



Research Paper

## CYTOMETRIE EN FLUX ET LEUCEMIES AIGUËS : POURQUOI ET COMMENT ?

Imane tlamcani, fahd bouhou, zineb azzine, amrani hassani moncef  
Service d'hématologie de laboratoire central d'analyse médicale CHU Fès Hassan II

**Résumé :** L'immunophénotypage est une technique utilisée pour caractériser les cellules leucémiques dans les leucémies aiguës. Elle permet d'identifier la lignée cellulaire d'origine des cellules leucémiques et de déterminer leur stade de maturation. Cette technique est particulièrement utile pour diagnostiquer les sous-types de leucémies aiguës, pour déterminer le pronostic et pour guider le traitement.

Dans les leucémies lymphoblastiques aiguës, l'immunophénotypage est utilisée pour identifier les marqueurs spécifiques des cellules B ou T, ce qui permet de classer les leucémies aiguës lymphoïdes en sous-types et de déterminer le traitement approprié. En outre, l'immunophénotypage permet de suivre la réponse au traitement et de détecter les rechutes.

Dans les leucémies myéloblastiques aiguës, l'immunophénotypage est utilisé pour déterminer le stade de maturation des cellules leucémiques et pour distinguer les leucémies aiguës myéloïdes de certains lymphomes. Cette technique est également utile pour évaluer le pronostic et pour guider le traitement.

Dans l'ensemble, l'immunophénotypage est une technique essentielle dans le diagnostic et la prise en charge des leucémies aiguës. Elle permet une caractérisation précise des cellules leucémiques et guide le choix du traitement. Les avancées récentes dans les techniques d'immunophénotypage ont amélioré la précision et la fiabilité de cette technique, ce qui permet une meilleure prise en charge des patients atteints de leucémies aiguës.

**Mots-clés :** cytométrie en flux, leucémie aiguës, diagnostic, maladie résiduelle, rechute

**Abstract :** Immunophenotyping is a technique used to characterize leukemic cells in acute leukemias. It identifies the cell lineage of origin of leukemic cells and determines their stage of maturation. This technique is particularly useful for diagnosing subtypes of acute leukemias, determining prognosis, and guiding treatment.

In acute lymphoblastic leukemias, immunophenotyping is used to identify specific markers of B or T cells, which allows classification of into subtypes and determination of appropriate treatment. Additionally, immunophenotyping allows monitoring of treatment response and detection of relapses.

In acute myeloid leukemias, immunophenotyping is used to determine the stage of maturation of leukemic cells and distinguish from certain lymphomas. This technique is also useful for evaluating prognosis and guiding treatment.

Overall, immunophenotyping is an essential technique in the diagnosis and management of acute leukemias. It allows for precise characterization of leukemic cells and guides treatment choice. Recent advances in immunophenotyping techniques have improved the accuracy and reliability of this technique, enabling better management of patients with acute leukemias.

**Key-words :** flow cytometry, acute leukemia, diagnosis, residual disease, relapse

Received 01 May, 2023; Revised 08May, 2023; Accepted 11 May, 2023 © The author(s) 2023.

Published with open access at [www.questjournals.org](http://www.questjournals.org)

### I. Introduction

Le diagnostic d'une leucémie aiguë est évoqué lors de la mise en évidence de cellules blastiques à l'examen morphologique d'un frottis de sang ou de moelle, dans un contexte d'hyperleucocytose ou au contraire de cytopénie périphérique, il s'agit d'une expansion tumorale et non contrôlée de cellules hématopoïétiques bloquées dans leur différenciation à un stade précoce de maturation [1]. Les étapes initiales du diagnostic requièrent l'identification de la lignée cellulaire en cause, et reposent sur l'examen morphologique et la caractérisation immunophénotypique et moléculaire des cellules blastiques. Ces résultats peuvent être obtenus en quelques heures et guider rapidement les décisions thérapeutiques.

Si la nouvelle classification de l'Organisation Mondiale de la Santé 2022 (OMS 2022) des leucémies aigues accorde une place importante à la biologie moléculaire et la cytogénétique, l'immunophénotypage reste

tout de même un outil indispensable dans chacune des étapes de diagnostic, suivi et évaluation de la maladie résiduelle [2].

Pour l'ensemble de ces étapes, diagnostic, évaluation de la chimiosensibilité et suivi de la maladie résiduelle (MRD), la cytométrie en flux, permettant de caractériser l'immunophénotype des cellules sanguines ou médullaires, est devenue un élément indispensable de la prise en charge des patients [1].

Indications de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës [3] :

- **Diagnostic** : La cytométrie en flux est souvent utilisée pour diagnostiquer les leucémies aiguës. Elle permet d'identifier les cellules leucémiques dans le sang ou la moelle osseuse et de les distinguer des autres types de cellules.
- **Classification** : La cytométrie en flux peut aider à classer les leucémies aiguës en fonction du type de cellules leucémiques impliquées. Par exemple, elle peut aider à distinguer une leucémie aiguë lymphoïde (LAL) d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM).
- **Évaluation de la réponse au traitement** : La cytométrie en flux peut être utilisée pour suivre l'efficacité du traitement des leucémies aiguës. Elle permet de mesurer la proportion de cellules leucémiques dans le sang ou la moelle osseuse avant et après le traitement.
- **Détection de la rechute** : La cytométrie en flux peut être utilisée pour détecter la rechute de la maladie après le traitement. Elle permet de mesurer la proportion de cellules leucémiques dans le sang ou la moelle osseuse pour déterminer une récurrence de la maladie.

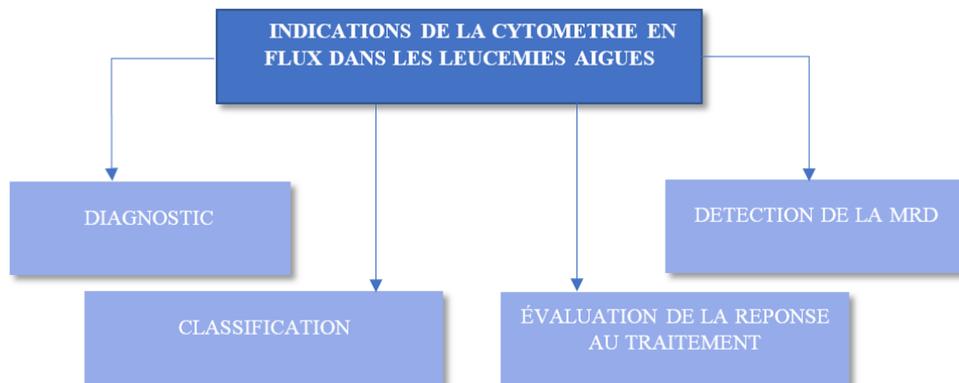
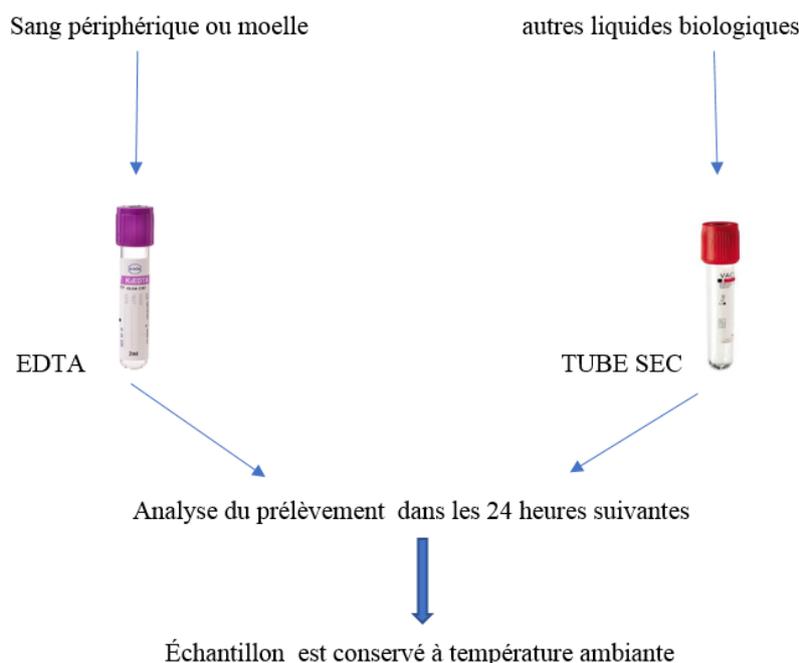


Schéma I : indication de la cytométrie en flux dans les leucémies aiguës :

**Principe de la technique :**

**a) Prélèvement [4] :**

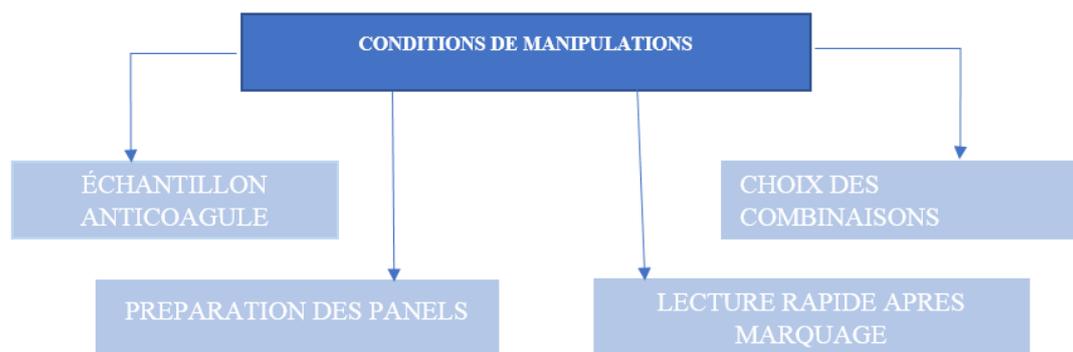
- Le sang périphérique ou de la moelle osseuse est mis sur un tube contenant l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), le tube sec est réservé pour la majorité des autres liquides biologiques.
- L'analyse du prélèvement doit se faire dans les 24 heures suivantes.
- Il n'y a pas de conditions particulières pour son acheminement.
- L'échantillon est conservé à température ambiante.



**Schéma II : montrant la phase pré-analytique du prélèvement**

**b) Conditions de manipulations [1,8]:**

- L'échantillon doit être correctement anticoagulé (tube EDTA), étape qui revient au préleveur mais doit être vérifiée au laboratoire.
- La préparation en amont des panels sous forme de cocktails utilisés sur plusieurs jours est possible mais doit respecter ces conditions de maintien à l'obscurité.
  - ✓ Panel d'orientation : B (CD79a) / T (CD3) / myéloïde (Myélopéroxydase).
  - ✓ Panel de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) : CD10, CD19, CD22, CD34, CD45, CD79a et terminale déoxynucléotidyl transférase (TdT).
  - ✓ Panel de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) : CD13, CD33, CD34, CD45 et HLA-DR
- La lecture au cytomètre doit être effectuée le plus rapidement possible après les marquages vu que les fluorochromes récents et les tandems de fluorochromes sont des réactifs extrêmement sensibles à la lumière qui doivent être conservés et manipulés de façon à les exposer le moins possible aux photons.
- Le choix des combinaisons d'anticorps doit tenir compte des coexpressions possibles et des fuites de fluorescence d'un fluorochrome à l'autre.



**Schéma 3 : montrant les principales conditions de manipulation de l'échantillon**

**c) Identification de la lignée hématopoïétique en cause [1] :**

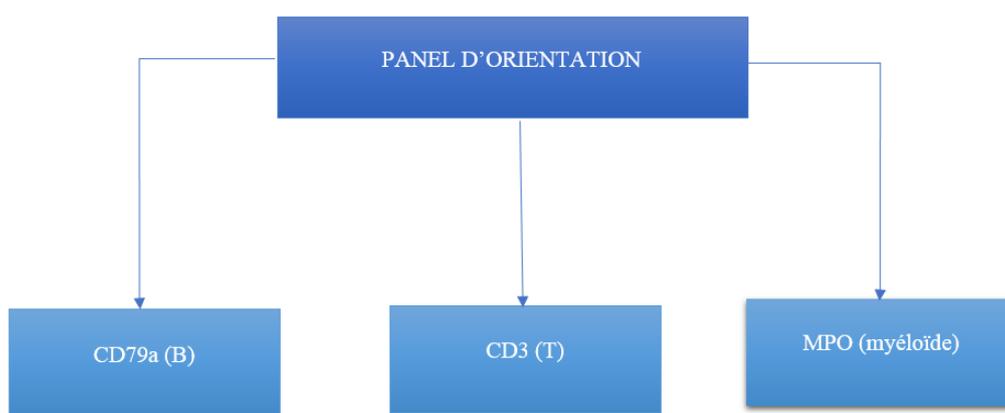
Le panel d'orientation pour l'immunophénotypage des leucémies aiguës est un panel d'anticorps utilisé pour identifier les types cellulaires de base et orienter la classification des leucémies aiguës. Il comprend généralement des marqueurs de surface qui permettent de différencier les cellules immunitaires en fonction de leur lignée de différenciation. Voici quelques exemples de marqueurs qui peuvent être inclus dans un panel d'orientation :

- CD3 : marqueur des lymphocytes T.
- CD79a, CD19, CD20, CD22 : marqueurs des lymphocytes B.
- CD33, CD13, CD117, Myéloperoxydase (MPO) : marqueurs des cellules myéloïdes.
- CD34, HLA-DR : marqueurs des cellules souches hématopoïétiques et des cellules immatures.
- CD45 : marqueur commun à toutes les cellules hématopoïétiques.

En utilisant ce panel d'orientation, les leucémies aiguës peuvent être classées en fonction de leur lignée de différenciation prédominante (lymphoïde ou myéloïde) et de leur stade de différenciation (précurseur ou mature). Ensuite, des panels de marqueurs plus spécifiques peuvent être utilisés pour caractériser les sous-types de leucémies aiguës avec plus de précision.

D'une manière générale, il est recommandé d'obtenir une positivité pour au moins deux marqueurs dans une lignée, associée à la négativité des marqueurs des autres lignées.

Les seuils de positivité pour chaque marqueur peuvent varier en fonction des protocoles d'analyse et des caractéristiques des échantillons. Les seuils de positivité peuvent être ajustés pour optimiser la sensibilité et la spécificité de la détection des cellules leucémiques, en utilisant des échantillons sains et des contrôles de qualité pour définir les seuils de positivité appropriés.

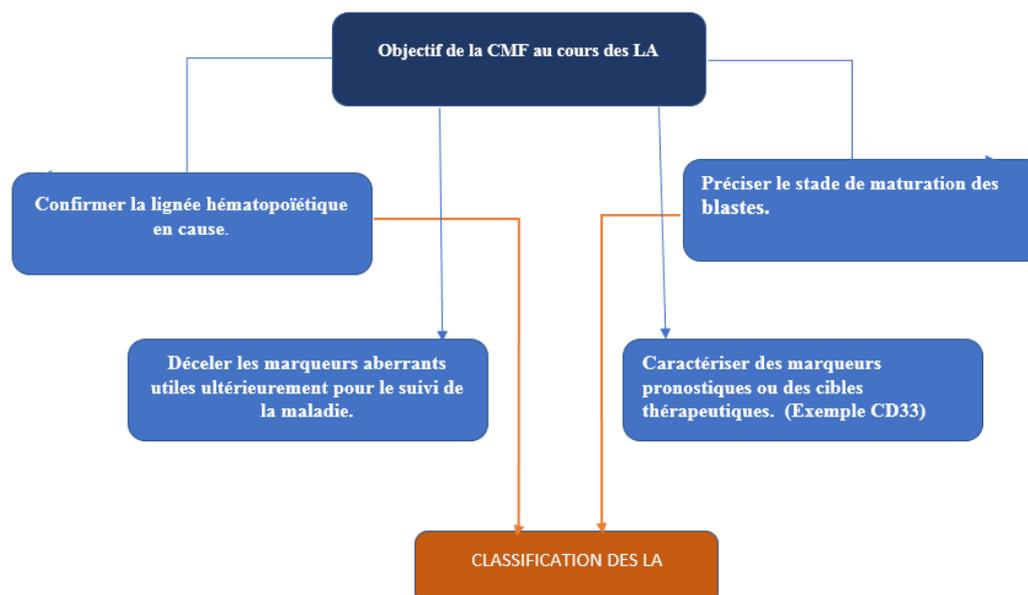


**d) Le choix des panels :**

La première étape du choix des panels consiste à affiner la définition du compartiment des progéniteurs en associant CD16 et CD11b pour identifier les granuleux et leurs progéniteurs, CD11b et CD14 pour identifier les monocytes. Les lymphocytes sont facilement repérables par leur forte expression de CD45 [5]. Une équation booléenne au sein des cellules vivantes (après exclusion des débris) permet alors de définir les progéniteurs comme : « non granuleux et non monocytes et non lymphocytes », excluant ainsi de la population leucocytaire les formes les plus matures. L'addition à ce panel de débrouillage de CD19 et CD10 permet de compléter l'analyse en identifiant les progéniteurs B ou hématogones dont l'intensité d'expression de CD45 s'accompagne de la perte de CD10. Ensuite, on étudie les marqueurs exprimés ou absents par des blastes. Quand on a un envahissement majeur et monomorphe de la moelle rend cette application simple [4,6].

Objectifs de l'immunophénotypage des leucémies aiguës

Intérêts de la cytométrie en flux (CMF) au cours des leucémies aiguës (LA) sont les suivants [7] :



**a) Classification des LAL :**

Les LAL peuvent être classées selon l'EGIL, qui se calque sur les étapes de différenciation lymphoïde [8].

**Tableau I – Critères immunophénotypiques de classification des LAL B de selon l'EGIL [8].**

Lignée B				
	cCD79a, CD19, c/sCD22	CD10	cy	sIg*
B-I (pro-B)	+	-	-	-
B-II (common)	+	+	-	-
B-III (pre-B)	+	+	+	-
B-IV (mature, Burkitt)	+	+	+	+

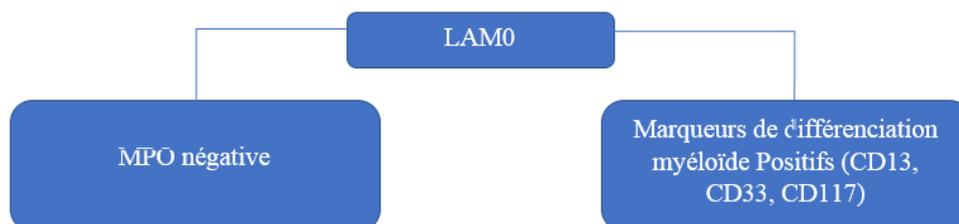
**Tableau II– Critères immunophénotypiques de classification des LAL T de selon l'EGIL [8].**

Lignée T					
	cCD3	CD7	CD2, CD5, CD8	CD1a	sCD3/ CD1a-
T-I (pro-T ou ETP*)	+	+	-	-	-
T-II (pre-T)	+	+	+	-	-
T-III (cortical-T)	+	+	+	+	-
T-IV (mature T)	+	+	+	-	+

Il est nécessaire de démontrer à la fois la positivité des blastes pour les marqueurs notés + et leurs négativité pour les marqueurs notés négatif. L'absence de l'une ou l'autre de ces informations empêche l'application de la classification.

**b) Classification des LAM :**

Les cinq marqueurs les plus importants pour caractériser une LAM sont les antigènes CD34, CD117, CD33, CD13 et MPO, sachant que toutes les combinaisons possibles de coexpression de ces molécules peuvent être observées. -Les formes de LAM caractérisées par une morphologie indifférenciée, l'absence de marqueurs des lignées lymphoïdes, la présence de marqueurs myéloïdes mais l'absence de MPO caractérise les LAM de différenciation minimale de la classification OMS ou LAM0 [9].



-Les caractéristiques cliniques et morphologiques des leucémies promyélocytaire à translocation t (15;17) n'imposent pas de réaliser un immunophénotypage.  
 -Les formes de LAM à différenciation monocyttaire, M4 et M5 de la classification franco-américano-britannique (FAB) associent souvent la coexpression d'antigènes monocytaires comme CD14 [1].

Le compte rendu immunophénotypique [1] :

Le compte rendu immunophénotypique doit conclure sur la lignée, le stade de la maturité des blastes et le détail des marqueurs exprimés ou non est donné sous forme de pourcentage (image I).

Analyse immunophénotypique des cellules immatures		
Nature de prélèvement	Moëlle osseuse	
Contrôle cytologique	Présence de blastes d'allure myéloïde.	
Blastes	12	%
<b>Marqueurs T</b>		
CD3	0	%
cyCD3	5	%
CD7	76	%
<b>Marqueurs B</b>		
CD19	0	%
cyCD79a	2	%
<b>Marqueurs myéloïdes</b>		
cyMPO	47	%
CD13	95	%
CD14	1	%
CD15	4	%
CD33	95	%
CD117	74	%
<b>Marqueurs non restreints</b>		
HLA-DR	97	%
CD38	93	%
CD11b	1	%
CD34	97	%

Image 1 : image montre un compte-rendu d'immunophénotypage:

Ce rapport dans cet exemple montre :

Une infiltration de la moelle osseuse par 12 % de blastes myéloïdes qui exprime :

- Marqueurs myéloïdes : MPO +, CD13+, CD33+, CD117+, CD15-, CD11b-

- Marqueur monocytaire : CD14-
- Marqueur lymphoïde : CD7 +
- Marqueurs d'immatrité : CD34+, CD38+, HLD-DR +

Il s'agit donc de blastes myéloïdes qui exprime un marqueur aberrant le CD7.

Ce résultat est à corrélér aux données du myélogramme qui reste l'examen de référence pour évaluer une blastose.

Autres intérêts de la cytométrie en flux dans le suivi des leucémies aiguës

a) **La recherche de la maladie résiduelle en cytométrie en flux :**

La recherche de la MRD repose sur l'identification de cellules présentant le même immunophénotype que les blastes du diagnostic [10, 11].

➡ L'absence de détection de cellules présentant l'immunophénotype des blastes initiaux après examen de 100 000 cellules place déjà la maladie résiduelle à une valeur inférieure à 10<sup>-5</sup>.

b) **L'examen de la moelle osseuse entre J8 et J35 :**

Selon les protocoles est traditionnellement réalisé en morphologie mais peut bénéficier utilement d'une analyse en cytométrie en flux permettant l'examen d'un bien plus grand nombre de cellules, en précisant leurs caractéristiques [12].

➡ Un nombre croissant de publications indique que les étapes précoces de la cortico- et de la chimio-sensibilité sont des éléments clés du pronostic des leucémies aiguës.

c) **Les données sont consultables et ré interprétables :**

Elles constituent un outil précieux pour comparer au fil du temps l'immunophénotype des cellules résiduelles et/ou d'une rechute à celui du diagnostic.

## II. Conclusion :

La cytométrie en flux reste un outil de diagnostic essentiel dans le cas des leucémies aiguës, avec des panels simplifiés étant de plus en plus utilisés pour l'assignement de lignée, qui est le critère principal pour guider les choix thérapeutiques. De plus, la définition des caractéristiques immunophénotypiques dès le diagnostic peut être utile pour détecter la maladie résiduelle et caractériser la rechute. Enfin, les études précoces de la sensibilité au traitement sont de plus en plus reconnues comme les meilleurs marqueurs pronostiques et peuvent bénéficier de la précision offerte par la cytométrie en flux.

## Référence :

- [1]. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European leukemia network package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567-74.
- [2]. Khoury JD, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1703-19. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-016131>
- [3]. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood*. 2015;126(8):964-971. Doi:10.1182/blood-2015-03-632433
- [4]. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26(9):1986-2010.
- [5]. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(1):4-10.
- [6]. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, et al. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. *Cytometry A* 2013;83(12):1066-72.
- [7]. Marie-Christine Béné a.\*, Francis Lacombe, Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës, REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - AVRIL 2015 - N°471// 35.
- [8]. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783-6.
- [9]. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Fourth Edition. Lyon, CIRC IARC, 2008.
- [10]. Garand R, Beldjord K, Cavé H, et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013;27(2):370-6.
- [11]. Lacombe F, Allou K, Arnoulet C, et al. Assessment of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia in multiparameter flow cytometry. *Leuk* 2013;122(21):2613 (ASH abstract)
- [12]. Wood B, Winter SS, Dunsmore KP, et al. T-lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows excellent outcome, lack of significance of the early thymic precursor (ETP) immunophenotype and validation of the prognostic value of end-induction minimal residual disease (MRD) in Children's oncology group (COG) study AALL0434. *Blood* 2014;124(21):ASH abstract.