



En 1945, W. Coulter a créé un appareil capable de compter les cellules et de mesurer leur taille en variant la résistivité du flux liquidien. En 1953, T. Crosland a utilisé un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire. Dans les années 70, le développement et les progrès réalisés en immunologie ont permis une large utilisation de la CMF. Actuellement, le développement simultané des appareillages polyvalents et de très nombreux anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux.

### Intérêts de la CMF

La CMF a un grand intérêt dans l'immunophénotypage en hématologie, la quantification d'ADN, l'analyse du cycle cellulaire, la détermination de la viabilité cellulaire et le monitoring de l'état immunitaire des patients et en recherche, dans l'analyse du caryotype, le suivi du flux ionique, l'analyse du stress oxydatif, la détermination du PH intracellulaire, l'analyse de la fluidité membranaire, l'analyse de la prolifération et de l'apoptose cellulaire.

Dans cet article, nous avons ciblé l'application de la CMF en hématologie.

### Avantages de la CMF

La cytométrie en flux réunit plusieurs caractéristiques qui font d'elle une des meilleures techniques analytiques.

- Les principaux avantages de la CMF sont une :
  - Analyse d'un grand nombre de cellules dans un temps court.
  - Analyse des populations très rares, comme les cellules souches hématopoïétiques CD 34+.
  - Analyse de plusieurs paramètres simultanément pour une même cellule, les meilleurs instruments de cytométrie peuvent mesurer jusqu'à 17 paramètres.
  - Analyse quantitative des paramètres mesurés.
  - Trier les cellules analysées en toutes stérilités.
- Les inconvénients de la CMF sont :
  - Analyse doit être effectuée sur des cellules vivantes.
  - Le coût : les réactifs du cymomètre sont très coûteux.
  - Absence d'étalons internationaux de fluorescence.

### Principe de fonctionnement d'un CMF

Le principe de fonctionnement du cymomètre repose sur la détection et la quantification de l'expression d'antigènes à la surface et dans le cytoplasme des cellules vivantes normales et pathologiques.

Un cymomètre en flux est un appareil complexe qui fait intervenir plusieurs systèmes. Il est composé de 03 systèmes qui sont : le système fluidique, le système optique et le système électronique (figure 1).

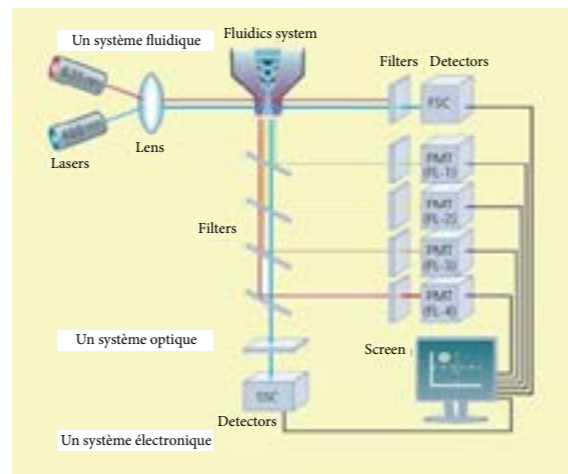


Figure 1 : Les principaux systèmes du cymomètre en flux.

### Technique de la CMF

Les cellules expriment différents marqueurs qui peuvent persister toute la vie ou au contraire apparaître au cours de la différenciation cellulaire ; les cellules vont acquérir leurs fonctions définitives, ce qui va s'accompagner d'un nouveau phénotype ; pour reconnaître ces cellules on utilise plusieurs AC monoclonaux qui reconnaissent les clusters de différenciation (CD) destinés à déterminer le type et le stade de maturation. La CMF est basée sur la mesure de la fluorescence des cellules.

Les prélèvements analysés par CMF en hématologie sont le sang périphérique, les prélèvements médullaires (moelle osseuse), le suc ganglionnaire obtenu par ponction aspiration ganglionnaire ou par une trituration après biopsie et sur d'autres suspensions comme le liquide pleural, le liquide d'ascite, le liquide céphalo-rachidien, le lavage alvéolaire).

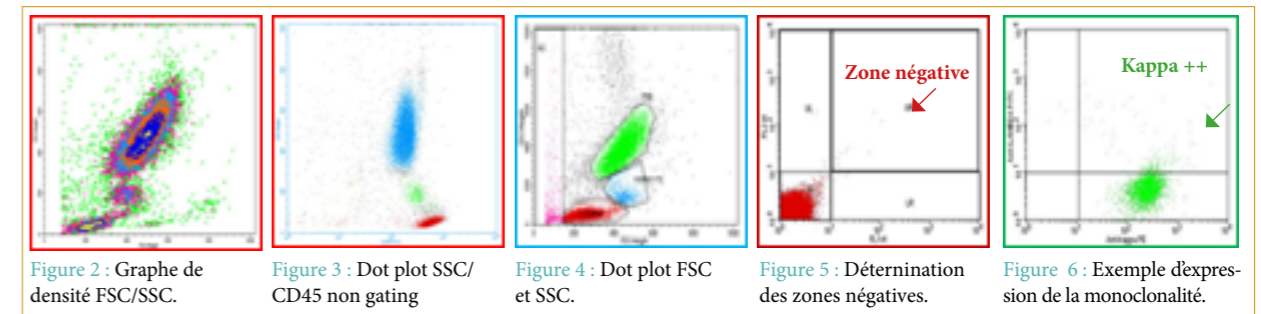
La préparation de l'échantillon pour immunophénotypage par CMF passe par différentes étapes : une numération de l'échantillon, un lavage du culot, une perméabilisation membranaire en cas de marquage intracytoplasmique et un marquage de surface par les différents anticorps monoclonaux selon les panels prédéfinis pour chaque pathologie étudiée avec acquisition et enregistrement sur le cymomètre.

L'analyse des données permet :

- D'étudier l'aspect morphologique des cellules (figure 2-3),
- De cibler les cellules à étudier « Gate » (figure 4),
- De déterminer les zones négatives pour une meilleure analyse (figure 5),
- De quantifier la positivité des fluorochromes, leurs résultats sont exprimés en pourcentage,
- De préciser l'intensité de fluorescence,
- De déterminer le phénotype des cellules tumorales et des cellules normales,

- D'analyser des populations minoritaires,
- De confirmer la monoclonalité des cellules malignes (figure 6).

- De rechercher des marqueurs aberrants et des marqueurs d'immatrité.



(Laboratoire hématologie CAC Blida)

### Application de la CMF en hématologie

Actuellement la CMF en hématologie est devenu un outil de travail incontournable et largement appliqué dans plusieurs approches soit diagnostique, thérapeutique, pronostique et dans le suivi de la maladie résiduelle ; et cela pour une prise en charge adéquate.

Nous allons étudier l'application de la CMF en hématologie tout en rapportant notre expérience dans ce domaine. Notre plateau technique de cytométrie en flux a été installé vers la fin de l'année 2006. Les premières manipulations ont été effectuées sur un cymomètre en flux 04 couleurs, actuellement en plus de ce dernier on manipule sur un cymomètre en flux de 08 couleurs.

Actuellement, l'application de la CMF a un grand intérêt dans :

#### 1. Le diagnostic

La CMF est largement utilisée en hématologie de routine pour poser un diagnostic précis dans les hémopathies bénignes ou malignes.

#### • Analyse des pathologies bénignes :

##### - Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) (8-9) :

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava-Micheli est une maladie rare, acquise et chronique. Elle est liée à l'expansion clonale d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques qui sont porteuses d'une mutation acquise du gène PIGA, localisé sur le bras court du chromosome X (Xp22). Il en résulte un blocage de la synthèse des molécules d'ancrage de Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI), responsables de la fixation de nombreuses protéines à la surface cellulaire. La CMF est la méthode de référence pour le diagnostic d'HPN car elle est la plus sensible et la plus spécifique tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Le diagnostic repose sur la détermination des populations déficitaires sur au moins 02 molécules GPI dépendantes à la surface des cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules négatives.

Depuis 2009 à 2017, nous avons effectués 118 immunophénotypages par CMF à la recherche du clone HPN dans l'aplasie médullaire. La CMF a conclu à une absence de clone HPN dans 91 cas (77,2%) et a retrouvé un clone HPN dans 27 cas (22,8%). La CMF a été déterminante pour le diagnostic d'HPN dans sa forme aplasiant dans 22,8% des cas, rejoignant en cela les données de la littérature. Les clones HPN sont diagnostiqués dans 10-45% des aplasies, soit lors du diagnostic ou durant l'évolution (tableau I et figure 7).

Tableau I : Répartition des clones HPN dans les AM.

Groupe (Réfs)	%
Notre étude	22,8
Tunis Menif (congrès maghrébin 2011) <sup>(9)</sup>	45
SFH : Socie (Lancet 1996) <sup>(8)</sup>	30
French (Blood 1990)	10

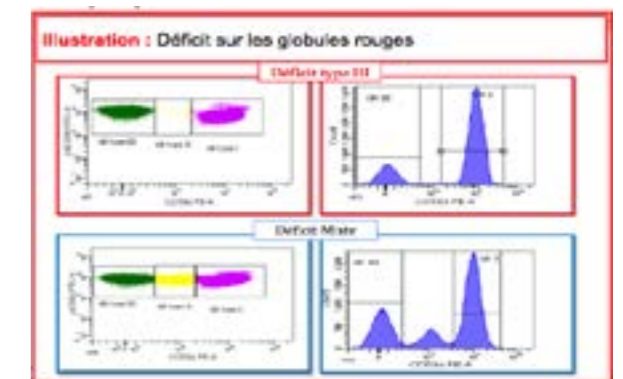


Figure 7 : Illustration par image de clone HPN sur globules rouges (CAC Blida)

La CMF est une technique très sensible et plus spécifique que les tests traditionnels dans le diagnostic et le suivi du clone HPN.

#### • Thrombopathies constitutionnelles :

La Thrombasthénie de Glanzmann est une anomalie d'agrégation plaquettaire liée à un déficit quantitatif ou

qualitatif de la GP IIB-IIIa (récepteur du fibrinogène). Le syndrome de Bernard Soulier est une anomalie par défaut d'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire lié à un déficit quantitatif ou plus rarement qualitatif en GP Ib-IX (récepteur majeur du FVW).

La CMF permet le diagnostic des anomalies quantitatives des glycoprotéines plaquettaires en quantifiant précisément les glycoprotéines GPIIb, GPIb et GMP140 (P-sélectine) à la surface des plaquettes, à l'état natif et après activation au TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide).

Les avantages de la CMF dans les thrombopathies :

- Il est possible de travailler sur des petits volumes de sang total,
- L'analyse est possible même en cas de thrombopénie sévère (contrairement à l'agrégométrie),
- Elle permet de diagnostiquer aussi bien les sujets homozygotes que les sujets hétérozygotes,
- Elle permet de typer la thrombasthénie de Glanzmann.

• Analyse des hémopathies malignes

La CMF permet d'affirmer le phénotype de la prolifération

qui peut être soit lymphoïde B- T- NK ou myéloïde ou monocyttaire ou extra-hématologique. Elle recherche la monoclonalité lymphoïde B ou T par l'analyse du ratio d'expression des chaînes légères et pour la lignée lymphoïde T, la monoclonalité mais qui reste difficile à déterminer (2).

- Les leucémies aiguës (LA) (5) : La CMF est le seul examen fiable qui permet d'affirmer la nature lymphoïde ou myéloïde d'une prolifération blastique, de classer en leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) B ou T et en sous classes les LAL et de différencier les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) notamment la LAM0.

De janvier 2007 à décembre 2014, nous avons réalisé 425 typages de leucémies aiguës (LA) par cytométrie en flux dont 180 cas (42,4%) concernaient des leucémies aiguës lymphoblastiques.

La CMF a permis de déterminer le phénotype de LAL selon les critères d'EGIL dans 94,5% des cas typés : LAL B (n = 87) (48,4%), LAL T (n = 83) (46,2%), elle a conclu à une LA indifférenciée dans 03 cas (1,6%) et était non concluante dans 07 cas (3,8%) (figure 8).

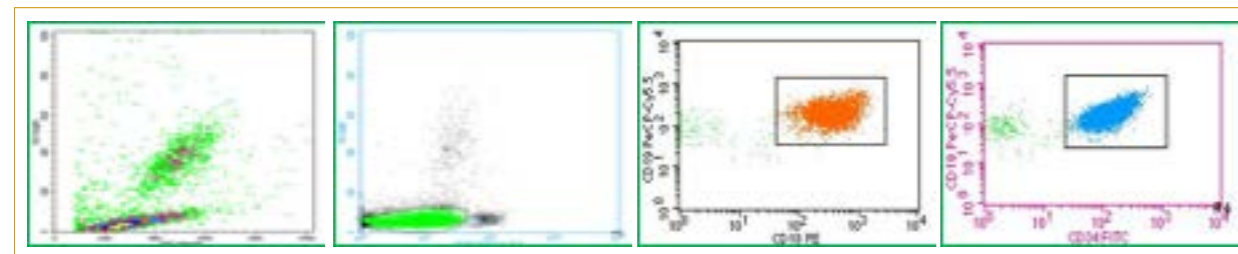


Figure 8 : Illustration par un cas de LAL : CD45-, CD19+, CD10+ et CD34+. (CAC Blida).

Tableau II : Comparaison des fréquences des LAL T avec la littérature.

Référence	LAL T %	
	Enfants	Adultes
Blida 83 LAL T /170 cas	43,2	51,7
Alger CPMC 83 cas (10)	42,5	44
Allemande Ludwig (12)	13	24
Bellaoui (Maroc) : 100 cas (13)	63	
Tunisienne : 30 cas (11)	26	-

Dans notre étude on note une fréquence élevée des LAL T qui confirme les données d'une étude déjà présentée en 2011 ; elle rejoint les données de celles du CPMC Alger (2) et du Maroc (7) ; paradoxalement les LAL T sont peu fréquentes

dans la série allemande de Ludwig (4) et de la série tunisienne. La prédominance des LAL T dans notre série est comparable à celle observée en Égypte 48%, en Palestine 60% et au Japon 50% par opposition à leurs fréquences plus faibles en Europe (France : 20%, Angleterre : 14%) et aux États Unis d'Amérique : 14% (tableau II).

• Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC)

la CMF a une place prépondérante dans le diagnostic des SLPC confirmant le diagnostic, en mettant en évidence la monoclonalité de la lignée lymphocytaire (B : rapport des chaînes légères Kappa et Lambda et T par analyse de rapport CD4/CD8, trou phénotypique, l'expression d'un marqueur aberrant).

La CMF permet de définir le score de Matutes qui attribue un score à chacun des 5 marqueurs suivants (tableau III).

Tableau III : Le score de Matutes.

Antigène (Ag)	1 point pour chaque Ag Si	0 point pour chaque Ag Si
CD5	Positif (+)	Négatif (-)
CD23	Positif (+)	Négatif (-)
CD22 (ou CD79b)	Expression faible	Expression non faible
FMC7	Négatif (-)	Positif (+)
Ig de surface	Expression faible	Expression non faible

Une leucémie lymphoïde chronique est défini par un score total ≥ 4. Des scores < 3 excluent une LLC (correspondent à des LNH-B leucémisés).

La CMF permet aussi de déterminer le pourcentage et l'intensité de la positivité des marqueurs monoclonaux (figure 9).

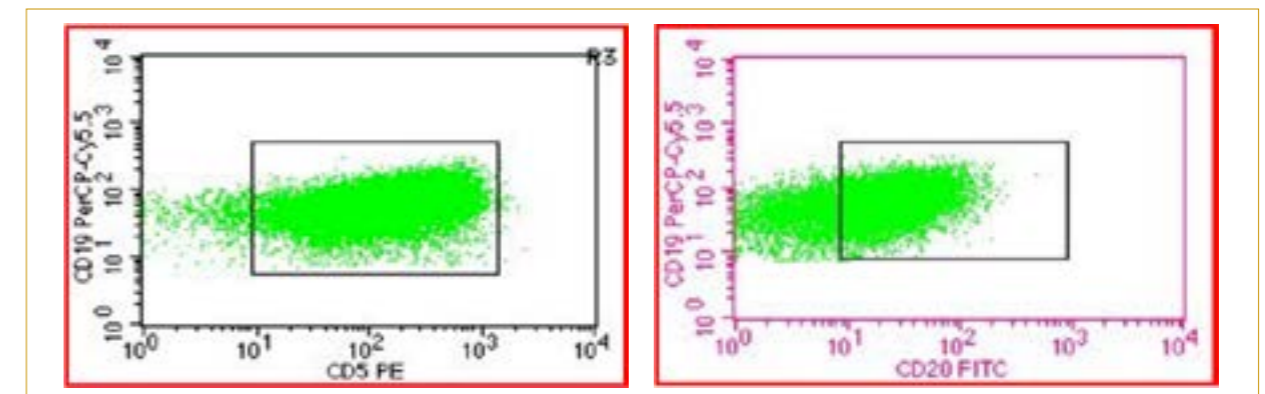


Figure 9 : Expression forte du CD5 et expression faible du CD20. (CAC Blida)

Dans notre étude, nous avons analysé 494 cas de SLPC. L'immunophénotypage par cytométrie en flux a conclu à : une leucémie lymphoïde chronique (LLC) dans 312 cas (63%), une leucémie à tricholeucocytes

12 cas (2,5%), un syndrome lymphoprolifératif chronique en conversion leucémique (SLPC) dans 170 cas (34,5%) dont 157 cas (92,4%) sont de phénotype B et 11 cas (6,5%) de phénotype T (figure 10).

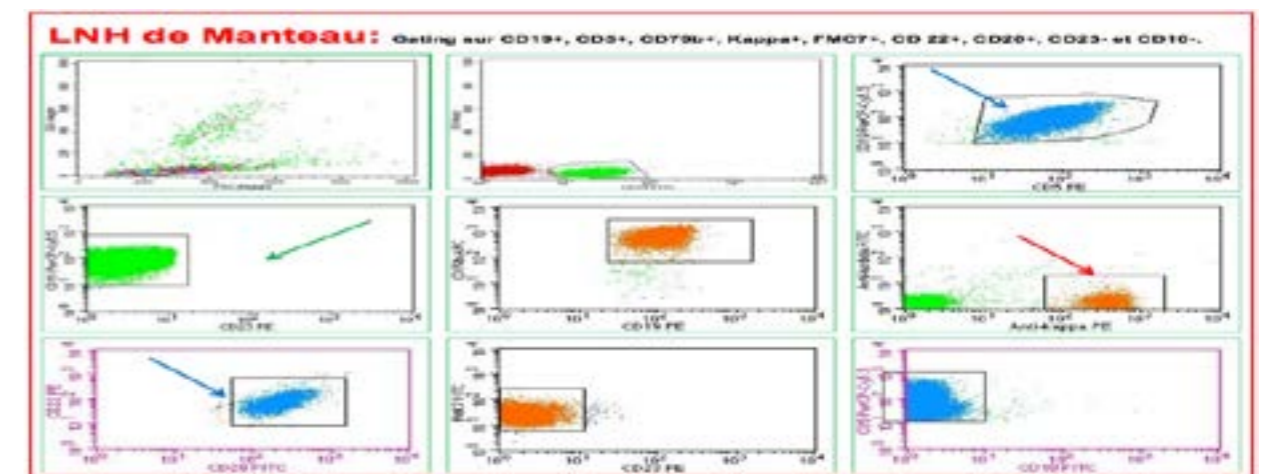


Figure 10 : Illustration par un cas de LNH Manteau. (CAC Blida).

## 2. Thérapeutique

Depuis l'avènement de la thérapeutique ciblée, plusieurs outils diagnostiques sont utilisés à la recherche de ces marqueurs comme la CMF qui détermine des marqueurs permettant une thérapeutique ciblée comme l'anti CD 20 (SLPC, LAL B), anti CD30 (figure 11).

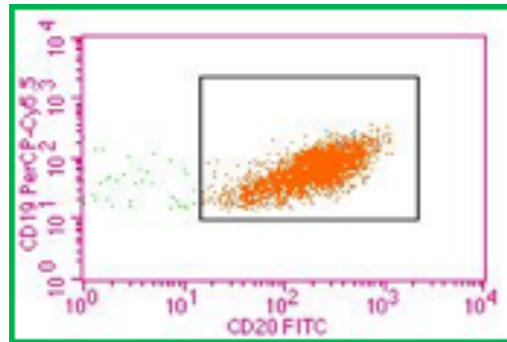


Figure 11 : Expression du CD20. (CAC Blida)

## 3. Pronostic

La CMF recherche et évalue l'impact pronostique de certains marqueurs membranaires comme l'expression du CD38, le Zap70 dans les LLC et le CD44 dans les LNH grandes cellules B.

## 4. Maladies résiduelles (MDR) (Monitoring des cellules malignes)

La CMF permet de faire le suivi de certaines hémopathies malignes en rémission complète en détectant précocement la réapparition des cellules malignes dans la moelle osseuse avant même la rechute clinique.

## 5. Numération cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+

La numération des CSH d'un greffon est obligatoire pour assurer l'efficacité de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (auto/allo greffe) en déterminant un seuil minimum de CD34 pour engager la procédure.

## Conclusion

En hématologie, des progrès considérables ont été faits dans les domaines diagnostique, pronostique et thérapeutique depuis l'avènement de la CMF. Ce qui fait de

cette technique un outil remarquable et aujourd'hui indispensable dans l'évaluation de toute hémopathie maligne et quelquefois bénigne.

## Date de soumission

25 Juillet 2019

## Liens d'intérêts

L'auteure déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

- H. Jouault, M. Imbert. La cytométrie en flux: intérêt et application en hématologie. Revue Française des Laboratoires; Volume 1995, n°275, pages 29-35
- Jeffers. M. D, Milton. J, Herriot. R et McKean. M. Fine needle aspiration cytology in the investigation on non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Pathol. 1998 March; 51(3): 189-196.
- Gane. P. La cytométrie en flux en immuno-hématologie. Transfusion clinique et biologique, 2002; 9: 271- 279.
- Lossos. I.S, Morgensztern. D. Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 2006 Feb 20; 24 (6) : 995 - 1007.
- Immunophénotypage des hémopathies malignes Bernard Husson Centres Hospitaliers. Jolimont, Lobbes Site de Jolimont Laboratoire de Biologie Clinique, Département Hématologie Unité de CMF 7100, Haine-Saint-Paul.
- Williams Hematology 6th edition (November 28, 2000): by Ernest Beutler M.D., Marshall A. Lichtman M.D., Barry S. Coller M.D., Thomas J. Kipps M.D. Ph.D., Uri Seligsohn M.D. (Editor) By McGraw-Hill Professional.
- Aplasies médullaires acquises G. Socié, C. Ferry, M. Robin, J.-Y. Mary EMC 2009.
- G. Socie, JY. Mary et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. Lancet.1996; 25: 1256 -64.
- H. Menif et al. Recherche de clone HPN par cytométrie en flux (CMF): à propos de 71 cas. CRTS de Sfax. Tunis. Casablanca. 8ème Congrès Maghrébin d'Hématologie 2011.
- Trabzi-Azeli Anissa. Application de l'immunophénotypage à la classification des leucémies aiguës. Thèse pour le diplôme de docteur en science médicales Juillet 1999, Faculté de Médecine d'Alger.
- S. Bouallegue. Etude cytogénétique des LAL de novo de l'enfant: à propos de 30 cas. Laboratoire d'hématologie biologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie. Hématologie, vol. 17, supplément, Mars 2011.
- Ludwig W. D, Reiter. A, Loffler. H et al. Immunophenotypic Features of childhood and Adult Acute lymphoblastic Leukaemia (ALL): Experience of the German Multicentre Trials ALL - BFM and GMALL Leukemia and lymphoma 1994, Vol 13, Supp 1: 71 - 76.
- H. Bellaoui, M. Khattab, M. EL Hansali et al. Etude du profil immunologique des leucémies aiguës Lymphoblastiques de l'enfant au Maroc. Intérêt de l'étude de la co-expression du CD34 et CD10. Biologie & Santé vol. 3, n° 1, 2003.

# 2016-2017-2018

## 19 numéros.

De nombreuses spécialités médicales couvertes

**Hémopathies malignes** Pathologies cardiovasculaires  
 Rhumatologie Immunothérapie des cancers  
**Oto-Rhino-Laryngologie** Allergies  
 Prévention & Dépistage des Cancers Endocrinologie  
**Diabète Néphrologie** Neurologie  
 Ophthalmologie Hépatologie Urologie-Andrologie  
 Ménopause & Ostéoprose Santé respiratoire  
 Santé de la femme

# 2019

## 07 Numéros déjà publiés.

## 03 numéros en cours.




Accès  
gratuit\*

Où que vous soyez, tous les numéros sont consultables en ligne sur :

**www.el-hakim.net**



 @elhakimmedecine

 elhakim.revuemedicale

 el\_alq

 linkedin.com/in/el-hakim