

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Biologiques
Spécialité: **Physiologie Cellulaire et Physiopathologie**

Thème

**Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic
d'hyperlymphocytose sanguine à évolution chronique**

Présenté par : M^r AMEUR Ahmed

Soutenu le 27 Octobre 2020 devant le jury composé de :

M ^r BENMOULOU A.	MCB (UMBB)	Président
M ^{me} BRENKIA O.	MCA (UMBB)	Promotrice
M ^{me} OUKID S.	Professeur (Hôpital Franz Fanon, Blida)	Co-Promotrice
M ^{me} GUETTAF H.	MCB (UMBB)	Examinatrice

Année universitaire : 2019-2020

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le bon dieu de m'avoir donné le pouvoir pour réaliser ce mémoire et aussi de m'avoir facilité les tâches durant notre travail.

Je remercie mes très chers parents de m'avoir encouragé durant toute ma formation et qui m'ont facilité les choses pour que je puisse terminer mes études.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Pr. OUKID. S d'avoir contribué au succès de mon stage et qui m'a aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier spécialement Mme. BRENKIA. O de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé jusqu'au bout de notre travail.

Je tiens à exprimer mes respectueux remerciements aux membres de jury Mr. BENMOULOU. A d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Mme. GUETTAF. H d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes :

Notre chef d'option Mr. BENMOULOU. A pour son soutien moral et intellectuel tout au long de ma formation master ainsi que toute l'équipe pédagogique de l'université de Boumerdes et les intervenants professionnels responsables de ma formation master.

Pr. BRADAI. M chef de service d'hématologie de m'avoir permis de faire mon stage pratique au sein de son service malgré les conditions défavorable.

Mme LARADJ. K d'avoir partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu, tout en m'accordant sa confiance et une large indépendance dans l'exécution de missions valorisantes.

Mr. BENALIOUAT. Y ainsi que tout le personnel du laboratoire d'hématologie du Centre Anti Cancer (CAC) - BLIDA.

Je remercie mes frères, ma petite sœur, ma famille ainsi que mes collègues et mes amis qui m'en soutenu par n'importe quelle façon jusqu'à la fin.

DÉDICACES

Je dédie ce travail :

À mes chers parents ;

À mes frères et à ma sœur ;

À ma famille ;

À mes amis ;

À tous les biologistes dignes de ce nom.



LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **APC** : Purified anti-Allophycocyanin.
- **BAX** : Bcl2 Associated X protein.
- **BCL-XL**: B Cell Lymphoma Extra-Large.
- **BCL-Xs**: B Cell Lymphoma small-large.
- **BCR** : B Cell Receptor.
- **CARD11**: Caspase Recruitment Domain Family Member 11.
- **CD** : Cluster de Différentiation.
- **CMF** : Cytométrie en flux.
- **CTCL** : Cutaneous T-Cell Lymphoma.
- **Del11q** : 11q Deletion.
- **EBV** : Epstein-Barr Virus.
- **EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic Acid.
- **FISH**: Fluorescence in Situ Hybridization.
- **FITC** : Fluorescein Isothiocyanate.
- **FL** : Follicular Lymphoma.
- **FSC** : Forward scatter.
- **HCL** : Hairy Cell Leukemia.
- **HLA-DR** : Human Leukocyte Antigen – DR isotype.
- **IgD** : Immunoglobulin D.
- **LB** : Lymphocyte B.
- **LGL** : Large Granular Lymphocyte.
- **LLC** : Leucémie Lymphoïde Chronique.
- **LNH** : Lymphomes Non Hodgkiniens.
- **LT** : Lymphocyte T.
- **LZM** : Lymphome de la Zone Marginale.
- **MCL** : Mantle Cell Lymphoma.
- **MCL1**: Induced Myeloid Leukemia Cell differentiation protein 1.
- **NF- κ B**: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.
- **NK** : Natural Killer cells.
- **PE** : Phycoérythrine.

- **PerCP** : Peridinin-Chlorophyll-Protein.
- **SLPC** : Syndrome Lymphoprolifératif Chronique.
- **SS** : Sezary Syndrome.
- **SSC** : Side scatter.
- **TP53** : Tumor Protein 53.
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	1

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. HYPERLYMPHOCYTOSE SANGUINE A EVOLUTION CHRONIQUE	3
I. 1. DEFINITION D'UNE HYPERLYMPHOCYTOSE SANGUINE	3
I. 2. ETIOLOGIE	3
I. 3. EPIDEMIOLOGIE	4
I. 4. PHYSIOPATHOLOGIE	5
II. DIAGNOSTIC POSITIF D'UNE HYPERLYMPHOCYTOSE SANGUINE CHRONIQUE	6
II. 1. EXAMEN CLINIQUE	6
II. 2. EXAMEN BIOLOGIQUE	6
II. 3. DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE	10
III. LA CYTOMETRIE EN FLUX	14
III. 1. DEFINITION ET DOMAINE D'APPLICATION	14
III. 2. COMPOSITION ET FONCTIONNEMENT DU CYTOMETRE EN FLUX	14
III. 3. LES AVANTAGES ET LIMITES DE LA CYTOMETRIE EN FLUX	17

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES	19
I. 1. DESCRIPTION GENERALE DE L'ETUDE	19
II. MATERIEL	19
III. METHODES	23

CHAPITRE III : RESULTATS

I. POPULATION ETUDIEE	29
I. 1. REPARTITION DES PATIENTS SELON LE SEXE	29

I. 2. REPARTITION DES PATIENTS SELON L'AGE	30
II. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES	30
II. 1. HEMOGRAMME	30
II. 2. CYTOLOGIE	31
III. RESULTATS DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE PAR CMF	32
III. 1. PRELEVEMENTS	32
III. 2. RESULTATS DE LA CMF	32
III. 3. CLASSIFICATION SELON LE SCORE MATUTES DANS LES SLPC B	34
IV. ASPECT IMMUNOPHENOTYPIQUE DES SOUS TYPES DES SLPC B	38
IV. 1. LES LEUCEMIES LYMPHOÏDES CHRONIQUES (LLC)	38
IV. 2. LES LYMPHOMES DE MANTEAU (MCL)	40
IV. 3. SYNDROME LYMPHOPROLIFERATIF CHRONIQUE B (SLPC B)	43
IV. 4. LYMPHOME DE LA ZONE MARGINALE (SMZL)	45
IV. 5. SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUE T (SLPC T)	45
IV. 6. HYPERLYMPHOCYTOSE REACTIONNELLE	48
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION</u>	49
CONCLUSION	53
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Répartition des différents types de SLPC en conversion leucémique (hors LLC) (Ramaoun et al., 2013).	4
2	Modèle de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille BCL-2 (Liu et Wang, 2012).	5
3	Signalisation en aval du BCR (Cymbalista, 2015).	6
4	Diagnostiques cytologiques différentiel des SLPC B (Haddad, 2010).	7
5	Stratégie de lecture de l'immunophénotypage des SLPC B (Dighiero et Hamblin, 2008).	9
6	Stratégie de lecture de l'immunophénotypage des SLPC T (Oukid, 2015).	10
7	Fonctionnement de l'ensemble des systèmes fluide, optique et l'électronique pendant l'acquisition et l'analyse des cellules (Christine Goetz et al., 2018).	15
8	Principe général de la cytométrie en flux (Zafrani et Monneret, 2017).	16
9	Dot Plot (Taille et structure du sang normale) du laboratoire d'hématologie du CAC Blida.	17
10	FACS Calibur BD du laboratoire d'hématologie du CAC Blida.	20
11	Calibrite 3 : Les Billes de calibration 3.	21
12	Exemple de 04 Anticorps monoclonaux.	22
13	Page d'acquisition des échantillons.	26
14	Ajustement de la zone négative.	27
15	Expression CD79b est fort en vert et faible en rose.	27
16	Expression de la monoclonalité Lambda.	28
17	Dot plot bi-paramétrique.	28
18	Répartition des 42 patients selon le sexe.	29

19	Répartition des 42 patients selon l'âge.	30
20	Répartition des 42 patients selon le taux de lymphocyte.	31
21	Répartition des 42 patients selon l'aspect cytologique.	32
22	Répartitions des SLPC selon le phénotype.	33
23	Répartition des 38 SLPC.	34
24	Classification selon le score de Matutes des 34 cas de SLPC B.	34
25	Répartition des patients LLC selon le sexe.	35
26	Répartition des patients LLC selon l'âge.	35
27	Répartition des patients LLC selon le taux de lymphocytes.	36
28	Résultats de la cytologie des patients LLC.	36
29	Score Matutes des patients LLC.	37
30	Expression des différents marqueurs chez les patients LLC.	38
31	Dot plot d'un cas LLC CD19 ⁺ , CD5 ⁺ , CD23 ⁺ , FMC7 ⁻ , CD79b ^{+/++} , Kappa ⁺ et CD20 ⁺ fortement exprimé.	39
32	Répartition des patients MCL selon le sexe et l'âge.	40
33	Répartition des patients MCL selon le taux de lymphocytes.	40
34	Résultats de la cytologie des patients MCL.	41
35	Score de Matutes des patients MCL.	41
36	Dot plot d'un cas MCL CD19 ⁺ , CD23 ⁻ , CD5 ⁺ et CD20 ⁺ fort.	42
37	Répartition des patients SLPC B selon le sexe et l'âge.	43
38	Répartition des patients SLPC B selon le taux de lymphocytes.	43
39	Répartition des patients SLPC T selon le sexe et l'âge.	45
40	Répartition des patients SLPC T selon le taux de lymphocyte.	46

41	Répartition des 4 patients SLPC T selon les résultats de la CMF.	46
42	Dot plot d'un cas CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁻ , CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , TCR αβ ⁺ , CD57 ⁻ .	47

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
I	Score de Matutes/Moreau (Moreau et al., 1997).	8
II	Critères en faveur d'une hyperlymphocytose réactionnelle ou néoplasique (Emile, 2016).	11
III	Néoplasmes lymphoïdes leucémiques à cellules B matures : diagnostic différentiel de la LLC par rapport aux autres causes fréquentes de néoplasmes lymphoïdes leucémiques à cellules B matures (Dighiero et Hamblin, 2008).	12
IV	Expression des différents marqueurs dans les SLPC T (Oukid, 2015).	13
V	Les marqueurs des cellules lymphoïdes (B, T, NK).	22
VI	Panel des SLPC B et T.	23
VII	Répartition des 42 patients selon le sexe.	29
VIII	Taux de globules blancs des 42 patients.	31
IX	Résultats de l'immunophénotypage par CMF.	33
X	Expression des marqueurs lymphocytaires dans la LLC.	38
XI	Expression des marqueurs B des lymphomes de Manteau.	42
XII	Expression des marqueurs lymphocytaire B chez les patients SLPC B.	44
XIII	Expression des différents marqueurs LT dans les SLPC T.	47
XIV	Comparaison des résultats du score de Matutes.	50
XV	Etude d'expression des marqueurs du score de Matutes.	50
XVI	Comparaison des résultats des SLPC hors LLC.	51
XVII	Expression de la monoclonalité dans les SLPC B hors LLC.	52

Introduction

INTRODUCTION

L'hyperlymphocytose est une augmentation du nombre de lymphocytes dans le sang dépassant $4 \times 10^9 / L$ (**Johansson *et al.*, 2014**).

Elle a été décrite pour la première fois avant les années 1900 puis a été étudiée plus en détail 2 ans après par Henwood et Harvey (**Harvey et Henwood, 1906**).

Elle peut être une caractéristique d'infection, en particulier chez les enfants, ou une atteinte d'un syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC) chez les sujets âgés.

Les SLPC sont des maladies incurables d'évolution indolente affectant les cellules matures des lignées lymphoïdes B, T et autres lignées apparentées comme les cellules NK dont la plus fréquente est la leucémie lymphoïde chronique (LLC B) (**Sylvain, 2008**).

Le diagnostic des SLPC en conversion leucémique se fait sur une simple prise de sang. Il est orienté tout d'abord par la clinique, les données de la numération de formule sanguine et l'examen des frottis sanguins, puis il sera complété éventuellement par l'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF).

Plusieurs études sur l'intérêt de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans le diagnostic des SLPC en conversion leucémique ont été menés, nous citons l'étude de **Khazri (2012)** sur un territoire en dehors de l'Algérie, et l'étude d'**Oukid *et al.*, (2015)** au niveau de Centre Anti-Cancer (CAC) Blida, service hématologie sur le territoire national. Ces études ont montré que les SLPC touchant les deux sexes, d'âge > 40 ans avec une prédominance masculine, et que la similitude dans la présentation clinique et cytologique des différents SLPC rend parfois le diagnostic positif difficile, d'où l'intérêt de rassembler ses syndromes pour une démarche diagnostique pluridisciplinaire.

Notre travail porte sur l'immunophénotypage par CMF dans le cadre du diagnostic d'hyperlymphocytose sanguine à évolution chronique. Cette étude concerne 42 patients qui ont consultés pour une suspicion d'un SLPC en conversion leucémique sur une période de 02 mois au CAC, Blida, Algérie.

Notre mémoire comportera :

- Chapitre I pour les rappels bibliographiques.
- Chapitre II pour notre partie expérimentale.
- Chapitre III comprendra les résultats.
- Chapitre IV est réservé à la discussion.

En fin une conclusion et des perspectives pour terminer

CHAPITRE I

RAPPEL

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Hyperlymphocytose sanguine à évolution chronique

I. 1. Définition d'une hyperlymphocytose sanguine :

L'hyperlymphocytose est définie sur les données de l'hémogramme par un nombre absolu de lymphocytes dépassant $4 \times 10^9 / L$ (**Johansson *et al.*, 2014**).

L'hyperlymphocytose est classée selon le type de cellule d'origine :

- Hyperlymphocytose à cellules B.
- Hyperlymphocytose à cellules T.
- Hyperlymphocytose à cellules NK.

Et aussi selon son étiologie : Bénigne donc réactionnelle ou maligne (syndromes lymphoprolifératifs qui peuvent être faits des cellules matures dans ce cas d'évolution chronique ou des cellules immatures avec une évolution aigüe).

I. 2. Etiologie :

Les hyperlymphocytoses ont des causes diverses :

✚ Bénignes :

- Infectieux : Elles correspondent souvent à une réponse du système immunitaire vis-à-vis d'agents pathogènes ou de protéines étrangères comme le virus d'Epstein-Barr (EBV) (**Bridgen *et al.*, 1999**), virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (**Rosenberg *et al.*, 1999**) ...
- Médicamenteuses : Selon **Johann (2016)**, de nombreux médicaments (par hypersensibilité ou autres mécanismes) peuvent induire une lymphocytose, de même que des vaccinations, des troubles endocriniens, des maladies auto-immunes, le tabagisme, les suites d'une splénectomie ou encore le stress.

✚ Malignes :

- Syndromes lymphoprolifératifs chroniques en conversion leucémique (SLPC) : SLPC sont des hémopathies malignes caractérisées par une prolifération monoclonale et incontrôlée des cellules lymphoïdes. Les SLPC de phénotype B sont les plus fréquents dont les causes les plus courantes dans cette catégorie sont la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (**Hamad et Mangla, 2019**), et plus rarement les lymphomes non

hodgkinien (LNH) comme le lymphome à cellules du manteau (MCL) et le lymphome folliculaire (FL) (**Arber et George, 2005**) et aussi les SLPC de phénotype T.

I. 3. Epidémiologie :

Les SLPC sont diagnostiquées chez les hommes plus que les femmes (60% - 40%), et les personnes atteintes ont un âge moyen de 60 ans (**Ramaoun et al., 2013**).

Leur prévalence dépend de l'étiologie sous-jacente, par exemple :

- La LLC est la leucémie la plus courante dans le monde occidental et rare en Asie. La LLC a une incidence de 4,2 / 100000 personnes par ans avec un âge médian de diagnostic de 72 ans (**Eichhorst et al., 2011**). En Algérie, l'incidence de la LLC est estimée à 0,57 cas pour 1000000 ha ; elle touche principalement les sujets âgés (âge moyen au diagnostic = 64,25 ans). Il existe une forte prédominance masculine (Sexe ratio M/F = 2) (**Ait Ali et al., 2012**).
- Hors LLC :

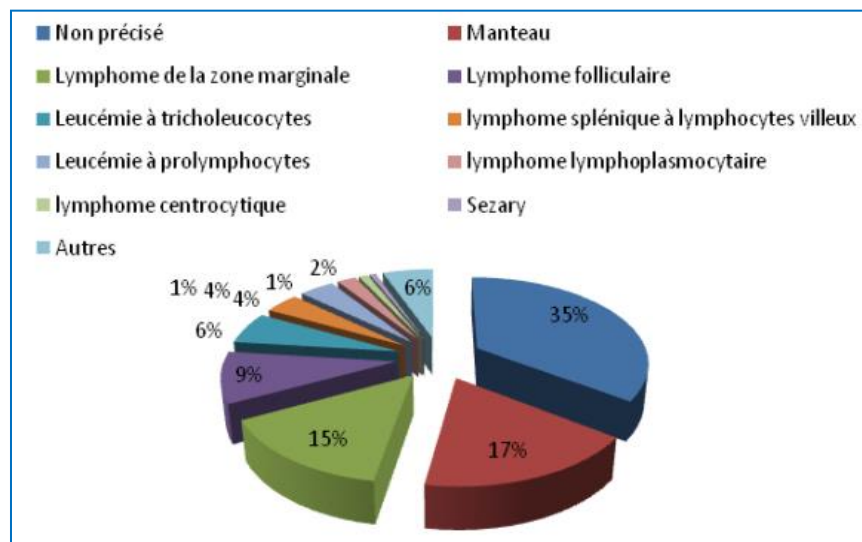


Figure 1 : Répartition des différents types de SLPC en conversion leucémique (hors LLC) (**Ramaoun et al., 2013**).

I. 4. Physiopathologie :

La physiopathologie de l'hyperlymphocytose varie selon l'étiologie. L'augmentation de la production de lymphocytes peut être due soit à un processus réactif (par exemple, une réponse à une infection), soit à un processus clonal (par exemple, des hémopathies malignes comme la leucémie lymphoïde chronique) (Matutes *et al.*, 2004).

Dans les SLPC, on note un certain nombre de défauts géniques intrinsèques, soit des aberrations chromosomiques (del11q, del17q, TP53) (Prabhjot, 2018) ou des mutations (CARD11, une protéine d'échafaudage nécessaire pour le facteur NF- κ B dans les lymphocytes B et T) (Hamad et Mangla, 2019).

D'après Gautier (2017), la résistance à l'apoptose est due au dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose (surexpression des protéines anti-apoptotiques BCL-XL, MCL1 et sous-expression des protéines pro-apoptotiques BAX, BCL-Xs) (Fig.2), tant dis que la prolifération et la survie des cellules malades est due à la stimulation du BCR (Fig.3) et le déclenchement de sa voie de signalisation.

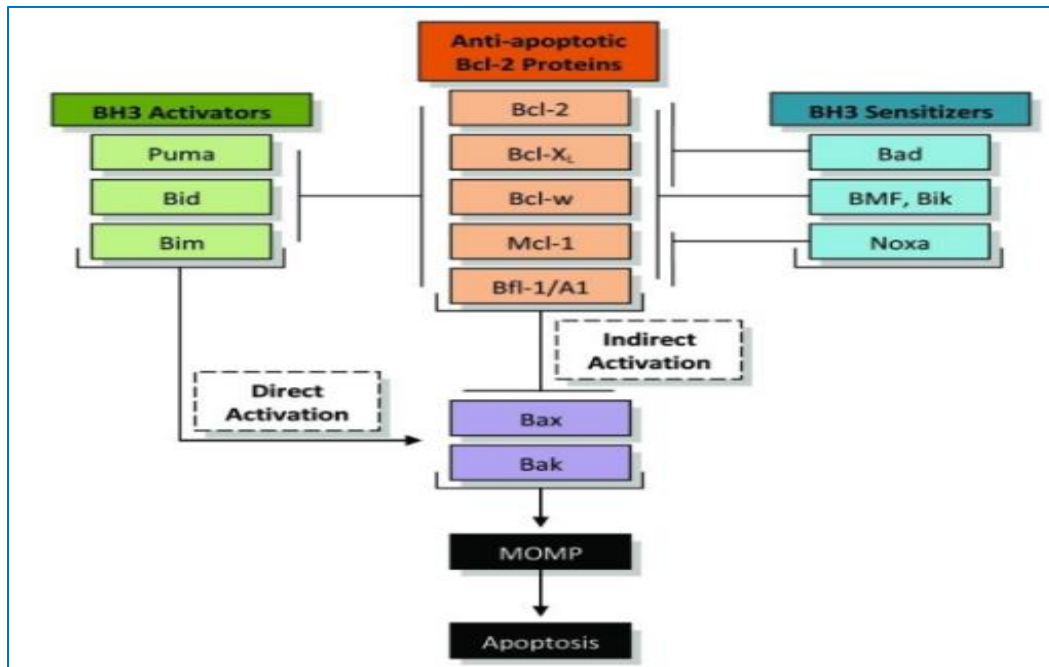


Figure 2 : Modèle de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille BCL-2 (Liu et Wang, 2012).

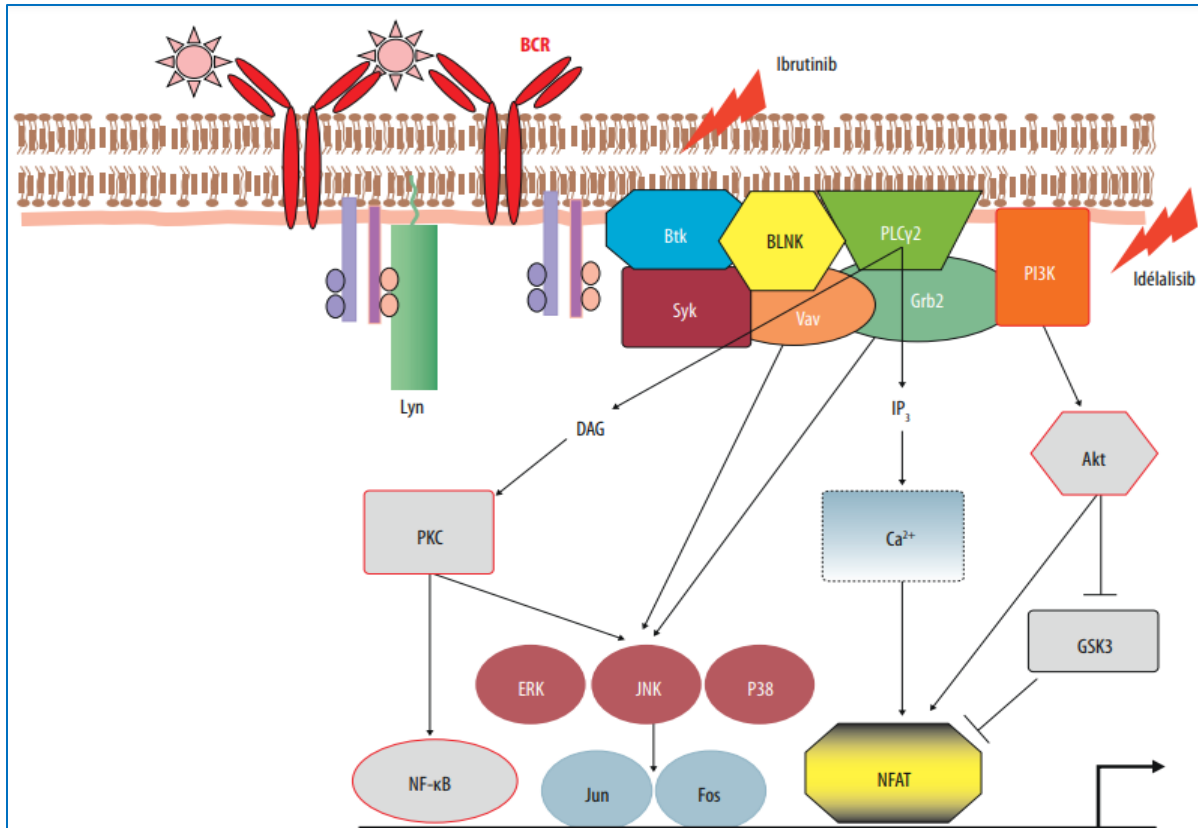


Figure 3 : Signalisation en aval du BCR (Cymbalista, 2015).

L'unité de signalisation constituée des protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ qui, après phosphorylation vont provoquer la phosphorylation de la protéine Lyn, ce qui induit le recrutement de Syk et sa phosphorylation. Syk, ainsi activé, recrute et phosphoryle l'adaptateur BLNK, ce qui permet la formation d'un complexe de signalisation appelé "signalosome", contenant plusieurs protéines dont Btk, PLC γ 2 et Vav. Ces protéines vont ensuite activer en aval plusieurs facteurs de transcription nécessaires à la prolifération des lymphocytes malins.

II. Diagnostic positif d'une hyperlymphocytose sanguine chronique

II. 1. Examen clinique :

D'après **Zelenetz *et al.*, (2015)**, les patients atteints de lymphocytose sont généralement asymptomatiques donc de découverte fortuite, mais ils peuvent présenter des signes d'appel comme la fièvre, sueur nocturne, adénopathies, splénomégalie, syndrome anémique.

II. 2. Examen biologique :

Les examens biologiques fondamentaux sont :

- Hémogramme : Présence d'une hyperlymphocytose $> 4000/\text{mm}^3$ (Johansson *et al.*, 2014), associée le plus souvent à une hyperleucocytose qui est définie par un taux de globules blancs $> 10000/\text{mm}^3$, par contre le taux de plaquettes et de l'hémoglobine est variable selon les étiologies.
- Frottis sanguin : La totalité du frottis doit être observée à l'objectif 10 pour noter les caractéristiques d'ensemble de la population et repérer d'éventuels événements rares. Un syndrome lymphoprolifératif est à priori plus monomorphe qu'un syndrome réactionnel (il s'agit d'une première orientation), puis l'analyse minutieuse des caractéristiques nucléaires et cytoplasmiques se fait cellule par cellule à l'objectif 100 (sur 100 cellules lymphoïdes) (Émile, 2009).

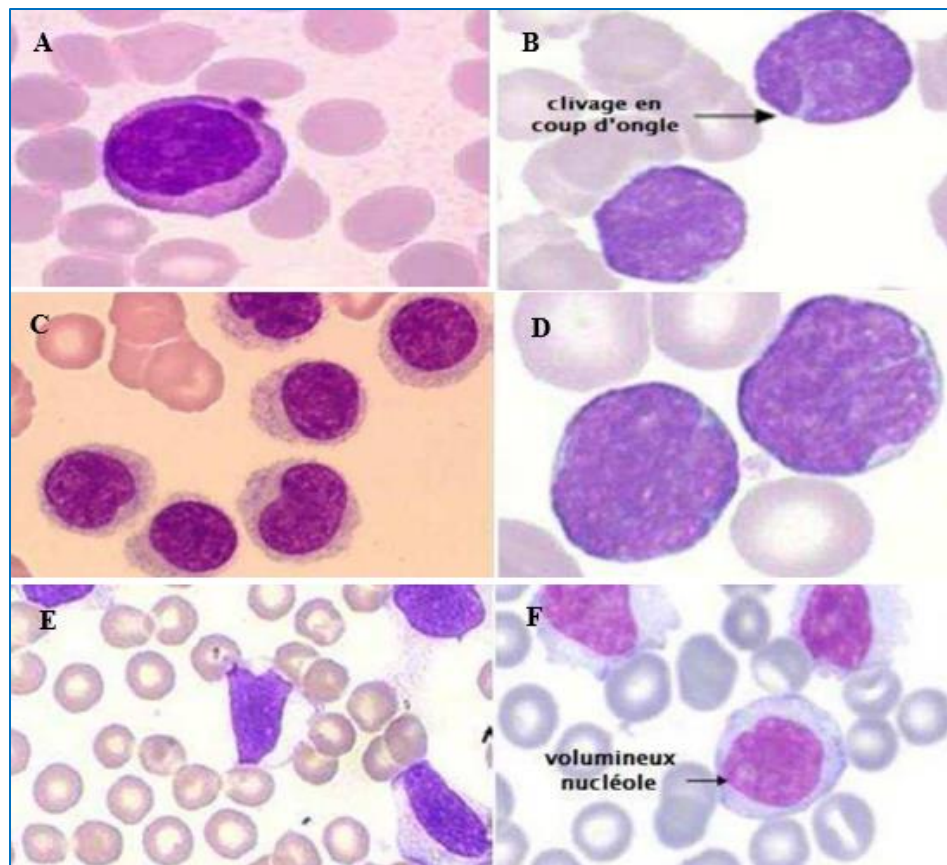


Figure 4 : Diagnostiques cytologiques différentiel des SLPC B (Haddad, 2010).

- A :* Leucémie lymphoïde chronique. *B :* Lymphome folliculaire.
C : Leucémie à tricholeucocytes. *D :* Lymphome du manteau.
E : Lymphocytose réactionnelle. *F :* Leucémie à prolymphocytes.

- Médullogramme : Le médullogramme est indiqué dans certains cas des SLPC hors LLC. Il permet d'analyser la richesse de la moelle et la représentation normale ou non des différentes lignées cellulaires. Il analyse aussi la présence ou l'absence de cellules malignes (**Hallek et al., 2008**).
- Immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) : elle permet de confirmer l'hyperlymphocytose, déterminer le phénotype des populations, et étudier les sous-catégories cellulaires. Si le profil phénotypique des lymphocytes est normal (absence des signes de monoclonalité), les investigations sont arrêtées. Si un SLPC est évoqué, des investigations seront réalisées, en appliquant un panel large des anticorps monoclonaux ciblant la population lymphoïde B, T et NK. En cas des SLPC, on recherche les signes de monoclonalité qui sont dans les SLPC :
 - De phénotype B :
 - Expression d'une seule chaîne légère.
 - Expression des marqueurs aberrant comme le CD5.
 - De phénotype T :
 - Trou phénotypique.
 - Inversion du rapport CD4/CD8.
- 🚦 Les critères de diagnostic des SLPC B par CMF :

Dans les SLPC B : on applique le score de Matutes (Tab I) (**Moreau et al., 1997**). Une LLC typique est définie par un score de Matutes ≥ 4 . Les autres SLPC B ont tous un score inférieur ou égal à 2. Un score de 3 peut correspondre à une LLC atypique ou un autres SLPC.

Tableau I : Score de Matutes/Moreau (**Moreau et al., 1997**).

Marqueurs	Points	
	0	1
Intensité des Ig de surface	Modérée/Forte	Faible
CD5	-	+
CD23	-	+
FMC7	+	Faible/-
CD22 ou CD79b	+	Faible/-

Score Matutes :

Les caractéristiques immunophénotypiques des SLPC ont permis de définir un score décrit par **Matutes et Catovsky (1994)** puis réévalué par **Moreau *et al.*, (1997)** en donnant une valeur de 1 à chacun des éléments suivants : positivité du CD5 et du CD23, négativité ou faible expression du FMC7 (qui identifie un épitope du complexe multimérique CD20), faible expression du CD79b (qui reconnaît la chaîne β associée au BCR) ou du CD22, et faible intensité d'expression de la chaîne légère kappa ou lambda.

En cas de doute, la réalisation d'un caryotype s'impose surtout en cas des LNH de Manteau et Folliculaire (**Dighiero et Hamblin, 2008**).

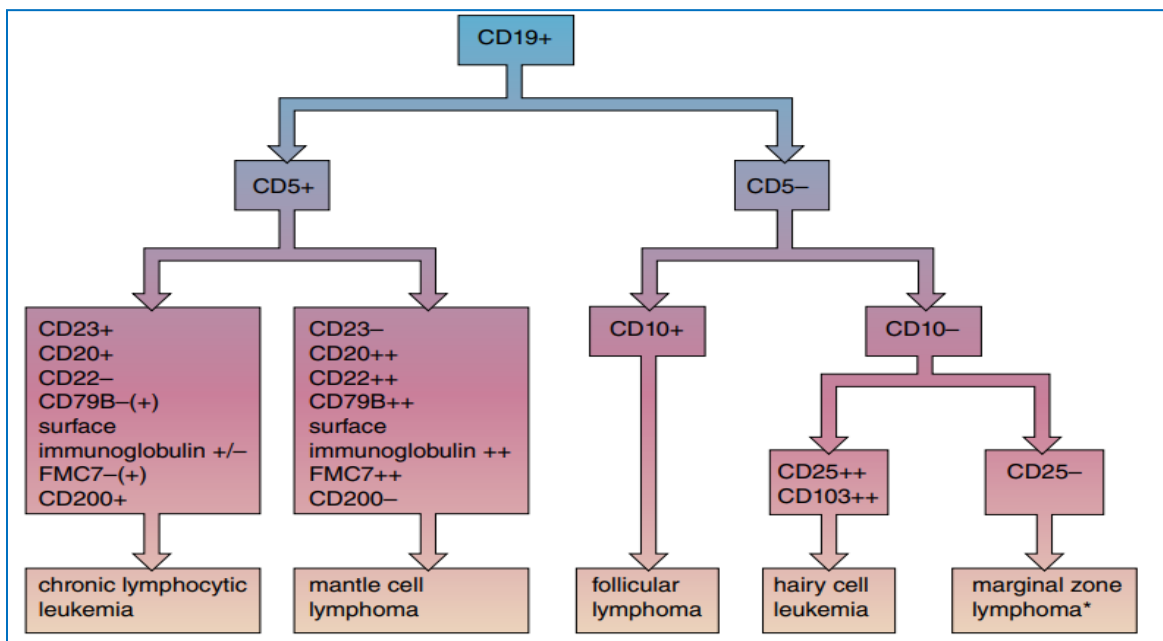


Figure 5 : Stratégie de lecture de l'immunophénotypage des SLPC B (**Dighiero et Hamblin, 2008**).

✚ Les critères de diagnostic des SLPC T par CMF :

La perte d'expression d'un des marqueurs T (trou phénotypique) (CD2, CD3, CD5, CD7) et/ou l'inversement du rapport CD4/CD8 ainsi que l'expression d'un monotype aberrant constitue un argument en faveur d'une lymphoprolifération T (**Émile, 2009**).

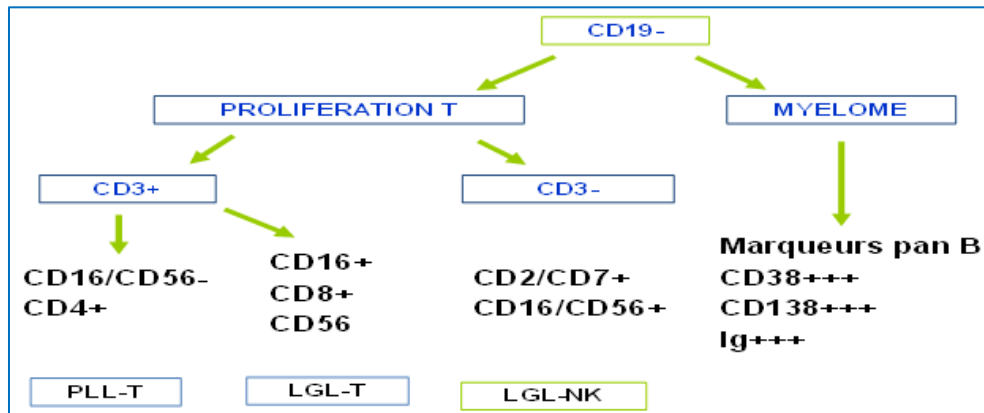


Figure 6 : Stratégie de lecture de l'immunophénotypage des SLPC T (**Oukid, 2015**).

- La cytogénétique conventionnelle ou l'usage de la fluorescence in situ par hybridation (FISH) : qui est une technique qui permet de mettre en évidence des anomalies clonales récurrentes dans 80 % des cas de LLC, notamment les délétions 13q14, 11q, 17p et la trisomie 12) (**Dohner et al., 2000**), les translocation t (11 ; 14) en cas des LNH manteau, et t (14 ; 18) en cas de LNH folliculaire.

II. 3. Diagnostic étiologique :

Le diagnostic étiologique d'une hyperlymphocytose repose sur l'immunophénotypage par cytométrie orienté par le contexte clinique (âge, syndrome infectieux, syndrome tumoral) (Tab II).

Tableau II : Critères en faveur d'une hyperlymphocytose réactionnelle ou néoplasique (Emile, 2016).

Hyperlymphocytose	Réactionnelle	Néoplasique
Présentation	Transitoire	Chronique (> 3 mois)
Contexte	Virose Infection bactérienne Tabac Stress	Aucun facteur déclenchant
Lymphocytose	Hyperlymphocytose	Variable
Cytologie	Lymphocytes polymorphes Taille des cellules variable Aspect du noyau : chromatine mûre ± nucléole, contours ± réguliers Aspect du cytoplasme : souvent abondant, souvent basophile non homogène, voire hyperbasophile, ± vacuoles, ± grains cytoplasmiques, renforcement périphérique de la basophilie Grands lymphocytes basophiles : syndrome mononucléosique Lymphocytes à grains Rares atypies lymphocytaires	Lymphocytes monomorphes Atypies morphologiques caractéristiques

II. 3. 1. Hyperlymphocytose réactionnelle :

- Syndrome mononucléosique : c'est un syndrome aigu et auto-limité de leucocytose mononucléaire qui survient chez les enfants. Ses caractéristiques cliniques déterminantes sont : la fièvre et les lymphocytes réactifs dans le sang. La cause la plus courante de mononucléose est l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Kaushansky *et al.*, 2015).

II. 3. 2. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques en conversion leucémique :

- ✚ Syndromes lymphoprolifératifs chroniques en conversions leucémiques B :
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC) : La LLC est une hémopathie maligne des cellules lymphoïdes B caractérisée par l'accumulation dans la moelle osseuse puis passage dans le sang périphérique, et les organes lymphoïdes secondaires des lymphocytes B clonaux avec un immunophénotype distinctif où les marqueurs des cellules B (CD19, CD23) sont exprimés avec CD5, avec un faible niveau d'expression du CD20 et des immunoglobulines de surface (Chiorazzi *et al.*, 2005).

- Le lymphome de la zone marginale (SMZL) : D'après **Jacque et Leblond (2019)**, la population lymphoïde de SMZL est d'aspect hétérogène et les cellules lymphomateuses sont le plus souvent négatives pour le CD5, CD23 et le CD10.
- Le lymphome à cellules du manteau (MCL) : Selon **Rogers et al., (2017)**, le diagnostic à évoquer devant des lymphocytes B monotypiques CD5⁺ et CD23⁻ et un score de Matutes inférieur à 3.
- Le lymphome folliculaire (FL) : Ce lymphome se présente comme de petites cellules clivées, dites en « grain de café » avec une absence des CD5 et CD23 et une expression de CD10 (**Jones et al., 2016**).
- La leucémie à tricholeucocytes (HCL) : Le tricholeucocyte est une cellule de grande taille dont le cytoplasme étendu présente de nombreuses projections cytoplasmiques fines d'aspect chevelu. Le score de Matutes est inférieur à 2, sans CD5 ni CD23 (elle est définie aussi par le score de tricholeucocyte qui comporte le CD103, CD25, CD11c et CD123) (**Jacque et Leblond, 2019**).

Tableau III : Néoplasmes lymphoïdes leucémiques à cellules B matures : diagnostic différentiel de la LLC par rapport aux autres causes fréquentes de néoplasmes lymphoïdes leucémiques à cellules B matures (**Dighiero et Hamblin, 2008**).

	CLL	PLL	HCL	HCL-v	SMLZ	FL	MCL	PCL
SIg	+/-	++	++	++	++	+	+	– (cyt Ig ⁺)
CD5	+	–	–	–	–	–	+	–
CD19/CD20/37	+	+	+	+	+	+	+	–
FMC7/CD22	-/+	+	+	+	+	+	++	–
CD23	+	-/+	–	–	–	-/+	–	–
CD25	–	–	++	–	–	–	–	–
CD38	-/+	–	-/+	-/+	–	-/+	–	++
CD103/CD123	–	–	+	–	–	–	–	–
HLA-DR	+	+	+	+	+	+	+	–
CD79b	-/+	++	-/+	?	++	++	++	?
CD200	+	-/+	+		+	-/+	–	+/-

- ✚ Syndromes lymphoprolifératifs chroniques en conversions leucémiques T :
- Leucémie lymphocytaire granulaire à grandes cellules T (LGL) : La LGL est un trouble lymphoprolifératif clonal des lymphocytes cytotoxiques caractérisé par une expansion des lymphocytes T cytotoxiques CD3⁺ (**Leblanc et al., 2012**).
 - Le syndrome de Sezary (SS) : Le syndrome de Sezary est une variante érythrodermique et leucémique rare des lymphomes cutanés à cellules T (CTCL) qui appartient au groupe hétérogène des lymphomes extranodaux non hodgkiniens (LNH) résultant de la prolifération maligne des lymphocytes T cutanés (**Campbell et al., 2010**).

Tableau IV : Expression des différents marqueurs dans les SLPC T (**Oukid, 2015**).

CD	LNHT AB	LNHT GD	L+/-PL T	LLTA ou HTLV1	Sézary	LGL T	LGL à NK
CD7	+	+	+/-	-	-(80%)	+/-	-/+
CD2	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	+	+	+	+	+/-	-
CD3	+	+	+	+	+	+	-
TCRAB	+	-	+/-	+	+	+(80%)	-
TCRGD	-	+	-/+	-	-	-/+	-
CD4	+/-	-	+/-	+	+	-	-
CD8	+/-	-	-/+	-	-	+	+/-
CD45	CD45 RO + OU RA+			RO+	RO+	+	+
CD25	-	-	-/+	+	-	-	-
HLA Dr	-	-	-	+	-	-	+/-
CD56	-	+/-	-	-	-	-/+	+
CD16	-	+/-	-	-	-	+/-	+
CD57	-	-		-	+/-	+	+/-

III. La cytométrie en flux

III. 1. Définition et domaine d'application :

III. 1. 1. Définition :

Qu'est-ce que la cytométrie en flux ? Le terme est divisé en trois parties pour fournir une définition : Flow = fluide, cyto = cellule et metry = mesure. La cytométrie en flux est la mesure ou la quantification de cellules en suspension. Les cellules sont marquées avec des anticorps couplés au fluorochrome spécifiques d'un marqueur cellulaire d'intérêt (**Christine Goetz *et al.*, 2018**).

III. 1. 2. Domaine d'application :

D'après **Hanley *et al.*, (2013)**, la cytométrie en flux peut être utilisée pour un large éventail d'applications, le plus souvent :

- La détection de protéines à la surface ou à l'intérieur des cellules.
- L'analyse du contenu d'ADN ou d'ARN.
- L'analyse de la viabilité des cellules et le cycle cellulaire.
- Les cellules des mammifères peuvent être analysées, mais aussi les cellules d'insectes, les bactéries, les noyaux isolés et même les exosomes.

III. 2. Composition et fonctionnement du cytomètre en flux :

III. 2. 1. La composition d'un cytomètre en flux :

Un cytomètre de flux comporte plusieurs systèmes (Fig.7) :

- Un système fluide pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine liquide sous pression (liquide de gaine) qui aura pour effet d'aligner et espacer les cellules en vue de l'analyse.
- Un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs).
- Un système électronique pour convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts). Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur.

- Un système informatique pour visualiser ces signaux.

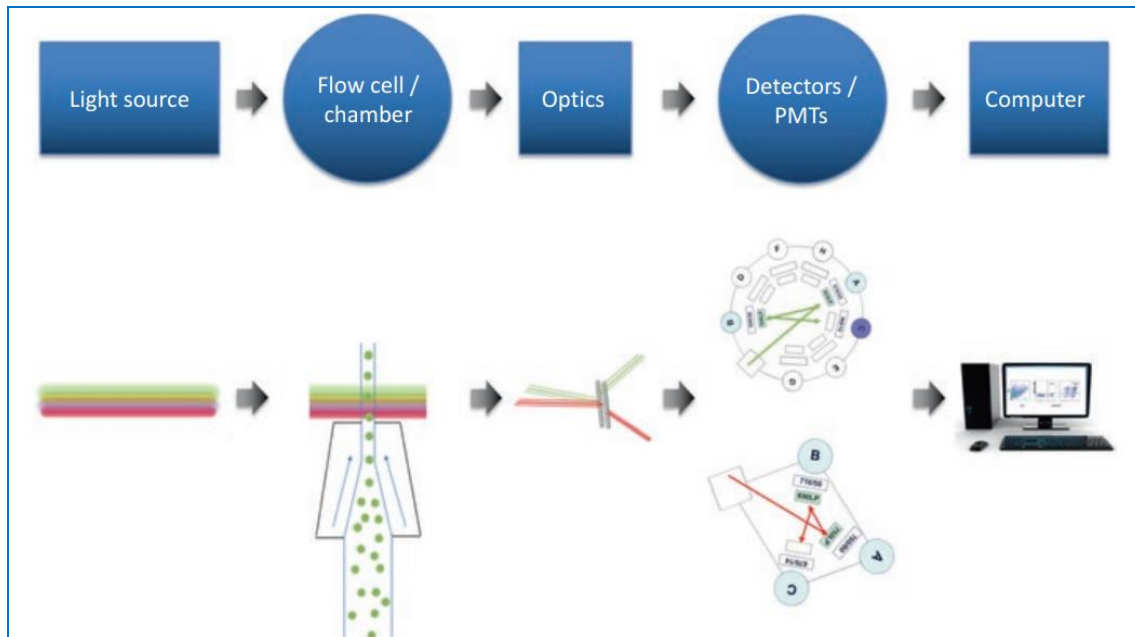


Figure 7 : Fonctionnement de l'ensemble des systèmes fluide, optique et électronique pendant l'acquisition et l'analyse des cellules (**Christine Goetz et al., 2018**).

III. 2. 2. Le fonctionnement du cytomètre en flux :

D'après **Zafrani et Monneret (2017)**, Les cellules en suspension dans un flux liquidien passent une à une dans un faisceau laser ou elles seront excitées. La diffusion physique de la lumière émise par la source lumineuse est dépendante de la taille et de la granularité cellulaire (contenu en granule, structure plus ou moins segmentée du noyau). La diffusion dans l'axe de la source lumineuse (Forward Scatter, FSC) renseigne sur la taille et la diffusion à 90°C (Side Scatter, SSC) renseigne sur la granularité ou structure. La lumière du laser va également exciter des fluorochromes préalablement couplés à des anticorps monoclonaux capables de reconnaître et fixer certaines protéines. Ici, un laser à 488 nm active la fluorescéine (FITC, émission à 520 nm), couplée à un anticorps identifiant un récepteur membranaire, et la phycoérythrine (PE, émission à 580 nm) couplée à un anticorps identifiant une intégrine. Un système de filtre optique et de photomultiplicateur (PMT) va permettre de collecter la lumière propre à chaque fluorochrome et de la quantifier (Fig.8).

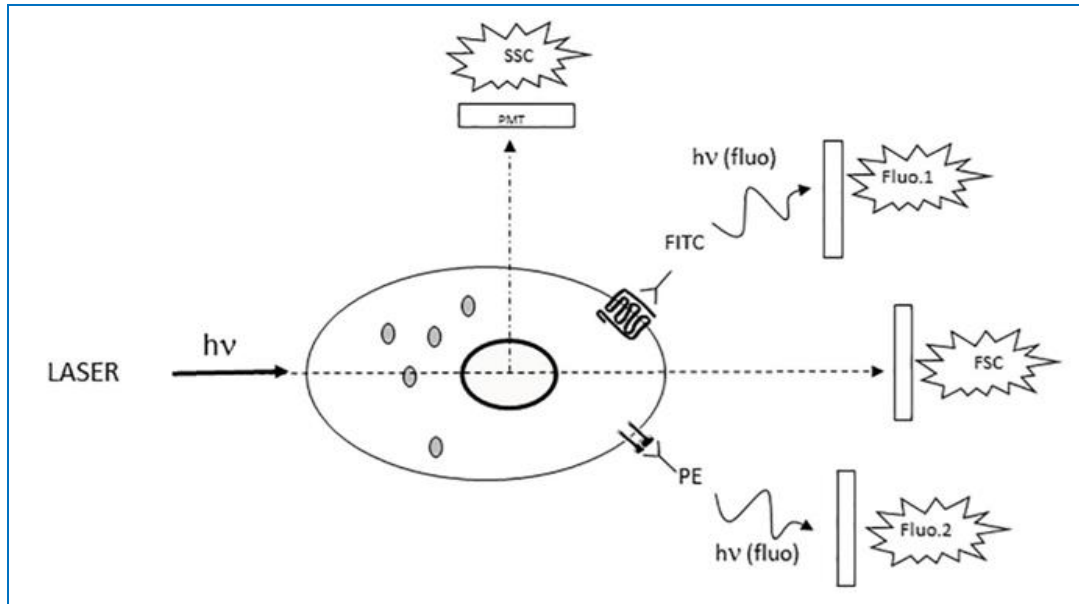


Figure 8 : Principe général de la cytométrie en flux (Zafrani et Monneret, 2017).

Lors d'une analyse en CMF, plusieurs histogrammes peuvent être créés :

- L'histogramme FSC (Forward Scatter) (taille) / SSC (Side Scatter) (granularité) : les cellules sont réparties selon leur granularité (lumière diffusée à 90°) et leur taille (lumière déviée dans l'axe du laser). La fluorescence émise par les cellules n'est pas prise en compte.
- L'histogramme monoparamétrique (FSC, SSC ou fluorescence) : il donne une information sur un paramètre unique pour une population donnée. En ordonnée et représenté le nombre de cellules et en abscisse l'intensité de fluorescence.
- L'histogramme biparamétrique : sont représentés deux signaux (FSC, SSC ou fluorescence) l'un par rapport à l'autre. On obtient des nuages de points, chaque point représentant une cellule. On pourra alors déterminer les cellules négatives/simples positives/doubles positives.

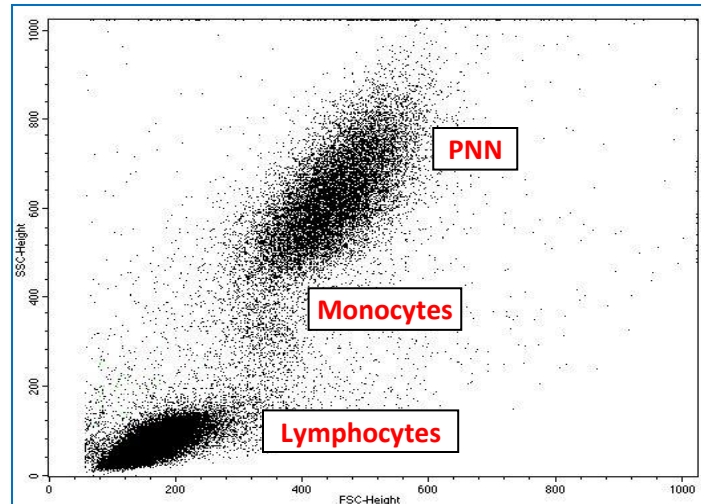


Figure 9 : Dot Plot (Taille et structure du sang normale) du laboratoire d'hématologie du CAC Blida.

PNN : Polynucléaires neutrophiles.

III. 3. Les avantages et limites de la cytométrie en flux :

Selon **La Peyronie (1993)**, ce qui distingue la CMF des autres techniques analytiques et réparatives est qu'elle réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes :

- L'analyse quantitative : Un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de (1 ~ 10000 unités arbitraires de fluorescence). C'est un atout majeur par rapport à la microscopie optique.
- Sensibilité de détection : En immunofluorescence, il est possible de discerner du bruit de fond une population de cellules lymphoïdes portant environ 1000 déterminants antigéniques par cellule.
- Vitesse de travail : La vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre est de 1000 cellules par seconde bien qu'il soit possible, sur les appareils modernes, d'analyser de manière fiable jusqu'à 10000 évènements par seconde sur plusieurs paramètres.
- L'analyse simultanée de plusieurs paramètres : La CMF offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres, ce qui permet de mesurer, par exemple, deux ou trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire du sang ou de la moelle. Aucune autre méthode n'offre cette polyvalence.

- Le coût : C'est une technique coûteuse qui demande un matériel assez cher.
- La complexité : La méthode est complexe et nécessite une grande technicité et un laboratoire spécifique pour l'entretien.

CHAPITRE II

PARTIE

EXPERIMENTALE

I. Description générale de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective, effectuée au niveau du laboratoire d'hématologie, service d'hématologie de l'EHS ELCC Centre Anti-Cancer (CAC) à l'hôpital de Frantz Fanon de Blida, sur une période allant du 01 Février 2020 au 12 Mars 2020 et du 16 Juillet 2020 au 30 Aout 2020. Pendant cette période, 42 patients présentant une hyperlymphocytose sanguine ont bénéficié d'une analyse immunophénotypique par cytométrie en flux afin de poser le diagnostic soit d'une hyperlymphocytose maligne entrant dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques en conversion leucémique (SLPC) soit une hyperlymphocytose réactionnelle bénigne.

II. Matériel

II. 1. Consommable :

- Les tubes à essai Falcon de 5 ml (adaptables au cytomètre).
- Les portoirs.
- Les micropipettes (20 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 2000 μ l).
- Les embouts.

II. 2. Appareillage :

✚ Non spécifique (Annexe 01) :

- Centrifugeuse.
- Agitateur rotatoire type Vortex.
- Réfrigérateur.
- Chronomètre.
- Automate pour Hématimétrie Sysmex pour un hémogramme avec une numération des taux de globules blancs. On parle de lymphocytose quand le taux des lymphocytes dépasse les 4000 elts/ μ l.

✚ Spécifique :

- Un Cytomètre en flux BD FACS Calibur de Becton- Dickinson (BD) à 2 lasers et à 04 couleurs (Fig.10).



Figure 10 : FACS Calibur BD du laboratoire d'hématologie du CAC Blida.

II. 3. Réactifs :

✚ Les solutions :

- BD Cell Wash : Pour le lavage des cellules.
- BD Cell Fix : Pour fixer les suspensions de cellules après immunomarquage.
- BD FACS Lysing : Pour la dissolution et la destruction des hématies.
- FACS Flow : Liquide de gaine (vecteur) nécessaire pour le fonctionnement du cytomètre.
- FACS Clean : Pour désinfecter et nettoyer les tubulures du cytomètre.
- FACS Rinse : Pour rincer les tubulures du cytomètre.

✚ Billes de calibration :

- Calibrite 3 : qui est un kit tricolore comprenant (Fig.11) :
 - Flacon blanc : contient des billes qui représentent les cellules non marquées.
 - Flacon vert : contient des billes couplées au fluorochrome FITC.
 - Flacon rouge : contient des billes couplées au fluorochrome PE.
 - Flacon rose : contient des billes couplées au fluorochrome PerCP.
 - Billes APC CaliBRITE : Flacon bleu qui contient des billes couplées au fluorochrome APC.



Figure 11 : Calibrite 3 : Les Billes de calibration 3.

✚ Anticorps monoclonaux conjugués aux fluorochromes :

- Les contrôles isotypiques :

Ce sont des anticorps monoclonaux conjugués aux différents fluorochromes (FITC, PE, PerCP Cy5.5, APC) mais ne reconnaissent aucun marqueur, ils sont utilisés pour déterminer les régions négatives et les régions positives en se fixant sur toutes les liaisons non spécifiques. Les contrôles isotypiques ont les mêmes caractéristiques que les AC monoclonaux à savoir le même isotype, même fournisseur, même fluorochrome, même concentration, même protocole.

- Les anticorps monoclonaux spécifiques (Fig.12) :

Ils sont conjugués avec des fluorochromes brillants (FITC, PE, PerCP, APC,), la diffraction et la fluorescence sera détecté par le cytomètre en flux équipé d'un système informatique sur lequel un logiciel d'analyse adapté (BD CellQuest Pro). Le rôle des AC est de déterminer le phénotype cellulaire et rechercher des marqueurs membranaires spécifiques et non spécifiques.



Figure 12 : Exemple de 04 Anticorps monoclonaux.

Tableau V : Les marqueurs des cellules lymphoïdes (B, T, NK).

Anticorps monoclonaux	
Les marqueurs des lymphocytes B	CD19 (Pan B), CD22, CD20, CD79b, FMC7, CD23, chaines légères Kappa et Lambda, IgM, IgG.
Les marqueurs des lymphocytes T	CD3 (Pan T), CD5, CD2, CD7, CD8, CD4.
Les marqueurs des lymphocytes NK	CD16, CD56.
Autres marqueurs	CD38, CD81, CD11c, CD43, CD25, CD138, IgD.
Fluorochromes	
L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).	
La phycoérythrine (PE).	
La périidine chlorophylle (PerCP).	
L'allophycocyanine (APC).	

✚ Panel des SLPC en conversion leucémique :

Les anticorps peuvent être utilisés dans diverses combinaisons selon la caractérisation de néoplasie hématologique destinée à diagnostiquer, c'est ce qu'on appelle un panel qui permet la recherche simultanée et rapide, de plusieurs marqueurs antigéniques. Le panel qu'on a utilisé dans notre étude figure dans le tableau suivant :

Tableau VI : Panel des SLPC B et T.

Fluorochromes	Anticorps			
	FITC	PE	PerCP	APC
Tube 1 (Témoin)	/	/	/	/
Tube 2	Kappa	Lambda	CD19	CD5
Tube 3	FMC7	CD23	CD19	CD5
Tube 4	CD81	CD11c	CD19	CD5
Tube 5	CD20	CD10	CD19	CD5
Tube 6	CD43	CD25	CD19	CD79b
Tube 7	CD5	CD38	CD19	CD138
Tube 8	CD22	IgD	CD19	CD200
Tube 9	CD7	CD8	CD4	CD3
Tube 10	CD103	CD123	CD19	CD5
Tube 11	CD8	CD7	CD4	CD3
Tube 12	CD2	CD7	CD3	CD1a
Tube 13	HLADR	CD8	CD3	CD5
Tube 14	CD57	TCR $\alpha\beta$	CD3	TCRgd
Tube 15	CD16	CD56	CD3	CD2
Marqueurs des LB	Marqueurs des LT/NK		Marqueurs non spécifiques	

III. Méthodes

III. 1. Description de la méthode de travail :

Après la consultation, réalisation d'une numération sanguine et en cas d'hyperlymphocytose, on a la réalisation des frottis sanguin sur des lames en verre (lame de microscope) par l'unité de cytologie. Un phénotypage est exigé pour confirmer le résultat de la cytologie et pour déterminer le type de la maladie.

L'immunophénotypage par cytométrie en flux est réalisé sur du sang veineux prélevé dans des tubes vacutainers contenant un anticoagulant EDTA. Les patients sont des consultants et non pas des patients hospitalisés.

Les prélèvements sanguins sont accompagnés d'une fiche de renseignements (Annexe 04) :

- L'identité du patient : nom, prénom, âge, sexe.
- La date de réception.
- Le nom du médecin traitant.
- Les signes cliniques.
- Données de l'hémogramme et du frottis sanguin.
- Le diagnostic suspecté.

Le protocole d'immunophénotypage est effectué dans les 24h qui suivent le prélèvement ; sachant que dans le cas de conservation du prélèvement pour une manipulation de lendemain, l'échantillon est conservé dans le tube d'origine, à température ambiante (20 - 25°C).

L'ensemble de ces résultats sera utilisé dans notre étude pour établir un profil épidémiologique des SLPC en conversion leucémique.

III. 2. Protocole de l'immunophénotypage :

Après avoir reçu les prélèvements de sang, il faut :

- Faire un hémogramme pour déterminer le taux de globules blancs.
- Diluer l'échantillon si le taux de globules blancs est $>$ à 50000 elts/ μ l.
- Préparer les tubes Falcon, les mettre sur un portoir et les numéroter (T1, T2...) selon le panel utilisé.
- Mettre dans le tube 1 : 100 μ l du sang seulement (tube témoin) sans aucun AC monoclonaux afin de déterminer les zones négatives.
- Mettre dans le tube 2 : 100 μ l du sang total puis faire 3 lavages à cet échantillon pour le marquage des chaînes kappa/lambda.

Technique de lavage :

- Ajouter 2000 μ l de BD CellWASH au 100 μ l de sang total.
- Vortexer la solution pour bien homogénéiser.
- Centrifuger la solution à 1500 tours/min pendant 5 minutes.

Répéter les 3 étapes si dessus 3 fois jusqu'à ce que le surnageant soit bien claire

- Ajouter 20 µl de chaque anticorps monoclonal dans le centre du creux de chaque tube selon le panel.
- Ajouter 100 µl de sang dans chaque tube (en cas de dilution, utiliser le sang dilué) sauf pour le tube 2 (utiliser le sang lavé).
- Vortexer délicatement les tubes puis laisser incuber pendant 10 minutes dans l'obscurité et à température ambiante.
- Ajouter 2000 µl de BD FACS Lysing (diluée à 1/10) à chaque tube pour détruire les globules rouges.
- Vortexer délicatement les tubes puis laissé incuber pendant 15 à 20 minutes dans l'obscurité et à température ambiante.
- Centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 minutes puis retirer le surnageant (les globules rouges lysés).
- Procéder à un premier lavage (en ajoutant un volume de 2000 µl de Cell Wash)
- Eliminer le surnageant du premier Lavage puis procéder au 2ème lavage.
- Eliminer le surnageant du 2ème lavage.
- Ajouter 500 µl de BD Cell Wash puis procéder à l'acquisition.
- Si l'acquisition est retardée, ajouter 500 µl de BD Cell FIX à chaque tube les vortexer délicatement puis les conserver à une température comprise entre 2 à 8 °C jusqu'à l'analyse. (Il est conseillé d'analyser les cellules dans les 24h suivant le marquage).

III. 3. La procédure de mise en marche du cytomètre :

Pour assurer le bon fonctionnement de l'appareil, les étapes d'allumage de BD FACS Calibur fournis par le manuel du cytomètre doivent être strictement respectées avant chaque utilisation (Annexe 05).

III. 4. La procédure de calibration du cytomètre :

Une opération nécessaire pour le bon fonctionnement du cytomètre et de la sensibilité des lasers dans laquelle on utilise les billes de Calibrite (Annexe 09).

III. 5. La procédure de compensation manuelle :

Les compensations sont faites afin d'éliminer les chevauchements des spectres d'émissions des différents fluorochromes utilisés en effectuant une soustraction de la superposition des signaux de ces fluorochromes (Annexe 10).

III. 6. L'acquisition des échantillons :

L'acquisition se fait à l'aide d'un logiciel préinstallé (CellQuest Pro). Après avoir respecté toutes les étapes précédentes, on effectue les étapes suivantes :

- Ouverture d'un masque d'acquisition déjà créée et qui comporte les graphes d'acquisition, des dots plots bi-paramétriques et des graphes de densités.
- Ouverture du fichier de compensation convenable qui est déjà enregistré.

L'analyse des tubes suivants permettra d'interpréter l'expression des différents antigènes en termes de positivité ou négativité et de déterminer l'intensité de la fluorescence.

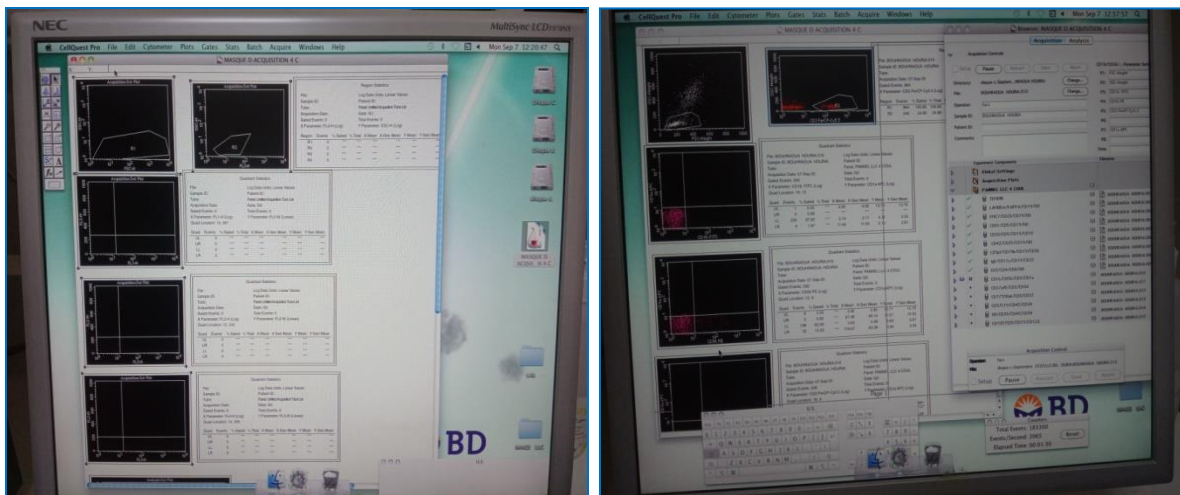


Figure 13 : Page d'acquisition des échantillons.

III. 7. Analyse des résultats :

Après l'étape d'acquisition débutera l'étape de lecture qui consiste à analyser des résultats enregistrés au préalable, elle nous permet de :

- Définir les différentes populations cellulaires présentes.
- Cibler la population cellulaire à étudier (gating).

- Définir la positivité ou la négativité de l'expression d'un antigène, sachant que le seuil de positivité utilisé au laboratoire est de plus de 20%.

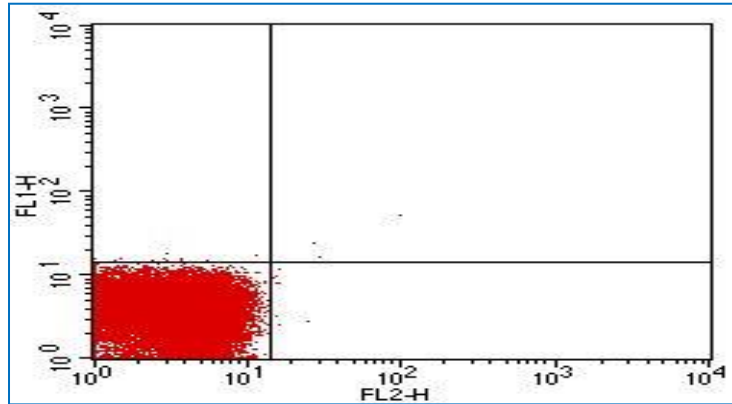


Figure 14 : Ajustement de la zone négative.

- Définir l'intensité d'expression de chaque antigène.

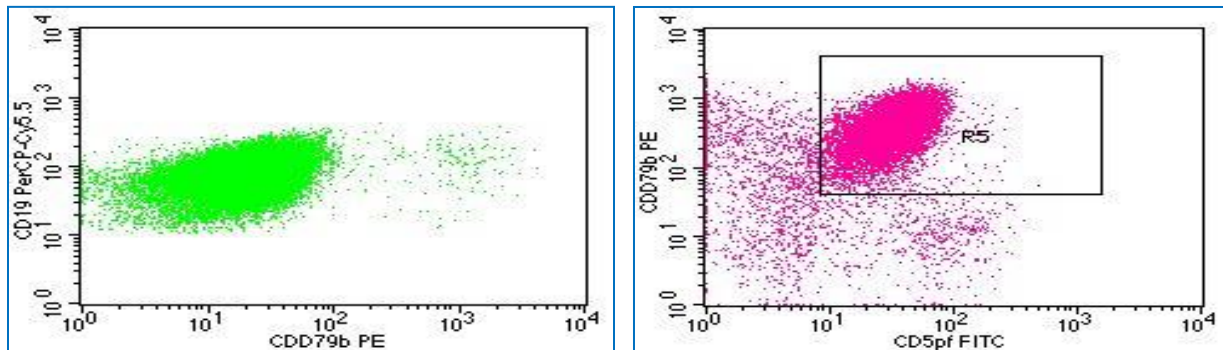


Figure 15 : Expression CD79b est fort en vert et faible en rose.

- Déterminer la présence d'une monoclonalité.

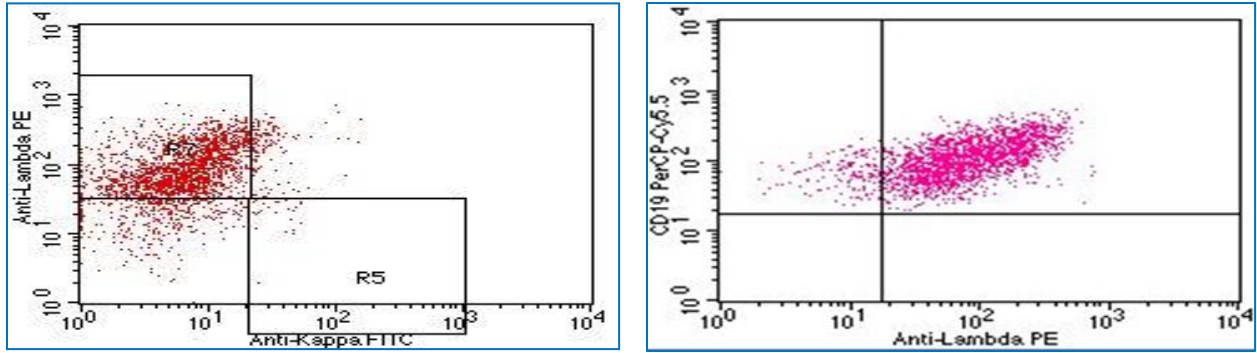


Figure 16 : Expression de la monoclonalité Lambda.

Un Dot plot est séparé en 4 quadrants qui ont pour but de délimiter les zones négatives des zones positives (Fig.17).

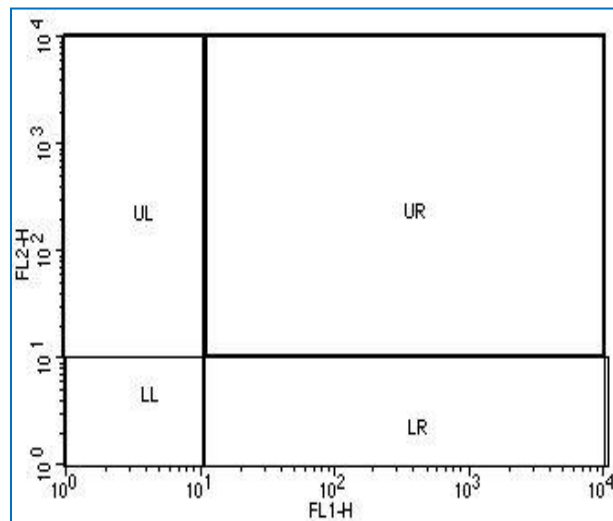


Figure 17 : Dot plot bi-paramétrique.

LL : $FL2H^- FL1H^-$ (zone de double négativité) **UL** : $FL2H^+ FL1H^-$

UR : $FL2H^+ FL1H^+$ (zone de double positivité) **LR** : $FL2H^- FL1H^+$

De $10^1 - 10^2$: + (faiblement positif)

De $10^2 - 10^3$: ++

De $10^3 - 10^4$: +++ (fortement positif)

Une analyse logarithmique qui apprécie l'intensité de la fluorescence pour chaque quadrant nous permet de détecter la positivité ou la négativité de la fluorescence ainsi que son intensité.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

I. Population étudiée

Durant notre stage de 02 mois, nous avons analysé 42 patients qui ont consulté pour suspicion d'un SLPC en conversion Leucémiques.

Nos résultats ont été présentés sous forme graphique à l'aide de l'outil statistique Microsoft Excel 2019.

I. 1. Répartition des patients selon le sexe :

Les hommes inclus dans notre étude constituent 69%, quant aux femmes, elles représentent 31%, avec un sex ratio H/F de 2,23.

Tableau VII : Répartition des 42 patients selon le sexe.

Sexe	Nombre	Pourcentage
Homme	29	69%
Femme	13	31%
Total	42	100%

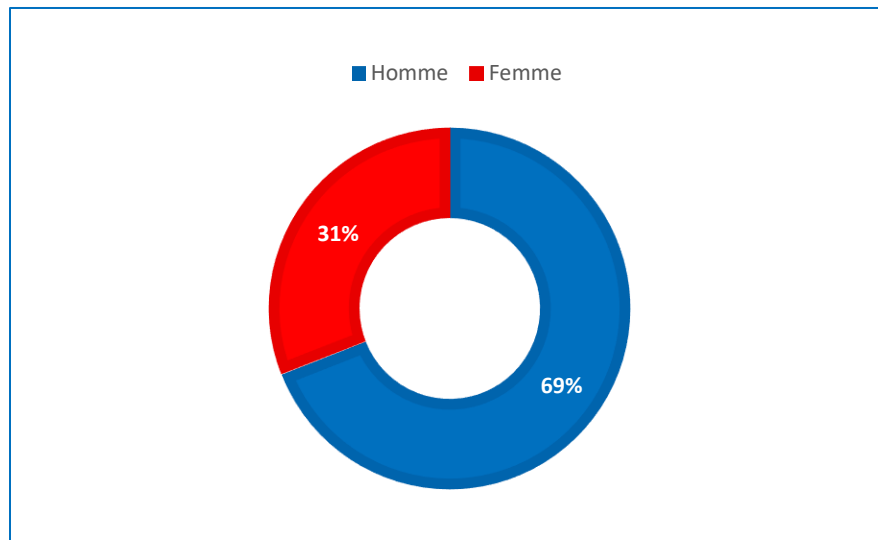


Figure 18 : Répartition des 42 patients selon le sexe.

I. 2. Répartition des patients selon l'âge :

- L'âge moyen des patients au moment du diagnostic est de 68,2 ans (43 - 88).
- Les patients ayant un âge plus de 60 ans représentent 81% des cas.
- Les patients ayant un âge inférieur à 60 ans représentent 19% des cas.

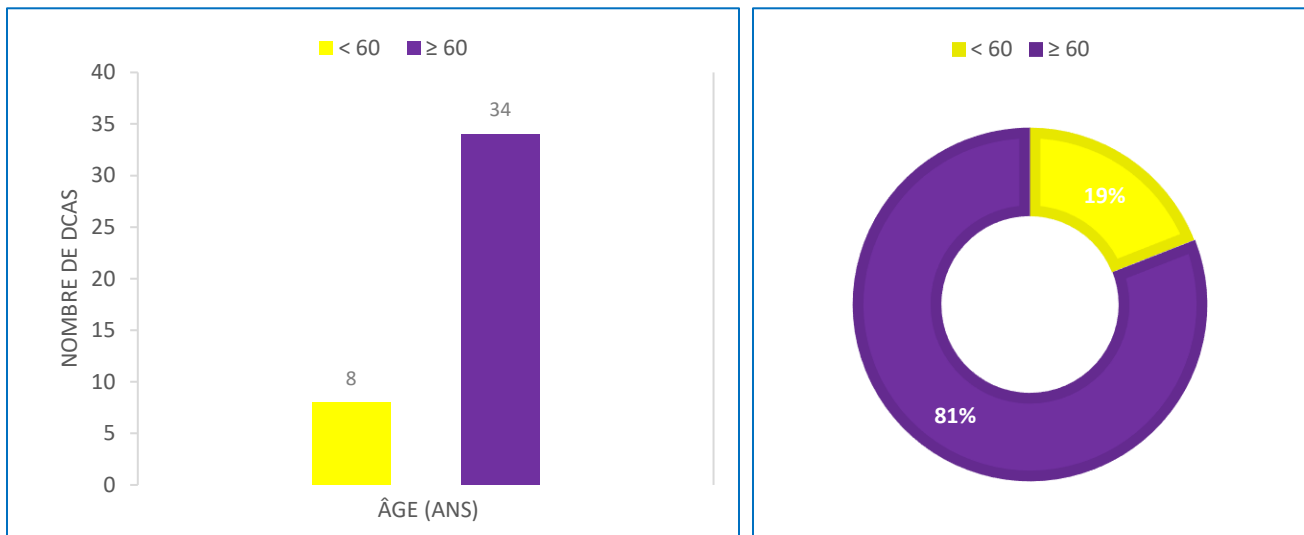


Figure 19 : Répartition des 42 patients selon l'âge.

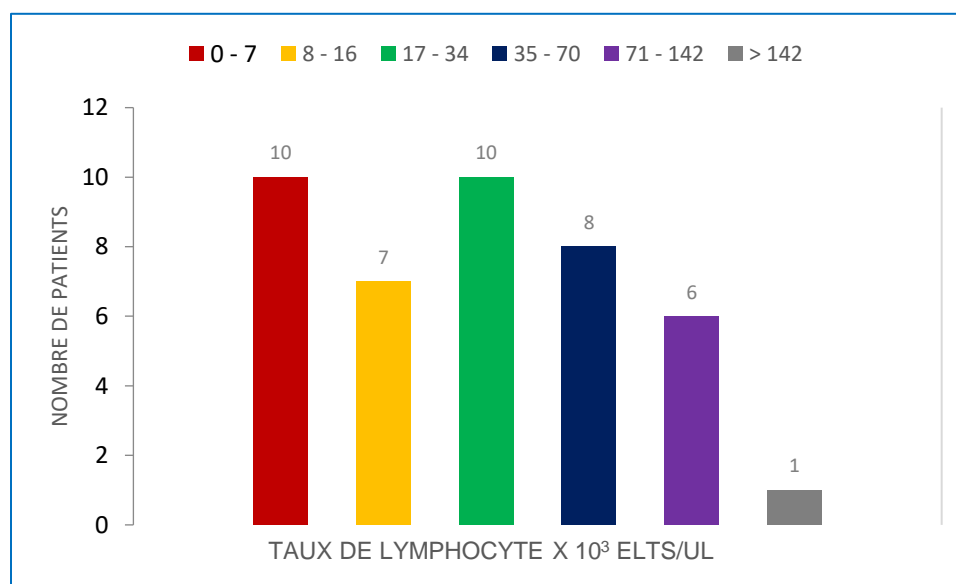
II. Caractéristiques biologiques

II. 1. Hémogramme :

- Analyse du taux de globules blancs :
 - Taux moyen des GB = 55388,09 elts/ μ l (6110 - 478780).
 - Hyperleucocytose : 38 cas (90,47%) avec un taux moyen des GB = 60431,31 elts/ μ l (10480 – 478780).
 - Dans 04 cas, le taux de globules blancs était normal.
- Analyse du taux de lymphocytes (Fig.20) :
 - Taux moyen des Lymphocytes = 42849 elts/ μ l (4230 – 428000).
 - Hyperlymphocytose dans les 42 cas (On parle d'hyperlymphocytose quand le taux des lymphocytes dépasse les 4000 elts/ μ l).

Tableau VIII : Taux de globules blancs des 42 patients.

Eléments	Globules blancs/ μ l	Lymphocytes/ μ l
Intervalle	[6110 - 478780]	[4230 – 428000]
Moyenne	55388,09	42849

**Figure 20** : Répartition des 42 patients selon le taux de lymphocyte.

- Les patients présentant un taux de lymphocytes allant de 17000 à 34000 elts/ μ l constituent 23,80% soit 10 cas.
- Le nombre de cas ayant un taux de lymphocytes inférieur à 17000 elts/ μ l est de 17 soit 40,47%.
- Le nombre de patients ayant un taux de lymphocytes supérieur à 34000 elts/ μ l est de 15 soit 35,17%.

II. 2. Cytologie :

Pour les 42 patients, l'aspect cytologique a été déterminé par l'analyse morphologique du frottis sanguin au moment de la consultation. Les résultats de l'unité de cytologie sont mentionnés ci-dessus (Fig.21).

L'analyse morphologique des frottis sanguin a évoqué un syndrome lymphoprolifératif chronique (SLPC) dans 79% soit 33 cas, une leucémie lymphoïde chronique (LLC) dans 19% (8 cas) et une leucémie aigüe dans 2% (01 cas).

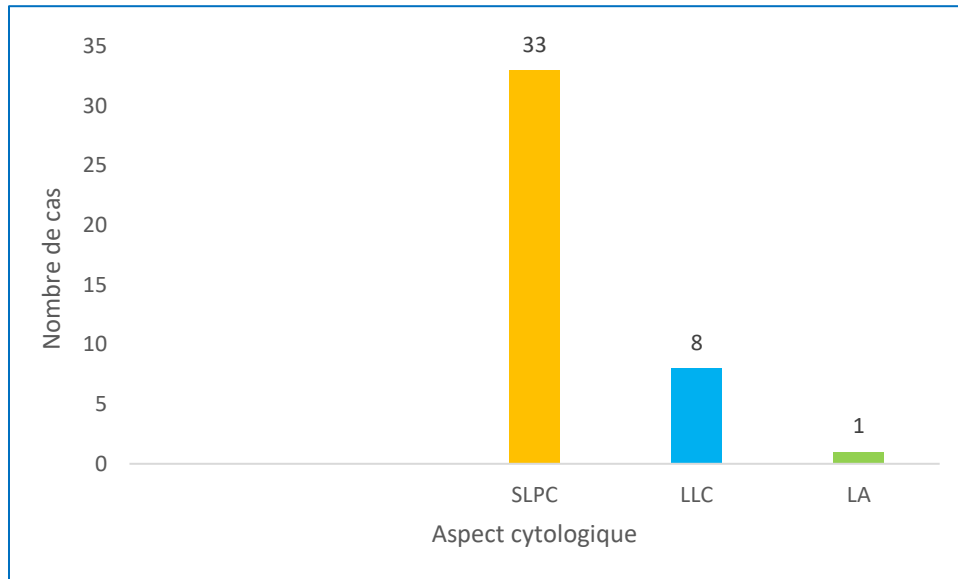


Figure 21 : Répartition des 42 patients selon l'aspect cytologique.

III. Résultats de l'immunophénotypage par CMF

III. 1. Prélèvements :

L'analyse immunophénotypique par CMF a été réalisée sur des prélèvements sanguins chez les 42 cas.

III. 2. Résultats de la CMF :

La CMF a confirmé qu'il s'agit de :

- Un SLPC : 38 cas (90,5%).
- Une lymphocytose réactionnelle : 04 cas (9,5%).

🚦 Analyse des 38 cas SLPC :

La CMF a conclu à un :

- SLPC de phénotype B : 34 cas (89,5%).

- SLPC de phénotype T : 04 cas (10,5%).

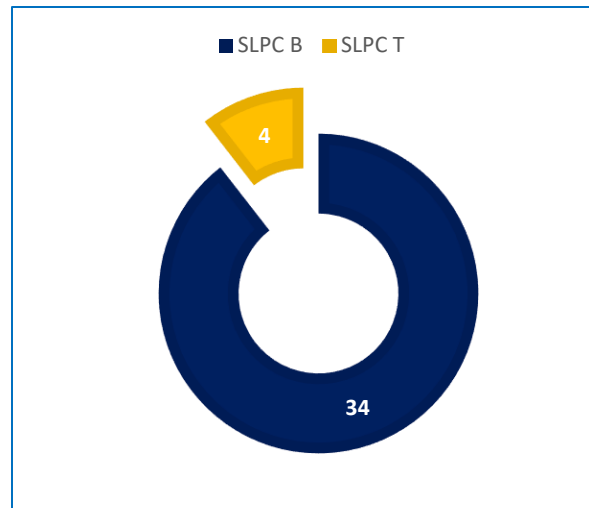


Figure 22 : Répartitions des SLPC selon le phénotype.

Les sous types des SLPC :

- Syndrome lymphoprolifératif chronique B : 34 cas
 - Leucémie lymphoïde chronique (LLC) : 23 cas (67,6%).
 - Lymphome du Manteau (MCL) : 5 cas (14,7 %).
 - Lymphomes de la zone marginale (SMZL) : 1 cas (3%).
 - Syndrome lymphoprolifératif chronique B (SLPC B) : 5 cas (14,7%).
- Syndrome lymphoprolifératif chronique T : 04 cas
 - Syndrome lymphoprolifératif chronique T (SLPC T) : 2 cas.
 - Syndrome lymphoprolifératif chronique T AB (SLPCT $\alpha\beta$) : 1 cas.
 - Syndrome de Sezary : 1 cas.

Tableau IX : Résultats de l'immunophénotypage par CMF.

Sous type de SLPC	SLPC T	SLPCT $\alpha\beta$	Sezary	SLPC B	LLC	MCL	SMZL	Total
Nombre de cas	2	1	1	5	23	5	1	38
Pourcentage	5.26	2.63	2.63	13.15	60.52	13.15	2.63	100

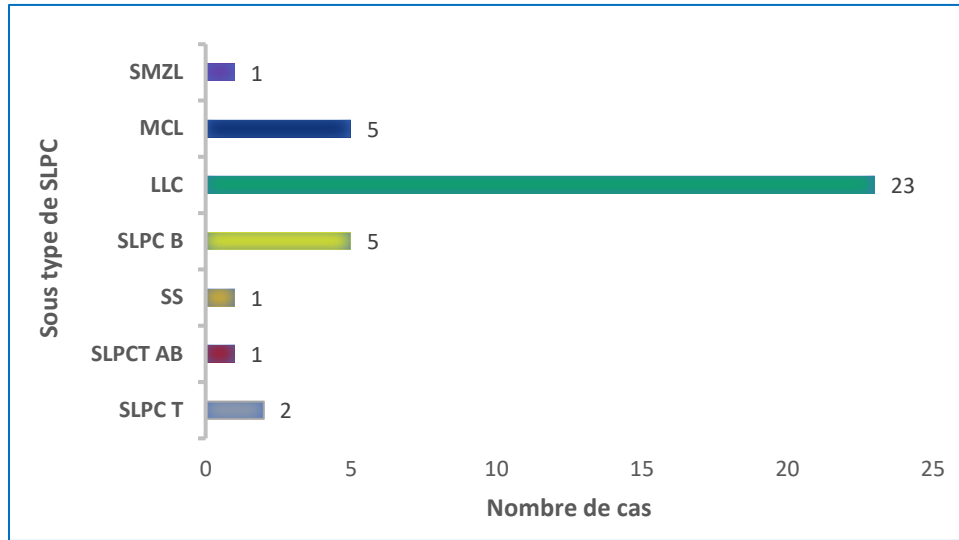


Figure 23 : Répartition des 38 SLPC.

III. 3. Classification selon le score Matutes dans les SLPC B :

Le score de Matutes a été calculé chez les 34 cas des SLPC B.

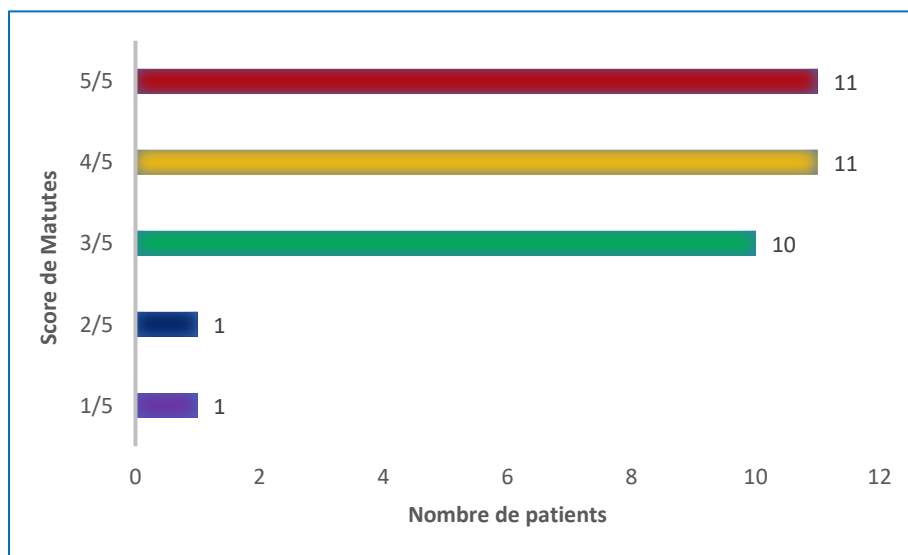


Figure 24 : Classification selon le score de Matutes des 34 cas de SLPC B.

- Chez 22 cas (64,70%), le score de Matutes est \geq à 4.
- Chez 10 cas (29,5%), le score de Matutes est = 3.
- Chez 02 cas le score de Matutes est \leq 2.

IV. Aspect immunophénotypique des sous types des SLPC B

IV. 1. Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) :

Sur les 42 patients reçus pour exploration d'une hyperlymphocytose, 23 patients soit (54,8%) sont diagnostiqués comme une LLC.

Il s'agit de 18 hommes et 5 femmes, avec un âge moyen de 70,39 ans (53 – 86).

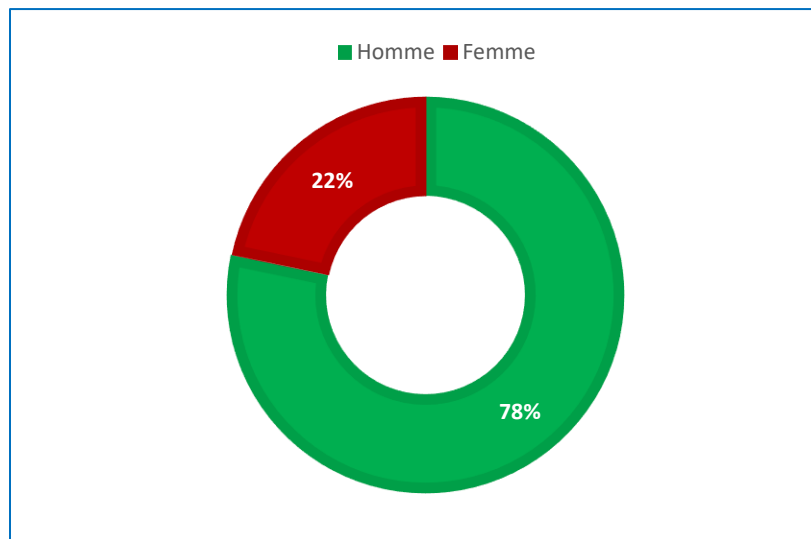


Figure 25 : Répartition des patients LLC selon le sexe.

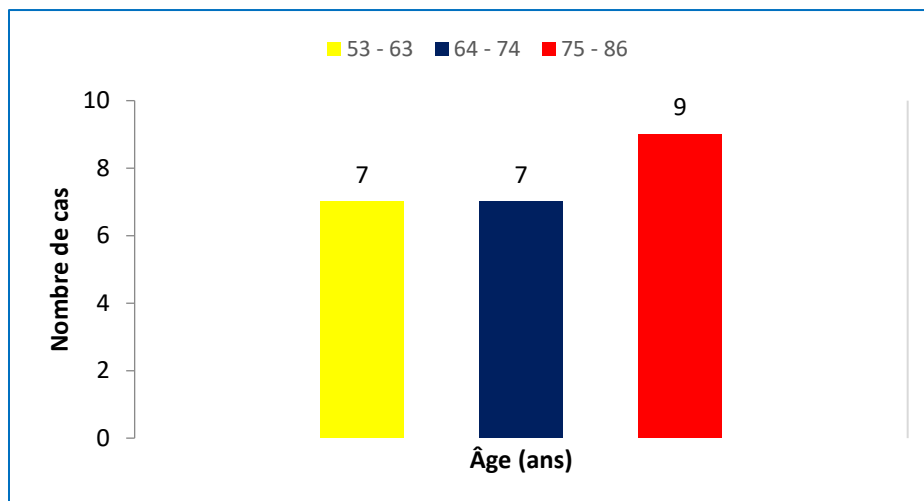


Figure 26 : Répartition des patients LLC selon l'âge.

- Hémogramme : le taux moyen de lymphocytes est de 66071,82 elts/ μ l (4230 – 428000) au moment du diagnostic.

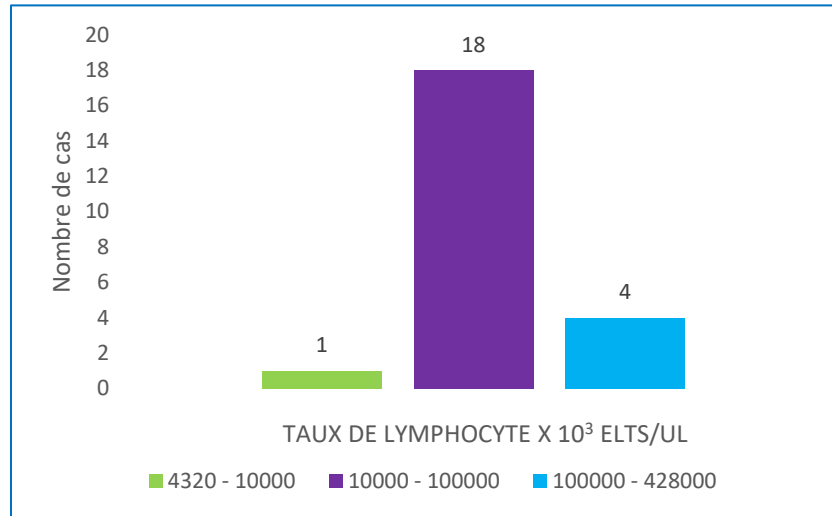


Figure 27 : Répartition des patients LLC selon le taux de lymphocytes.

- Un cas avait une lymphocytose < 10000 elts/ μ l.
 - 04 cas avait une hyperlymphocytose majeur > 100000 elts/ μ l.
- Cytologie :

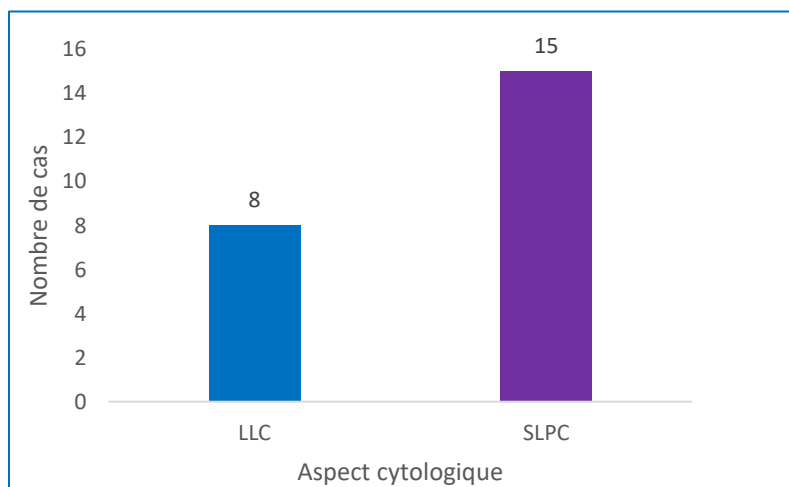


Figure 28 : Résultats de la cytologie des patients LLC.

- L'analyse morphologique du frottis sanguin a évoqué une LLC dans 35% des cas.
- Application du score de Matutes :
 - Score 5/5 : 11 cas soit 48% des cas.
 - Score 4/5 : 10 cas soit 43% des cas.
 - Score 3/5 : 02 cas soit 9% des cas.

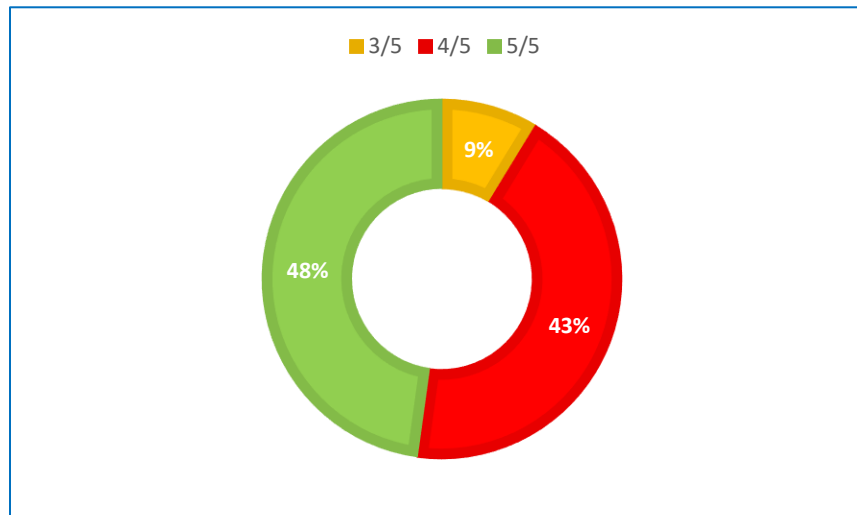


Figure 29 : Score Matutes des patients LLC.

- La cytométrie en flux a confirmé qu'il s'agit d'une LLC typique dans 91% des cas, et une LLC atypique dans 9% des cas.
- Expression des différents marqueurs dans LLC (Tab X) :
 - Le CD 19 est un marqueur pan-B exprimé dans 100% des cas.
 - Le CD5 est exprimé dans 100% des cas.
 - Le CD23 est exprimé dans 100% des cas.
 - Le FMC7 est négatif dans 100% des cas.
 - Le CD22 est exprimé dans 52% des cas.
 - Le CD79b est exprimé dans 74% (17 cas) avec une forte expression dans 8 cas.
 - La monoclonalité est exprimé dans 17 cas soit 74% des cas.

- Prédominance de la monoclonalité Lambda dans 10 cas soit 59% des cas.
- Le CD20 est exprimé dans 95,65% des cas avec une forte expression dans 04 cas.
- Absence d'expression du CD10 dans 100% des cas.
- Le CD38 est exprimé dans 13 cas.
- Le CD43 est exprimé dans 21 cas.

Tableau X : Expression des marqueurs lymphocytaires dans la LLC.

Marqueurs		Expression		
		+	-	Intensité forte
Marqueurs des lymphocytes	CD19	100%	/	/
	FMC7	0%	100%	/
	CD23	100%	/	/
	CD5	100%	/	/
	CD22	52%	/	/
	CD79b	74%	/	8/17 cas
	CD20	95,65%	/	4/22 cas
Marqueur de monoclonalité	Kappa	30,43%	/	/
	Lambda	43,47%	/	/
	Absence de monoclonalité	26,08%	/	/

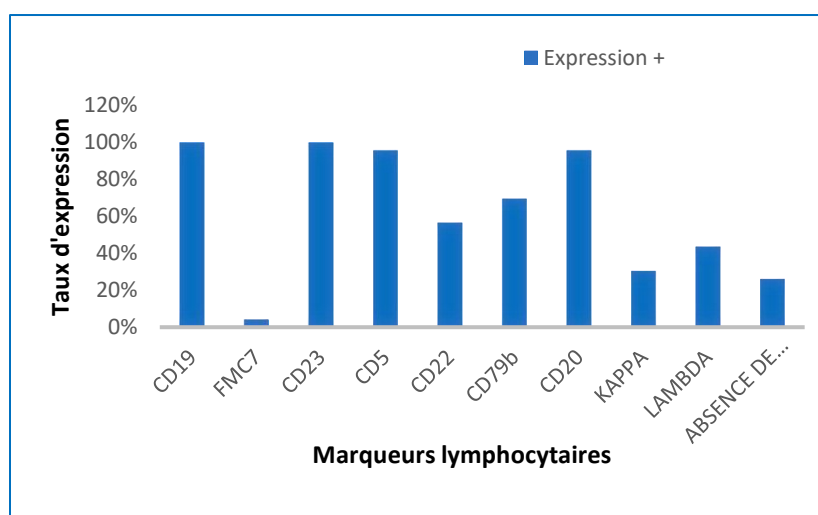


Figure 30 : Expression des différents marqueurs chez les patients LLC.

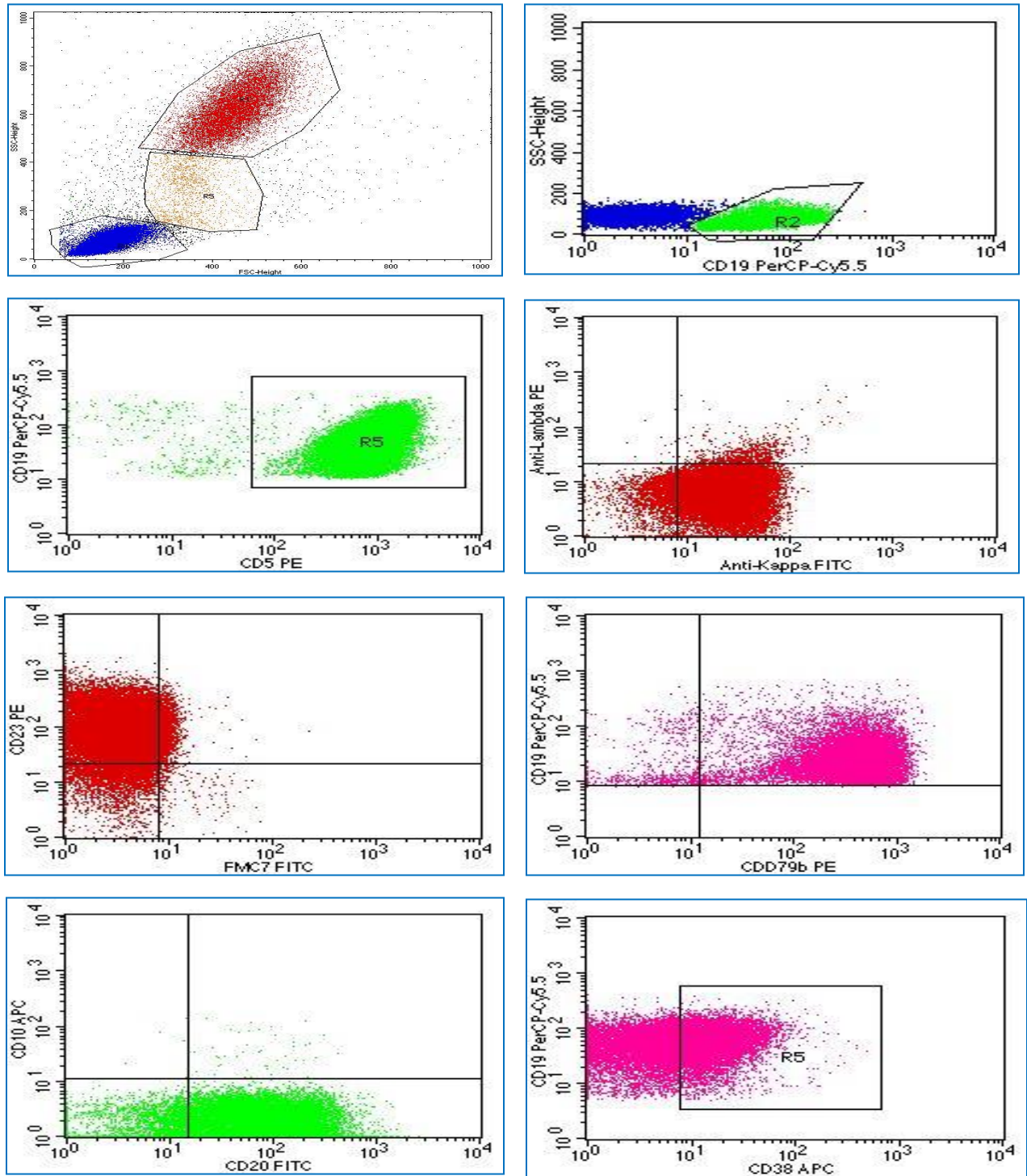


Figure 31 : Dot plot d'un cas LLC CD19⁺, CD5⁺, CD23⁺, FMC7⁺, CD79b^{+/++}, Kappa⁺ et CD20⁺ fortement exprimé.

IV. 2. Les lymphomes de Manteau (MCL) :

L'immunophénotypage par CMF nous a permis de diagnostiquer 5 cas de MCL sur les 42 cas étudiés, il s'agit de 4 hommes et 1 femme avec un âge moyen de 70,4 ans (61 - 76), ayant un taux de lymphocytes moyen de 23003,2 elts/ μ l (9355 - 54300).

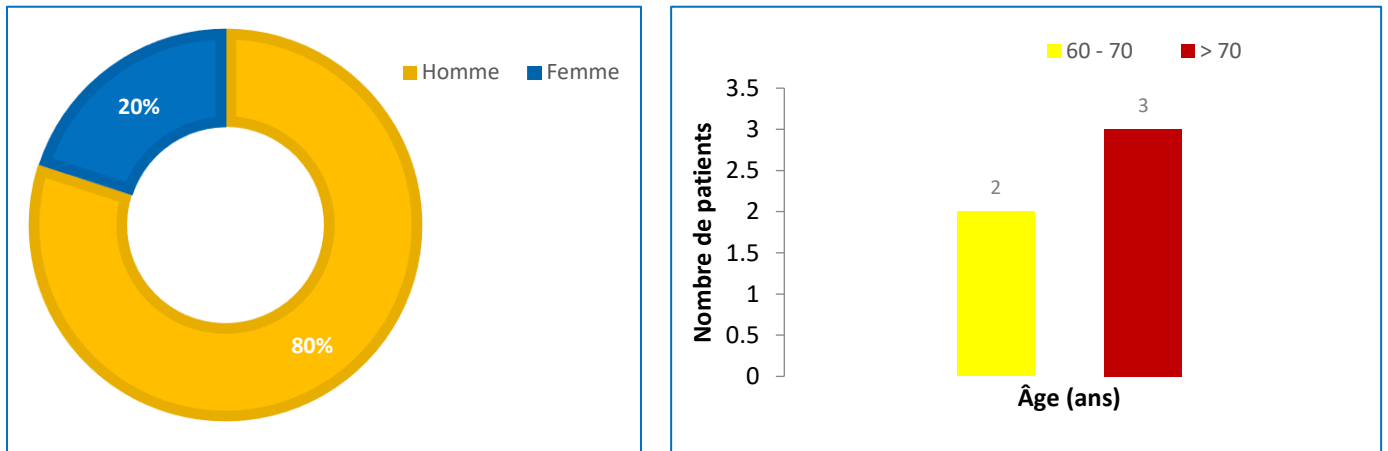


Figure 32 : Répartition des patients MCL selon le sexe et l'âge.

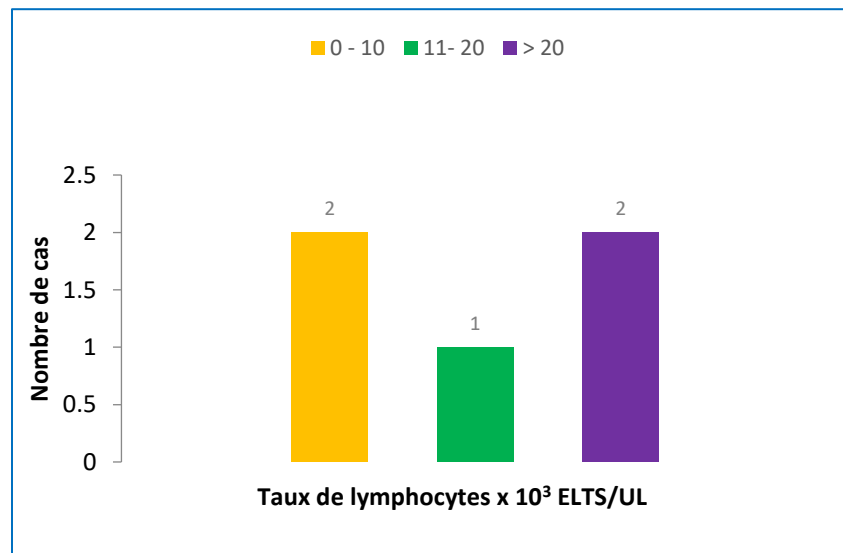


Figure 33 : Répartition des patients MCL selon le taux de lymphocytes.

- Cytologie :

La cytologie a évoqué un SLPC dans 04 cas et une Leucémie Aigüe (LA) dans 01 cas.

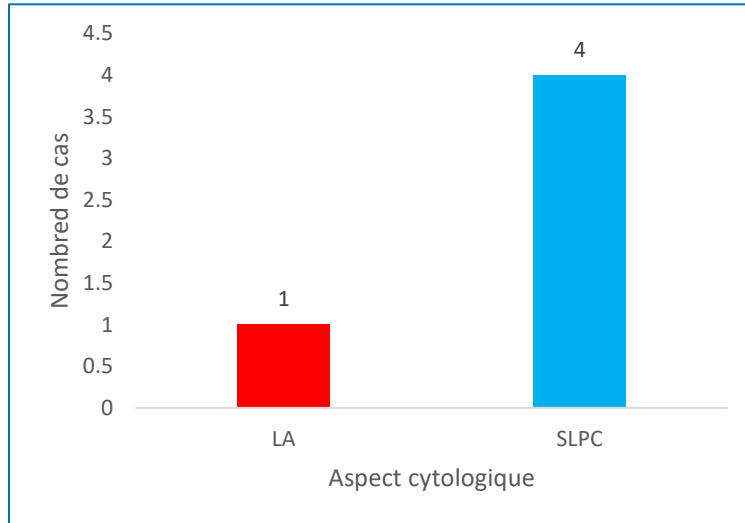


Figure 34 : Résultats de la cytologie des patients MCL.

- Analyse du score de Matutes :

- Score 3/5 : 04 cas.
- Score 2/5 : 01 cas.

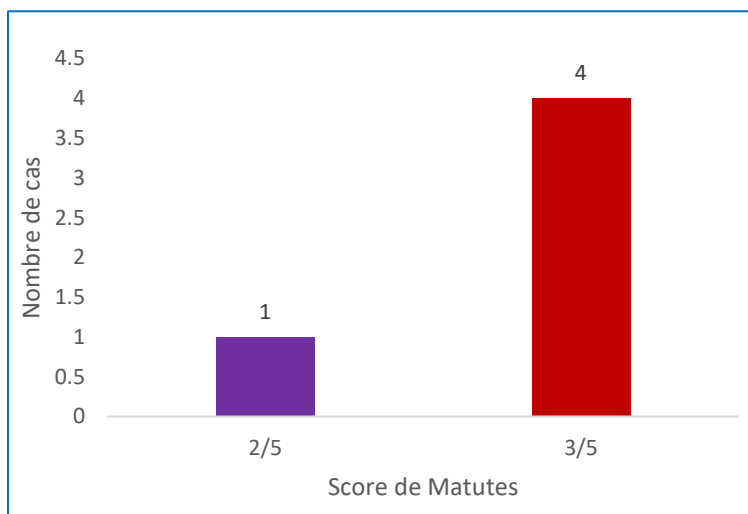


Figure 35 : Score de Matutes des patients MCL.

- Expression des différents marqueurs (Tab XI) :

On note :

- Expression du CD19 (Pan B) dans 100%.
- Expression du CD5 chez les 5 cas.
- L'expression du CD79b dans 04 cas avec une forte expression dans 03 cas.
- L'expression du FMC7 dans 3 cas.
- Faible expression du CD23 dans 01 cas
- Absence de monoclonalité dans 02 cas.
- Expression de monoclonalité dans 03 cas : (Kappa : 02 cas et Lambda : 01 cas).
- Expression forte de CD20 dans 03 cas.

Tableau XI : Expression des marqueurs B des lymphomes de Manteau.

Marqueurs	CD5	CD23	Kappa	Lambda	FMC7	CD79b	CD20	Score de Matutes	
Expression positive	5	1	2	1	3	4	4	2/5	3/5
Expression négative	/	4	/	/	2	1	1	1 pts	4 pts

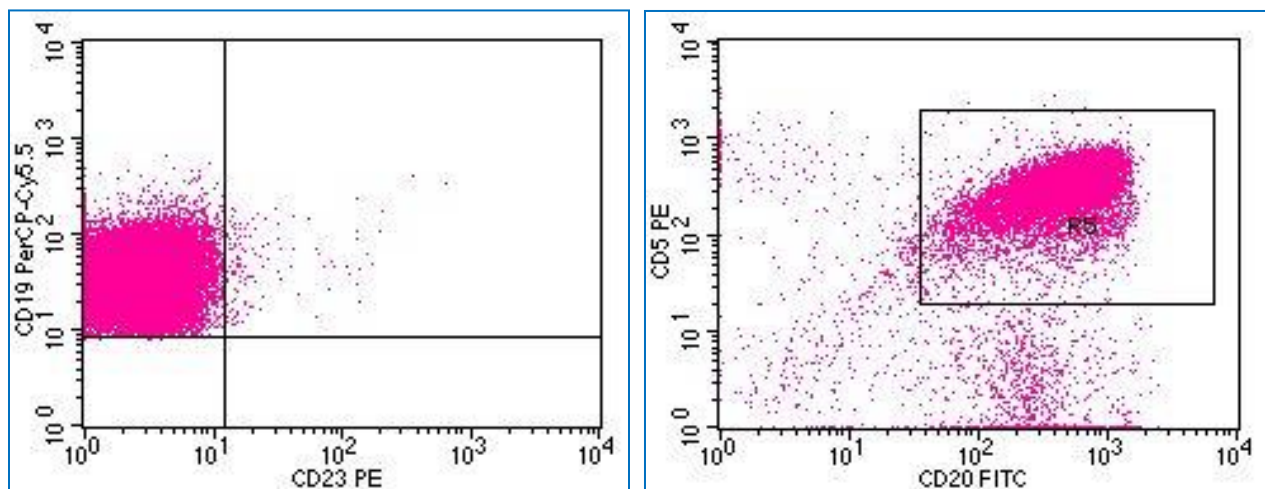


Figure 36 : Dot plot d'un cas MCL CD19⁺, CD23⁻, CD5⁺ et CD20⁺ fort.

IV. 3. Syndrome lymphoprolifératif chronique B (SLPC B) :

05 Patients ont été diagnostiqués comme SLPC B par CMF sur les 42 cas traités. Il s'agit de 3 hommes et 2 femmes avec un âge moyen de 71,4 ans (43 – 88).

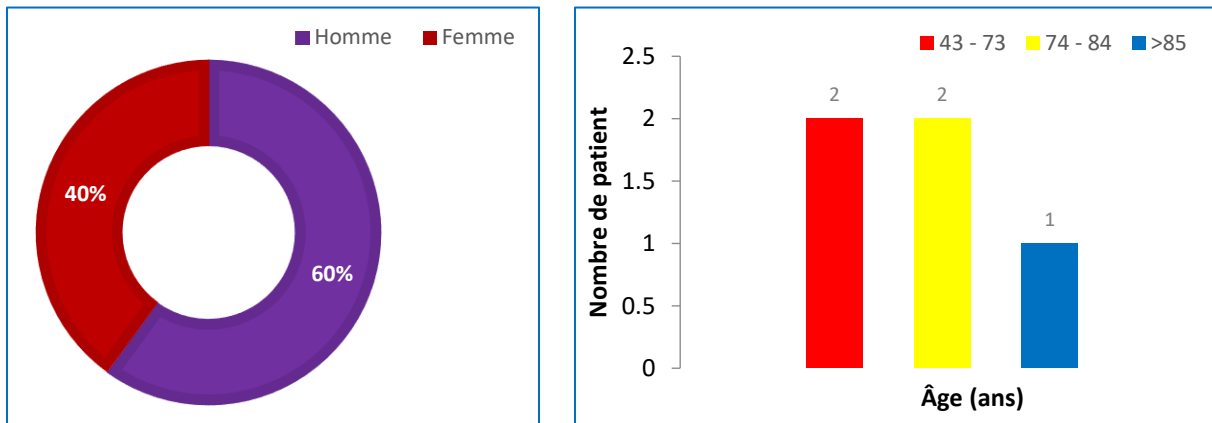


Figure 37 : Répartition des patients SLPC B selon le sexe et l'âge.

- Hémogramme : Le taux moyen de lymphocytes est de 16530 elts/ μ l (6200 – 39540).

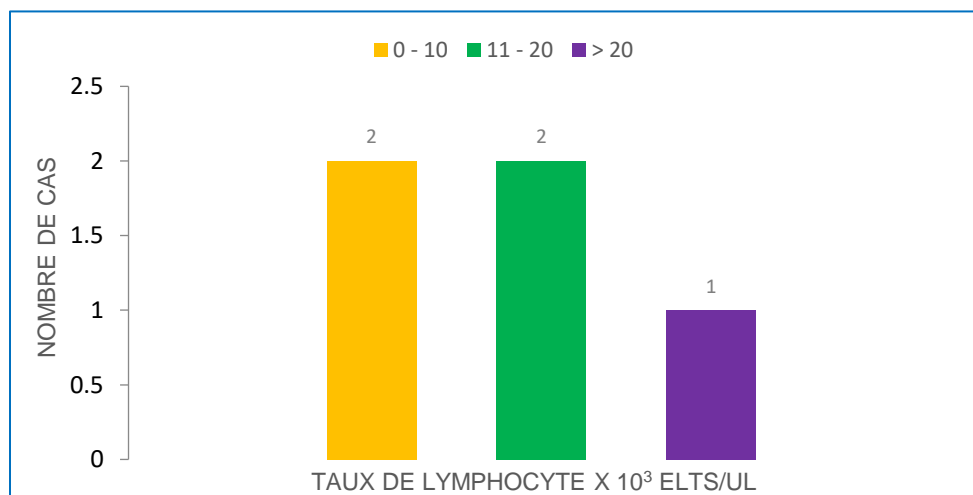


Figure 38 : Répartition des patients SLPC B selon le taux de lymphocytes.

- Application du score Matutes :
 - Score 4/5 : 1 cas (20%), dans ce cas le CD23 est négatif.
 - Score 3/5 : 04 cas (80%).

- Expression des marqueurs :
 - Le CD 19 est exprimé dans 100% des cas.
 - Prédominance de la monoclonalité Lambda dans 03 cas.
 - Le CD5 est exprimé dans 80% des cas.
 - Le CD23 est exprimé dans 100% des cas.
 - Le FMC7 est négative dans 60% des cas.
 - Le CD22 est exprimé dans 100% des cas.
 - Le CD79b est exprimé dans 100% des cas avec une forte expression dans 03 cas.
 - Le CD20 est exprimé dans 100% des cas avec une forte expression dans 04 cas.

L'expression des différents marqueurs étudiés est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XII : Expression des marqueurs lymphocytaire B chez les patients SLPC B.

Marqueurs		Expression	
		+	Intensité forte
Marqueurs membranaires	CD19	100%	/
	FMC7	60%	/
	CD23	80%	/
	CD5	80%	/
	CD22	100%	/
	CD79b	100%	60%
	CD20	100%	80%
Marqueur de monoclonalité	Kappa	40%	/
	Lambda	60%	/
	Absence de monoclonalité	/	/

IV. 4. Lymphome de la Zone Marginale (SMZL) :

L'immunophénotypage par CMF nous a permis de diagnostiquer un cas de SMZL. Il s'agit d'un homme âgé de 54 ans, ayant un taux de lymphocytes de 5770 elts/ μ l, ainsi qu'un aspect cytologique en faveur d'un SLPC. Son score Matutes a été 1/5.

- Expression des différents marqueurs :
 - On note l'expression du CD19⁺, CD5⁺, FMC7⁺, CD79b⁺ fort, CD20⁺ fort.
 - Absence d'expression du CD 23.
 - Monoclonalité Lambda.

IV. 5. Syndromes lymphoprolifératifs chronique T (SLPC T) :

Notre étude a permis de mettre en évidence 04 cas de SLPC T, il s'agit de 02 hommes et 02 femmes avec un âge moyen de 64,25 ans (51 – 79), et le taux moyen de lymphocytes est de 14530 elts/ μ l (4640 – 46120), et dont la cytologie avait révoqué un SLPC pour les 4 cas.

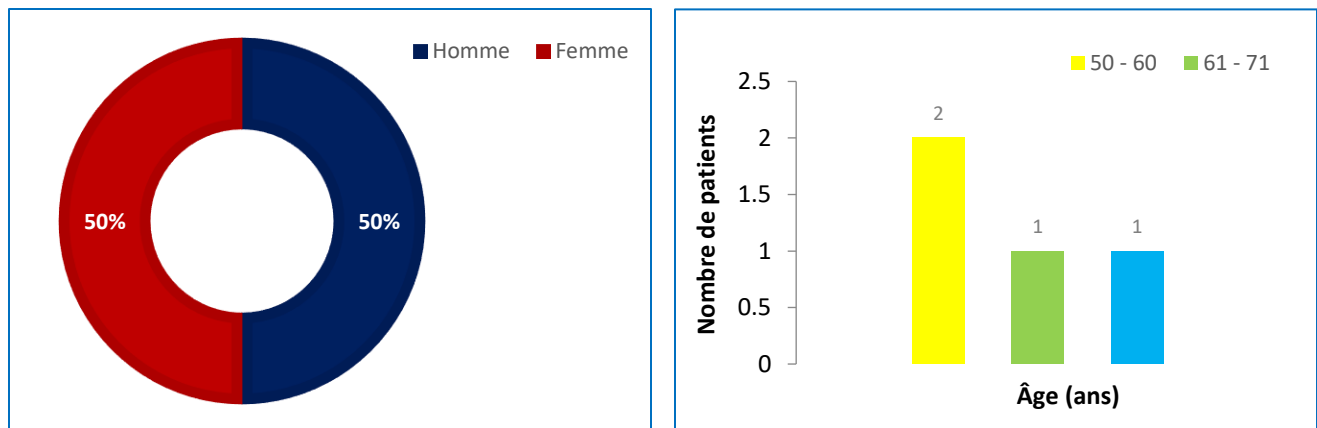


Figure 39 : Répartition des patients SLPC T selon le sexe et l'âge.

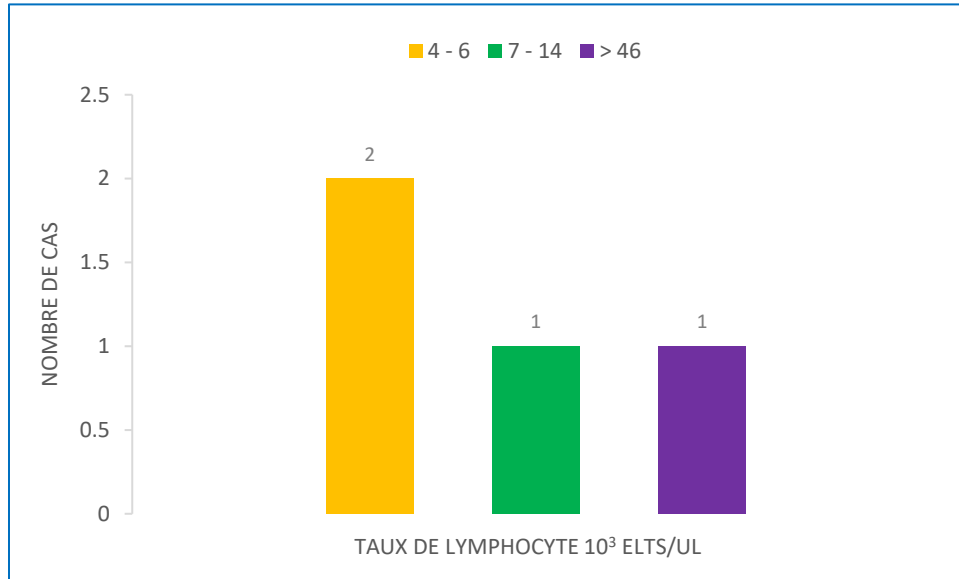


Figure 40 : Répartition des patients SLPC T selon le taux de lymphocyte.

Les résultats de la CMF ont confirmé la présence d'un cas Sezary, un cas SLPCT $\alpha\beta$ et 2 cas SLPC T :

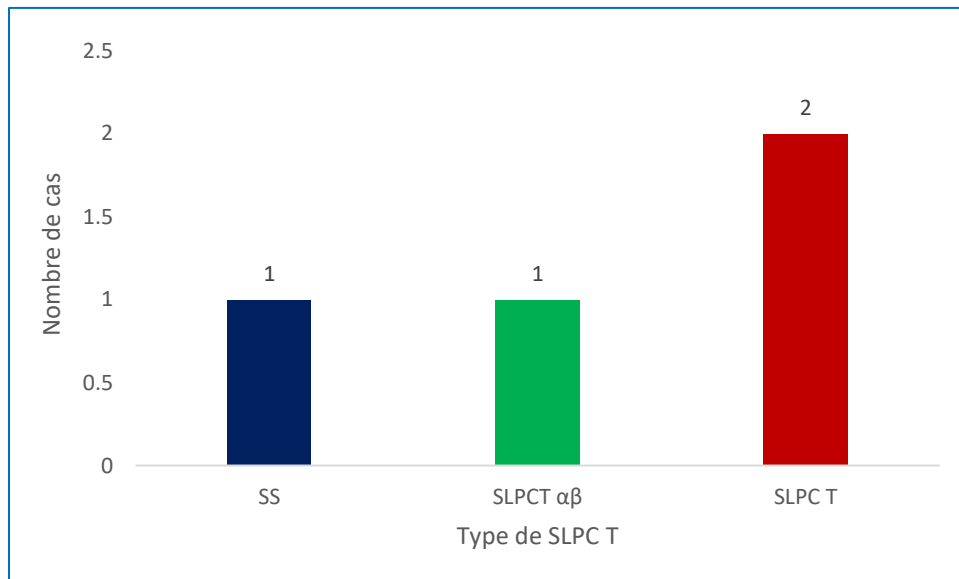


Figure 41 : Répartition des 4 patients SLPC T selon les résultats de la CMF.

- Expression des marqueurs (Tab XIII) :

On note :

- L'absence d'expression du CD19 chez tous les patients.
- Expression du CD3, CD2, CD5 chez tous les patients.
- Un trou phénotypique (Absence d'expression du CD7) : 01 cas.
- Inversion du rapport CD4/CD8 dans 03 cas.
- Expression du TCR $\alpha\beta$: 02 cas.

Tableau XIII : Expression des différents marqueurs LT dans les SLPC T.

Marqueurs	CD3	CD4	CD8	CD2	CD5	CD7	CD19
Expression positive	4	2	2	4	4	3	/
Expression négative	/	2	2	/	/	1	4

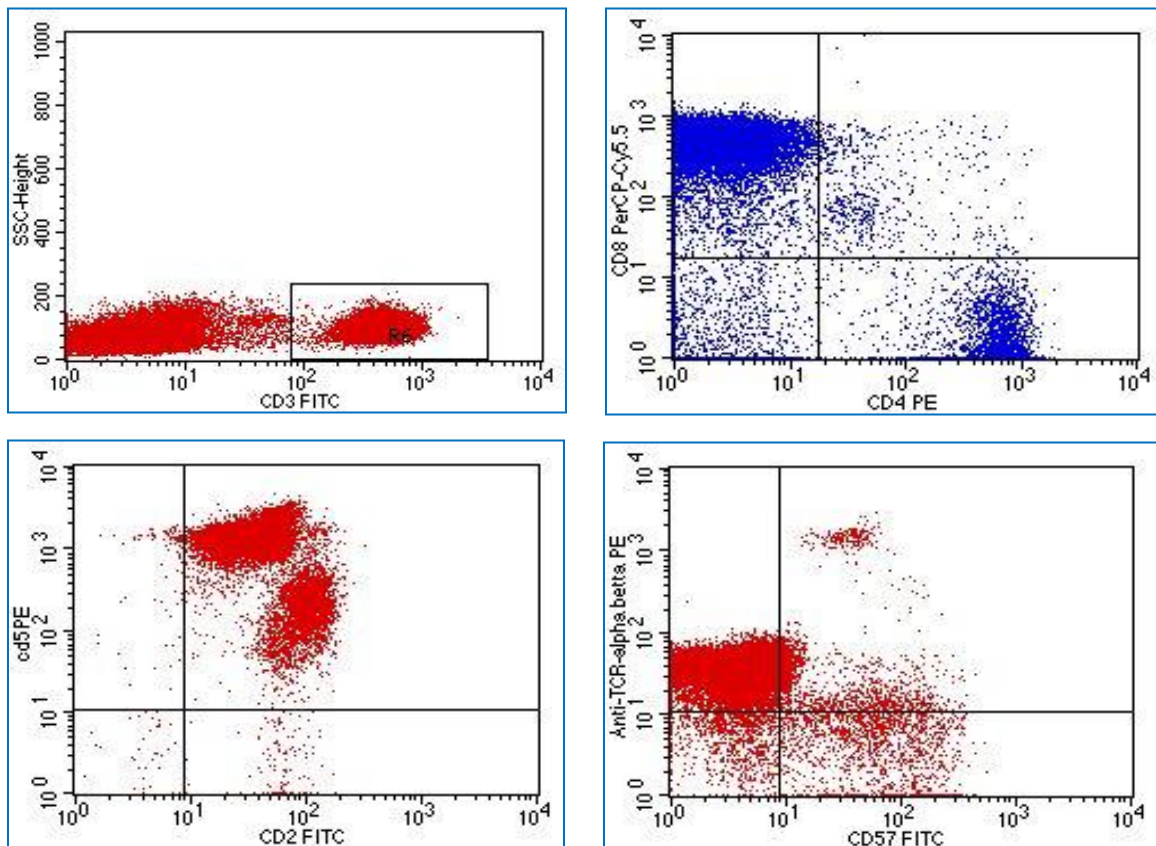


Figure 42 : Dot plot d'un cas CD3⁺, CD8⁺, CD4⁻, CD2⁺, CD5⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD57⁻.

IV. 6. Hyperlymphocytose Réactionnelle :

Nous rapportons 04 cas d'hyperlymphocytose réactionnelle sur les 42 cas traités. Il s'agit de 3 femmes et un homme avec un âge moyen de 56,75 ans (51 – 65), un taux moyen de lymphocytes de 4615 elts/ μ l (4230 – 5000).

La cytologie a évoqué un SLPC pour les 4 cas et l'immunophénotypage par CMF note l'absence d'expression des signes en faveur d'un processus malin à savoir une monoclonalité B, un trou phénotypique et/ou une inversion du rapport CD4/CD8.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Discussion

Dans notre étude prospective ayant colligée 42 patients ayant une hyperlymphocytose sanguine. L'immunophénotypage par CMF a permis d'établir le pourcentage d'expression et l'intensité des différents marqueurs et de calculer le score de Matutes dans les SLPC B pour identifier les différents types et sous types des SLPC et de déterminer les cas réactionnels.

A travers les résultats de l'hémogramme, nous avons relevé une hyperlymphocytose sanguine excédant $4 \times 10^9/l$ chez tous les patients, ce qui rejoint les données de la littérature, dont l'étude de **Khazri (2012)**.

Sur les 42 cas analysés par cytométrie en flux, nous avons noté 38 cas (90%) de SLPC et 04 cas d'hyperlymphocytose sanguine réactionnelle. Dans les cas de SLPC, 89,5% des cas sont de phénotype B et 10,5% sont de phénotype T (une prédominance d'expression du phénotype B) ce qui concorde avec les données de **Ramaoun et al., (2013)**.

Nous avons noté une prédominance masculine avec un sexe ratio (H/F) de 2,23, ce qui concorde avec les résultats de **Abad (2010)** et **Khazri (2012)**.

L'âge moyen de nos patients au moment du diagnostic est de 68,2 ans, ce qui correspond aux données de plusieurs études comme celle de **Ramaoun et al., (2013)** équivalent à celui relevé dans les résultats LLC de **Ait Ali (2013)**, ainsi celle de **Khazri (2012)** qui ont noté respectivement les âges moyens de 63 et de 61 ans.

Parmi les 34 cas SLPC B, 67,6% ont été identifiés comme étant des LLC, contre 32,4% qui représente les autres SLPC B (14,7% MCL, 3% SMZL et 14,7% comme étant SLPC B). Ces résultats rejoignent les résultats de **Ramaoun et al., (2013)** et de **Taoussi (2012)** qui ont noté respectivement 74% et 78,6% cas LLC.

La CMF nous a permis d'établir le pourcentage d'expression et l'intensité des différents marqueurs et de calculer le score de Matutes pour identifier les différents types de SLPC.

🚩 Analyse de LLC :

Dans notre étude, la LLC a été affirmée chez 23 cas, avec un âge moyen de 70,39 ans, parmi eux 78% sont de sexe masculin. Ces données rejoignent les résultats de l'étude de **Taoussi (2012)** qui a relevé un âge moyen de 64 ans avec une prédominance masculine.

L'évaluation du niveau du score de Matutes dans notre étude est similaire aux proportions retrouvées dans d'autres travaux du même sujet (voir tableau ci-dessous).

Tableau XIV : Comparaison des résultats du score de Matutes.

Etude	Notre étude (2020)	Oukid (2015)	Taoussi (2012)	N. Guillaume (2002)	X. Troussard (2002)
Nombre de cas	23	300	150	79	77
Matutes \geq à 4 (%)	91	90.6	90	91	87
Matutes < à 3 (%)	8	9.4	10	8	13

La fréquence d'expression des différents marqueurs du score de Matutes impliqués dans la LLC, et l'analyse de la monoclonalité, au sein de notre population (n = 23) sont discutées avec d'autres études celle de **Chakou et Amalou (2013)** et celle de **Oukid (2015)** et résumé dans le tableau suivant :

Tableau XV : Etude d'expression des marqueurs du score de Matutes.

Etude	Notre étude (2020) n=23	Oukid (2015) n=300	Chakou et Amalou (2013) n=46
CD5⁺	100%	100%	91,3%
CD23⁺	100%	98.4%	93,5%
FMC7⁻	100%	87%	84,8%
CD79b/faible	74%	63%	82,6%

Kappa	30,43%	54%	77,5%
Lambda	43,47%	28%	22,6%

Nous avons remarqué que seul notre travail qui a mis en évidence une prédominance à monoclonalité Lambda, dans les autres travaux la prédominance est en faveur de la monoclonalité Kappa, cette différence peut être due à notre effectif réduit. De plus, la monoclonalité n'est pas exprimée dans 26,08% des cas, dans l'étude d'**Oukid (2015)** l'absence d'expression des chaînes légères s'élève à 18%, et dans celle de **Chakou et Amalou (2013)** elle est de 19,57%, les données des deux travaux sont semblables à nos résultats. Concernant les marqueurs CD5, CD23, FMC7, et CD79b il n'existe pas de différence.

Les SLPC hors LLC :

Les autres SLPC (hors LLC) diagnostiqués durant notre étude représentent 39,48% du total des cas étudiés. Selon le tableau ci-dessous comparant les SLPC (hors LLC) dans notre cohorte et celles relevées dans les travaux de la littérature. Les variétés avec les fréquences rejoignent globalement les résultats de **Oukid (2015)** et **Wyrwas (2015)**.

Tableau XVI : Comparaison des résultats des SLPC hors LLC.

SLPC hors LLC	Notre étude (2020)	Oukid et al (2015)	Wyrwas (2015)
MCL	13,15	10,4	13,2
HCL	/	2,4	/
SMZL	2,63	6,07	20,5
FL	/	2,8	/
SLPC B	13,15	/	/
SLPC T	5,26	2,2	/
SLPCT AB	2,63	/	/
SS	2,63	/	/

🚩 Analyse des SLPC B :

D'après le tableau suivant l'analyse de l'expression de la monoclonalité indique une expression variée des chaînes légères des immunoglobulines.

La CMF nous a permis de diagnostiquer 5 lymphomes de manteau grâce à l'expression positive des marqueurs Panel B, ainsi que l'expression positive du marqueur aberrant CD5, le CD23 a été négativement exprimé chez 4 cas, ces données rejoignent les données citées dans la littérature, la prédominance de monoclonalité a été en faveur du clone Kappa dans 2 cas et Lambda dans 1 cas.

Tableau XVII : Expression de la monoclonalité dans les SLPC B hors LLC.

	Notre Etude			Oukid et al (2015)		
	Kappa	Lambda	Non Exprimé	Kappa	Lambda	Non Exprimé
Manteau	02	01	02	29	18	05
Zone Marginale	/	01	/	15	10	05
SLPC B	02	03	/	14	05	06

Nous avons diagnostiqué 1 cas de Lymphome de la Zone Marginale (SMZL) qui a été relevé durant notre étude grâce à l'expression positive des marqueurs Pan B, et à l'absence d'expression du CD23. Le marqueur aberrant CD5 a été fortement exprimé chez notre patient, ceci rejoint les résultats de l'étude de **Wyrwas (2015)**. La prédominance de monoclonalité a été en faveur du clone Lambda.

Concernant les SLPC T, deux cas ont été relevés durant notre étude grâce à l'absence d'expression des marqueurs Pan B, ce qui nous a orientés vers le phénotype T, et aussi à l'expression positive des marqueurs spécifiques aux SLPC T, notamment l'expression positive du CD3, CD2, CD5 chez tous les patients, un trou phénotypique (absence d'expression du CD7) chez 1 cas et l'inversion du rapport CD4/CD8 dans 3 cas.

Parmi nos 42 sujets, 4 cas ont présenté une hyperlymphocytose réactionnelle mais la CMF a confirmé l'absence des signes de processus malin.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au terme de ce travail de deux mois d'étude, ayant porté sur 42 cas d'hyperlymphocytose au sein du laboratoire d'hématologie du CAC-BLIDA, nous avons pu émettre un diagnostic de certitude d'une atteinte par un SLPC en conversion leucémique grâce à l'immunophénotypage par CMF dans 38 cas parmi les 42 patients concernés.

La cytologie a suspecté un SLPC chez 33 cas, une LLC chez 8 cas, et une LA chez 1 seul cas, et grâce à l'immunophénotypage par CMF nous avons pu déterminer le type de SLPC.

Pour la fréquence des différents SLPC en conversion leucémique reçus au laboratoire durant notre stage, une nette prédominance du phénotype B par rapport au phénotype T a été retrouvée (89,5% vs 10,5%) ce qui rejoint des études nationales et internationales déjà faites.

Dans notre étude, nous avons relevé une prédominance des LLC suivis par le MCL et SLPC puis les autres SLPC en conversion leucémique.

Suite à notre travail, nous pouvons conclure que l'hyperlymphocytose à évolution chronique due à des hémopathies malignes touchent surtout les sujets âgés plus de 40 ans touchant les deux sexes avec une nette prédominance masculine. Le diagnostic doit être évoqué devant une hyperlymphocytose sanguine excédant $4 \times 10^9/l$ et persistante plus de trois mois. La similitude dans la présentation clinique et cytologique des différents SLPC rend parfois le diagnostic positif difficile, donc la CMF reste le meilleur moyen de diagnostic.

D'après notre étude, nous suggérons que le diagnostic d'hyperlymphocytose exige le renforcement des méthodes de diagnostic en incluant la cytogénétique et la biologie moléculaire ainsi que la création des comités de concertation et de relecture des données des malades.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Abad MT.** Epidémiologie des syndromes lymphoprolifératifs chroniques en Algérie. 2ème journée d'hématologie, 14 Février 2010.CAC BLIDA.
- ❖ **Ait Ali H.** (2012). Approche épidémiologique de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en Algérie IXème congrès national d'hématologie, 10-12 mai 2012.
- ❖ **Ait Ali H.** (2013). Approche épidémiologique de la leucémie lymphoïde chronique en Algérie. Revue Algérienne d'hématologie 2013 – 2014; N° 8 – 9: 6-8.
- ❖ **Arber DA, George TI.** Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. Am. J. Surg. Pathol. 2005 Dec;29(12):1549-57.
- ❖ **Brigden ML, Au S, Thompson S, Brigden S, Doyle P, Tsaparas Y.** Infectious mononucleosis in an outpatient population: diagnostic utility of 2 automated hematology analyzers and the sensitivity and specificity of Hoagland's criteria in heterophile-positive patients. Arch. Pathol. Lab. Med. 1999 Oct;123(10):875-81.
- ❖ **Campbell J. J., R. A. Clark, R. Watanabe, and T. S. Kupper,** “Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors,” Blood, vol. 116, no. 5, pp. 767–771, 2010.
- ❖ **CHAKOU.M, ET AMALOU.M** (2013, Apport de l'immunophénotypage par cymomètre en flux dans le diagnostic et le pronostic de la Leucémie Lymphoïde Chronique de type B, thèse en vue de l'obtention du diplôme de master, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene USTHB) 36, 16-31.
- ❖ **Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M.** (2005). Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;352:804–15.
- ❖ **Christine Goetz, Christopher Hammerbeck, Jody Bonnevier.,** 2018. Flow Cytometry Basics for the Non-Expert. R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, 219.
- ❖ **Cymbalista F,** (2015). Voies de signalisation dans la LLC : Nouvelles thérapies ciblées dans la leucémie lymphoïde chronique. Service d'hématologie biologique, hôpital Avicenne, Bobigny.
- ❖ **Dighiero G, Hamblin TJ.** (2008). Reproduced with permission of Elsevier, Lancet 2008;371:1017.

- ❖ **Dohner, Hartmut, Stephan Stilgenbauer, Axel Benner, Elke Leupolt, Alexander Kröber, Lars Bullinger, Konstanze Döhner, Martin Bentz, and Peter Lichter.** (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910–6.
- ❖ **Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E, Hallek M.** (2011). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2011;22(Suppl 6):vi50–4.
- ❖ **Emile, C.** (2009). Rôle du biologiste devant une hyperlymphocytose. *Option/Bio,* 20(412), 14-15.
- ❖ **Emile, C.** (2016). Conduite à tenir devant une hyperlymphocytose. *Option/Bio,* 27(549-550), 13-16.
- ❖ **Gauthier, M.** (2017). Suivi de la reconstitution immunitaire après immunochimiothérapie par Rituximab, Fludarabine et Cyclophosphamide en première ligne de leucémie lymphoïde chronique: implications pour la prise en charge thérapeutique (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- ❖ **HADDAD B,** Rôle du biologiste cytologiste dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques. CHU Conception, Marseille. 7èmes journées de Biologie Hospitalière. Les Menuires, 17 Mars 2010.
- ❖ **Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., & Kipps, T. J.** (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology,* 111(12), 5446-5456.
- ❖ **Hamad, H., & Mangla, A.** (2019). Lymphocytosis. In *StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.*
- ❖ **Hanley MB, Lomas W, Mittar D, Park E.** (2013). Detection of low abundance RNA molecules in individual cells by flow cytometry. *PLoS One.* 2013;8(2):e57002.
- ❖ **Harvey, W. Henwood,** (1906), Experimental lymphocytosis. *The Journal of Physiology,* 35 doi: 10.1113/jphysiol.1906.sp001183.

- ❖ **Jacque, N., & Leblond, V.** (2019). La leucémie lymphoïde chronique: mise au point. *La Presse Médicale*, 48(7-8), 807-815.
- ❖ **Johann, R. O. S. E.** (2016). Hyperlymphocytose sanguine modérée de l'adulte: seuils rationnels et orientation optimale au laboratoire d'hématologie.
- ❖ **Johansson, Ulrika, David Bloxham, Stephen Couzens, Jennifer Jesson, Ricardo Morilla, Wendy Erber, Marion Macey:** Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 165(4):455–488, 2014.
- ❖ **Jones, J., Choi, M.Y., Mato, A.R., Furman, R.R., Davids, M.S., Heffner, L.T., Cheson, B.D., Lamanna, N., Barr, P.M., Eradat, H. and Halwani, A.** (2016). Venetoclax (VEN) monotherapy for patients with CLL who relapse after of were refractory to ibrutinib or idelalisib. *Blood* 2016;128:637.
- ❖ **Kaushansky k, Marshall A. Lichtman, Josef Prchal, Marcel M. Levi, Oliver W.** Press, Linda J. Burns, Michael Caligiuri., 2015. *Williams Hematology*. 9ème edition, McGraw-Hill Medical, New York, 2528.
- ❖ **KHAZRIA** (2012, Les syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques: aspects épidémiologiques, cliniques et cytologiques. Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine. faculté de médecine et pharmacie, université CADI AYYAD MARRAKECH),134: 11-19.
- ❖ **La Peyronie, H.** (1993). Cytométrie en flux et en image: principes et applications.
- ❖ **Leblanc F, Zhang D, Liu X, Loughran TP** (2012). "Large granular lymphocyte leukemia: from dysregulated pathways to therapeutic targets". *Future Oncol.* 8 (7): 787–801.
- ❖ **Liu, Q., and Wang, H.-G.** (2012). Anti-cancer drug discovery and development: Bcl-2 family small molecule inhibitors. *Commun Integr Biol* 5, 557–565.
- ❖ **Matutes E, Catovsky D.** (1994). The value of scoring systems for the diagnosis of biphenotypic leukemia and mature B-cell disorders. *Leukemia Lymphoma* 1994;13(Suppl1):11-4
- ❖ **Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Morilla R, Atkinson S, Elnenaei MO, Jain P, Giustolisi GM, A'Hern RP, Catovsky D.** The leukemic

presentation of mantle-cell lymphoma: disease features a prognostic factors in 58 patients. *Leuk. Lymphoma*. 2004 Oct;45(10):2007-15.

- ❖ **MEDDOUR. Y** (2015, Apport de l'Immunophénotypage et de la biologie moléculaire dans le suivi et le pronostic du myélome multiple. Thèse de doctorat en sciences médicales. Faculté de médecine. Université d'ALGER 1), 223 : 63-106.
- ❖ **Moreau, Elisabeth J., Estella Matutes, Roger P. A'Hern, Alison M. Morilla, Ricardo M. Morilla, Kwasi A. Owusu-Ankomah, Ben K. Seon, and Daniel Catovsky.** (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108(4):378-82.
- ❖ **N. Guillaume.** Pertinence des analyses cytologiques et immunophénotypiques dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique B Volume 60, numéro 6, Novembre - Décembre 2002.
- ❖ **OUKID. S** (2015, Profil phénotypique des Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC) par cytométrie en flux. Service Hématologie, EHS ELCC CAC Blida; Faculté de médecine, Université de Blida I, Algérie). 12ème Congrès Maghrébin d'Hématologie. 29 au 30 Mai 2015 à l'hôtel Le Royale Hammamet, Tunis.
- ❖ **OUKID.S, TAOUSSIS, BRAHIM.F** (2015, Profil phénotypique par cytométrie en flux (CMF) des Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques en conversion leucémique, XIIème congrès national d'hématologie, SAHTS).
- ❖ **Prabhjot Kaur.** (2018). *Chronic Lymphocytic Leukemia: Pathobiology, B Cell Receptors, Novel Mutations, Clonal Evolution*, Lebanon, Springer, 135.
- ❖ **Ramaoun, M., Oukid, S., Taoussi, S., Abad, M. T., Ahmidatou, H., Louanchi, L., & Nacer, R. A.** APPROCHE ÉPIDÉMIOLOGIQUE NATIONALE DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFÉRATIFS CHRONIQUES EN CONVERSION LEUCÉMIQUE (HORS LLC). TRAVAIL COOPÉRATIF ET MULTICENTRIQUE À PROPOS DE 285 CAS (2010-2013). *Hématologie Revue Algérienne d'hématologie*.
- ❖ **Rogers, K.A., Luay, M., Zhao, Q., Wiczer, T., Levine, L., Zeinab, E.B., Blachly, J.S., Byrd, J.C., Guerrero, T., Jones, J.A. and Polina, S.** (2017). Incidence and type of opportunistic infections during Ibrutinib treatment at a single academic center #830. In: 59th Annual American Society of Hematology Meeting; 2017.

- ❖ **Rosenberg ES, Caliendo AM, Walker BD.** Acute HIV infection among patients tested for mononucleosis. *N. Eng Med.* 1999 Mar 25;340(12):969.
- ❖ **Sylvain Choquet.** Syndromes lymphoprolifératifs chroniques chez la personne âgée : du diagnostic à la prise en charge. *Bulletin du Cancer.* 2008;95(8):74-78.
doi:10.1684/bdc.2007.0534
- ❖ **TAOUSSIS** (2012, Évaluation des examens immunocytologiques et cytogénétiques à visée diagnostique et pronostique dans la leucémie lymphoïdes chronique. Thèse pour le diplôme de docteur en sciences médicales; faculté de médecine, université SAAD DAHLEB BLIDA),172 : 03-53.
- ❖ **Troussard. X.** Différences d'expression des molécules membranaires entre la leucémie lymphoïde chronique (LLC) typique ou atypique et le lymphome à cellules du manteau (LCM).
- ❖ **WYRWAS.M** (2015, Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératif B matures. Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. Faculté de pharmacie, université de LORRAINE), 140:25-79.
- ❖ **Zafrani, L., & Monneret, G.** (2017). Comprendre la cytométrie en flux. *Médecine Intensive Réanimation*, 26(6), 517.
- ❖ **Zelenetz, A.D., Gordon, L.I., Wierda, W.G., Abramson, J.S., Advani, R.H., Andreadis, C.B., Bartlett, N., Byrd, J.C., Czuczman, M.S., Fayad, L.E. and Fisher, R.I.** (2015). "Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 1.2015". *J Natl Compr Canc Netw.* 13 (3): 326–62.

ANNEXES

Annexe 01 : Le matériel non spécifique utilisé



Sysmex, centrifugeuse, chronomètre et un Vortex du laboratoire d'hématologie du CAC Blida.

**Annexe 02 : Tableau récapitulatif des principales différences morphologiques
entre les cellules des différents SLPC**

	Taille des Lc	Chromatine	Nucléole	cytoplasme
LLC typique	<2 GR	Condensée en mottes	Absent	Peu abondant Rapport N/C élevé
LLc atypique	Mélange de petits et grands lymphocytes < 10% de prolymphocytes			
Leucémie prolymphocytaire	> 2GR	Condensée de manière diffuse	1 apparent	Rapport N/C bas
Leucémie à tricholeucocytes	> 2GR	Modérément condensée		Rapport N/C très bas, villosité
SLVL	> 2GR	Condensée		Variable, courte villosités unipolaire
FCL	1-2 GR	Grossièrement condensée		Peu ou pas visible
MCL	Moyenne	Condensée		Rapport N/C élevé
LPL	Varibale	Condensée en mottes	1 petit	Parfois basophile
Leucémie à plasmocytes	Cellules lymphocytaires avec cytoplasme basophile, présence de plasmocytes ou cellules blastiques			
Lc : lymphocyte; GR: globule rouge; N/C rapport nucléocytoplasmique.				

Annexe 03 : Tableau récapitulatif des marqueurs lymphoïdes T

CD	LNH T ab	LNHT gd	L+/-PL T	LLTA ou HTLV1	Sézary	LGL T	LGL à NK
CD7	+	+	+/-	-	-(80%)	+/-	-/+
CD2	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	+	+	+	+	+/-	-
CD3	+	+	+	+	+	+	-
TCR ab	+	-	+/-	+	+	+(80%)	-
TCR gd	-	+	-/+	-	-	-/+	-
CD4	+/-	-	+/-	+	+	-	-
CD8	+/-	-	-/+	-	-	+	+/-
CD45	CD45 RO + OU RA+			RO+	RO+	+	+
CD25	-	-	-/+	+	-	-	-
HLADR	-	-	-	+	-	-	+/-
CD56	-	+/-	-	-	-	-/+	+
CD16	-	+/-	-	-	-	+/-	+
CD57	-	-		-	+/-	+	+/-

LNHT: Lymphome non hodgkinien T; LNHT ab: LNHT alpha bêta ; LNHT gd : LNHT gamma delta;

Annexe 04 : Fiche technique requise pour Immunophénotypage

Service Hématologie, EHS ELCC Blida							
Fiche technique pour Immunophénotypage des Hémopathies Malignes							
N° FC :	N° DH :						
Nom :	Prénom :	Age :					
Origine :	Date du diagnostic :						
Antécédents:							
Date de début :	1 ^{er} signe clinique :						
Tableau clinique :							
Hémogramme :	GB :	PN :	Lym :	Blaste :			
	HB :	VGM :	Retic :	Plaq :			
FS :	GR :						
	GB :	(, , , ,)	Myélemie :				
	Blastes :	%.	Type :				
MO :	Cellularité :	, Méga :					
Gr :	%	Eb :	%	Lym :	%	Plasmocyte :	%
Blastes : %.							
GP :							
Anapath :							
Diagnostic suspecté :							
Accord du Laboratoire		Le :		DR :			

Annexe 05 : Procédure de mise en marche du BD FACS Calibur

- Mettre le FACS Calibur sous tension.
- Mettre le système informatique FACS Calibur sous tension par la touche située en haut à droite du clavier.
- Remplir le réservoir de liquide de gaine aux $\frac{3}{4}$ avec du FACS Flow, bien fermer le bouchon, tuyaux orientés vers la droite.
- Vider le réservoir de déchets (WASTE). Ajouter 200 ml de javel à 12°C dans le fond du réservoir, fermer le bouchon, tuyaux orientés vers la gauche.
- Commuter la valve de mise sous pression du réservoir de FACS Flow sur sa position ON.
- Vérifier que le réservoir contenant le FACS Flow se gonfle correctement (2 min).
- Retirer le tube d'eau distillée (mis en place lors de la précédente procédure d'arrêt).
- Vérifier si des bulles d'air sont présentes dans le filtre salin, actionner le système de purge.
- Appuyer sur le bouton PRIME pour éliminer les bulles dans la chambre d'analyse (sans le tube installé), renouveler cette étape 2 fois.
- Pipeter 3 ml d'eau distillée dans un tube Falcon, installer le tube et le laisser 10min en position RUN et en vitesse HIGH.
- Retirer ce tube.

Annexe 06 : Procédure d'arrêt du BD FACS Calibur

- Préparer 2 tubes Falcon A et B.
- Pipeter 3 ml de solution FACS Clean dans le tube A et 3 ml de solution FACS Rinse dans le tube B.
- Mettre en place le tube A, rabattre le support de tube et laisser 10 min en position RUN et en vitesse HIGH.
- Dégager le support de tube et attendre la vidange complète du tube A pour le retirer.
- Retirer le tube A et mettre en place le tube B et laisser le support de tube dégagé. Après aspiration de 2 ml, rabattre le support de tube et laisser en position RUN pendant 10 min.
- Retirer le tube B et mettre en place le tube d'eau distillée et laisser en position RUN pendant 10 min.
- Appuyer sur le bouton STANDBY, laisser en place le tube d'eau distillée et dépressuriser le réservoir FACS Flow en commutant la valve de mise sous pression sur sa position OFF.
- Couper l'alimentation du FACS Calibur et du système informatique FACStation par fonction SHUTDOWN.

Annexe 07 : Procédure hebdomadaire de maintenance du BD FACS Calibur

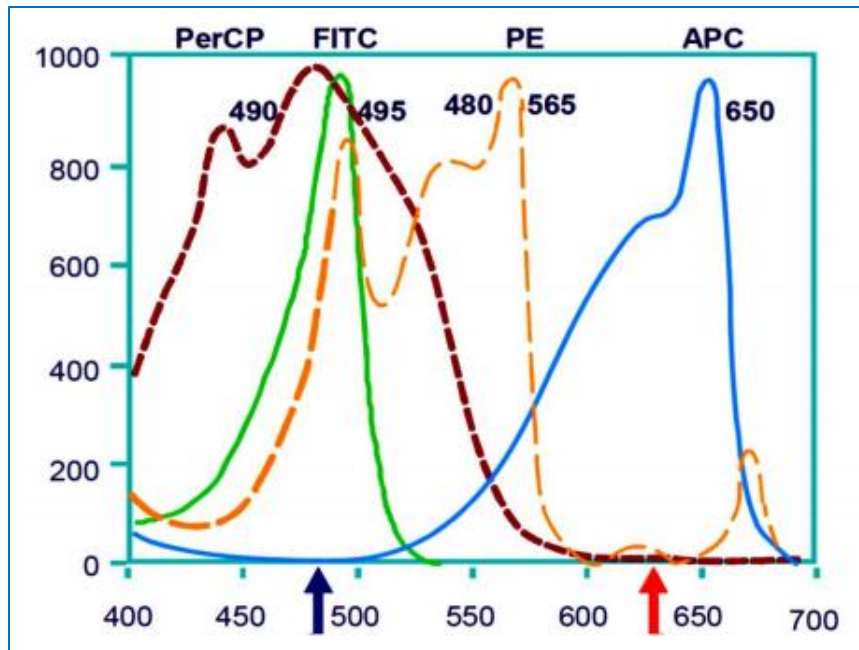
- Préparer 2 tubes Falcon A et B.
- Pipeter 3 ml de solution FACS Clean dans le tube A et 3ml de solution FACS Rinse dans le tube B.
- Retirer le tube présent sur l'aiguille de prélèvement, laisser le support de tube dégagé et le commutateur des fluides sur sa position RUN.
- Commuter la valve de mise sous pression sur sa position OFF, vider le réservoir à déchets, retirer le réservoir de FACS Flow et le remplacer par le réservoir FACS Rinse.
- Déconnecter le filtre salin par le connecteur blanc supérieur et mettre à la place celui du réservoir de liquide de gaine. (Ceci a pour effet de court-circuiter le filtre salin).
- Installer le réservoir contenant le FACS Clean et le réservoir à déchets. Mettre la valve de mise sous pression sur sa position ON.
- Effectuer un PRIME de l'instrument 5 fois.
- Mettre en place le tube A, sélectionner la position RUN et la vitesse HIGH, et laisser le tube en place pendant 30 min.
- Retirer le tube A, laisser le support de tube dégagé et le commutateur des fluides sur sa position RUN.
- Commuter la valve de mise sous pression sur sa position OFF, vider le réservoir à déchets et retirer le réservoir FACS Clean.
- Rincer les détecteurs de niveau avec de l'eau distillée et installer le réservoir de FACS Rinse et le réservoir à déchets. Commuter la valve de mise sous pression sur la position ON.
- Effectuer un PRIME de l'instrument 5 fois.
- Mettre en place le tube B. Sélectionner la position RUN et la vitesse HIGH et laisser le tube en place pendant 30 min.
- Retirer le tube B, laisser le support de tube dégagé et le commutateur des fluides sur la position RUN.
- Commuter la valve de mise sous pression sur sa position OFF, et vider le réservoir à déchets et retirer le réservoir de FACS Rinse.

- Rincer les détecteurs de niveau avec de l'eau distillée et installer le réservoir de FACS Flow et le réservoir à déchets. Commuter la valve de mise sous pression sur la position ON.
- Effectuer un PRIME de l'instrument 5 fois.
- Reconnecter le filtre salin et effectuer à nouveau un PRIME de l'instrument 5 fois.
- Mettre en place le tube d'eau distillée et sélectionner le mode RUN en vitesse HIGH. Laisser le tube en place pendant 10min.
- Appuyer sur le bouton STANDBY. Laisser le tube d'eau distillée en place et dépressuriser le réservoir de FACS Flow en commutant la valve de mise sous pression sur sa position OFF.
- Couper l'alimentation du FACS Calibur et du système informatique FACStation par la fonction SHUTDOWN.

Annexe 08 : Les caractéristiques des fluorochromes utilisés

Fluorochromes	Laser	(λ_{ex})	(λ_{em})
FITC	Bleu	488 nm	520 nm
PE	Bleu	516 nm	578 nm
Percp-Cy 5.5	Bleu	488 nm	678 nm
APC	Rouge	633 nm	660 nm

Caractéristiques des fluorochromes utilisés



Spectres d'absorption et d'émission des fluorochromes. (Meddour, 2015).

Annexe 09 : Procédure de calibration

Pour cette procédure on utilise les billes de Calibrite 3 et l'APC CaliBRITE, ce kit comprend :

- Flacon blanc : contient des billes qui représentent les cellules non marquées.
- Flacon vert : contient des billes couplées au fluorochrome FITC.
- Flacon rouge : contient des billes couplées au fluorochrome PE.
- Flacon rose : contient des billes couplées au fluorochrome PerCP.

Billes APC CaliBRITE : Flacon bleu qui contient des billes couplées au fluorochrome APC.

Mode opératoire :

- Préparer deux tubes A et B.
- Disposer 1 ml de FACS Flow et une goutte des billes non marqués dans le tube A, ce tube servira à régler les PMT du cytomètre.
- Mettre 3 ml de FACS Flow et une goutte de chaque type de billes dans le tube B, ce tube permettra le réglage des compensations des fluorochromes.
- Vortexer les tubes, et procéder directement à la calibration.

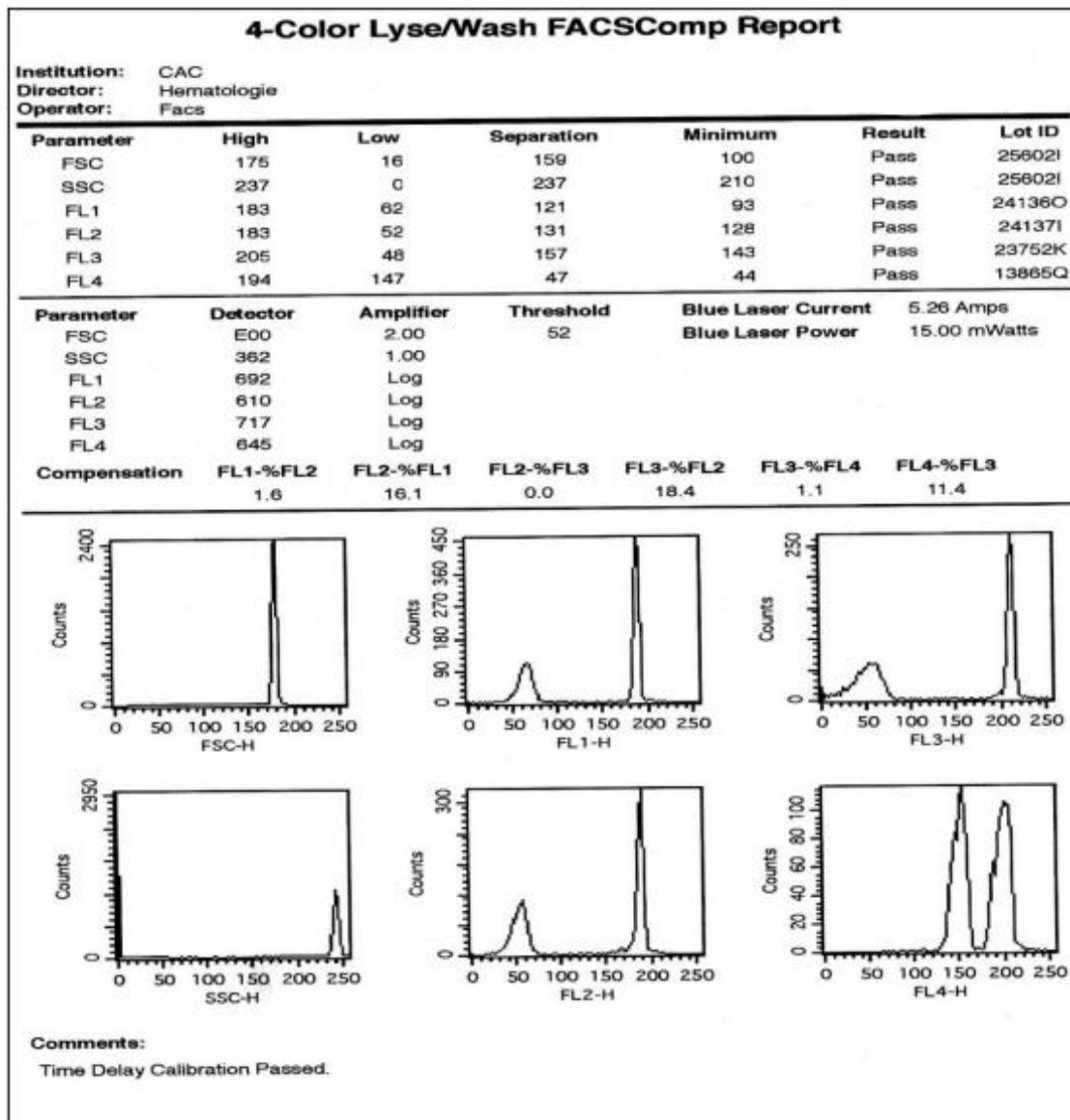
Acquisition des calibrations à l'aide du logiciel FACS Comp :

- Mise en marche du logiciel FACS Comp sur le système informatique du cytomètre, et sélection du réglage (Lyse/Wash).
- Introduction des numéros d'identification des lots de billes (Calibrite3 ; APC CaliBRITE).
- Placement du tube A au niveau de l'aiguille de l'appareil, et activation du mode RUN et à la vitesse High.
- Sélection de l'icône START qui va permettre le commencement de l'acquisition.

Après l'acquisition du tube A, il faut le retirer, et mettre en place le tube B et commencer une 2^{ème} acquisition.

Le logiciel FACS Comp affichera (Pass) si la procédure est réussie, ou (Fail) si la procédure a échoué. En cas de non réussite de l'opération, il faut la refaire jusqu'à ce qu'elle réussisse, si persistance de Fail il fut faire appel à l'équipe de maintenance.

Compte rendu FACS Comp Report (Pass) :



Annexe 10 : Procédure de compensations manuelles

Mode opératoire :

On aura besoin d'un échantillon de sang prélevé d'un sujet sain. Faire un hémogramme pour déterminer le taux de GB.

Préparer 6 tubes Falcon, les numéroter, et disposer 100 µl de sang + 20 µl d'un anticorps monoclonal (un anticorps par tube) qu'on dépose dans le tube.

Le panel utilisé pour des compensations 4 couleurs comprend :

- Tube 01 : 100 µl de sang. Ce tube est le contrôle négatif, il n'est pas soumis à un marquage.
- Tube 02 : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un fluorochrome type FITC.
- Tube 03 : 100 µl de sang +20 µl d'AC lié à un fluorochrome type PE.
- Tube 04 : 100 µl de sang + 20 µl d'AC lié à un fluorochrome type PerCP Cy5.5.
- Tube 05 : 100 µl de sang +20 µl d'AC lié à un fluorochrome type APC.
- Tube 06 : 100 µl de sang +20 µl d'AC lié aux 4 fluorochromes utilisés dans les tubes précédents.

Lecture des compensations :

Avant la lecture des compensations, s'assurer de suivre la procédure de mise en marche et de calibration du cytomètre. Il est aussi recommandé de lire les compensations à une vitesse faible afin d'éviter l'apparition des doublets.

Acquisition des échantillons :

- Tube 01 : il va permettre d'ajuster le gain des amplificateurs FSC et SSC pour que les différentes populations présentes soient visibles, mais aussi de réduire la zone de débris. Sur le Dot plot FSC/SSC, on fait le « gating » pour cibler la population lymphoïde pour indiquer les cellules à analyser, ainsi on pourra ajuster les zones négatives par réglages des PMT de chaque fluorochrome au niveau des Dot plot des fluorochromes.
- Tube 02 à 05 : Ces tubes monomarqués permettent d'éliminer les chevauchements des spectres qui peuvent être superposés en effectuant une soustraction des signaux.

🚩 Exemple du tube 02 :

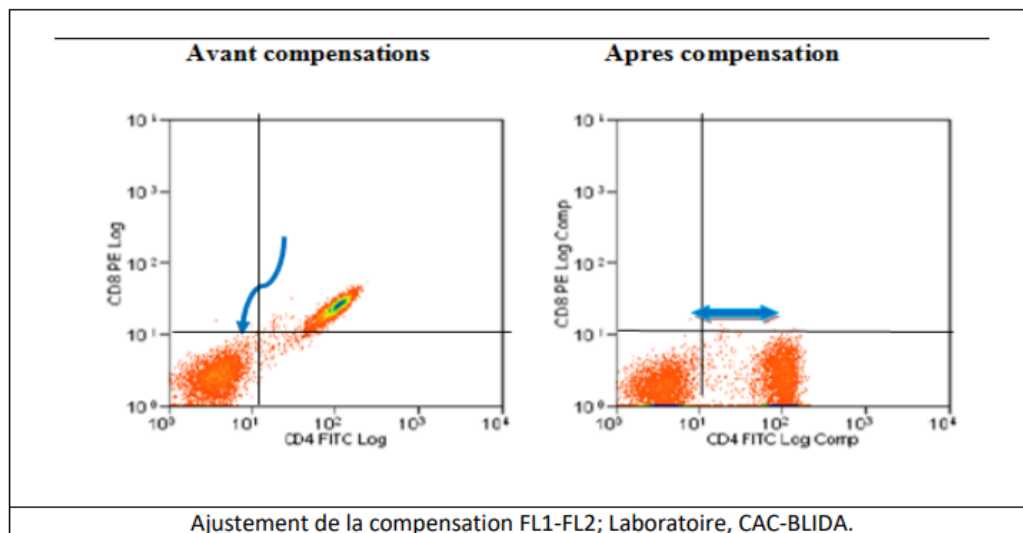
Pour les 2 fluorochromes FITC et PE, le niveau des compensations (FL2-FL1) est réglé de façon à ce que la population FITC soit alignée le long de l'axe des ordonnées avec la population des billes non marquées, puis on effectue les autres ajustements du fluorochrome FITC.

- FL1 : correspond à une population marquée par FITC.
- FL2 : correspond à une population marquée par PE.
- FL3 : correspond à une population marquée par PerCP Cy5.5.
- FL4 : correspond à une population marquée par APC.

Tube N° 2	Tube N° 3	Tube N° 4	Tube N° 5
FL2 – FL1 = %.	FL1 – FL2 = %.	FL1 – FL3 = %	FL1 – FL4 = %.
FL3 – FL1 = %.	FL3 – FL2 = %.	FL2 – FL3 = %.	FL2 – FL4 = %.
FL4 – FL1 = %.	FL4 – FL2 = %.	FL4 – FL3 = %.	FL3 – FL4 = %.

- Tube 6 : Ce tube comporte les 4 fluorochromes, il sert à s'assurer que les voltages et compensations sont bons.

La figure suivante illustre les Dot plot avant et après ajustement des compensations :



Dans le but d'évaluer l'apport de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic d'hyperlymphocytose sanguine à évolution chronique, nous avons réalisé une étude prospective, effectuée au niveau du laboratoire d'hématologie, service d'hématologie de l'EHS ELCC Centre Anti-Cancer (CAC) à l'hôpital de Frantz Fanon de Blida. Nous avons analysé 42 patients qui ont consulté pour suspicion d'un Syndrome lymphoprolifératif chronique (SLPC).

Nous avons trouvé que les SLPC touchent surtout les personnes âgées de > 40 ans avec une prédominance masculine, et selon les résultats de la CMF, 89,5% des cas présentaient un SLPC de type B parmi lesquels 67,6% des cas avaient une leucémie lymphoïde chronique (LLC).

L'immunophénotypage confirme sa place de choix dans le diagnostic des SLPC, cependant une appréciation minutieuse de la cytologie et la biologie moléculaire essentielle dans certaines situations.

Mots clés : Syndromes lymphoprolifératif chronique, Cytométrie en flux, Leucémie lymphoïde chronique.

In order to assess the contribution of flow cytometry in the diagnosis of chronic blood hyperlymphocytosis, we carried out a prospective study, carried out at the level of the hematology laboratory, hematology service of the Center Anti-Cancer (CAC) at Frantz Fanon hospital in Blida. We analyzed 42 patients who consulted for suspected Chronic Lymphoproliferative Syndrome.

We found that Chronic Lymphoproliferative Syndromes mainly affects people aged > 40 years with a predominance of men, and according to the results of flow cytometry, 89,5% of the cases presented Chronic Lymphoproliferative Syndrome Type B, of which 67,6% of cases had chronic lymphoid leukemia.

Immunophenotyping confirms its prominent place in the diagnosis of Chronic Lymphoproliferative Syndromes, yet a careful appreciation of cytology and molecular biology essential in certain situations.

Keywords: Chronic lymphoproliferative syndrome, Flow cytometry, Chronic lymphoid leukemia

من أجل تقييم دور التعداد الخلوي المتعاقب في تشخيص فرط الكريات البيضاء المزمن ، أجرينا دراسة مستقبلية على مستوى مختبر أمراض الدم في مركز مكافحة السرطان في مستشفى فرانس فانون بالبلدية. قمنا بتحليل 42 مريضاً استشاروا للاستتباب في الإصابة بأمراض التكاثر اللمفاوي المزمن. وجدنا أن أمراض التكاثر اللمفاوي المزمنة تصيب بشكل رئيسي الأشخاص الذين تزيد أعمارهم عن 40 عاماً خصيصاً الرجال ، ووفقاً لنتائج التعداد الخلوي المتعاقب ، فإن 89,5% من الحالات الإصابة بأمراض التكاثر اللمفاوي المزمن هي من النوع ب منها 67,6% حالة سرطان الدم الليمفاوي المزمن. يؤكد التعداد الخلوي المتعاقب مكانته البارزة في تشخيص أمراض التكاثر اللمفاوي المزمنة ، ولكن التقدير الدقيق لعلم الخلايا والبيولوجيا الجزيئية ضروري في بعض الحالات

الكلمات المفتاحية : أمراض التكاثر اللمفاوي المزمنة ، التعداد الخلوي المتعاقب ، سرطان الدم الليمفاوي المزمن