pour induire un avantage prolifératif, alors que d'autres bloquent la mort programmée des cellules (apoptose) ou la différenciation cellulaire. En effet les mutations observées concernent des gènes importants pour

l'hématopoïèse normale, comme des récepteurs à activité tyrosine kinase gouvernant la prolifération et la survie cellulaires (FLT3, KIT), des facteurs de transcription régulant les processus de différenciation cellulaire (CEBPA, AML1) ou l'autorenouvellement (MLL, NPM1). D'autres mutations impliquent des gènes de la prolifération (NPM1, RAS), du remodelage chromatinien (TET2, DNMT3A) ou du métabolisme cellulaire (IDH1/2) (65,66).

3.6.1 Classification pronostic du MRC (Medical Research Council) (67)

Anomalies chromosomiques de pronostic favorable

- Translocation t(15;17)(q25;q21) pathognomonique des LAM3
- LAM avec remaniements du CBF
 - Translocation t(8 ;21) des LAM2
 - Inversion du chromosome 16 inv (16)(p13q22) ou translocation t(16 ;16)(p13 ;q22) des LAM 4Eo

Anomalies chromosomiques de pronostic intermédiaire

- Anomalies non classées comme favorables ou défavorables

Anomalies chromosomiques de pronostic défavorable

- Monosomie ou délétion du chromosome 5 del(5q) ou du chromosome 7 del(7q)
- Anomalie du 3q abn(3q) sauf t(3;5)(q21~25;q31~35)
- Inversion du chromosome 3 inv(3)(q21q26) ou translocation t(3;3)(q21;q26)
- add(5q), del(5q), -5
- add(7q)/del(7q), -7
- Translocation t(6;11)(q27;q23)
- Translocation t(10 ;11)(p11~13 ;q23)
- Translocation t(11q23) sauf t(9;11)(p21~22;q23) et t(11;19)(q23;p13)
- Translocation t(9;22)(q34;q11),
- Monosomie du chromosome 17 ou anomalie du 17p abn(17p)
- Caryotypes complexes (≥ 4 anomalies non reliées)

3.7 DIAGNOSTICS DIFFÉRENTIELS

3.7.1 Devant une blastose sanguine

Il faut faire la différence avec :

- Les syndromes myélodysplasiques (Anomalies de maturation des cellules souches aboutissant à une hématopoïèse inefficace, avec risque de transformation en LAM), mais ces derniers ont le plus souvent 0-5% de blastes circulants, parfois 5 -19%.
- Les leucémies aiguës lymphoblastiques : morphologie, cytochimie et immunophénotypage permettent le diagnostic différentiel.
- Les syndromes myéloprolifératifs :
 - Leucémie myéloïde chronique en phase d'accélération ou en phase blastique ;
 - Myélofibrose primitive au cours de laquelle on observe une érythromyélocytémie et parfois une petite blastose sanguine ;
 - Phase de dissémination des lymphomes diffus à grandes cellules (parfois aspect se rapprochant de celui de grands monoblastes) : clinique et histoire de la maladie aident à la différenciation

3.7.2 Devant une blastose médullaire

On peut évoquer :

- Une phase de réparation d'agranulocytose ou d'aplasie médullaire : un excès de myéloblastes et de promyélocytes est possible transitoirement. L'histoire de la maladie, l'évolution en quelques jours et l'absence de corps d'Auer sont utiles pour avancer.

- Une partie des syndromes myélodysplasiques : c'est l'aspect de la moelle osseuse qui permet la classification. Le pourcentage de blaste est par définition inférieur à 20%.
- Quelques tumeurs solides : rhabdomyosarcome, cancer du poumon à petites cellules.

3.8 TRAITEMENT

Le schéma thérapeutique des LAM comporte deux grandes phases : l'induction est la consolidation.

- Le traitement d'induction est une phase de réduction tumorale qui a pour objectif d'induire une rémission complète (RC), c'est à dire la disparition apparente de tous les signes cliniques, le rétablissement d'une activité hématopoïétique normale, la réduction du nombre des cellules leucémiques en dessous du seuil de détection dans le sang, la moelle et les sites extra-médullaires. Le schéma le plus classique consiste en une association anthracycline et cytarabine selon le schéma « 3+7 » (68). Cette chimiothérapie intensive va entraîner une aplasie médullaire, d'une durée de trois semaines en moyenne, nécessitant l'hospitalisation du patient avec isolement en milieu protégé.
- Les critères de rémission complète sont (69) :
 - Un pourcentage de blastes médullaires inférieur à 5%,
 - un taux de polynucléaires neutrophiles dans le sang supérieur à 1 Giga/L,
 - un taux de plaquettes supérieur à 100 Giga/L,
 - l'absence de blastes avec corps d'Auer,
 - la présence de moins de 5 % de blastes dans la moelle osseuse,
 - l'indépendance aux transfusions de globules rouges,
 - et la disparition de toutes les atteintes extra-médullaires présentes au diagnostic.
- En cas d'échec, une deuxième cure identique à la première ou utilisant de la cytarabine à fortes doses peut permettre d'obtenir la rémission complète
- La deuxième phase du traitement, la phase de consolidation, a pour objectif l'éradication de la maladie résiduelle. Après trois ans de rémission complète la

probabilité de rechute diminue nettement pour devenir inférieur à 10% (70). plusieurs schémas de traitement de consolidation existent : des cures répétées de cytarabine à haute dose, une cure de cytarabine suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (SCH) ou l'allogreffe.

- L'allogreffe de CSH permet de remplacer les cellules leucémiques résiduelles par la moelle osseuse normale d'un donneur HLA compatible.
- L'autogreffe de CSH consiste en l'administration d'un traitement supralétal suivi de la réinjection des CSH du patient prélevées auparavant en rémission complète et cryopréservées. L'avantage par rapport à l'allogreffe est l'absence de réaction immunologique entre le greffon et l'hôte. Par contre il y a absence de réaction immunologique post-greffe et il existe un risque de réinjection de cellules leucémiques résiduelles.

Le choix du protocole thérapeutique va ensuite dépendre les facteurs pronostics spécifiques de chaque patient à savoir l'âge, la présence de comorbidités et les anomalies cytogénétiques et moléculaires.

Dans le cas des leucémies aiguës promyélocyaires LAM3, la prise en charge thérapeutique présente plusieurs particularités (21). D'une part le traitement des LAM3 est une urgence (71) du fait du risque important de CIVD avec activation aberrante de la fibrinolyse. D'autre part la LAM3 est la seule LAM à bénéficier d'un traitement ciblé ; l'acide tout-transrétinoïque (ATRA), qui induit la différenciation des blastes vers le stade de polynucléaires (72). Le traitement des LAM3 consiste donc en la mise sous ATRA per os le plus rapidement possible après l'établissement du diagnostic puis l'association à une chimiothérapie dans les 3 à 5 jours suivant le diagnostic. L'ATRA est maintenu jusqu'à l'obtention de la rémission. Le traitement de consolidation fait appel à deux ou trois cures d'ATRA associé à de l'anthracycline dans la majorité des cas. Il existe ensuite un traitement d'entretien par chimiothérapie orale à faible dose et par ATRA sur une période de deux ans.

IV. LA CYTOMÉTRIE EN FLUX PEUT-ELLE REMPLACER LA CYTOCHIMIE POUR LA CLASSIFICATION FAB DES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES

4.1 OBJECTIF DE L'ETUDE

Le diagnostic et la classification des leucémies aiguës demeurent un défi pour le biologiste : l'aspect morphologique est souvent difficile à établir et de ce diagnostic biologique dépend une décision thérapeutique urgente avec potentiellement mise en jeu du pronostic vital. Le biologiste doit ainsi fournir le diagnostic le plus précis et le plus rapide possible (73).

Malgré l'importance croissante des données moléculaires et cytogénétiques dans la classification des LA, les analyses morphologiques et immunophénotypiques restent la première étape primordiale du diagnostic biologique des LA.

L'analyse morphologique comprend la lecture au microscope de frottis médullaires colorés au May-Grünwald-Giemsa (MGG) puis dans un deuxième temps de frottis colorés avec des techniques de cytochimie. Les colorations de cytochimie ont été indispensables au diagnostic des LA pendant plus de 20 ans. Ce sont des techniques à faible coût financier qui ont l'avantage d'être accessibles pour la majorité des laboratoires. Mais elles présentent également tous les inconvénients inhérents aux techniques manuelles (Figure 1). En pratique, elles sont maintenant réservées à une poignée de laboratoires spécialisés et peuvent donc être concurrencées par de nouvelles techniques.

Ainsi les techniques de cytochimie perdent de leur intérêt dans un laboratoire où la cytométrie en flux est disponible. En effet l'immunophénotypage par cytométrie en flux présente comme avantages d'utiliser un panel étendu d'anticorps permettant l'étude d'un grand nombre de marqueurs de différenciation, de réaliser une analyse automatisée cellule par cellule sur mille fois plus de cellules que cela n'est possible au microscope et de caractériser ainsi de façon rapide et fiable les cellules sanguines. Tout ceci remet en question le rôle de la cytochimie pour différencier les LAL des LAM (74). Cependant, ce n'est pas le seul rôle des marquages par techniques de cytochimie : la négativité de la MPO est utilisée pour classer les LAM

au sein des sous-groupes FAB et la positivité des butyrates est nécessaire pour la classification des LAM 5.

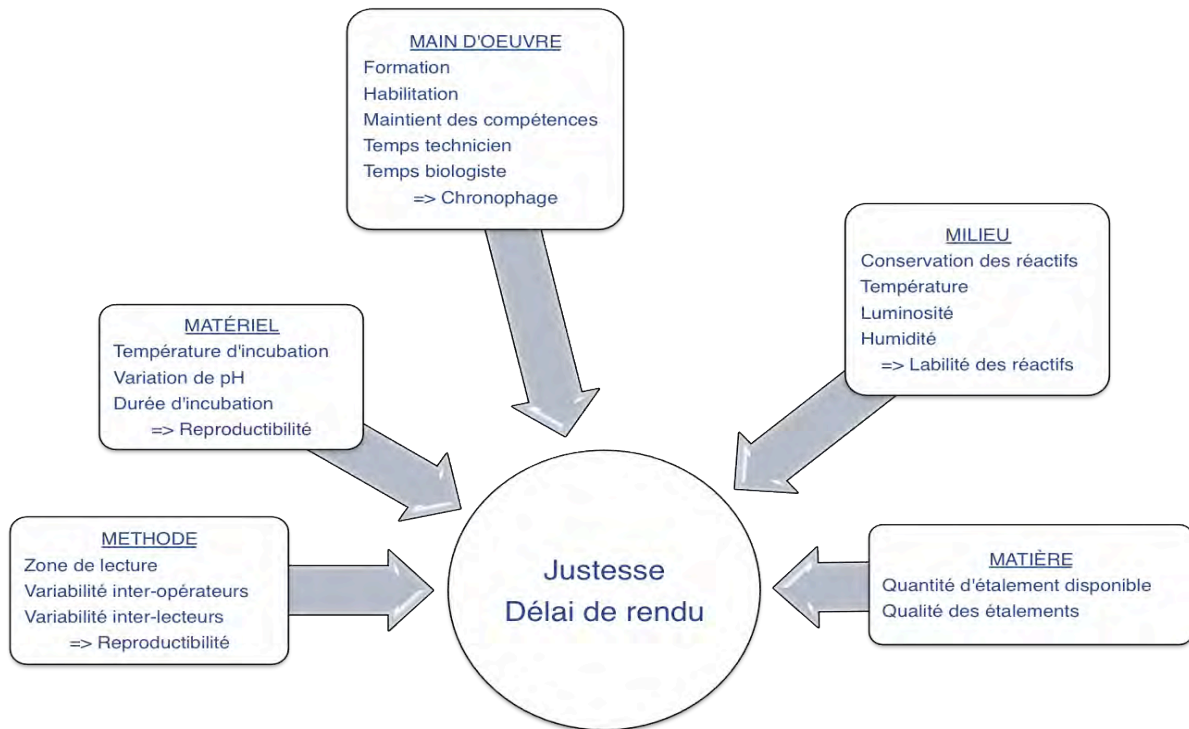


Figure 1 : Analyse de risques – Techniques de cytochimie

Cette étude a pour objectif d'évaluer la place des techniques de cytochimie au laboratoire du CHU de Toulouse en parallèle de la technique d'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la classification FAB des LAM. Nous étudierons plus particulièrement leurs rôles respectifs dans la distinction des sous types M0, M4 et M5 de la classification FAB.

4.2 PATIENTS

Nous avons réalisé une étude rétrospective des cas de LAM diagnostiqués au CHU de Toulouse sur une période de deux ans.

Grâce au logiciel d'extraction de données BO Web XI® du CHU de Toulouse et au système informatique du laboratoire Molis®, nous avons sélectionné, sur la période choisie, tous les patients ayant eu un premier diagnostic de LAM par cytométrie en flux et une analyse morphologique sur un frottis sanguin ou médullaire. Les patients non suivis au CHU de Toulouse, les diagnostics de leucémie aiguë biclonale et les rechutes de leucémie aiguë ont été exclus.

Au total, 196 patients avec une LAM de novo ont été inclus entre le 1^{er} Janvier 2013 et le 31 Décembre 2014 au CHU de Toulouse : 111 hommes et 85 femmes avec un âge médian de 65 ans (de 15 à 87 ans).

4.3 ANALYSE MORPHOLOGIQUE

Le diagnostic de LAM a été établi après analyse microscopique des prélèvements de sang et de moelle osseuse colorés au MGG, par les biologistes experts en cytologie du laboratoire d'hématologie de l'IUC du CHU de Toulouse, en accord avec les critères de la classification FAB : 14 cas de LAM 0 (7%), 47 cas de LAM 1 (24%), 64 cas de LAM 2 (32,6%), 16 cas de LAM 3 (8%), 26 cas de LAM 4 ((13,3%), 19 cas de LAM 5 (9,7%), 9 cas de LAM 6 ((4,6%) et 1 cas de LAM 7 ((0,5%).

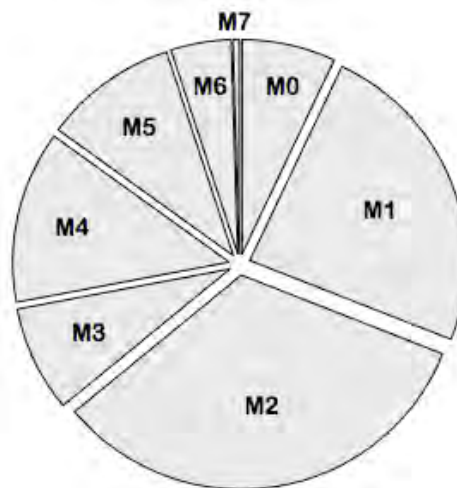


Figure 2 : Répartition des patients selon la classification FAB

Les caractéristiques cliniques et hématologiques des 196 cas sont résumées dans l'annexe [1](#).

Les colorations de cytochimie ont été réalisées selon le mode opératoire utilisé depuis de nombreuses années au laboratoire (Annexes [2](#) et [3](#)).

La cytochimie de la MPO a été réalisé de façon systématique, quel que soit le sous-type FAB, sous réserve d'avoir un nombre d'étalements exploitables suffisant. La cytochimie de l'alpha-naphtyl butyrate estérase (ANBE) n'a été réalisée que dans les cas de suspicion de LAM M4 ou M5 après examen morphologique au MGG et également sous réserve d'un nombre d'étalements exploitables suffisant.

Au total, 178 cas ont été analysés en cytochimie : 141 MPO (12 M0, 40 M1, 42 M2, 9 M3, 17 M4, 14 M5, 6 M6 et 1 M7) et 37 ANBE (21 M4 et 16 M5).

Les caractéristiques cytochimiques retrouvées en fonction de la classification FAB sont résumées dans l'annexe [4](#).

4.4 ANALYSE EN CYTOMÉTRIE EN FLUX

L'analyse en cytométrie en flux des prélèvements de moelle osseuse et/ou de sang périphérique a été réalisée selon le protocole suivant (Annexe [5](#)):

- 100µl de moelle osseuse totale ou de sang total anticoagulé par EDTA ont été incubés pendant 15 minutes dans un tube à hémolyse avec un panel d'anticorps.
- Les globules rouges ont ensuite été lysés avec 2ml de BD FACSLysis (BD biosciences) pendant 15 minutes.
- Les cellules ont été lavées deux fois puis reprises dans 350µl de CellWash (BD biosciences).
- Pour les tubes INTRA1 et INTRA2, au lieu de reprendre les cellules après le lavage, les marquages intracytoplasmiques ont été fait en utilisant le kit Intra-Prep (Beckman-Coulter) en suivant les recommandations du fournisseur, puis les cellules ont été lavées 2 fois et reprises dans 350µl de CellWash (BD biosciences).
- Les tubes ont ensuite été acquis sur un cytomètre Navios (Beckman-Coulter).
- L'analyse des fichiers de données .LMD a été faite sur le logiciel Kaluza.

La population de cellules blastiques a été ciblée sur l'histogramme CD45/SSC.

L'analyse a été réalisée avec un panel étendu d'anticorps monoclonaux (Annexe [6](#)) :

- marqueurs d'immaturité : CD34, HLA-DR
- marqueurs myéloïdes : MPOc, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD65 et CD117
- marqueurs lymphoïdes : CD3c, CD4, CD7, CD10, CD19 et CD79a
- marqueurs associés aux cellules NK : CD16 et CD56
- autres marqueurs : CD64, CD38 et CD123

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

Un marqueur membranaire est considéré positif s'il est exprimé par 20% ou plus des cellules analysées (CD34, HLA-DR, CD7, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD65, CD117, CD4, CD10, CD19, CD16, CD56, CD64, CD38, CD123). Le seuil de positivité est de 10% dans le cas des marqueurs cytoplasmiques très spécifiques (CD79a, CD3 et MPO) (58).

L'immunophénotypage en cytométrie en flux a été réalisé sur 168 prélèvements médullaires et 28 prélèvements sanguins. Les caractéristiques immunophénotypiques des différents sous types FAB sont résumées dans les annexes [7](#).

4.5. RESULTATS

4.5.1 Cytochimie

Comme attendu, les cellules blastiques sont MPO positifs en cytochimie dans la majorité des cas de LAM 1 (33/41), LAM 2 (36/42), LAM 3 (9/9), LAM 4 (14/17) et les LAM 6 (6/6).

Tous les cas de LAM 0, LAM sans différenciation myéloïde, sont négatifs pour la MPO en cytochimie.

Dans le cas des LAM 5, dans lesquelles 80% au plus des cellules blastiques appartiennent à la lignée monocyttaire (monoblastes, promonocytes et monocytes), les blastes sont majoritairement négatifs pour la MPO (9/14) et très majoritairement positifs pour la ANBE (14/15).

Dans le cas des LAM 4, LAM caractérisées par la prolifération des précurseurs granulocytaires et des précurseurs monocytaires, les blastes sont majoritairement MPO positifs (14/17) et ANBE négatifs (20/21).

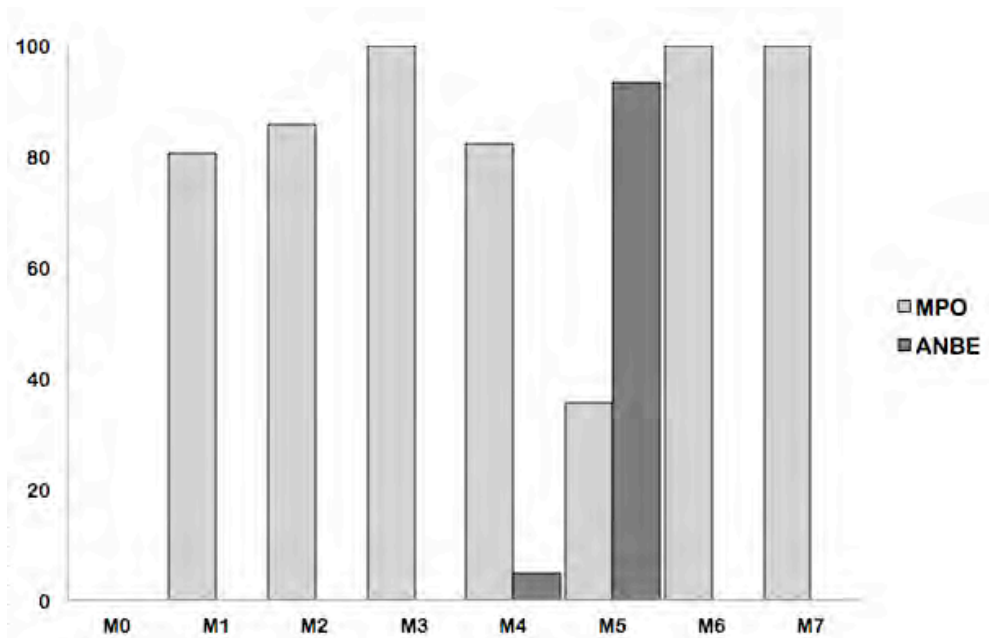


Figure 3: Profils cytochimiques en fonction de la classification FAB

4.5.2 Cytométrie en flux

a) Description des résultats

Les profils d'expression de chaque marqueur et de chaque sous-type FAB sont représentés annexes [8](#) et [9](#).

Les marqueurs myéloïdes CD13, CD33 et CD117 sont exprimés dans la grande majorité des LAM, respectivement 84,7%, 89,3% et 90,3%. Le marqueur MPOc est positif dans 64,8% des cas. Il est négatif comme attendu dans 13 cas de LAM M0 sur les 14 étudiés. Le seul cas de LAM 0 positif pour la MPOc en cytométrie en flux a un pourcentage de positivité qui reste faible (16%).

Les marqueurs d'immaturation HLA-DR et CD34 sont exprimés à 80,8% et 62,8% respectivement. HLA-DR est positif dans tous les cas de LAM M4, M5 et M6, il est positif dans 92,9% des cas de LAM M0. Sur les 16 cas de LAM M3, seulement 4 cas sont positifs pour CD34 et aucun pour HLA-DR.

Parmi les marqueurs lymphoïdes, CD7 est le marqueur le plus souvent exprimé dans les LAM (25,8%), suivi par CD4 (7,7%). Les autres marqueurs lymphoïdes CD3c, CD10, CD19 et CD79a sont détectés dans moins de 5% des cas.

Les marqueurs CD16 et CD56, associés aux cellules NK, sont faiblement exprimés à 4% et 19,4% respectivement. CD38 et CD123 sont très majoritairement positifs, respectivement à 97,4% et 91,8%, alors que le CD65 est peu exprimé (19,2%), sauf dans les LAM M5 où il est présent dans 43,5% des cas.

Le profil immunophénotypique des LAM M3 est typique avec l'absence totale d'expression de HLA-DR (0%), l'absence ou la faible expression de CD34 (25%) et l'expression de CD33 (93,8%) et CD13 (87,5%). CD56 et CD14 ne sont positifs que dans des 7% cas.

Les LAM M0 présentent une forte expression des marqueurs d'immaturité CD34 et HLA-DR, positifs à 92,9%. Les marqueurs myéloïdes CD13 (92,9%), CD33 (71,4%) et CD117 (73,8%) sont aussi positifs dans une grande majorité des cas. On note comme attendu l'absence d'expression de MPOc (7,1%). Les marqueurs lymphoïdes ne sont pas ou peu exprimés, les plus fréquents étant CD7 (26,8%) et CD4 (22,9%).

Les LAM M4 représentent une population hétérogène. CD33, HLA-DR et CD38 sont exprimés dans 100% des cas. D'autres marqueurs myéloïdes sont fortement exprimés, CD13 et CD117 à 84,6%, MPOc à 73,1%. On observe également une expression importante du marqueur lymphoïde CD4 à 52% et du CD123 à 96,2%. CD14 n'est exprimé qu'à 12%.

Tous les cas de LAM 5 sont positifs pour le marqueur d'immaturité HLA-DR et pour le CD38. La majorité est positive pour les marqueurs myéloïdes CD33 (94,7%), CD11b (64,5%), CD13 (63,2%) MPOc (57,9%) ainsi que pour le marqueur lymphoïde CD4 (73,7%) et le marqueur CD123 (94,7%). Le marqueur CD14, dont l'expression est associée à la lignée monocyttaire, n'est positif que dans 26,3% des LAM M5.

b) Identification immunophénotypique des LAM M0

Les LAM M0 sont identifiées en cytochimie grâce à leur négativité pour la MPO. En cytométrie en flux, le marqueur MPOc est considéré comme positif si 10% ou plus des blastes l'expriment. La corrélation entre les deux techniques a été évaluée selon ces critères et est très significative en utilisant le test exact de Fisher ($p < 0,0001$). Le tableau de contingence ci-dessous résume les résultats de ces deux techniques pour les 141 patients ayant eu une analyse cytochimique.

		MPO cytométrie		Total
		+	-	
MPO cytochimie	+	92	12	104
	-	15	22	37
Total		107	34	141

Tableau 5 : Comparaison des techniques de cytochimie et de cytométrie pour l'évaluation de la positivité de la MPO chez 141 patients

En comparant les résultats des 141 MPO obtenus par cytochimie et les résultats de la MPOc obtenus par cytométrie en flux. Les résultats des deux techniques sont corrélés. On observe 12 cas de MPO négative en cytométrie en flux mais positive en cytochimie. Sur ces 12 cas 7 ont une MPO en CMF comprise entre 5 et 9%. Ceci a déjà été observé dans d'autres études et expliqué par différents seuils de sensibilité selon les techniques (76). On observe également 15 cas négatifs en cytochimie mais positifs en cytométrie en flux, avec des pourcentages d'expression allant de 11 à 96%. Cela peut s'expliquer par la présence dans les cellules leucémiques d'une myéloperoxydase non fonctionnelle (la protéine est détectée en cytométrie mais la fonction n'est pas révélée en cytochimie).

En regardant le profil d'expression de la MPOc dans les différents sous-types FAB, on voit que le marqueur MPOc seul ne peut pas suffire pour définir une LAM M0 en cytométrie.

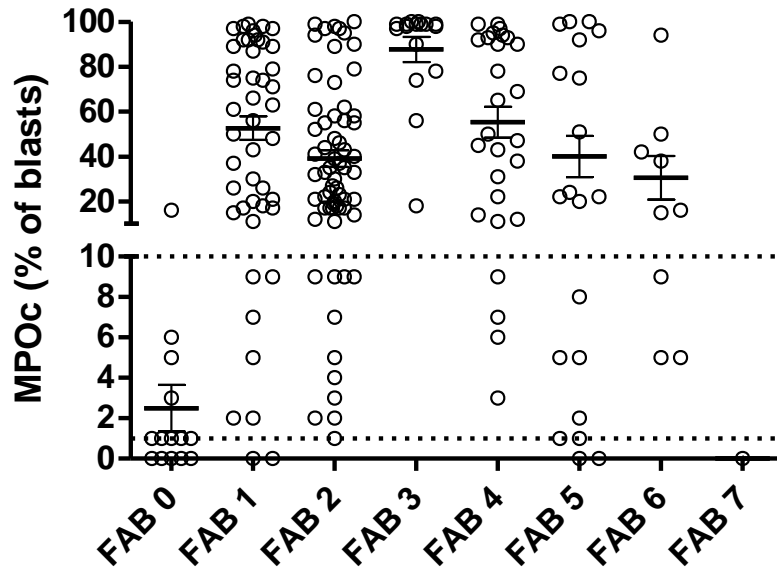


Figure 4 : Pourcentage d'expression du marqueur MPOc en cytométrie en flux

L'intérêt de chaque marqueur pour l'identification des LAM M0 a été étudié à l'aide de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) (Annexe [10](#)). Les marqueurs statistiquement liés à la classification FAB M0 sont CD7, CD11b, CD14, CD16, CD33, CD34, CD56, CD64, CD65, CD79a, HLA-DR et MPOc. Les seuils retenus sont résumés dans le tableau 5. Aucun marqueur ne permet à lui seul d'identifier les LAM M0. Ils sont soit spécifiques mais peu sensibles, avec un risque de faux négatifs, soit sensibles mais peu spécifiques, avec un risque de faux positifs.

Marqueur	Seuil	Se	Spe	p
CD7	> 87%	65	95	0,0002
CD11b	≤ 5%	93	51	< 0,0001
CD14	≤ 0,2%	64	78	0,007
CD16	≤ 0,6%	71	71	0,02
CD33	≤ 95%	100	48	< 0,0001
CD34	> 85%	86	68	0,0003
CD56	≤ 3%	93	44	< 0,0001
CD64	≤ 1,5%	93	72	< 0,0001
CD65	≤ 0,7%	79	82	< 0,0001
CD79a	< 2,3%	64	88	0,006
HLA-DR	> 85%	93	46	0,006
MPOc	≤ 6%	93	87	< 0,0001

Tableau 6 : Seuils des marqueurs d'intérêt pour l'identification des LAM M0

c) Identification immunophénotypique des LAM M5

De même pour l'identification des LAM M5, chaque marqueur d'intérêt a été étudié à l'aide de courbes ROC (Annexe 11). Les marqueurs statistiquement liés à la classification FAB M5 sont CD4, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD34, CD56, CD64, CD65 et CD117. Les seuils retenus sont résumés dans le tableau 6. Ils présentent une bonne spécificité (de 64 à 95%) mais sont peu sensible (< 85%)

Marqueur	Seuil	Se	Spe	p
CD4	> 71%	70	85	0,0004
CD11b	> 44%	65	93	< 0,0001
CD13	≤ 72%	75	59	0,0007
CD14	> 3%	60	81	< 0,0001
CD33	> 92%	85	48	0,0005
CD34	≤ 2%	75	74	0,004
CD56	> 4%	68	64	0,038
CD64	> 87%	65	95	< 0,0001
CD65	> 6%	80	69	< 0,0001
CD117	≤ 18%	60	95	< 0,0001

Tableau 7 : Seuils des marqueurs d'intérêt pour l'identification des LAM M5

d) Construction d'un score de cytométrie pour l'identification des LAM M0 et des LAM M5

Aucun marqueur ne permet à lui seul d'identifier un sous-type FAB. Il faut donc les étudier de façon combinée au sein d'un score prédictif. Pour ce faire, les seuils déterminés par les courbes ROC ont été pondérés en fonction des valeurs de p afin d'établir un score d'identification des LAM M0 et des LAM M5.

Marqueur	Seuil	FAB_0 score
CD7	> 87%	3
CD11b	≤ 5%	4
CD14	≤ 0,2%	2
CD16	≤ 0,6%	1
CD33	≤ 95%	4
CD34	> 85%	3
CD56	≤ 3%	4
CD64	≤ 1,5%	4
CD65	≤ 0,7%	4
CD79a	> 2,3%	2
HLA-DR	> 85%	2
MPOc	≤ 6%	4

Tableau 8 : Score FAB_0

Marqueur	Seuil	FAB_5 score
CD4	> 71%	3
CD11b	> 44%	4
CD13	≤ 72%	2
CD14	> 3%	4
CD33	> 92%	3
CD34	≤ 2%	2
CD56	> 4%	1
CD64	> 87%	4
CD65	> 6%	4
CD117	≤ 18%	4

Tableau 9 : Score FAB 5

Les scores FAB_0 et FAB_5 ont été calculés pour les 196 cas de LAM (Figure 5).

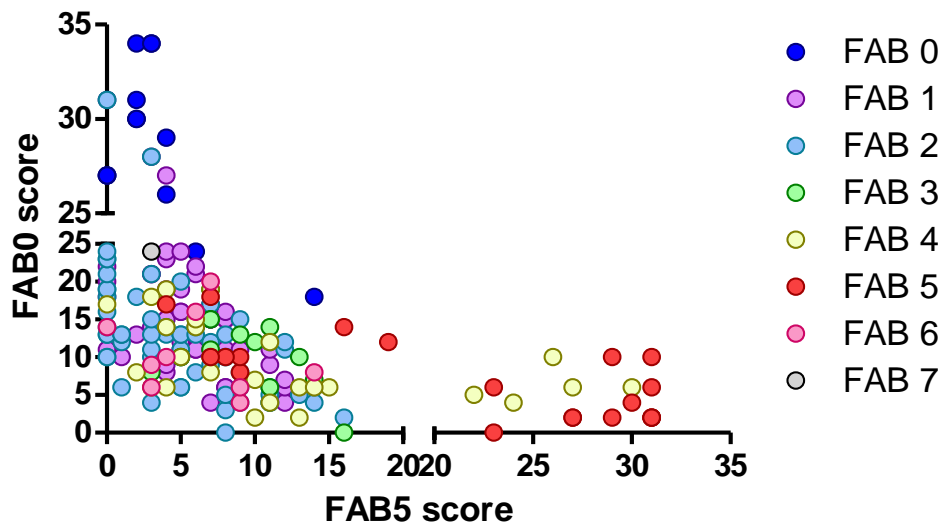


Figure 5 : Distribution des scores FAB_0 et FAB_5

Sur la figure 5 on observe qu'un score FAB_0 à un seuil de 25 permet d'isoler 16 cas dont 12 sont des LAM M0, ce qui correspond à une valeur prédictive positive (VPP) de 75%. On observe 4 faux positifs :

- Parmi les 4 faux positifs, 2 sont des patients initialement classés LAM M1 : le premier a été classé en LAM M1 sur la morphologie myéloblastique des cellules blastiques qui présentaient rarement quelques granulations azurophiles. Les blastes étaient douteux pour la cytochimie de la MPO. Le deuxième a été classé LAM M1 devant la présence de corps d'Auer dans le cytoplasme des blastes et une MPO franchement positive en cytochimie.
- Le 3e cas faux positif était classé initialement en LAM M2 sur l'aspect morphologique au MGG sans que la cytochimie ne soit possible du fait de l'absence d'une quantité suffisante d'étalements. La classification a été difficile du fait de la présence de nombreux noyaux nus et cellules lysées, évoquant un aspect de moelle nécrotique. Il est également à noter que la lignée granulocytaire ne représentait que 5% de l'ensemble des éléments comptés.
- Enfin le 4^e faux positif, classé en LAM M2 également sur l'aspect morphologique au MGG, avec une lignée granulocytaire représentant cette fois ci 17% des cellules nucléées sur le myélogramme, n'a pas été étudié en cytochimie non plus.

Le score FAB_0 présente une très bonne valeur prédictive négative (VPN) à 99% (175/177) quand on regarde l'ensemble des sous-types FAB. En ne prenant en compte que les LAM dites myéloblastiques, LAM M0, M1 et M2, qui en pratique sont difficiles à différencier morphologiquement les unes des autres, la VPN est également excellente à 98% (105/107).

Le score FAB_5 avec un seuil à 20 a une VPP de 71% (12/17). On observe 5 faux positifs:

- Le premier classé en LAM M4 n'avait pas une quantité suffisante d'étalement pour être testé en cytochimie. La classification M4 a été arrêtée sur l'aspect morphologique de la population blastique constituée de myéloblastes (50%) et promonocytes (12%) (Annexe [12](#)). La lignée granulocytaire représentait 18% des éléments du myélogramme.
- Le 2^e faux positif présentait 86% de blastes d'aspect myéloïde mais polymorphe et 8% de promonocytes sur le myélogramme. L'ANBE en cytochimie a été rendue négative mais avec un seuil limite (Annexe [13](#)).
- Le myélogramme du 3^e cas faux positif comportait 49% de blastes myéloïdes et 20% de promonocytes très dysmorphiques. En cytochimie, les blastes étaient faiblement positifs pour la MPO et semblaient négatifs pour l'ANBE. Les blastes sont cependant difficilement différenciables des promonocytes qui sont eux positifs pour l'ANBE (Annexe [14](#)).
- Le 4^e cas faux positif présentait au myélogramme 40% de blastes d'aspect myéloïde devant un cytoplasme parfois granuleux, et 48% de promonocytes. Les blastes apparaissent bien positifs pour la MPO en cytochimie. L'ANBE en cytochimie, rendue négative, est plus douteuse (Annexe [15](#)).
- Enfin, le 5^e cas faux positif, avec un myélogramme comportant 53% de blastes, 10% de promonocytes, 11% de monocytes et 20% de lignée granulocytaire a également été classé en LAM M4 sur l'aspect morphologique. La MPO rendue positive en cytochimie apparaît toutefois douteuse (Annexe [16](#)). L'ANBE est négative en cytochimie.

La VPN du score FAB_5 à un seuil à 20 est de 95% (168/176). Lorsque l'on regarde uniquement le groupe des LAM M4 et M5, la VPN est de 72% (21/29). On observe en effet 8 faux négatifs :

- 3 cas ont été classés LAM M5 en l'absence de cytochimie de l'ANBE. Le premier cas avec 7% de promonocytes, 26% de lignée granulocytaire et 21% de blastes à rapport nucléocytoplasmique intermédiaire et à cytoplasme basophile finement granuleux dans la moelle osseuse (Annexe [17](#)). Le 2^e avec 78% de blastes d'aspect similaire (Annexe [18](#)), 4% de promonocytes et 1% de lignée granulocytaire sur le myélogramme. Le 3^e faux positif présentait 83% de blastes d'aspect monoblastique avec un rapport nucléocytoplasmique bas et un cytoplasme basophile souvent vacuolé (Annexe [19](#)). La lignée granulocytaire ne représentait que 4% des cellules du myélogramme.
- Le 4^e faux négatif a été classé LAM M5 d'emblée sur l'aspect morphologique des blastes au MGG, évocateur de monoblaste. La MPO en cytochimie, rendue négative, apparaît douteuse après relecture. L'ANBE en cytochimie est positive (Annexe [20](#)).
- Dans le cas du 5^e faux négatif, les 60% de blastes sur le myélogramme étaient moins typiques avec un rapport nucléocytoplasmique moyen et un noyau souvent irrégulier. L'ANBE en cytochimie rendue positive est cependant très difficile de lecture et champs-dépendant (Annexe [21](#)).
- Concernant le 6^e cas faux négatif, les cellules blastiques représentaient 70% des éléments du myélogramme avec un aspect cytologique de LAM M5. On notait par ailleurs 6% de promonocytes et 18% de lignée granulocytaire, avec une MPO et une ANBE en cytochimie bien positives (Annexe [22](#)).
- Le 7^e cas faux négatif avait pour particularité d'être un double diagnostic de leucémie lymphoïde chronique et de leucémie aiguë myéloïde. Le myélogramme comportait 40% de blastes d'aspect plutôt myéloblastique, 17% de promonocytes et 5% de lignée granulocytaire au total. La MPO et l'ANBE en cytochimie, rendues positives, apparaissent douteuses après reprise des frottis (Annexe [23](#)).
- Le dernier cas faux négatif était d'emblée évocateur de LAM M5 sur l'aspect

des blastes au MGG. Cependant les colorations de cytochimie, rendues MPO négative et ANBE positive, apparaissent douteuses après relecture (Annexe [24](#)).

Les résultats du score FAB_5 avec un seuil à 20 sont insuffisants, tout particulièrement dans le groupe des LAM de M4 et M5, le groupe le plus intéressant lorsqu'on s'interroge sur la nécessité de faire des butyrates en cytochimie. Les difficultés de classement ne semblent pas liées à la présence de promonocytes (Figure 6).

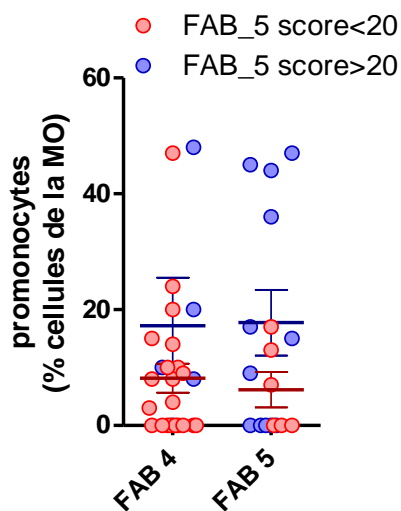


Figure 6 : Distribution du pourcentage de promonocytes médullaires dans les LAM M4 et LAM M5

Le score FAB_5 n'est corrélé avec la classification par cytochimie que dans un peu plus de deux tiers des cas, positifs ou négatifs. Nous avons donc cherché à améliorer le FAB_5 score par des techniques d'analyse originales des données de cytométrie en flux: analyse en radar, analyse en composantes principales et analyse en cluster.

e) Analyse en radar

L'analyse en radar consiste à potentialiser les marqueurs les plus instructifs en les combinant dans un graphe en forme de toile d'araignée ou de radar. La mesurande n'est plus le pourcentage de cellules positives mais la surface de la zone délimitée par les différents paramètres choisis. Pour cibler la population d'intérêt, on peut jouer sur le nombre de paramètres, l'ordre de leur association ou encore le degré d'écartement entre différents axes.

Cette méthode d'analyse est facile d'accès, elle ne nécessite aucun logiciel d'analyse autre qu'un tableur type Excel. Elle permet une analyse progressive des données, nécessaire dans le contexte d'un laboratoire de diagnostic de routine (une fois que le seuil a été déterminé). Cette méthode est de plus facile à interpréter et peut conserver un sens biologique selon l'association des paramètres (signature de maturation dans notre cas), mais elle peut être complexifiée si besoin en jouant sur les trois leviers modifiant l'aire du radar (nombre de paramètres/séquence/angle entre deux axes). À noter que l'analyse en radar est indépendante de la technique d'obtention des valeurs de cytométrie en flux (nombre de couleurs, construction des panels)

Cependant, l'analyse en radar ne permet qu'une augmentation faible de la VPP et de la VPN par rapport une analyse simple des données de cytométrie en flux et par rapport aux scores. De plus, les résultats obtenus sont dépendants de la méthode d'analyse primaire des données de cytométrie en flux (mesure de l'intensité de fluorescence ou % de cellules positives). On peut également regretter que l'optimisation des trois variables (nombre de paramètres/séquence/angle entre deux axes) puisse vite devenir complexe à gérer et donc nécessiter un logiciel de calcul.

L'analyse en radar a été réalisée sur les marqueurs CD11b, CD64, CD65, CD34 et CD117, afin de créer un profil axé sur la différenciation (Annexe [25](#)).

En représentant la surface du polygone obtenu par l'analyse en radar en fonction des différents sous-types FAB (Figure 7), on observe que les LAM M5 ont une surface en moyenne plus élevée (> 10000) que les autres sous-types de LAM. Cependant, on observe les mêmes faux négatifs que ceux obtenus avec le FAB_5 score.

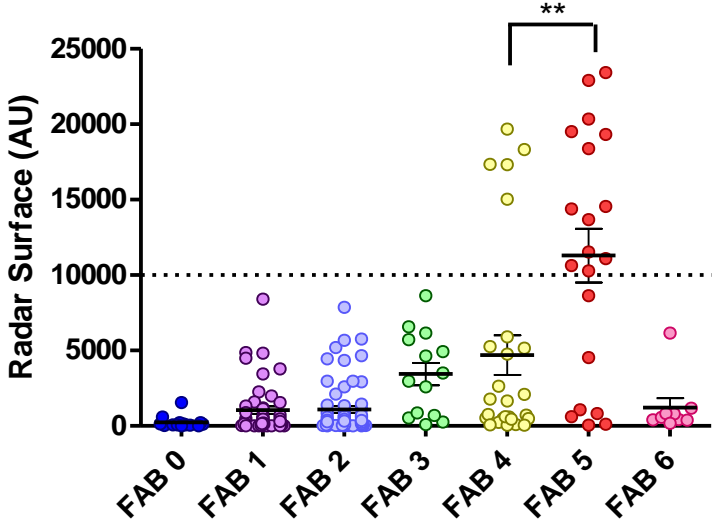


Figure 7 : Distribution des surfaces de radar en fonction des sous-types FAB de LAM

f) Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (PCA) est une méthode multifactorielle qui consiste à résumer de la façon la plus fidèle possible un grand ensemble de données pour chaque membre d'une population d'étude. Ce résumé engendre une perte d'information (l'analyse multidimensionnelle étant réduite à un ou deux axes), mais au profit de la sélection des informations les plus pertinentes et donc d'une meilleure interprétation. Ce modèle d'analyse donne des indications sur la nature, la force et la pertinence des liens qui existent entre les données étudiées, afin de découvrir quelles sont les tendances dominantes de l'ensemble.

Grâce aux graphiques qu'elle fournit, l'analyse en composantes principales permet d'appréhender simplement une grande quantité de résultats. Elle offre un résumé et une vue complète des relations existantes entre les variables quantitatives d'une population d'étude. L'analyse en composantes principales est également une méthode très souple, puisqu'elle peut s'appliquer à de nombreux types de données différents, en contenu et en taille, à partir du moment où ces données sont quantitatives et organisées sous forme individus/variables.

L'inconvénient de cette technique de résumé de données est que la perte d'information engendrée risque d'occulter des caractéristiques pourtant représentatives dans certains cas particuliers.

Nous avons réalisé une première analyse en composantes principales avec les 20 marqueurs de cytométrie en flux sur 193 LAM, tous sous-types FAB confondus (Annexe [26](#)). Cette analyse comporte deux axes : un premier axe qui met en évidence les marqueurs CD11b, CD64, CD117, CD65, CD4 et CD14 ; un deuxième axe qui met en évidence CD79a, CD33, MPOc, CD34 et HLA-DR. La représentation de ces deux axes sur un graphique (Figure 8) permet d'isoler une majorité des LAM M5 de l'ensemble des LAM si on considère un axe 1 supérieur ou égal à 200 mais il persiste des faux négatifs et des faux positifs.

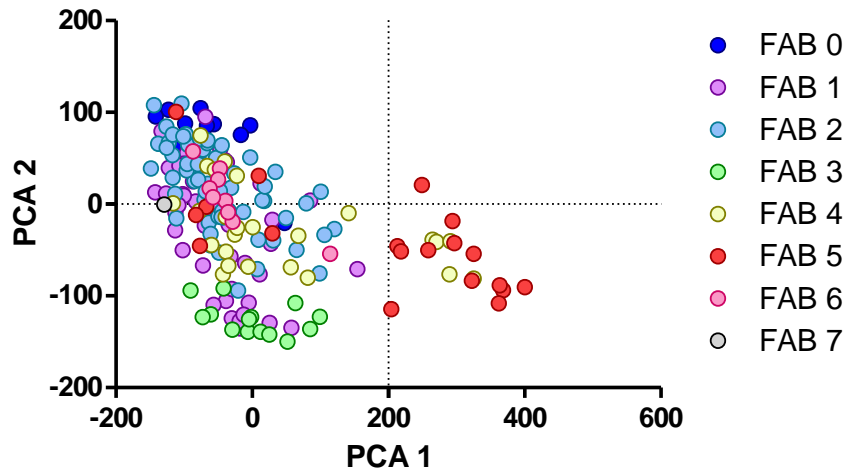


Figure 8 : Représentation graphique des axes 1 et 2 après analyse en composantes principales avec l'ensemble des marqueurs et l'ensemble des LAM

En regardant la répartition de l'axe 1 en fonction des sous-types FAB (Figure 9), on retrouve un graphique similaire à celui construit avec l'analyse en radar. On observe cependant moins de faux négatifs (6 versus 8).

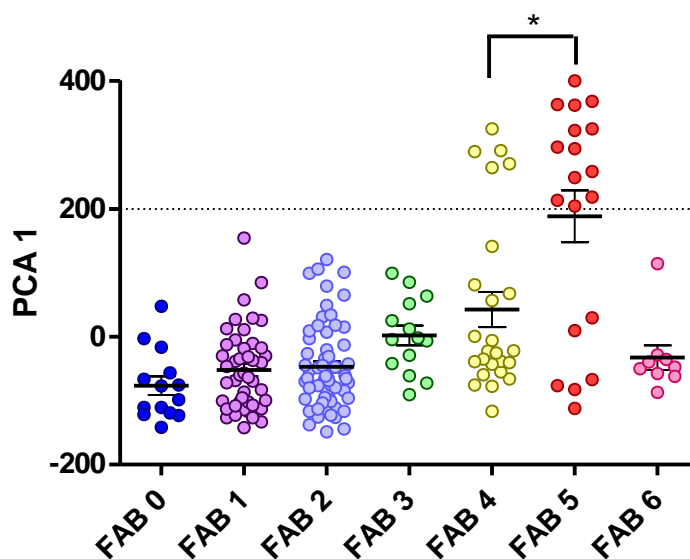


Figure 9 : Répartition de l'axe 1 en fonction de la classification FAB, après analyse en composantes principales avec l'ensemble des marqueurs et l'ensemble des LAM

En effectuant une analyse en composantes principales avec les 20 marqueurs mais uniquement sur les LAM M4 et LAM M5 (Annexe 27), on trouve également un modèle à un seul axe discriminant comportant 9 marqueurs (CD64, CD117, CD11b, CD4, CD65, CD13, CD56, CD34 et CD14). Cet axe permet une séparation des LAM M5 pour un seuil supérieur à 100, mais comporte toujours 5 faux positifs et 6 faux négatifs.

On peut représenter les résultats sur un graphique montrant la répartition de l'axe 1 au sein des sous-types LAM M4 et M5 (Figure 10).

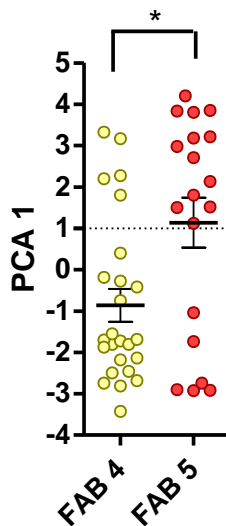


Figure 10 : Répartition de l'axe 1 en fonction des sous-types M4 et M5, après analyse en composantes principales avec l'ensemble des marqueurs et l'ensemble des LAM

g) Analyse en cluster

L'analyse en cluster est une méthode de classification dont l'objectif est de répartir les éléments d'un ensemble en groupes, c'est à dire d'établir une partition de cet ensemble. Différentes contraintes sont imposées, chaque groupe devant être le plus homogène possible, et les groupes devant être les plus différents possibles entre eux.

L'analyse en cluster a été réalisée grâce à l'algorithme SPADE (75). Il s'agit d'un algorithme particulièrement adapté aux données de cytométrie en flux, qui permet l'analyse d'un grand nombre de marqueurs et qui aboutit à une répartition en groupes phénotypiques hiérarchisés. La première étape de SPADE est de répartir la population étudiée en fonction de la densité de chaque marqueur étudié. Au sein du nuage de points ainsi obtenus, l'algorithme va ensuite regrouper les points ayant un phénotype similaire, c'est à dire ayant la même intensité d'expression des marqueurs étudiés. Enfin, SPADE extrait et modélise le nuage de points ainsi formés en une structure en branche d'arbre, de façon à relier tous les groupes phénotypiques entre eux avec un minimum de distance totale. On peut ensuite étudier le comportement des marqueurs d'intérêts en appliquant à chaque nœud un code couleur correspondant au pourcentage médian d'intensité d'expression du marqueur

Cette méthode de classification présente comme avantages de permettre l'exploration d'un nombre important de données, et d'en déduire l'articulation et la hiérarchisation de façon objective, sans avoir à définir un schéma au préalable (analyse non supervisée). En partant d'un échantillonnage basé sur la densité des marqueurs, cette méthode permet une représentation de tous les types cellulaires, même rares. Enfin, la représentation en branche d'arbre permet une visualisation simple de la structure globale des données et du comportement de chaque marqueur au sein de la population d'étude.

Toutefois, le caractère limitant de cette classification est le choix des marqueurs à partir duquel est construit l'arbre. En effet si le groupe de marqueur choisi n'est pas représentatif de la population étudiée, les relations qui en découlent ne le seront pas non plus.

L'algorithme SPADE a été réalisé sur l'ensemble des LAM avec les marqueurs CD45, CD34, CD117, CD65, CD11b, CD16, CD14 et CD7, marqueurs les plus pertinents pour caractériser les LAM M5. L'arbre ainsi créé est représenté figure 11. On observe un regroupement de cluster en 8 branches. Chaque groupe correspond à une population cellulaire ayant un profil d'expression des différents marqueurs unique.

Nous avons ensuite observé le comportement des marqueurs en fonction de leur intensité d'expression, annexe 28. Cela permet d'identifier les types cellulaires correspondant à chaque branche de l'arbre.

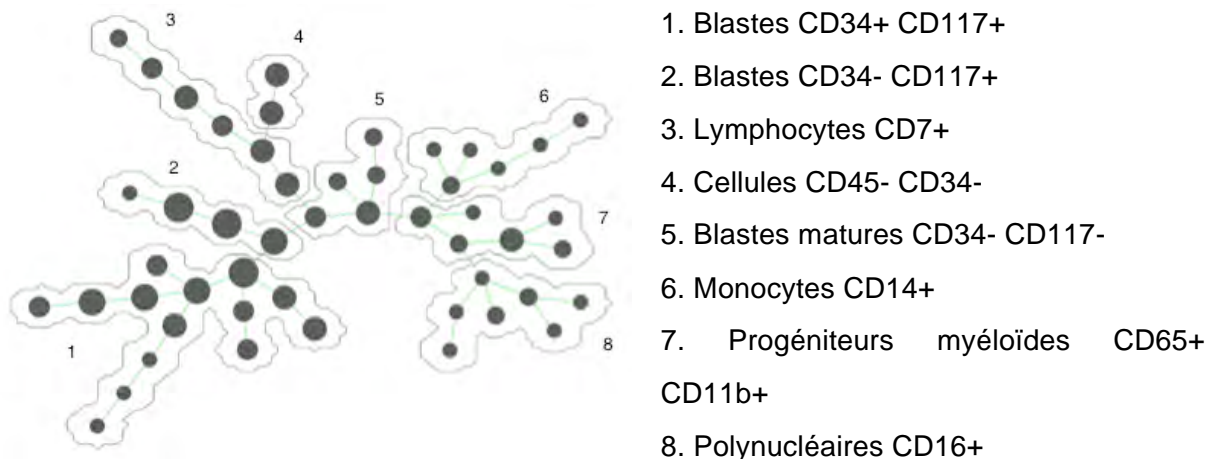


Figure 11 : Arbre SPADE construit avec les marqueurs CD45, CD34, CD117, CD65, CD11b, CD16, CD14 et CD7 des 196 cas de LAM

Ainsi le groupe de clusters n°5 comporte des populations cellulaires CD45 faibles, CD34- et CD117-, ce qui correspond à une population de blastes matures. Le groupe de clusters n°6 comporte lui des cellules exprimant le plus fortement le marqueur CD14 ce qui correspond à une population monocyttaire.

La figure 12 représente la répartition de la taille du groupe de clusters n°6 par rapport à toutes les cellules matures (groupes de clusters n°3, 6, 7 et 8), et celle du groupe de cluster 5 par rapport à tous les blastes (groupes de clusters n°1, 2 et 5), au sein de la classification FAB. On observe que les LAM M4 ont un pourcentage de cellules monocytaires parmi les cellules matures plus important que les autres groupes FAB (> 40%), ce qui n'est pas forcément le cas pour les LAM M5. Par contre les LAM M5 présentent un pourcentage de blastes matures plus important que les autres groupes FAB (> 90%), ce qui est cohérent avec la nature monoblastique des LAM M5. On retrouve cependant toujours des cas faux négatifs et des cas faux positifs.

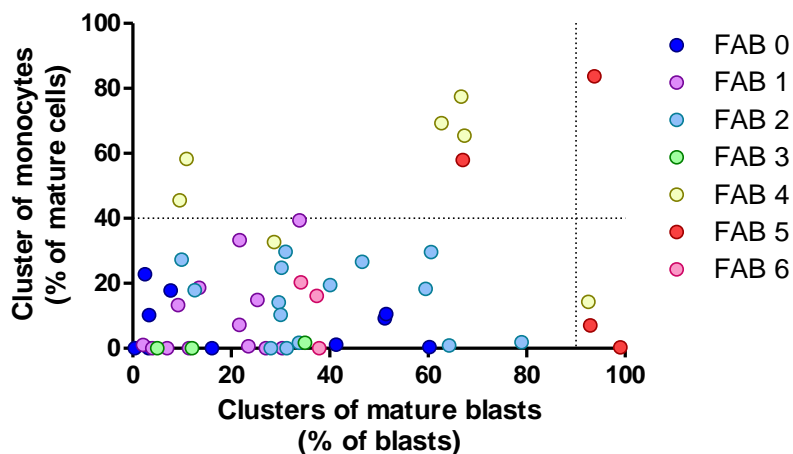


Figure 12 : Répartition des groupes de cluster 5 et 6 en fonction de la classification FAB

V. DISCUSSION

Cette étude rétrospective de 196 cas de LAM diagnostiquées au CHU de Toulouse décrit les caractéristiques immunophénotypiques des sous-groupes de la classification FAB.

Tous les cas sont classés initialement au sein des sous-groupes FAB grâce aux analyses morphologiques et cytochimiques. Cette première étape du diagnostic au laboratoire comporte néanmoins plusieurs limites : la classification des cellules au microscope peut s'avérer dans certains cas évident, comme dans les LAM M3 avec présence de corps d'Auer en fagot, mais le plus souvent celle-ci fait débat devant des morphologies cellulaires intermédiaires ou devant une population blastique hétérogène. Or de ces caractéristiques morphologiques dépendent la détermination précise du nombre de cellules blastiques, l'identification et la détermination de leur degré de maturation, qui sont des données essentielles pour éliminer les diagnostics différentiels des LAM et pour évaluer le pronostic. Il a ainsi été développé les outils de cytochimie afin d'aider le biologiste à déterminer la lignée cellulaire impliquée dans le processus leucémique. En cas de doute devant une LAM peu différenciée, la cytochimie de la MPO permet de trancher entre une LAM M0 (MPO-) et une LAM M1 (MPO+). En cas de LAM à composante monocytaire, la cytochimie de l'ANBE est utilisée pour déterminer s'il s'agit d'une LAM M4 (ANBE-) ou d'une LAM M5 (ANBE+). Ces réactions ont en effet l'avantage d'être sensibles mais présentent les inconvénients d'être peu spécifiques et d'être opérateurs-dépendant tant dans la réalisation de la coloration que dans sa lecture. De plus ce sont des techniques manuelles chronophages dont les résultats sont rendus avec un délai de plusieurs jours, délai incompatible avec l'urgence d'un diagnostic tel que celui de la leucémie aiguë myéloïde.

En parallèle s'est développé l'immunophénotypage en cytométrie en flux qui permet l'identification et la caractérisation précise des cellules, la discrimination des cellules pathologiques par rapport aux cellules normales et l'identification de phénotypes aberrants.

Nous avons ainsi voulu déterminer dans cette étude en quoi l'accès à la cytométrie en flux pour le phénotypage des cellules blastiques des leucémies aiguës myéloïdes redéfinit la place de la cytochimie au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse.

Nous avons ensuite analysé la distribution de 20 marqueurs de cytométrie en flux, 17 marqueurs membranaires et 3 marqueurs cytoplasmiques, au sein des sous-groupes FAB. En particulier nous avons axé cette étude sur les sous-groupes FAB dont la reconnaissance morphologique est la plus délicate. Il s'agit d'une part des LAM M0, difficiles à distinguer des autres LAM myéloïdes M1 et M2, et d'autre part de la distinction des LAM monocytaires entre elles, les LAM M4 et M5.

Grâce à l'analyse des courbes ROC de chaque marqueur, nous avons sélectionné les antigènes les plus pertinents pour l'identification des LAM M0 et des LAM M5. Il s'agit des marqueurs CD7, CD34, HLA-DR, CD11b, CD14, CD16, CD33, CD56, CD64, CD65, CD79a et MPOc dans les cas des LAM M0. Pour les LAM M5, ce sont les marqueurs CD4, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD34, CD56, CD64, CD65 et CD117 qui ressortaient. Mais aucun marqueur ne présentait une sensibilité et une spécificité suffisante pour permettre à lui seul l'identification des LAM M0 ou des LAM M5 par son caractère positif ou négatif.

Nous avons donc étudié ces marqueurs en combinaison au sein d'un score pondéré, le score FAB_0 pour les LAM M0 et le score FAB_5 pour les LAM M5.

Les résultats du score FAB_0 avec un seuil à 25 sont satisfaisants. Ce score permet déjà d'émettre l'hypothèse d'une LAM « autre que M0 » dans la très grande majorité des cas avec une faible probabilité de se tromper : VPN > 98% que l'on considère toutes les LAM ou uniquement le groupe des M0, M1, M2 dans lequel la question de la positivité de la MPO se pose plus souvent. Pour les cas positifs, il reste statistiquement une chance sur 4 de se tromper en affirmant que ce sont des LAM de type LAM M0 (VPP = 75%). Les probabilités liés au score FAB_0 permettent ainsi soit (i) de réduire drastiquement le nombre de réalisation de MPO en cytochimie (16 au lieu de 141, soit une réduction de 88%, si la VPP ne satisfait pas le biologiste) soit

(ii) de compléter le score par des critères morphologiques (présence de grains, de signes de maturation, etc...) pour discerner les 2,5% de cas faux positifs tout en se passant de la cytochimie.

Les résultats du score FAB_5 avec un seuil à 20 sont insuffisants pour la discrimination entre les LAM M4 et les LAM M5. Nous avons donc cherché à améliorer le FAB_5 score par des techniques d'analyse originales des données de cytométrie en flux: analyse en radar, analyse en composantes principales et analyse en cluster.

Ces différentes méthodes d'analyse permettent à chaque fois d'isoler la majorité des cas de LAM M5, mais avec la présence récurrente de 5 cas faux positifs et de 8 cas faux négatifs. Nous avons repris un à un l'analyse morphologique de ces cas discordants. Sur les 5 cas faux positifs, tous étaient initialement classés en LAM M4 : 1 n'a pas été analysé en cytochimie faute d'étalement suffisant, 3 étaient douteux pour l'ANBE ce qui peut remettre en cause la classification FAB ; le dernier faux positif était clairement négatif pour l'ANBE. Cela pose d'une part la question des conditions de réalisation de la coloration, très sensible aux variations de pH et de température (77), et d'autre part la question de l'existence de faux négatifs par défaut d'expression du substrat de l'ANBE (35). Sur les 8 cas faux négatifs, 3 n'ont pas été testés en cytochimie et ont été classés LAM M5 uniquement sur l'aspect morphologique au MGG ; 4 présentaient une cytochimie de l'ANBE douteuse du fait de la qualité des étalements et/ou de la qualité de la coloration. Le dernier cas faux négatif présentait une ANBE en cytochimie nettement positive, ce qui confirme l'appartenance des cellules blastiques à la lignée monoblastique.

VI. CONCLUSION

L'immunophénotypage par cytométrie en flux est devenu indispensable au diagnostic biologique des leucémies aiguës myéloïdes, notamment pour assurer l'origine myéloïde des blastes leucémiques. Cette technique reste néanmoins sous-exploitée pour la caractérisation des LAM. Bien qu'elle permette, par exemple, d'identifier phénotypiquement une LAM M3, par l'absence d'expression de CD34 et de HLA-DR, le caryotype prévaut. De même, le phénotype des blastes pourrait orienter la classification mais la cytochimie tient encore une place importante en onco-hématologie, derrière la biologie moléculaire ou la cytogénétique.

Dans cette étude nous avons voulu exploiter la masse d'information apportée par l'immunophénotypage des LAM afin de n'avoir recours que de façon raisonnée et parcimonieuse à la cytochimie, technique très sensible mais coûteuse en temps et en formation.

Actuellement, plus de 20 marqueurs sont analysés par cytométrie en flux de façon combinée ; mais aucun, seul, n'est à même de séparer les différents sous-types FAB. Ceci pourrait-être expliqué par le fait que la classification FAB ne repose pas uniquement sur des critères morphologiques mais aussi sur la présence et le nombre de progéniteurs granulocytaires, monocytaires ou érythrocytaires.

Pour essayer d'accorder les résultats cytochimiques et immunophénotypiques, nous avons développé des scores basés sur l'expression de marqueurs en cytométrie : le score FAB_0, pour l'identification des LAM M0 et le score FAB_5 pour l'identification des LAM M5.

Nous proposons d'utiliser le score FAB_0 en complément de l'analyse morphologique. Sa VPN, supérieure à 98% devrait permettre de diminuer de plus de 80% le nombre de cas nécessitant la réalisation d'une cytochimie de la MPO. Il sera cependant nécessaire de valider ce score sur une plus grande cohorte de LAM M0.


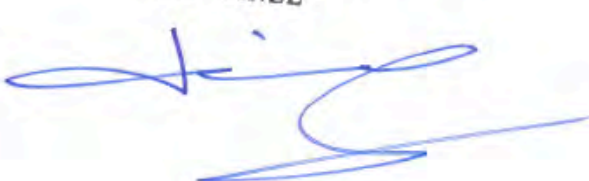
Nous avons également développé un score FAB_5 et réalisé des analyses en radar, en composantes principales et en clusters afin d'isoler les LAM M5 par cytométrie en

flux. Les différentes analyses effectuées n'ont pas permis de différencier efficacement les LAM M5 des LAM M4 (VPN et VPP inférieure à 80% dans tous les cas). Ceci implique que l'utilisation de la cytochimie de l'ANBE devrait rester nécessaire dans le laboratoire d'hématologie. Cependant, nous pouvons remarquer que de façon récurrente, les mêmes cas de LAM sont faussement positifs ou négatifs, quelle que soit la méthode d'analyse. Ceci pourrait permettre d'envisager le score FAB_5, non pas en remplacement de la cytochimie, mais plutôt comme une aide décisionnel pour limiter le recours à la cytochimie. Il serait ainsi intéressant de vérifier si, de façon prospective, les discordances de classification sont liées à l'analyse morphologique ou aux capacités discriminantes des différents algorithmes.

D'autre part on peut remarquer que les différentes méthodes d'analyses permettent de très nettement détacher deux groupes de LAM M4 et deux groupes de LAM M5. Il serait intéressant de savoir si ces patients partagent des caractéristiques communes en confrontant ces données aux informations cliniques et génétiques.

Toulouse, le 09 11 2015

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Purpan
J.P VINEL



BIBLIOGRAPHIE

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.
2. Fey MF, Dreyling M, On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Acute myeloblastic leukaemias and myelodysplastic syndromes in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May 1;21(Supplement 5):v158–61.
3. Club de réflexion en hématologie, Dombret H. Utilisation des facteurs de croissance hématopoïétiques: guide pratique. Paris: J. Libbey Eurotext; 1996.
4. Stevens A, Lowe JS. *Human histology*. 2. ed. London: Mosby; 1997. 408 p.
5. Kierszenbaum AL. *Histologie et biologie cellulaire: une introduction à l'anatomie pathologique*. Bruxelles: De Boeck; 2006.
6. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. 1995 Apr 15;75(8):2186–95.
7. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2099–107.
8. Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. *Bone marrow pathology*. Chicago: ASCP Press; 2010.
9. Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;82–101.
10. Rousselot P, Hardas B, Patel A, Guidez F, Gäken J, Castaigne S, et al. The PML-RAR alpha gene product of the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. *Oncogene*. 1994 Feb;9(2):545–51.

11. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2322–33.
12. Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:150–74.
13. Angelescu S, Berbec NM, Colita A, Barbu D, Lupu AR. Value of multifaced approach diagnosis and classification of acute leukemias. *Mædica*. 2012 Sep;7(3):254–60.
14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnack HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451–8.
15. Konoplev S, Bueso-Ramos CE. Advances in the pathologic diagnosis and biology of acute myeloid leukemia. *Ann Diagn Pathol*. 2006 Feb;10(1):39–65.
16. Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(3):737–45.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnack HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. 1991 Jul;78(3):325–9.
18. British Committee for Standards in Haematology, Milligan DW, Grimwade D, Cullis JO, Bond L, Swirsky D, et al. Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. *Br J Haematol*. 2006 Nov;135(4):450–74.
19. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019–32.
20. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J,

et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Dec;17(12):3835–49.

21. Huguet F, Récher C. Acute leukemia in adults. *Hématologie*. 2011;6;(3):203–24.

22. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 2006 Nov 25;368(9550):1894–907.

23. Seymour JF, Pierce SA, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH. Investigation of karyotypic, morphologic and clinical features in patients with acute myeloid leukemia blast cells expressing the neural cell adhesion molecule (CD56). *Leukemia*. 1994 May;8(5):823–6.

24. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Jun;50(3):197–222.

25. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453–74.

26. Hayhoe FGJ, Flemans RJ. *A colour atlas of haematological cytology*. 3rd ed. London: Wolfe; 1992. 384 p.

27. Bain BJ. *Leukaemia diagnosis* [Internet]. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010 [cited 2015 Oct 21]. Available from: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=485659>

28. Hayhoe FGJ, Quaglino D, De Pasquale A. *Haematological cytochemistry*. 2nd ed. Edinburgh;New York: Churchill Livingstone; 04.

29. Mufti GJ, editor. *An atlas of malignant haematology: cytology, histology and cytogenetics*. London: Martin Dunitz; 1996. 424 p.

30. Swirsky DM, Richards SJ. *Laboratory diagnosis of acute myeloid leukaemia*.

Best Pract Res Clin Haematol. 2001 Mar;14(1):1–17.

31. <http://hematocell.univ-angers.fr>.

32. Nauseef WM, Olsson I, Arnljots K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase--a marker for myeloid cell differentiation. *Eur J Haematol*. 1988 Feb;40(2):97–110.

33. Moloney WC, Mcpherson K, Fliegelman L. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1960 May;8:200–7.

34. Dunphy CH, Orton SO, Mantell J. Relative Contributions of Enzyme Cytochemistry and Flow Cytometric Immunophenotyping to the Evaluation of Acute Myeloid Leukemias With a Monocytic Component and of Flow Cytometric Immunophenotyping to the Evaluation of Absolute Monocytoses. *Am J Clin Pathol*. 2004 Dec 1;122(6):865–74.

35. Bozdech MJ, Bainton DF. Identification of alpha-naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *J Exp Med*. 1981 Jan 1;153(1):182–95.

36. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Nov;56(2):223–34.

37. Browman GP, Neame PB, Soamboonsrup P. The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. *Blood*. 1986 Oct;68(4):900–5.

38. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):2863–92.

39. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004 Jan;28(1):43–8.

40. Casasnovas RO, Campos L, Mugneret F, Charrin C, Béné MC, Garand R, et

al. Immunophenotypic patterns and cytogenetic anomalies in acute non-lymphoblastic leukemia subtypes: a prospective study of 432 patients. *Leukemia*. 1998 Apr 1;12(1):34–43.

41. Al-Mawali A, To LB, Gillis D, Hissaria P, Mundy J, Lewis I. The presence of leukaemia-associated phenotypes is an independent predictor of induction failure in acute myeloid leukaemia: LEUKAEMIA-ASSOCIATED PHENOTYPES IN AML. *Int J Lab Hematol*. 2009 Jan 11;31(1):61–8.

42. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol*. 2004;112(1-2):8–15.

43. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;9999B:NA – NA.

44. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Jan 11;111(8):3941–67.

45. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730–7.

46. Bradstock K, Matthews J, Benson E, Page F, Bishop J. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood*. 1994 Aug 15;84(4):1220–5.

47. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Rev*. 2006 Mar;20(2):71–82.

48. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001 Feb 15;46(1):23–7.

49. Béné MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*. 2005 Apr;98(1):9–21.

50. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. The role

of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. *Br J Haematol.* 1992 Jan;80(1):62–8.

51. Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G, et al. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):870–7.

52. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood.* 1991 Dec 1;78(11):2962–8.

53. Cascavilla N, Musto P, D’Arena G, Melillo L, Carella AM, Petrilli MP, et al. CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica.* 1998 May;83(5):392–7.

54. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal N a. C, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004 Jul;60(1):1–13.

55. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* 1992 Sep 1;80(5):1105–15.

56. Chasis JA, Mohandas N. Red blood cell glycoporphins. *Blood.* 1992 Oct 15;80(8):1869–79.

57. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Jan;135(1):44–54.

58. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995 Oct;9(10):1783–6.

59. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):515–27.
60. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, et al. Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol*. 1989 Jun;72(2):161–6.
61. Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Jan;127(1):42–8.
62. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrózek K, Strout MP, et al. Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia*. 1998 Mar;12(3):317–25.
63. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group. *Br J Haematol*. 1988 Apr;68(4):487–94.
64. Keagle MB, editor. *The principles of clinical cytogenetics*. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press; 2005. 596 p.
65. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2010 Nov;22(6):646–55.
66. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059–74.
67. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council

trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354–65.

68. Tallman MS. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1154–63.

69. Cheson BD. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 3;21(24):4642–9.

70. de Lima M, Strom SS, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, et al. Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):4719–24.

71. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1875–91.

72. Wang Z-Y, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2505–15.

73. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):28–36.

74. Mhaweck P, Buffone GJ, Khan SP, Gresik MV. Cytochemical staining and flow cytometry methods applied to the diagnosis of acute leukemia in the pediatric population: an assessment of relative usefulness. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001 Feb;23(2):89–92.

75. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol*. 2011 Oct 2;29(10):886–91.

76. Abdulsalam AH, Nadal-Melsio E, Naresh KN. Complementarity of evaluation of myeloperoxidase expression by flow cytometry and immunohistochemistry on bone marrow trephine biopsy sections in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*.

2014 Jan;86(1):70–3.

77. Li CY, Lam KW, Yam LT. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1973 Jan;21(1):1–12.

78. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591–619.

79. Achour L, Scott MGH, Shirvani H, Thuret A, Bismuth G, Labbé-Jullié C, et al. CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood.* 2009 Feb 26;113(9):1938–47.

80. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature.* 1987 Nov 19;330(6145):256–9.

81. Eto T, Akashi K, Harada M, Shibuya T, Takamatsu Y, Teshima T, et al. Biological characteristics of CD7 positive acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1992 Nov;82(3):508–14.

82. Stillwell R, Bierer BE. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol Res.* 2001;24(1):31–52.

83. Kita K, Miwa H, Nakase K, Kawakami K, Kobayashi T, Shirakawa S, et al. Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. *Blood.* 1993 May 1;81(9):2399–405.

84. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 1998 Aug;58(4):278–84.

85. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2011 Mar;29(3):389–96.

86. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1336–45.

87. Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest.* 1989 Apr 1;83(4):1299–307.
88. Jersmann HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol.* 2005 Oct;83(5):462–7.
89. Tucker J, Dorey E, Gregory WM, Simpson AP, Amess JA, Lister TA, et al. Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. *Hematol Oncol.* 1990 Feb;8(1):47–58.
90. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U A.* 1999;96(10):5640–4.
91. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 2012;1(1):36.
92. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy-Martin J-P, Deconinck E, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1256–64.
93. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2014 Jun 13;4(6):e218.
94. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.* 2008 Nov 15;121(22):3683–92.
95. Hamblin TJ. CD38: what is it there for? *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):1939 – a – 1940.
96. Di Bona E, Sartori R, Zambello R, Guercini N, Madeo D, Rodeghiero F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2002 Mar;87(3):250–6.
97. Hulett MD, Hogarth PM. The second and third extracellular domains of

FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol.* 1998 Oct;35(14-15):989–96.

98. Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, et al. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1453–9.

99. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM Off Publ Soc Appl Immunohistochem.* 2005 Sep;13(3):205–20.

100. Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A, et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica.* 2001 Dec;86(12):1261–9.

101. Bull M, van Hoef A, Gorski J. Transcription analysis of class II human leukocyte antigen genes from normal and immunodeficient B lymphocytes, using polymerase chain reaction. *Mol Cell Biol.* 1990 Jul;10(7):3792–6.

102. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159–74.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques cliniques et hématologiques [↪](#)

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Total
n	14	47	64	16	26	19	9	1	196
Homme/Femme	12/2	22/25	39/25	10/6	14/12	11/8	3/6	0/1	111/85
Hb (g/dL)	8,1	9,5	9,8	10	9	8,9	9,2	7,5	9,4
	(6,1 - 12,3)	(3 - 13,2)	(5,2 - 16,5)	(6,3 - 13,7)	(4,1 - 11,9)	(4,7 - 14,4)	(7,8 - 12,3)	NA	(3 - 16,5)
Leucocytes (Giga/L)	3,1	17	3,49	2,72	45,8	63,7	1,5	13	6,9
	(1,1 - 86,7)	(0,3 - 247,4)	(0,7 - 283,5)	(0,7 - 114,6)	(1,6 - 375)	(1,34 - 123,7)	(0,2 - 23,7)	NA	(0,2 - 375)
Plaquettes (Giga/L)	77	34	75,5	34	66,5	133	55	1	58
	(30 - 204)	(5 - 639)	(13 - 360)	(16 - 126)	(11 - 228)	(9 - 188)	(5 - 121)	NA	(5 - 639)
% Blastos (SP)	17	69,7	10	39,5	22,5	35,5	2,7	18,7	25,8
	(0 - 78)	(0 - 98)	(0 - 88)	(0 - 96)	(0 - 76)	(0 - 65)	(0 - 9)	NA	(0 - 98)
% Blastos (MO)	58,5	83	34	86	55	55,5	11	36	52,5
	(7 - 90)	(13 - 98)	(12 - 84)	(28 - 96)	(6 - 86)	(5 - 95)	(7 - 25)	NA	(5 - 98)

Annexe 2 : Protocole de cytochimie de la myélopéroxydase

- Préparation des réactifs :
 - Solution A : 0,25g de benzidine dans 100ml d'éthanol à 95° (95 ml d'alcool absolu + 5ml d'eau distillée)
 - Solution B : 0,5g de nitroprussiate dans 2ml d'eau distillée
 - Solution C : mélanger 100ml de solution A avec 2ml de solution B
 - Eau oxygénée à 3% : 3ml d'eau oxygénée dans 97ml d'eau distillée
 - Solutions préparées extemporanément :
 - Eau oxygénée à 1 cinquantième : 1 goutte d'eau oxygénée à 3% dans 49 gouttes d'eau distillée
 - Giemsa : 3,5ml de Giemsa filtré dans 50ml d'eau distillée

- Mode opératoire :
 - Placer les lames à colorer horizontalement sur un support au dessus d'un plateau.
 - Répartir 1ml de solution C filtrée avec un papier filtre.
 - Laisser agir 3 minutes.
 - Répartir un mélange de 1ml de solution C et 1ml d'eau oxygénée au 1/50^{ème}.
 - Laisser agir 15 minutes.
 - Rincer à l'eau et sécher au ventilateur
 - Replacer les lames sur le portoir et verser le Giemsa
 - Laisser agir 5 minutes
 - Rincer à l'eau et sécher au ventilateur

- Préparation des réactifs :
 - Solution A : dissoudre 0.1 g de nitrile de sodium dans 2.5 ml d'eau distillée
 - Solution B : 0.5 ml de Pararosaniline dans 0.5 ml de solution A. Attendre 1 minute.
 - Solution C : Mélanger 66 ml de Tampon Sorensen avec 0.37 ml de solution B et 4.45 ml d'Alpha-naphtyl

- Mode opératoire :
 - Placer les lames à colorer verticalement dans un bac.
 - Verser la solution C à travers une gaze à l'aide de l'entonnoir.
 - Mettre le bac à l'étuve pendant 45 minutes.
 - Rincer abondamment à l'eau (environ 1 minute).
 - Sortir les lames et les laisser sécher à l'air libre.
 - Placer la lame horizontalement sur un support au dessus d'un plateau.
 - Effectuer la sur coloration en versant du vert de méthyl.
 - Laisser agir 10 minutes.
 - Rincer à l'eau et laisser sécher.

Annexe 4 : Positivité en cytochimie en fonction de la classification FAB [↩](#)

FAB		MPO		ANBE
M0	0/12	0 %	NA	NA
M1	33/41	80,5 %	NA	NA
M2	36/42	85,7 %	NA	NA
M3	9/9	100 %	NA	NA
M4	14/17	82,4 %	1/21	4,8 %
M5	5/14	35,7 %	14/15	93,3 %
M6	6/6	100 %	NA	NA
M7	1/1	100 %	NA	NA

PROTOCOLES LEUCEMIES AÏGUES

IUC

Ac.à 10 µl	Ac.à 5 µl	Intracyto
---------------	-----------	-----------

	FITC (F1)	PE (F12)	PerCPCy5.5 (F14)	PC7 (F15)	APC (F16)	APC- H7 (F18)	V450 (F19)	BV510 (F110)
Tube INTRA 1	mu c	MPO	CD34	CD3 c	CD79a c	CD45	CD41a c	CD19
Tube INTRA 2	X	X	x	X	X	CD45	X	X

	FITC (F1)	PE (F12)	PerCPCy5.5 (F14)	PE-CY7 (F15)	APC (F16)	APC- H7 (F18)	V450 (F19)	BV510/V500 (F110)
LAM 1	CD33	CD38	CD34	CD10	CD13	CD45	CD64	CD19
LAM 2	CD65	CD7	CD34	CD16	CD117	CD45	CD11b	CD14
LAM 3	CD4	CD38	CD34	CD56	CD123	CD45	X	DR
LAM 4	X	X	x	X	X	CD45	X	X

Annexe 6 : Marqueurs utilisés en cytométrie en flux

- CD3

Complexe de protéines transmembranaires (complexe T3) qui, après association avec le récepteur T des lymphocytes T, génèrent un signal d'activation (78). Il est exprimé par les lymphocytes T.

- CD4

Glycoprotéine de surface exprimée par les lymphocytes T CD4+, les monocytes, les macrophages et par certaines cellules dendritiques. CD4 appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est impliqué à la fois dans le développement des lymphocytes T et dans la reconnaissance des antigènes en interagissant avec le CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigène (79,80). CD4 est également le récepteur utilisé par le VIH-1 pour infecter ses cellules cibles.

- CD7

Protéine transmembranaire, membre de la superfamille des immunoglobuline, exprimée par les thymocyte, les lymphocytes T et NK (81). CD7 joue un rôle essentiel dans les interactions cellulaires entre lymphocytes T et dans les interaction entre lymphocytes T et lymphocytes B au cours du processus de maturation lymphocytaire (82). CD7 est un marqueur de mauvais pronostic dans les LAM (83,84).

- CD10

Metallo-endopeptidase largement exprimée à la surface de nombreux types cellulaires (cellules B, cellules myoépithéliales du sein, les canalicules biliaires, les fibroblastes, bordure en brosse du rein, cellules épithéliales, ..) (85). CD10 est utilisé comme marqueur dans de nombreux cancers.

- CD11b

Ou Integrin alpha M (ITGAM), CD11b s'associe au CD18 pour former l'hétérodimère CR3 (complement receptor 3). Il est impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire au cours de la réponse inflammatoire (86). Il a également un rôle dans le système du complément par sa capacité à lié le composant 3b inactivé. Il est exprimé à la surface des monocytes, des neutrophiles, des cellules NK et des macrophages.

- CD13

Metalloprotéase membranaire exprimée par les progéniteurs granulocytaires, monocytaires précoces et les cellules matures de ces lignées (87). CD13 joue un rôle dans la présentation des antigènes à la surface des cellules par l'excision des acides aminés N-terminaux des peptides liés au CMH de classe II.

- CD14

Récepteur à endotoxine (lipopolysaccharide) exprimé en particulier par les cellules monocytaires et macrophagiques. CD14 joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée anti-bactérienne (88). Il est particulièrement positif dans les LAM à différenciation monocyttaire (LAM4 et LAM5) (89).

- CD16

Glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines, CD16 est un récepteur de faible affinité pour la partie constante Fc des IgG. Il intervient donc dans la cytotoxicité dépendante des anticorps. Il est présent à la surface de nombreuses cellules de l'immunité innée comme les cellules NK, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (90).

- CD19

Glycoprotéine membre de la superfamille des immunoglobulines, présente à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques folliculaires du système hématopoïétique. Le CD19 est un régulateur crucial dans le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes B. À la surface des lymphocytes B, le CD19 s'associe aux CD21, CD81 et CD225 pour former un complexe de transduction du signal (91).

- CD33

Molécule d'adhésion appartenant à la famille des siglecs (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin), impliquée dans les interactions entre cellules. CD33 est fortement exprimé par les myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et monocytes (92). Il est positif dans 85 à 90% des LAM (93).

- CD34

Glycoprotéine de surface, CD34 a une fonction de facteur d'adhésion entre

cellules, exprimée par les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques ainsi que par les cellules lymphocytaires (94).

- CD38

Glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et la transduction du signal. CD38 est exprimé sur les thymocytes et également à la surface des lymphocytes T, lymphocytes B et cellules NK, expression augmentée au moment de l'activation lymphocytaire (95).

- CD56

Isoforme de la molécule d'adhésion aux cellules neuronales (NCAM), CD56 intervient dans les interactions cellulaires. Il est exprimé par les cellules NK et par quelques sous-groupe de lymphocytes T et de monocytes (96).

- CD64

Glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des récepteurs du complément. CD64 a la particularité d'avoir une forte affinité pour la partie constante Fc des IgG (97). Il a un rôle dans l'initiation et l'adaptation de la réponse immunitaire. Il est principalement exprimé par les macrophages, les monocytes.

- CD79

Glycoprotéine membranaire qui, associé au CD79b, forme le récepteur hétérodimérique des lymphocytes B (BCR) (98). Ce récepteur est responsable de la signalisation des lymphocytes B. C'est l'équivalent du CD3 pour les lymphocytes B. Il est exprimé à tous les stades de maturation des cellules B, depuis le lymphocyte pré-B précoce jusqu'au plasmocyte.

- CD117

Récepteur tyrosine kinase du CSF codé par l'oncogène c-kit. CD117 est exprimé par les myéloblastes, les cellules érythrocytaires primitives, quelques mégacaryoblastes et par les cellules mastocytaires (99).

- CD123

Chaîne α du récepteur de l'IL3. IL3 est une glycoprotéine impliquée dans la survie, la prolifération et la maturation des précurseurs hématopoïétiques (100).

- MPO

Enzyme intracytoplasmique exprimée dans quasiment toutes les cellules myéloïdes. Localisée à l'intérieur des phagosomes, elle est impliquée dans la génération de peroxyde d'hydrogène (49). Marqueur précoce le plus sensible et spécifique pour l'identification des myéloblastes.

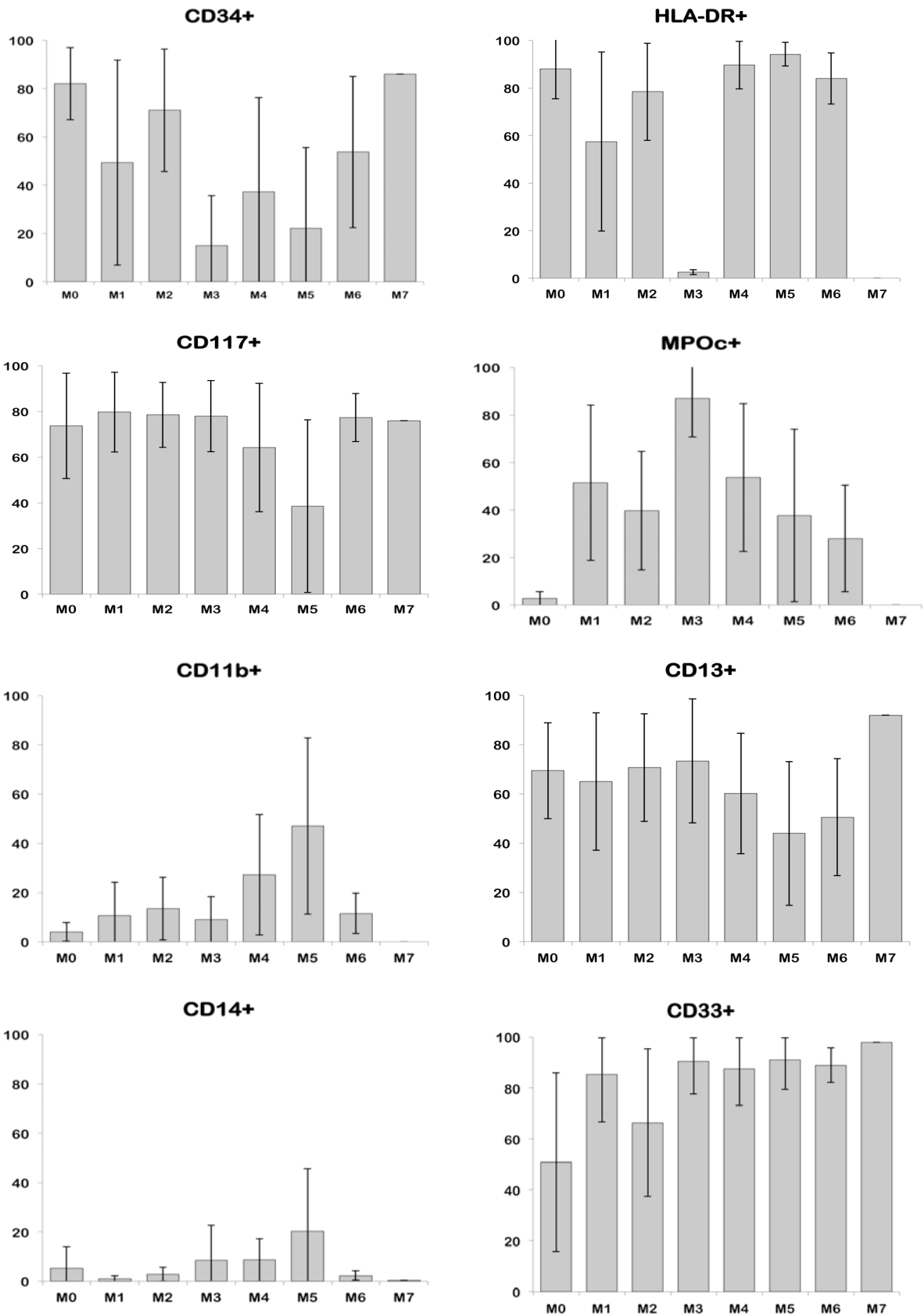
- HLA-DR

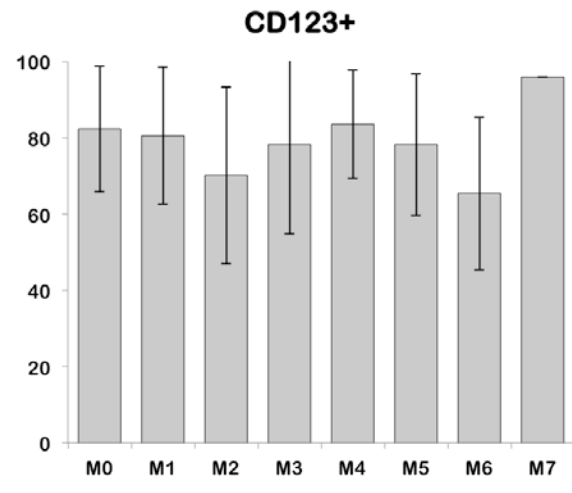
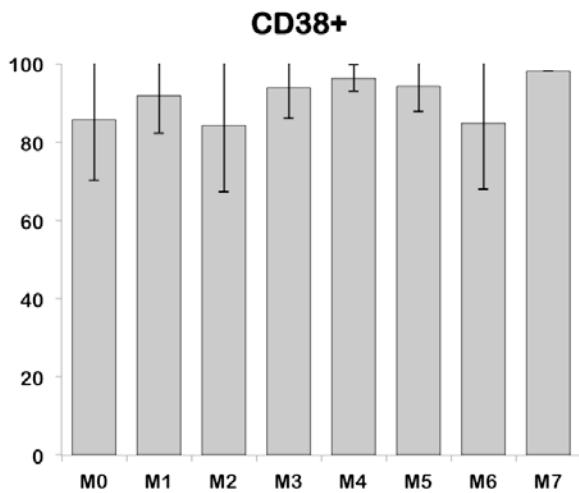
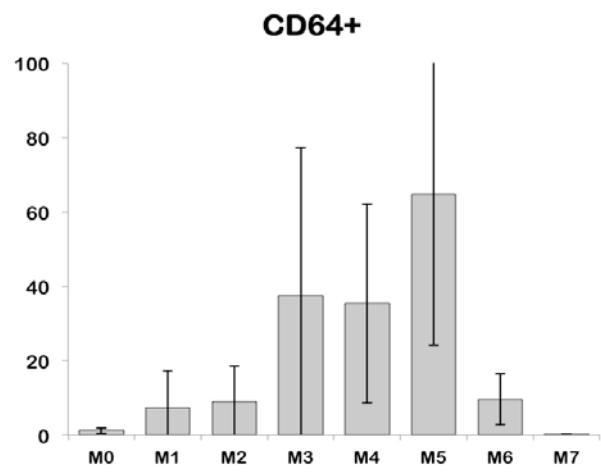
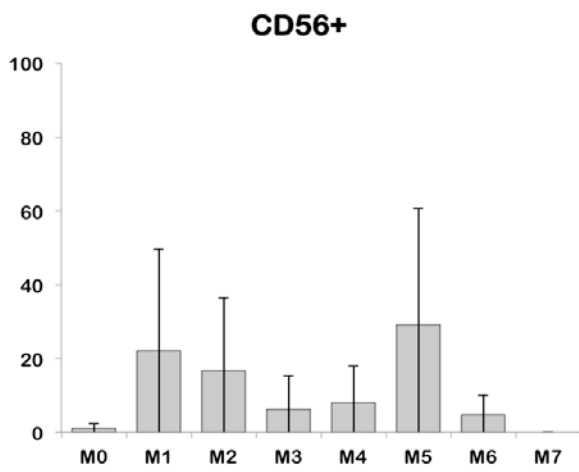
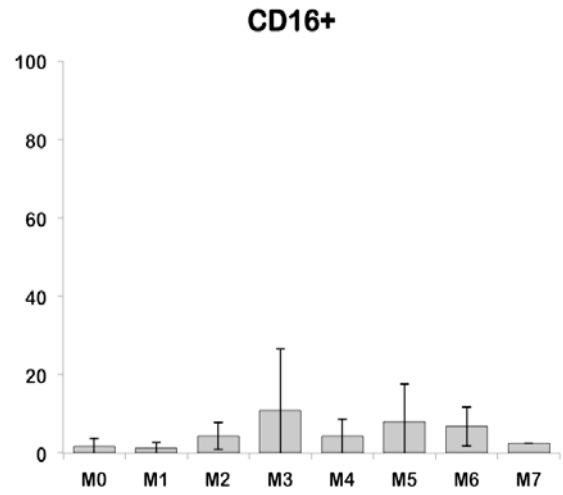
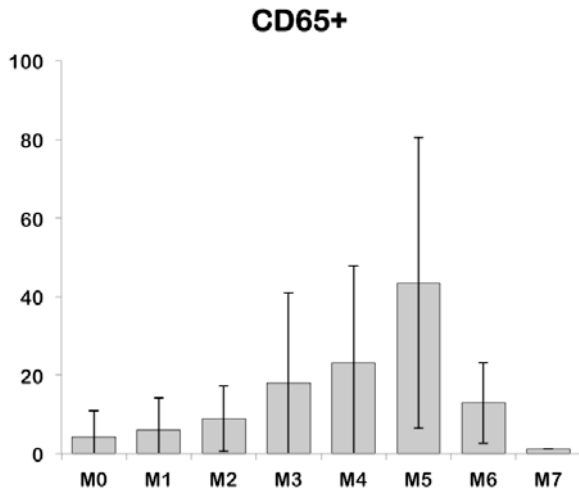
Protéine exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules T activées). c'est un hétérodimère transmembranaire composée des sous-unités alpha et beta qui joue un rôle important dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 (101)

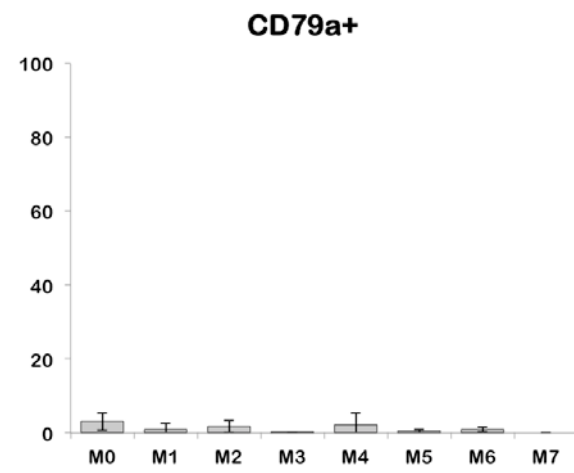
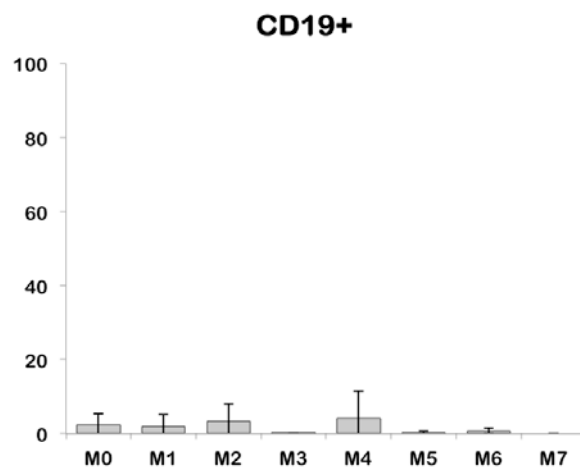
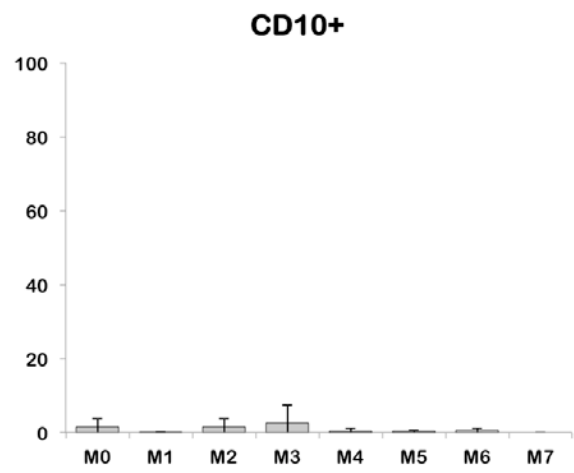
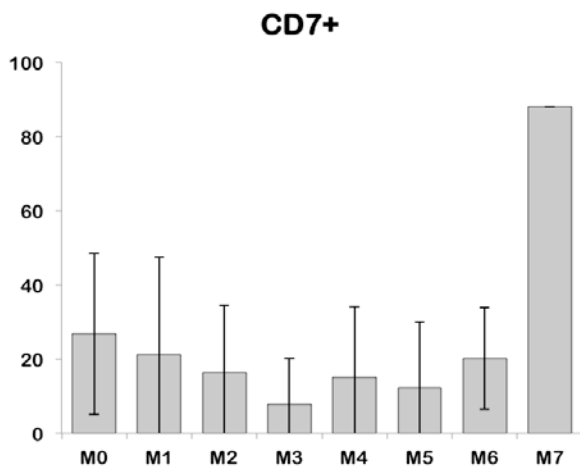
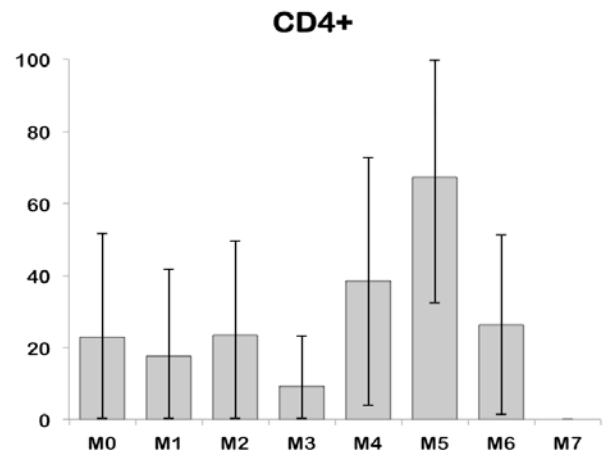
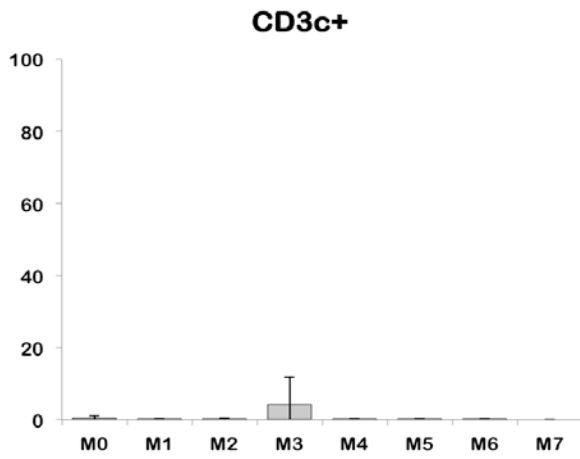
Annexe 7 : Incidence des marqueurs en fonction de la classification FAB ↴

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M5	M5	M7
	n=14	n=47	n=64	n=16	n=26	n=19	n=9	n=1	n=1
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
CD19	0/14	1/47	2/64	0/16	1/26	0/19	0/9	0/1	0/1
CD10	0/14	0/47	3/64	0/16	0/26	0/19	0/9	0/1	0/1
CD79a	1/14	1/47	4/64	0/16	0/26	0/19	0/9	0/1	0/1
CD4	28/6	11/47	20/64	31/3	13/25	14/19	3/9	33/3	0/1
CD7	42/8	13/47	15/64	25	5/25	4/19	3/9	33/3	0/1
CD3c	0/14	0/47	0/64	0/16	0/26	0/19	0/9	0/1	0/1
CD13	13/14	35/47	53/64	14/16	22/26	12/19	7/9	77/8	1/1
CD33	10/14	43/47	54/64	15/16	26/26	18/19	9/9	88/9	1/1
CD117	13/14	45/47	63/64	16/16	22/26	8/19	9/9	100	1/1
MPOc	1/14	33/47	43/64	16/16	19/26	11/19	4/9	44/4	0/1
CD34	92/9	27/47	55/64	4/16	12/26	4/19	7/9	77/8	1/1
HLA-DR	13/14	34/47	57/64	0/16	24/24	19/19	9/9	100	0/1
CD56	0/14	12/46	17/64	1/14	2/25	8/18	0/9	0/1	0/1
CD64	0/14	4/47	10/64	7/14	14/25	14/19	1/9	11/1	0/1
CD38	13/14	45/47	61/64	14/16	26/26	19/19	9/9	100	1/1
CD65	1/14	4/47	10/64	3/14	8/25	10/19	1/9	11/1	0/1
CD16	0/14	0/47	1/64	2/14	2/24	2/19	1/9	11/1	0/1
CD14	1/14	0/47	2/62	1/14	3/25	5/19	0/9	0/1	0/1
CD11b	1/11	4/36	10/53	18/9	7/21	8/13	1/9	11/1	1/1
CD123	13/14	44/47	56/64	13/14	25/26	18/19	8/9	86/9	1/1

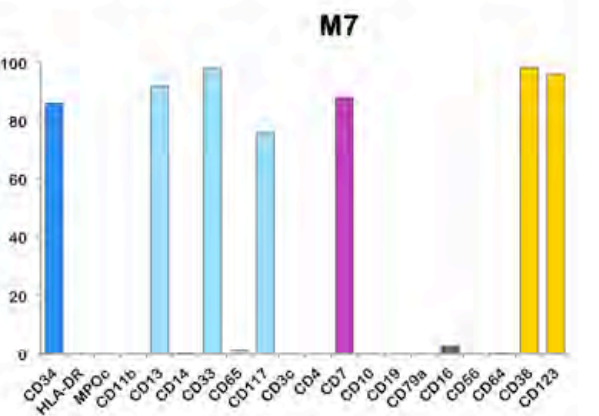
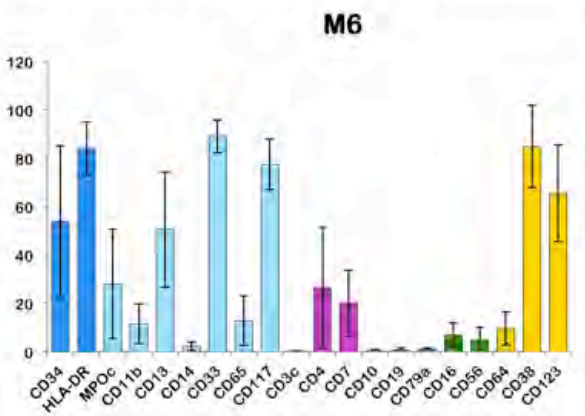
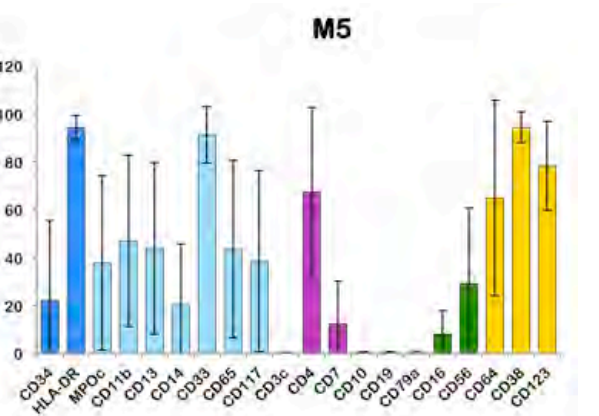
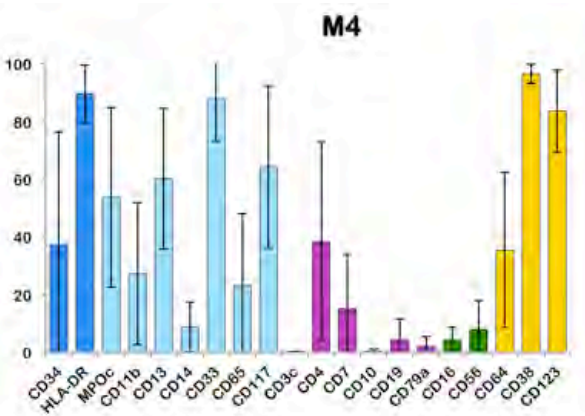
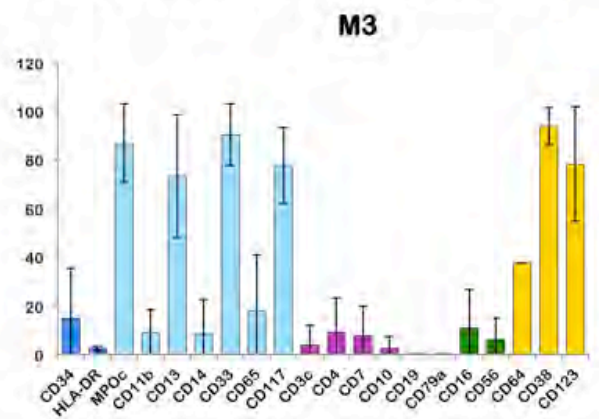
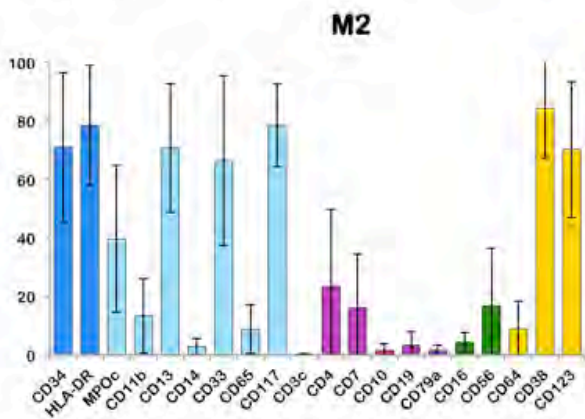
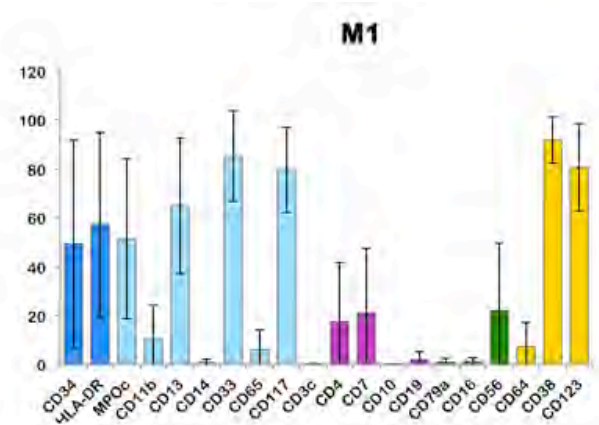
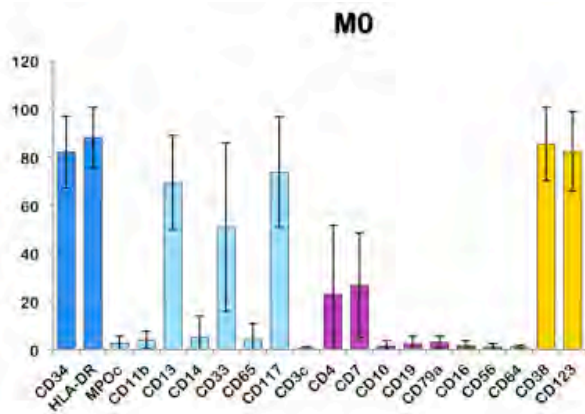
Annexe 8 : Pourcentage moyen de marqueurs positifs et écart-type en fonction des sous-types FAB ↩



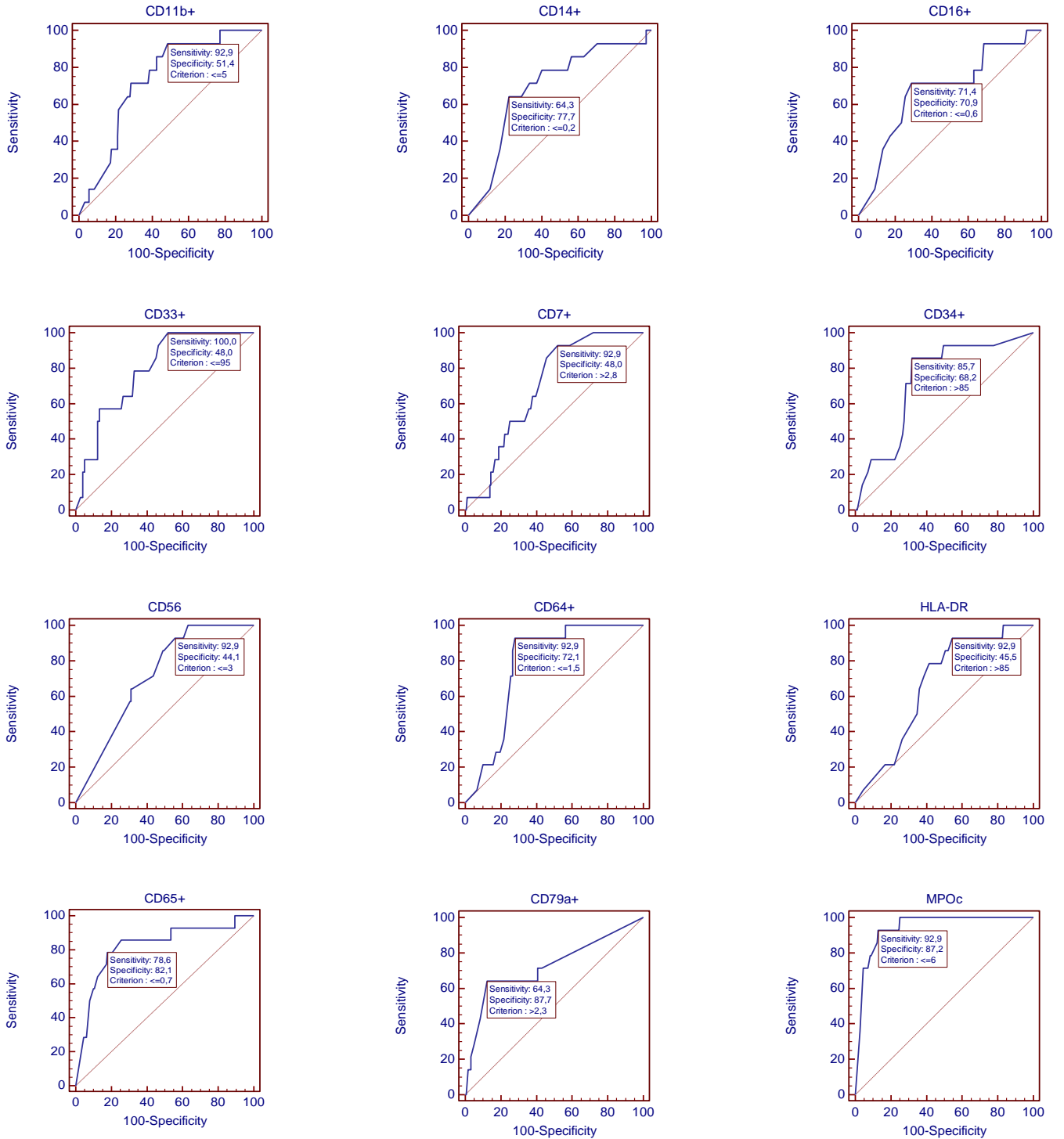




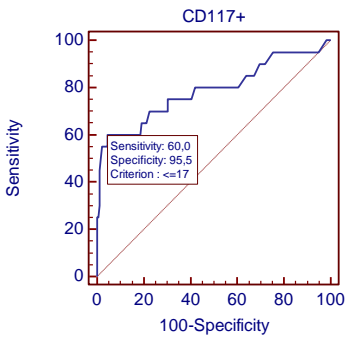
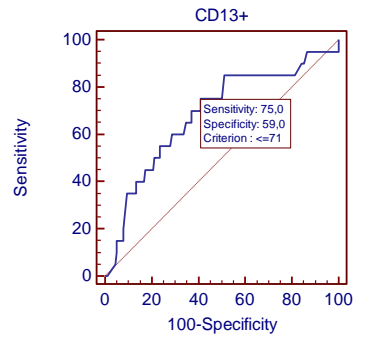
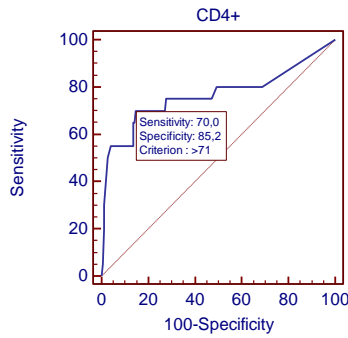
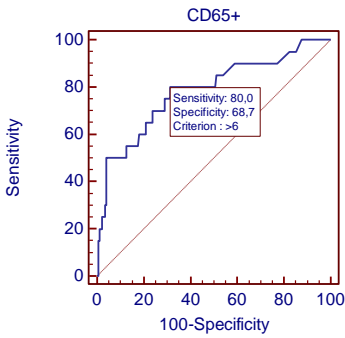
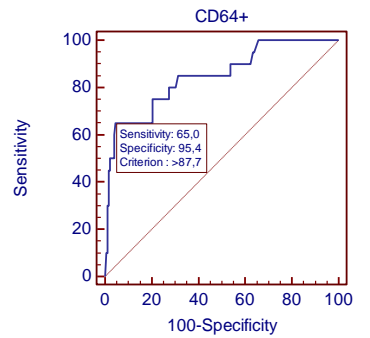
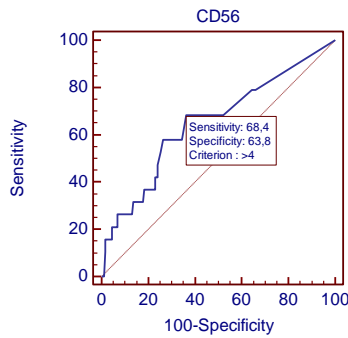
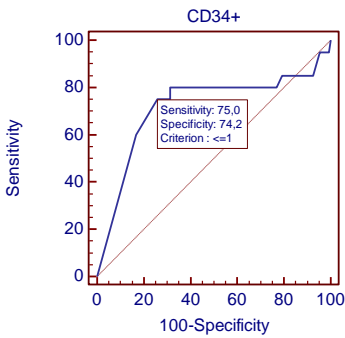
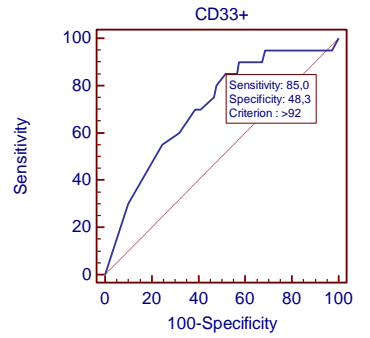
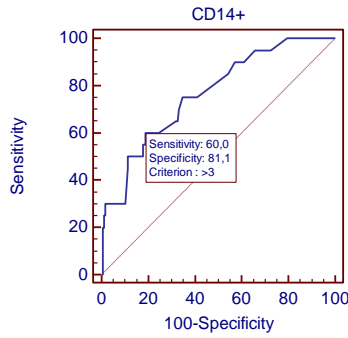
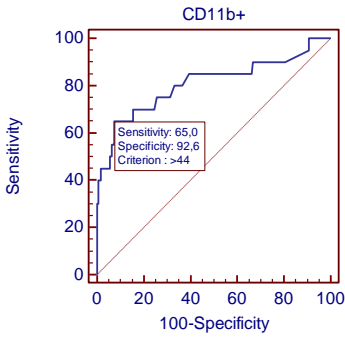
Annexe 9 : Profils immunophénotypiques des sous-types FAB ↩



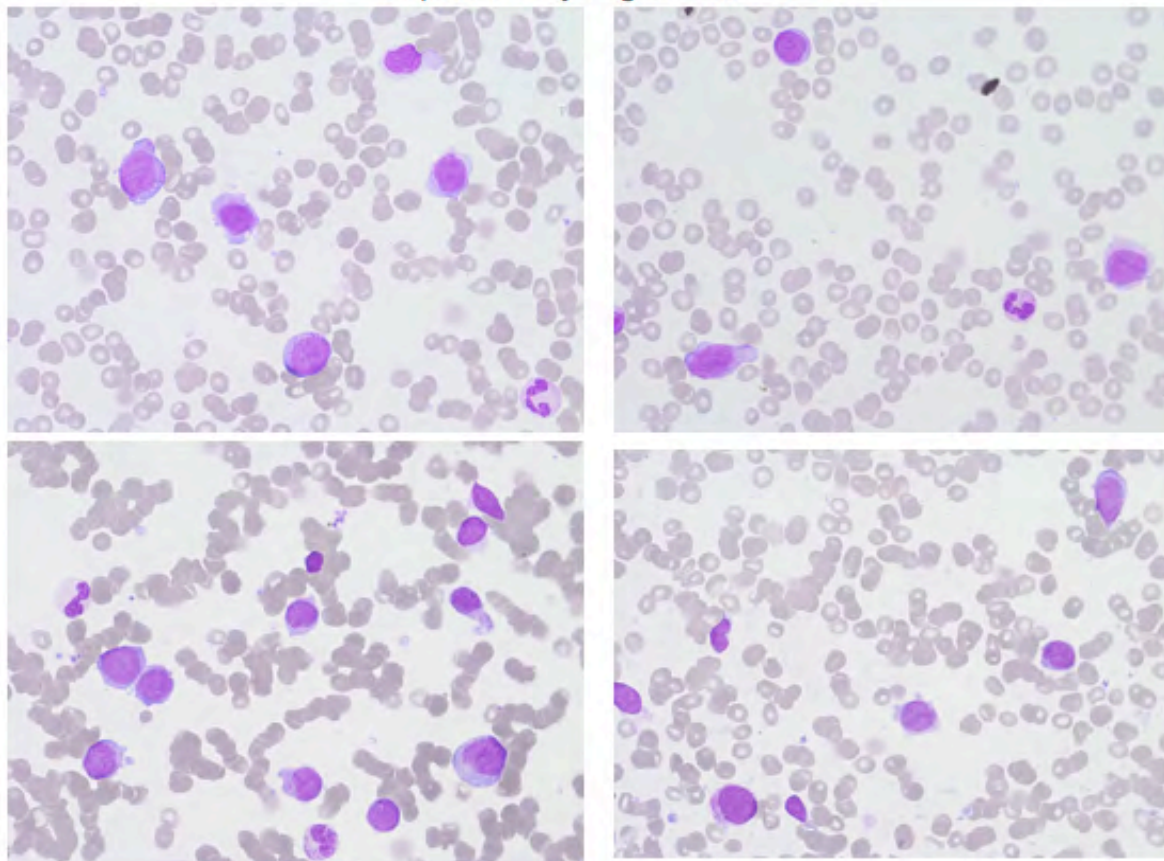
Annexe 10 : Courbes ROC pour l'identification des LAM M0



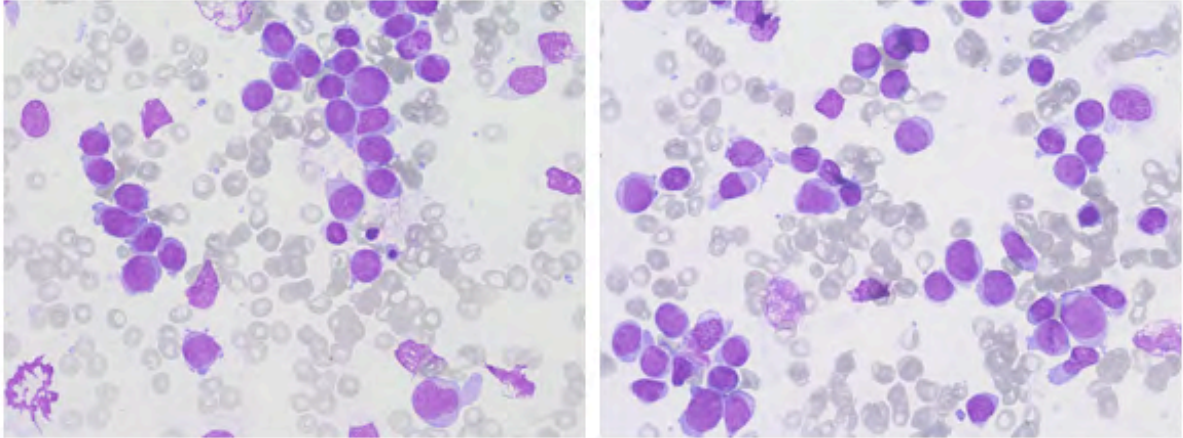
Annexe 11 : Courbes ROC pour l'identification des LAM M5



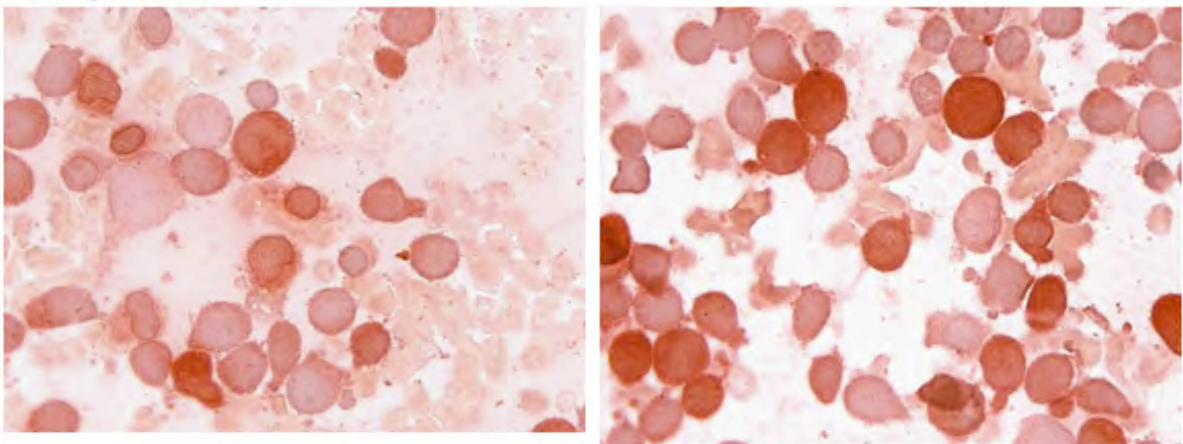
Aspect du myélogramme - MGG



Myélogramme – coloration MGG :

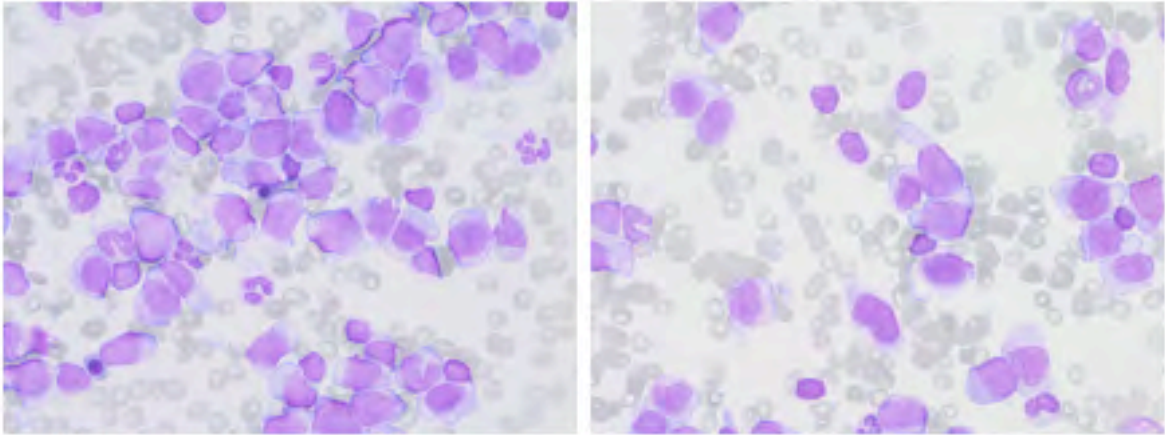


Myélogramme – coloration ANBE :

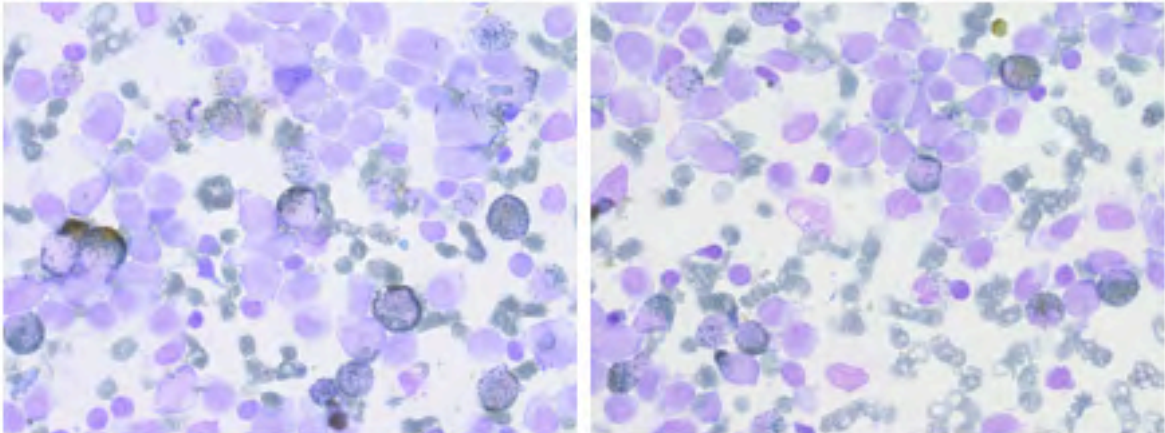


Annexe 14 : SERNI faux positif score FAB_5 [↩](#)

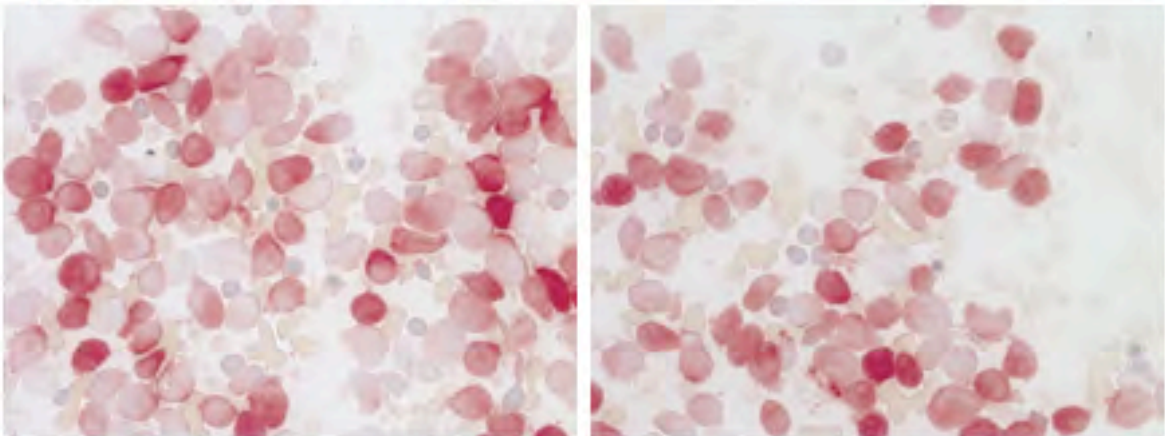
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

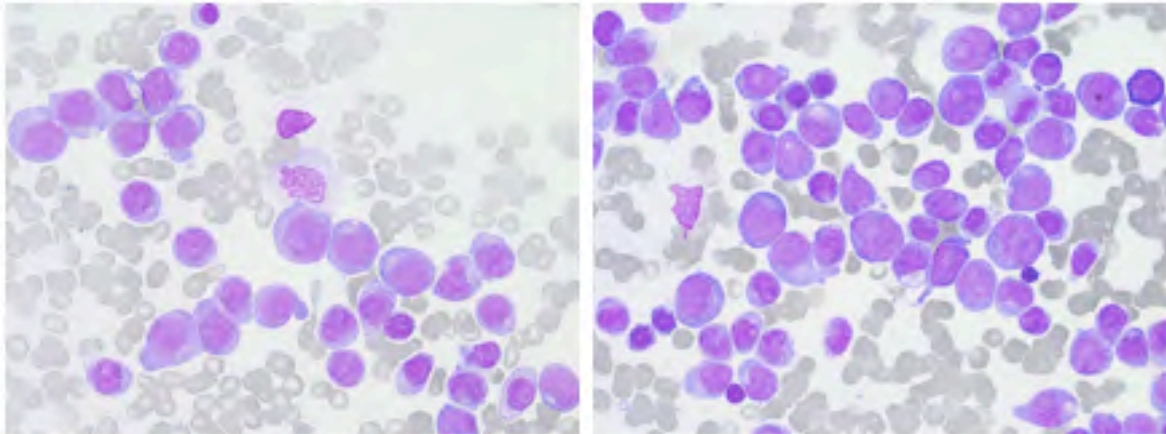


Myélogramme – coloration ANBE :

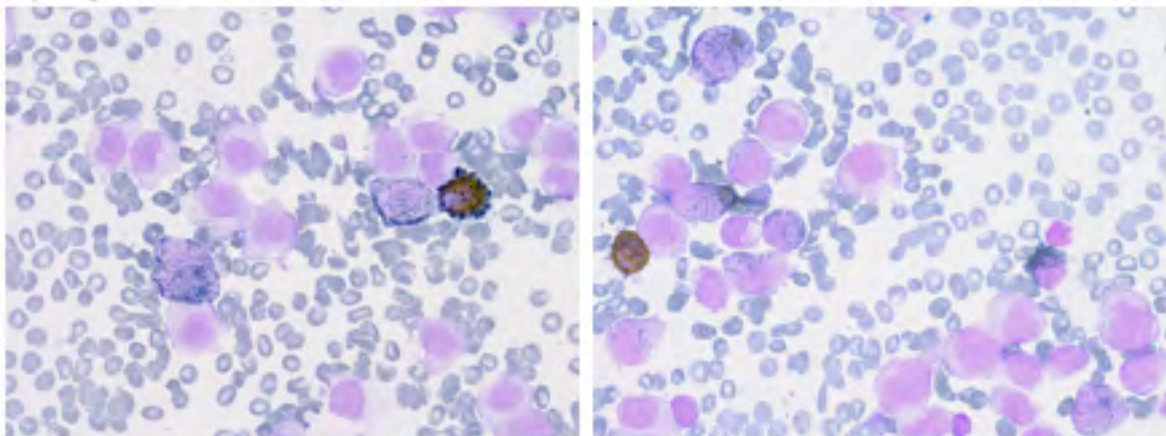


Annexe 15 : HUEBE faux positif score FAB_5 [↩](#)

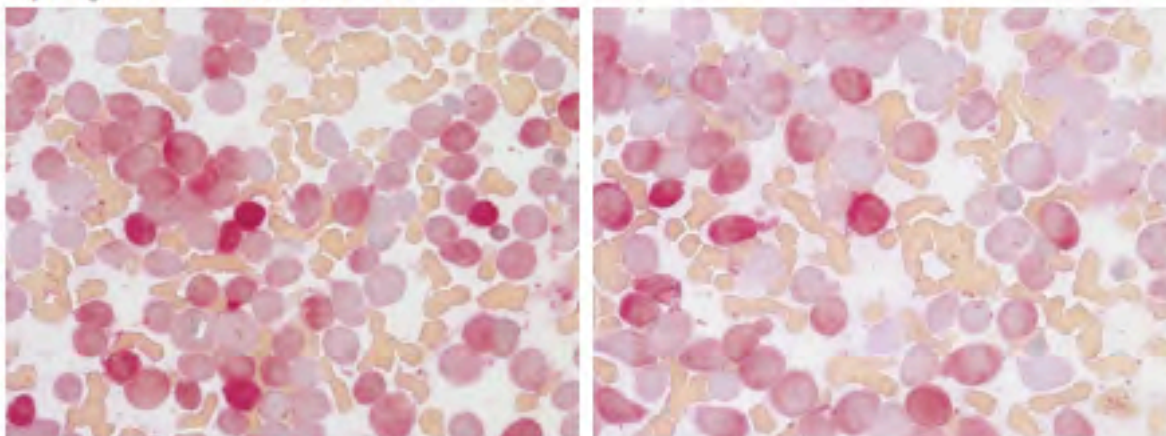
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

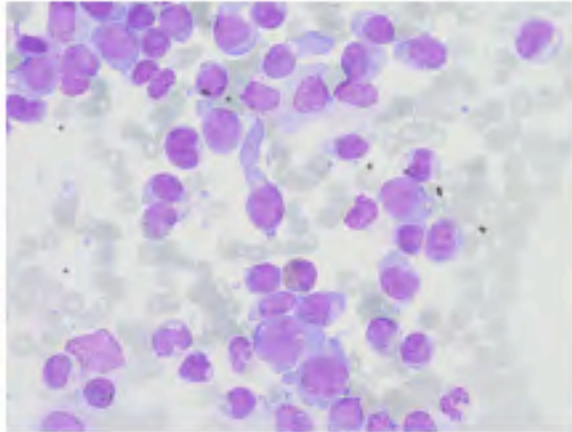
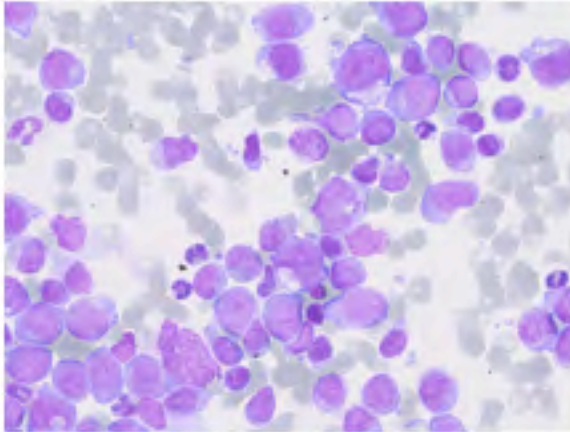


Myélogramme – coloration ANBE :

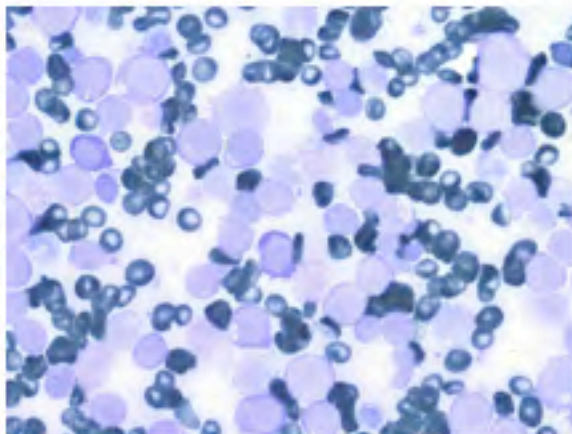
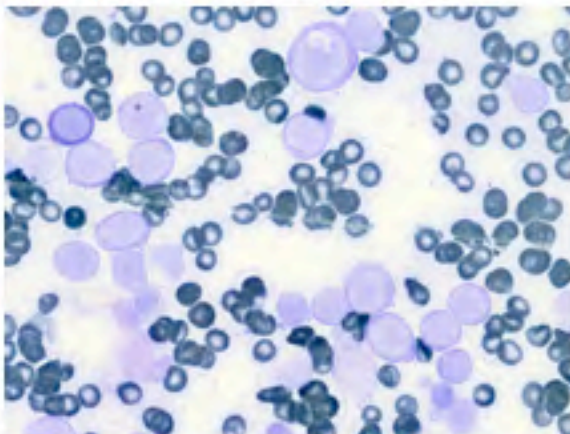


Annexe 16 : LACFR faux positif score FAB_5 [↩](#)

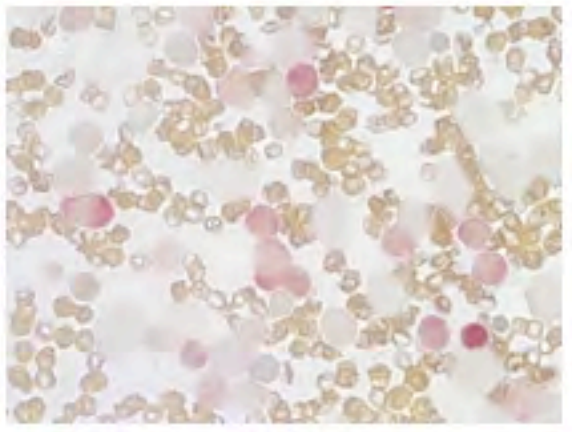
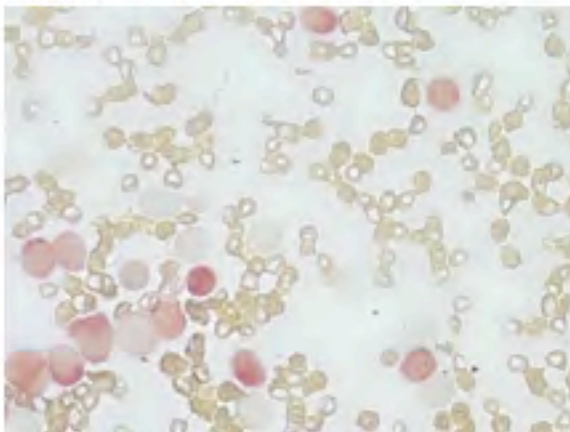
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

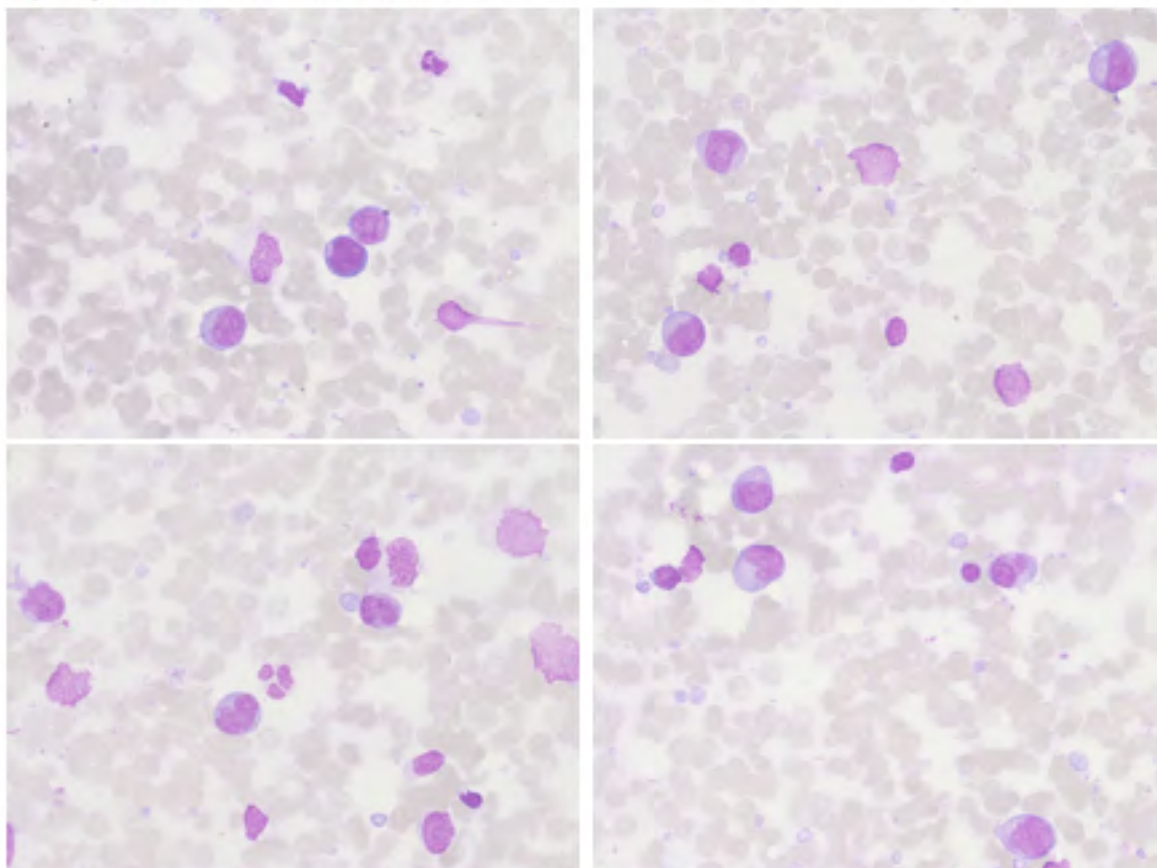


Myélogramme – coloration ANBE :



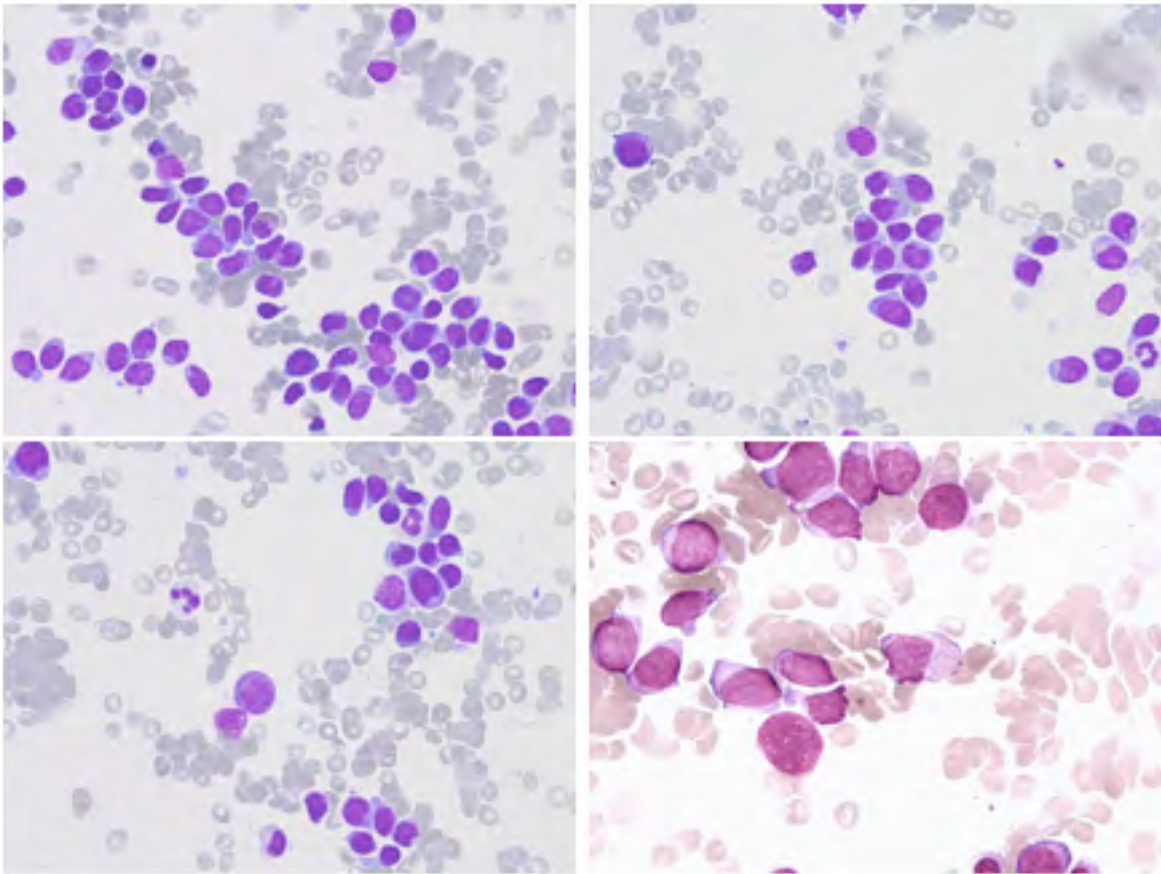
Annexe 17 : PUJHE faux négatif score FAB_5 [↩](#)

Myélogramme – coloration MGG :



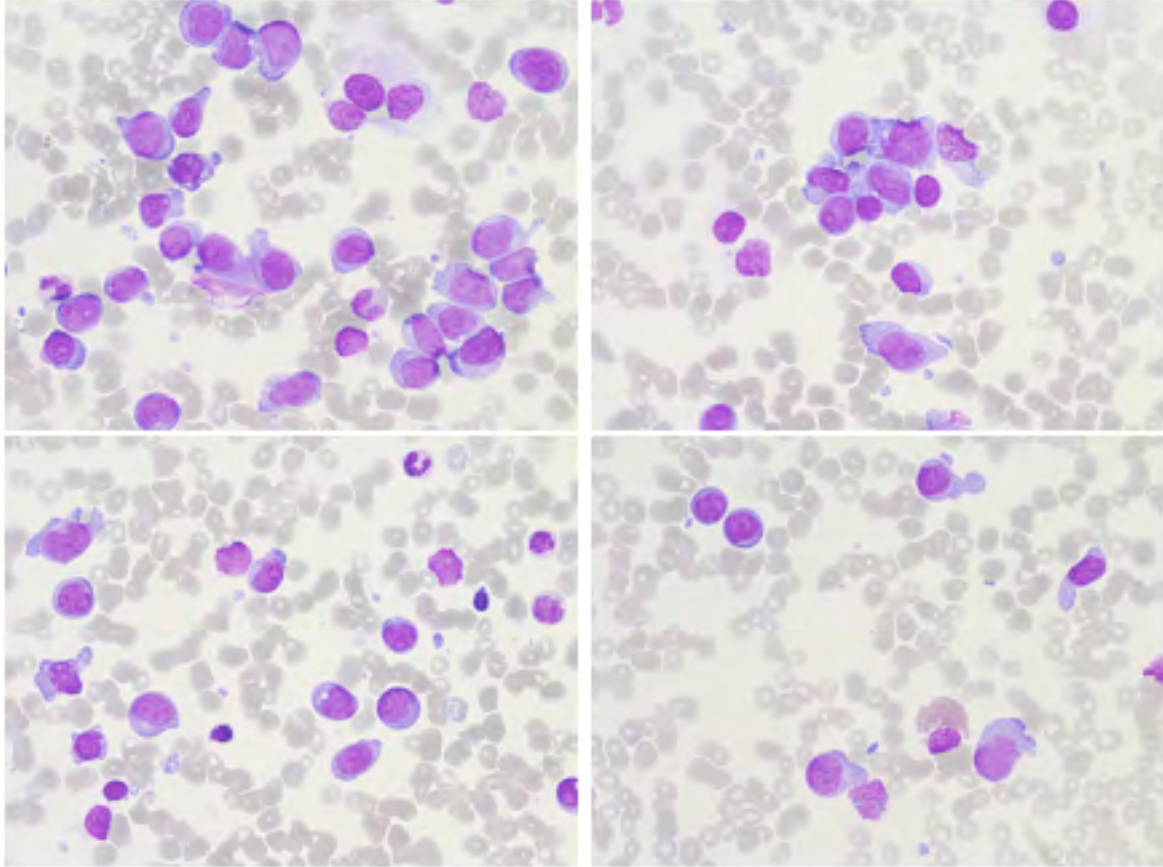
Annexe 18 : ROUJE faux négatif score FAB_5 [↩](#)

Myélogramme – coloration MGG :



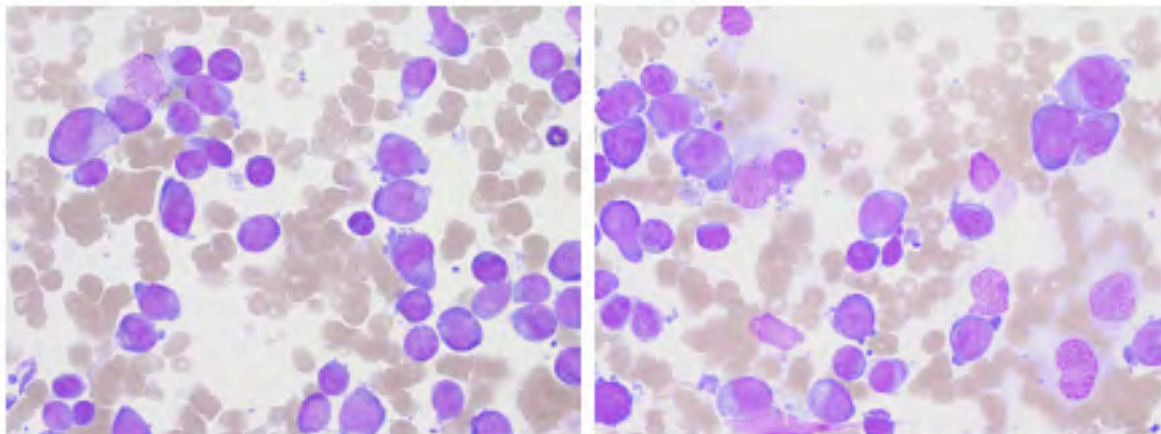
Annexe 19: BRUNA faux négatif score FAB 5 [↩](#)

Myélogramme – coloration MGG :

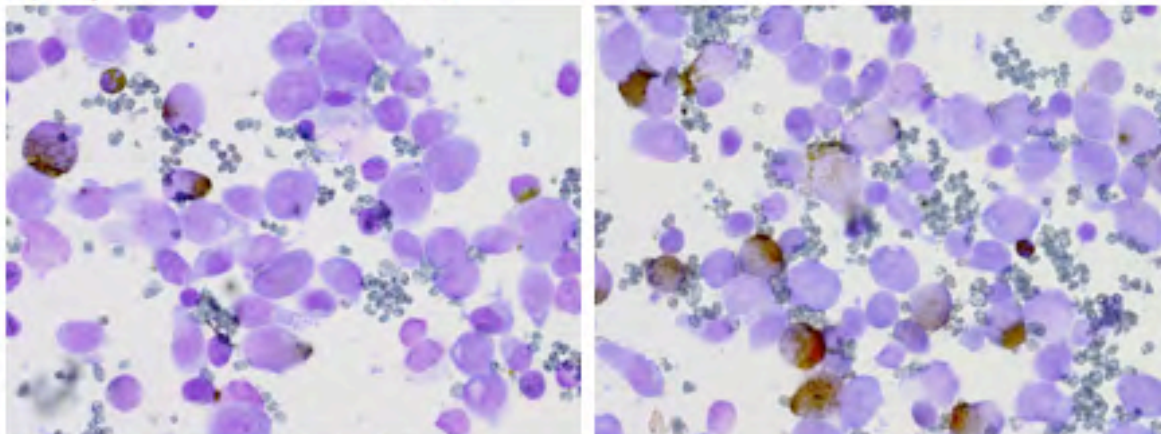


Annexe 20 : DELJE faux négatif score FAB_5 ↩

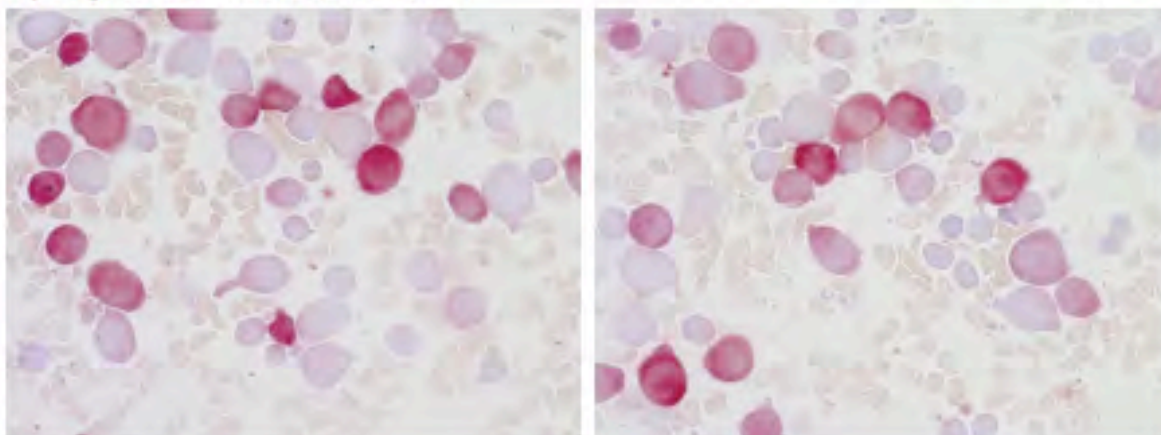
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

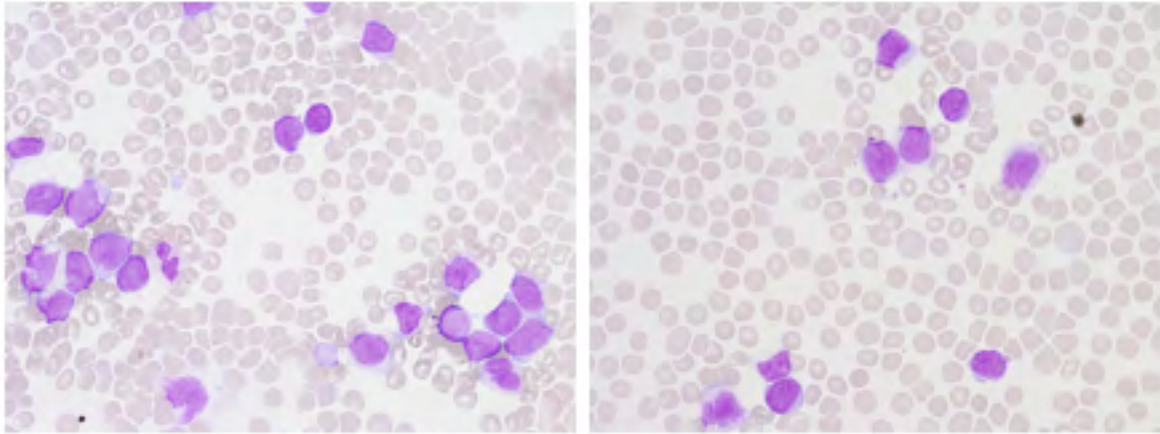


Myélogramme – coloration ANBE :

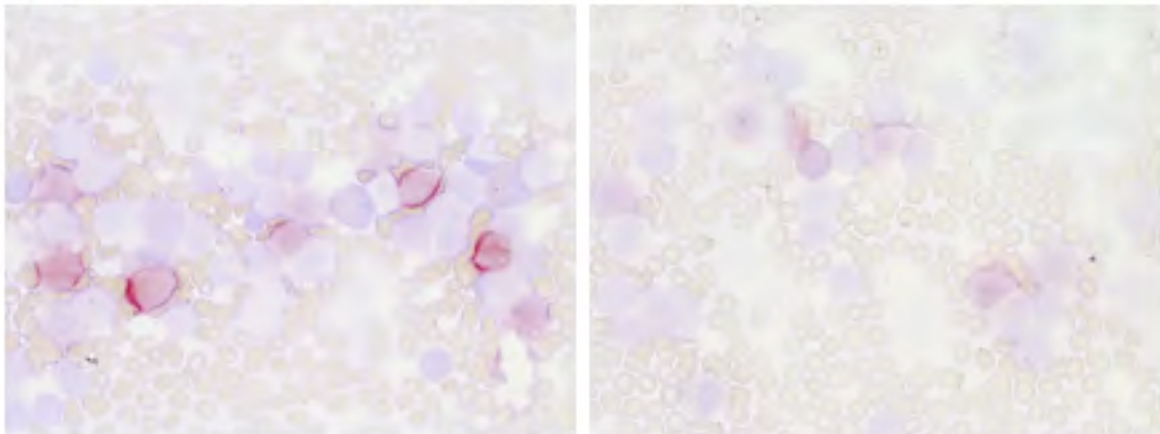


Annexe 21 : HOULA faux négatif score FAB_5 [↩](#)

Myélogramme – coloration MGG :

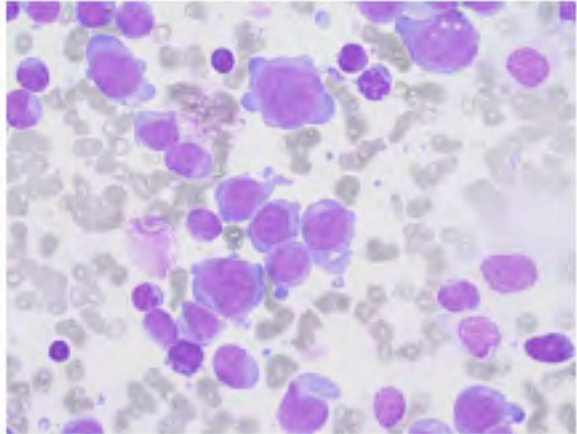
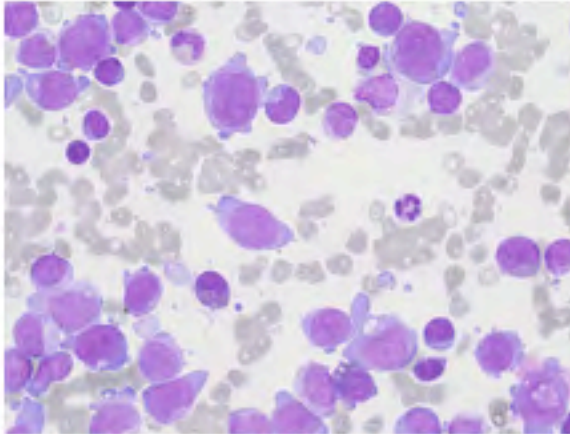


Myélogramme – coloration ANBE :

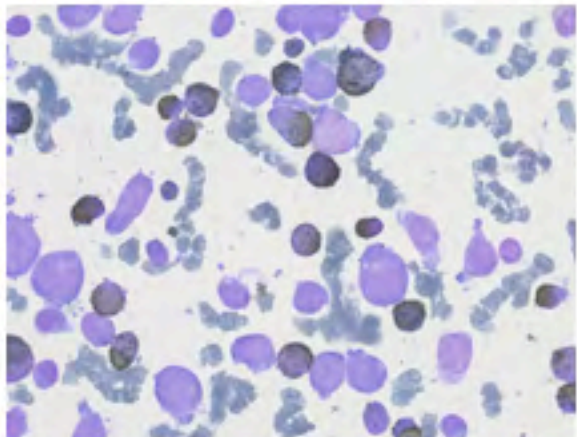
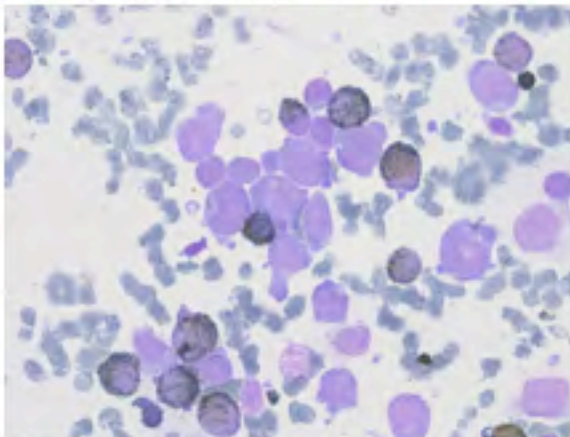


Annexe 22 : BEUJA faux négatif score FAB_5 [↩](#)

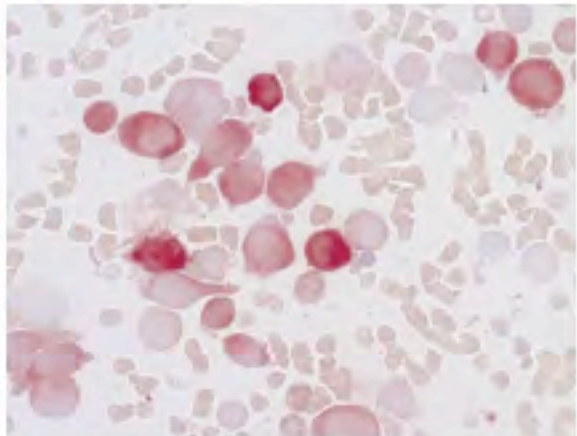
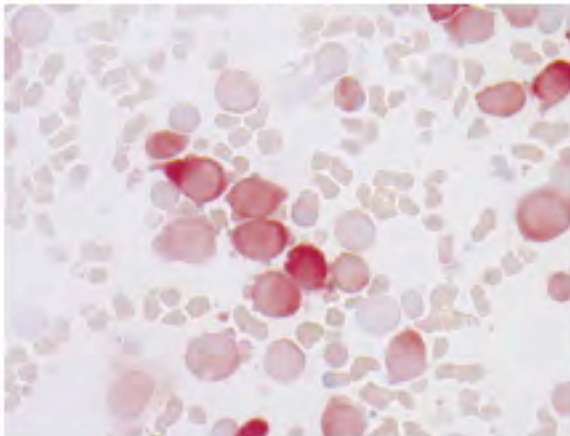
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

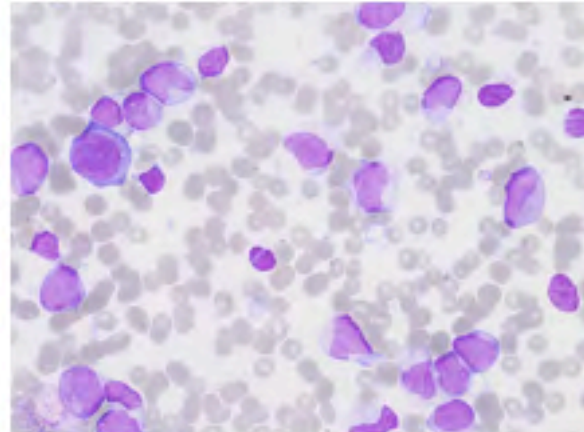
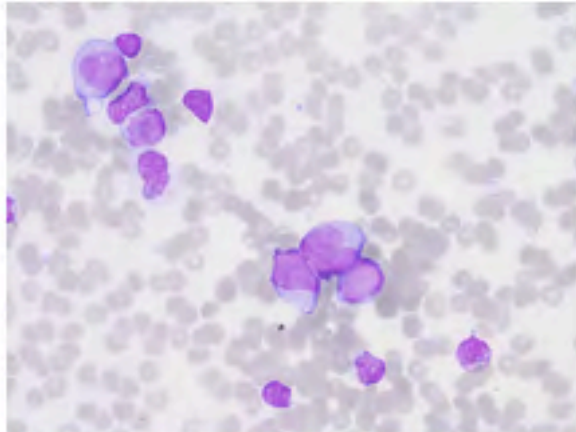


Myélogramme – coloration ANBE :

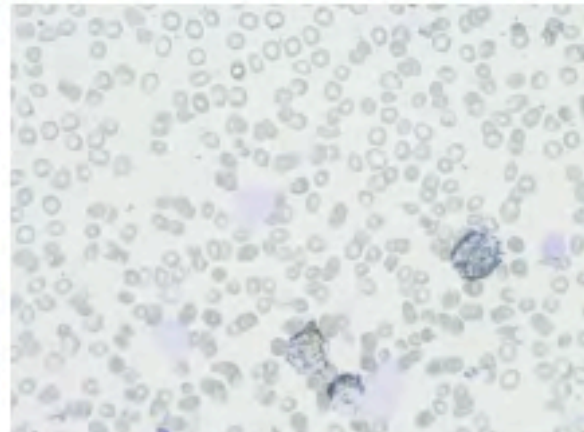
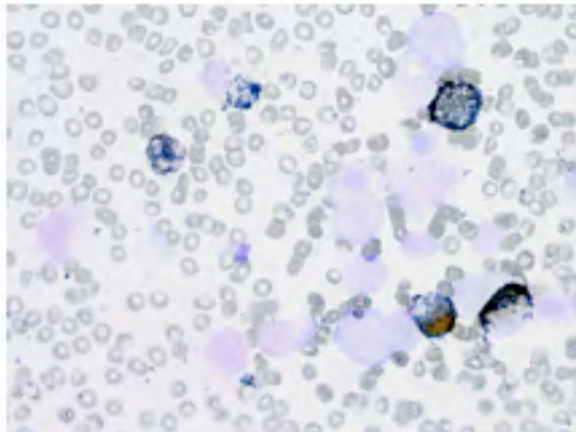


Annexe 23 : FLUBR faux négatif score FAB_5 ↩

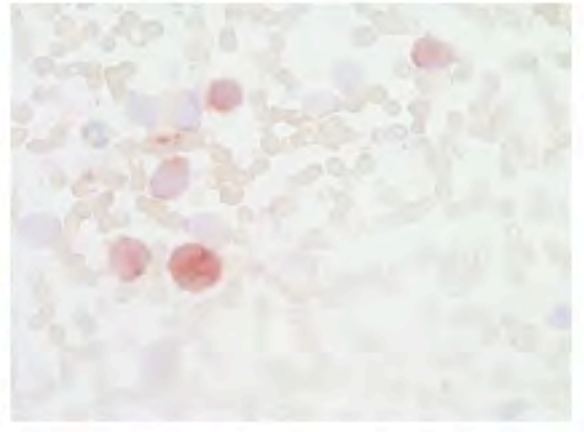
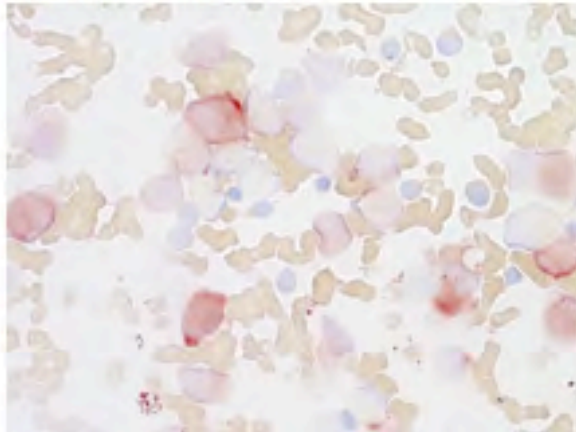
Myélogramme – coloration MGG :



Myélogramme – coloration MPO :

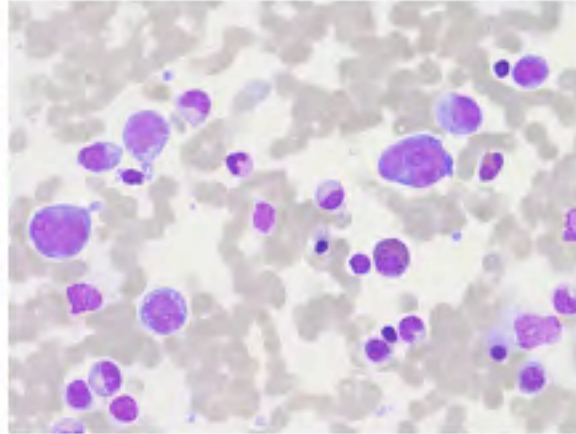
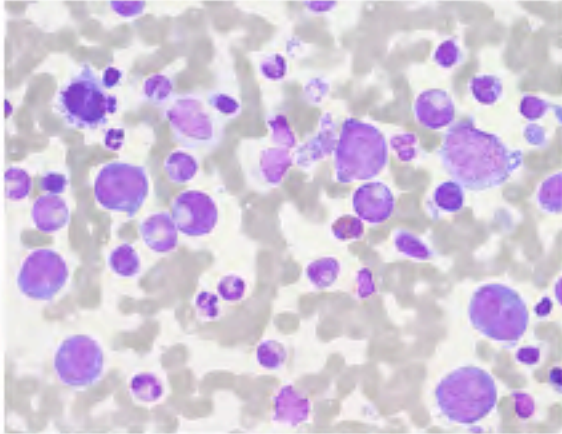


Myélogramme – coloration ANBE :

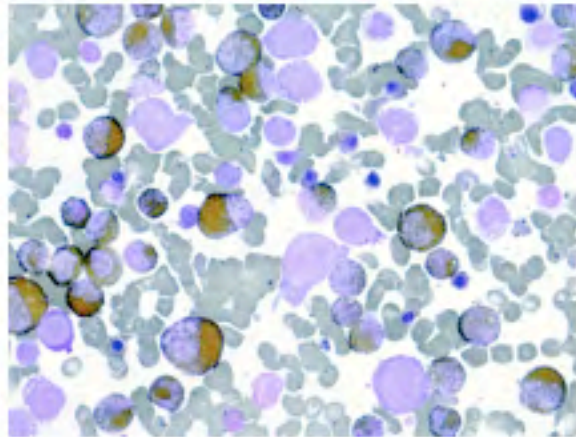
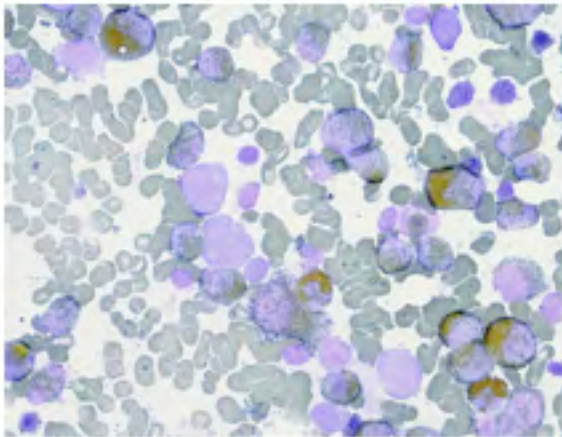


Annexe 24 : GIOAL faux négatif score FAB_5 ↩

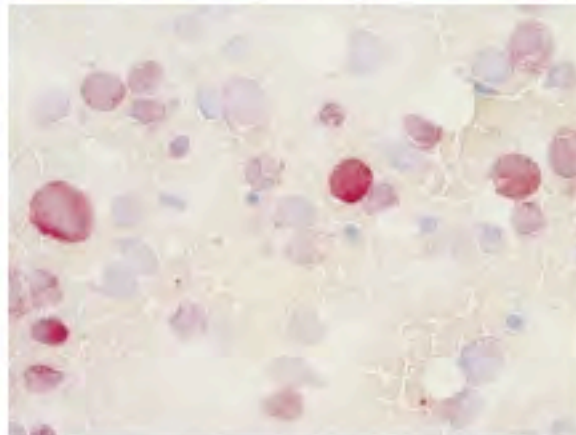
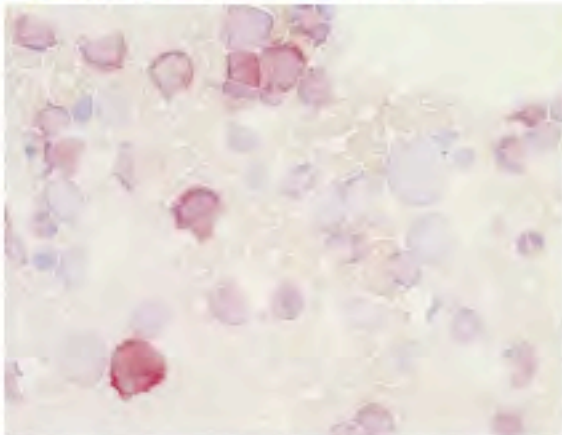
Myélogramme – coloration MGG :



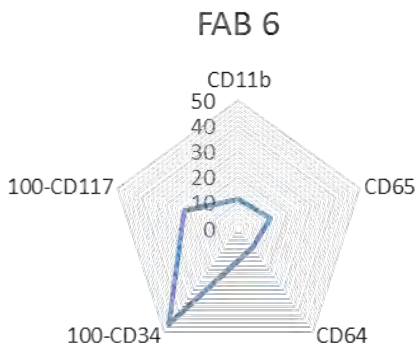
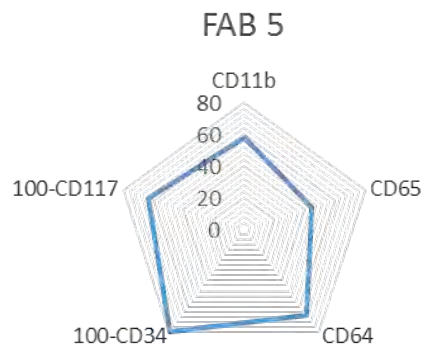
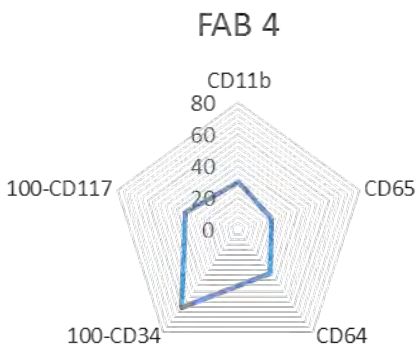
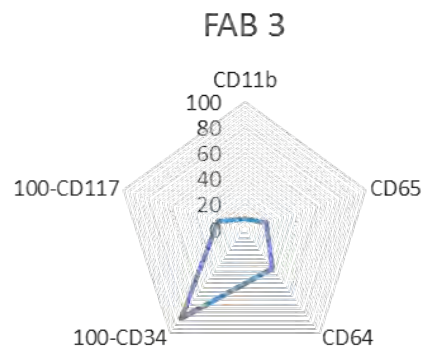
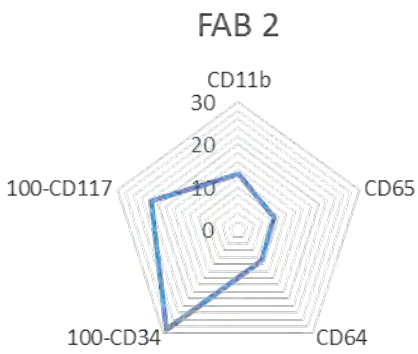
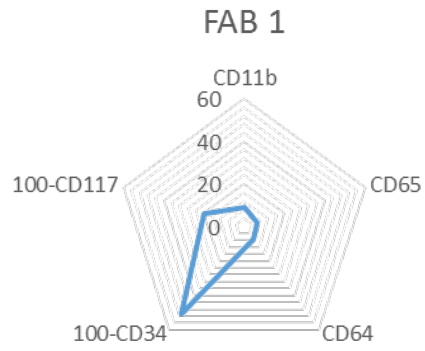
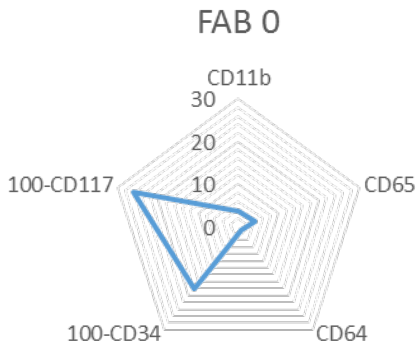
Myélogramme – coloration MPO :



Myélogramme – coloration ANBE :



Annexe 25 : Analyse en radar ↩



Annexe 26 : Analyse en composantes principales avec les 20 marqueurs et sur 193

LAM 

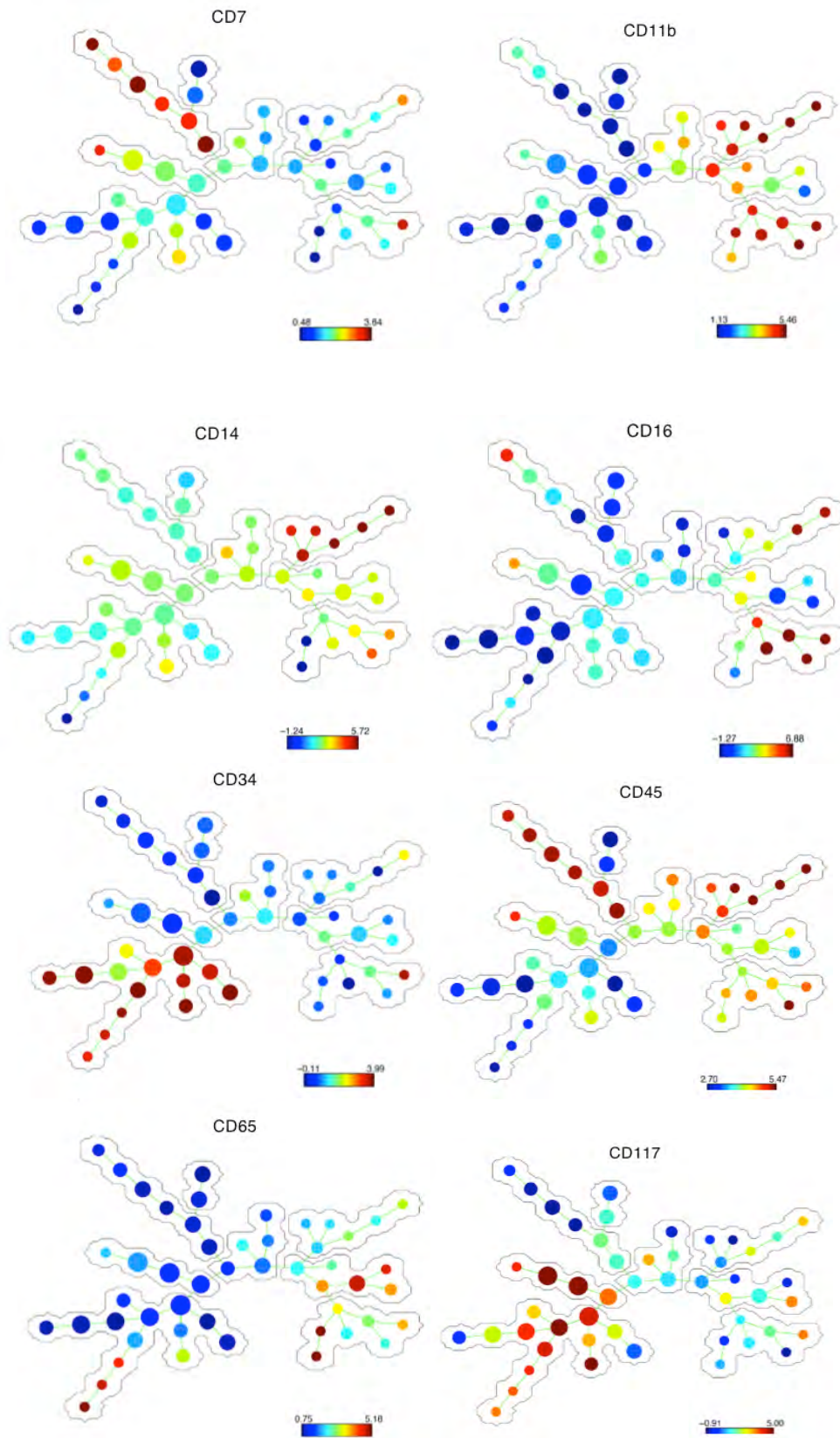
Marqueurs	Axe 1		Axe 2	
	Corr.	% (Tot. %)	Corr.	% (Tot. %)
-				
CD11b+	0,8	70 % (70 %)	0,1	0 % (70 %)
CD64+	0,8	66 % (66 %)	-0,2	3 % (69 %)
CD117+	-0,8	59 % (59 %)	0,0	0 % (59 %)
CD65+	0,7	55 % (55 %)	-0,1	1 % (56 %)
CD4+	0,7	45 % (45 %)	0,0	0 % (45 %)
CD14+	0,6	35 % (35 %)	0,0	0 % (35 %)
CD79a+	-0,1	1 % (1 %)	0,6	39 % (40 %)
CD33+	0,2	5 % (5 %)	-0,6	37 % (42 %)
MPOc	0,0	0 % (0 %)	-0,6	36 % (36 %)
CD34+	-0,5	22 % (22 %)	0,6	35 % (58 %)
HLA-DR	0,1	1 % (1 %)	0,6	33 % (34 %)
CD3c+	0,1	0 % (0 %)	0,4	18 % (19 %)
CD10+	0,1	2 % (2 %)	0,4	15 % (17 %)
CD38+	0,2	3 % (3 %)	-0,2	4 % (6 %)
CD13+	-0,4	16 % (16 %)	0,2	3 % (19 %)
CD7+	-0,2	6 % (6 %)	0,2	3 % (9 %)
CD19+	0,0	0 % (0 %)	0,1	2 % (2 %)
CD56	0,3	12 % (12 %)	-0,1	0 % (12 %)
CD123+	-0,1	2 % (2 %)	0,0	0 % (2 %)
CD16+	0,3	9 % (9 %)	0,0	0 % (9 %)
Var. Expl.	4,1	20 % (20 %)	2,3	11 % (32 %)

Annexe 27 : Analyse en composantes principales avec les 20 marqueurs et sur les

LAM M4 et M5 

Attribute	Axis_1		Axis_2	
	Corr.	% (Tot. %)	Corr.	% (Tot. %)
-				
CD64+	0,9	87 % (87 %)	0,1	1 % (88 %)
CD117+	-0,9	85 % (85 %)	0,1	0 % (85 %)
CD11b+	0,8	72 % (72 %)	-0,1	0 % (72 %)
CD4+	0,8	57 % (57 %)	0,2	5 % (61 %)
CD65+	0,7	55 % (55 %)	0,4	13 % (68 %)
CD13+	-0,6	41 % (41 %)	-0,3	10 % (52 %)
CD56	0,6	39 % (39 %)	0,2	5 % (44 %)
CD34+	-0,6	35 % (35 %)	-0,2	3 % (37 %)
CD14+	0,6	34 % (34 %)	-0,4	17 % (52 %)
CD16+	0,4	13 % (13 %)	-0,7	53 % (66 %)
CD3c+	0,0	0 % (0 %)	-0,7	44 % (44 %)
CD19+	0,0	0 % (0 %)	-0,5	21 % (21 %)
CD79a+	-0,3	10 % (10 %)	-0,4	15 % (25 %)
CD33+	0,3	12 % (12 %)	0,3	11 % (23 %)
CD38+	0,2	4 % (4 %)	0,3	9 % (13 %)
HLA-DR	-0,1	0 % (0 %)	0,2	6 % (6 %)
CD123+	-0,4	15 % (15 %)	0,2	5 % (20 %)
CD10+	0,3	10 % (10 %)	-0,2	3 % (13 %)
CD7+	-0,4	20 % (20 %)	0,1	1 % (21 %)
MPOc	-0,2	4 % (4 %)	0,1	1 % (5 %)
Var. Expl.	5,9	30 % (30 %)	2,2	11 % (41 %)

Annexe 28 : Analyse en cluster ↩



Contribution of flow cytometric immunophenotyping in the morphological classification of acute myeloid leukemia.

This retrospective study of 196 cases of acute myeloid leukemias (AML) diagnosed in the UH of Toulouse permitted to describe the immunophenotypic characteristics of the FAB classification leukemic subtypes. We performed several analyses with the 20 markers used in flow cytometry, in order to distinguish AML with no differentiation (AML 0) and monoblastic AML (AML 5), with the intention to limit the use of cytochemistry. We developed a FAB_0 score for AML 0 identification. We suggested that this score can be used as a complement to the morphological analysis because of its negative predictive value greater than 98%. This would allow to avoid cytochemistry in more than 80% of cases. However, it will be necessary to validate this score with a larger cohort of AML 0. We also developed a FAB_5 score and realised radar analysis, a principal components analysis and a clusters analysis, in order to identify AML 5 by flow cytometry. This several analyses did not allowed to effectively discriminate AML 5 from AML 4, and cytochemistry will still be needed in those cases. However, it would be interesting to apply the FAB_5 score on an independant cohort in order to see if the incorrectly categorized cases are due to the morphological assessment or to the FAB_5 score. Also, we noticed that a same group of cases standed out of the other AML, group composed of AML 4 and AML 5. It would be interesting to know if these cases share common characteristics by confronting bio-clinical data.

Key words : Acute myeloid leukemia – FAB classification – cytochemistry – immunophenotyping – flow cytometry

Nom : POLESZCZUK

Prénom : Laurie

Apport de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la classification morphologique des leucémies aiguës myéloïdes.

Toulouse, le 25 Novembre

2015

Cette étude rétrospective de 196 cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) diagnostiquées au CHU de Toulouse a permis de décrire les caractéristiques immunophénotypiques des sous-groupes de la classification FAB. Nous avons réalisé différentes analyses utilisant 20 marqueurs de cytométrie en flux, dans le but de distinguer d'une part les LAM sans différenciation (LAM 0), et d'autre part les LAM monoblastiques (LAM 5), afin d'éviter d'avoir recours aux colorations de cytochimie. Nous avons développé un score de cytométrie, le score FAB_0, pour l'identification des LAM 0. Nous proposons de l'utiliser en complément de l'analyse morphologique. Grâce à sa valeur prédictive négative supérieure à 98%, il devrait permettre de diminuer de plus de 80% le nombre de cas nécessitant la réalisation d'une cytochimie. Il serait cependant nécessaire de valider ce score sur une plus grande cohorte de LAM 0. Nous avons également développé un score FAB_5 et réalisé des analyses en radar, en composantes principales et en clusters afin d'identifier les LAM 5 par cytométrie en flux. Ces analyses n'ont pas permis de différencier efficacement les LAM 5 des LAM 4, et le recours à la cytochimie reste nécessaire. Il serait cependant intéressant d'appliquer le score FAB_5 à une cohorte de contrôle afin de déterminer si les erreurs de classement sont liées à l'analyse morphologique ou aux capacités discriminantes des différents tests. D'autre part, on remarque qu'un même groupe de cas se détache de l'ensemble des LAM, groupe constitué de LAM 4 et de LAM 5. Il serait intéressant de savoir si ces patients partagent des caractéristiques communes en confrontant ces données aux informations cliniques et génétiques.

Discipline administrative : BIOLOGIE MÉDICALE

Mots-Clés : Leucémies aiguës myéloïdes – classification FAB – cytochimie – immunophénotypage – cytométrie en flux

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 – France

Directeur de thèse : PERES, Michaël