

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physiopathologie

Intitulé :

---

## Quantification d'ADN par cytométrie en flux pour les patients atteints d'une leucémie aigue

---

Présenté et soutenu par : BENMERZOUG Cheima

FILALI kaltoum

Jury d'évaluation :

Présidente : Pr ROUABAH Leila ( Pr-UFM Constantine-1)

Encadrants : Dr OUNIS Leyla ( MCB-U FM Constantine-1)

Dr ZOUITEN Raouf (MAHU en Hémobiologie Faculté de medecine)

Examinatrice : Dr DAHMANI DAHBIA Ines (MCB-UFM Constantine-1)

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

## **Remerciements**

*"Nous ne pouvons construire notre propre avenir sans aider les autres à construire le leur."*

*Par cette citation, je voudrais remercier toutes les personnes qui nous ont accompagnés dans la réalisation de ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements et notre profonde gratitude au Professeur Leila ROUABAH, de nous faire l'honneur de présider la soutenance de ce mémoire. Les mots ne suffiront pas et n'exprimeront pas tout ce que nous aimerons vous dire. Nous vous remercions pour votre savoir-faire que vous avez généreusement partagé avec nous, votre soutien moral, votre gentillesse et votre disponibilité pendant toutes ces longues années. Trouvez ici le témoignage de nos reconnaissances et de notre profond respect.*

*Nous remercier très sincèrement notre encadrante de mémoire ; Dr OunisLeyla. Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger notre mémoire. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements, pour le temps que vous avez consacré et surtout pour votre patience et ça tout pendant la rédaction de ce mémoire. Nous vous en sommes sincèrement reconnaissantes.*

*Nous tiens également nos remerciements et nos reconnaissances à notre encadreur Dr R .Zouitene nous vous remercions d'avoir encadré merci pour tout le temps que vous avez consacré, pour votre confiance, pour votre patience, et ça tout au long de la réalisation de ce mémoire, et pour tout ce que vous avez appris, vos judicieux conseils et pour avoir eu la patience de répondre à nos innombrables questions et surtout votre foi dans l'action, grâce à vous nous avons appris de nouvelles connaissances et techniques, pour nous vous êtes un exemple à suivre et un espoir pour l'Algérie.*

*Nos remerciements vont également à dr DahmaniInes d'avoir accepté de juger notre travail.*

*Sans oublier tout le personnel de service d'hématologie CTS à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine pour leur accueil chaleureux, compréhension et leur soutien qu'ils nous ont fait vivre durant la période de préparation de ce mémoire*

## ***Dédicaces***

*Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes qui mes chères.*

*Tout le merci est à Dieu le tout puissant et le miséricordieux qui m'a donné la force, la patience d'accomplir ce travail et durant toutes mes années d'études.*

*A titre plus personnel, je tiens à témoigner et remercier toute ma reconnaissance à ma très chère maman pour leur amour sincère, leurs conseils, leur patience ainsi que leur soutien inconditionnel tout au long de ces nombreuses années d'étude un grand merci pour toi ma maman. Je remercie aussi ma chère sœur Malak, pour leur encouragement, tu es ma fierté.*

*Je voudrais également exprimer ma reconnaissance envers mes chères amies Ouafa, Yasmine qui ont toujours été là pour moi, qui m'ont apporté leur soutien de moral et intellectuel ont été d'une grande aide.*

*Ce travail est évidemment dédié à toutes les personnes qui me sont chères qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

***Chaima***

## ***Dédicaces***

*Je remercie du fond du cœur le Bon Dieu tout puissant qui m'a honorée par ce savoir et qui m'a donné*

*.la force, le courage et la volonté pour ce modeste travail*

*Tous les mots sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout*

*Simplement que je dédie cet humble travail à : À mon exemple éternel, mon soutien moral, ma source de joie, à l'homme qui était toujours fier de moi, à L'homme qui attendait ce jour avec impatience, qui est allé au paradis et qui me garde de là, à toi mon père, maintenant je sais .que tu es fier et heureux pour moi*

*À ma source d'énergie, ma force, mon bonheur, la femme qui a toujours sacrifié pour moi, qui me supporte dans toutes les conditions, la femme que je travaille jour et nuit pour réaliser .ses rêves, ma maman, je t'aime*

*À mon fiancé Djamel, l'homme de ma vie, l'homme qui a donner des promesses et il les ai .toujours réaliser, que dieu te garde et que notre vie sera pleine de joie et de bonheur*

*À toute ma belle famille, ma belle mère Nasira, et tonton Toufik, et mes beaux frères*

*À ma famille*

*Mon grand père Mohammed Saleh que j'ai toujours aimée ,et Mostafa le deuxième que j'ai, Ma sœur Imen et ses anges Anies et Anes, Mes oncles Messouad , Rabeh , Djamel, Saleh, Mohammed , Toufik et bien sur Rachid et Chakib qui ont essayer d'être là pour moi après le décès de mon père je vous remercie énormément, Mes tantes Fatiha et Leila, Mes cousines Meriem, Warda, Aya, Zineb, Sofia, Sabrina, Khawla, Soumia ; Mes chers Cousins Riad, Hamza, Ali, Seif, Zaki, Younes, Mes petits Loulou, Bahaa Eddine, Nousseiba, Dorsaf, Rassil, Adem, Saleh, Yahia*

*À mes chères copines Lina, Chiraz, Amina, Kenza, Emy, Meriem , et je vous dit que vous êtes .les MEUILLEURES copines au mondes*

*À Mme Ounis Leila qui nous a soutenue toute cette période , À Mme Dahmani Dahbia Ines .que je remercie jamais assez pour son soutien moral pendant toute ces années*

*À Mr ALI de l'hôpital militaire qui m'a aidée et soutenue dans l'achèvement de mon travail*

*Et bien sur notre à tous les professeurs qui ont participé à ma formation tout au long de ces ,longues années universitaires et, en particulier, Professeur ROUABAH Leïla*

*À tous ceux-là, j'adresse tous mes vifs remerciements les plus chaleureux et l'expression de ! ma profonde gratitude*

*À toutes mes clientes de ma chère marque vestimentaire FKL BY LILIANE.*

***Kaltoum***

# TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicas</b>	
<b>Résumés</b>	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I : LE CYCLE CELLULAIRE</b>	
<b>Généralité</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Définition</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Chronologie des différentes phases du cycle cellulaire</b> .....	<b>6</b>
2.1. La phase G0 .....	<b>6</b>
2.2. La phase G1 .....	<b>6</b>
2.3. La phase S .....	<b>7</b>
2.4. La phase G2 .....	<b>7</b>
2.5. La phase M .....	<b>7</b>
2.5.1 La prophase .....	<b>7</b>
2.5.2 La prométaphase.....	<b>8</b>
2.5.3 La métaphase .....	<b>8</b>
2.5.4 L'anaphase.....	<b>8</b>
2.5.5 La télophase.....	<b>8</b>
<b>3. Contrôle et régulation du cycle cellulaire</b> .....	<b>8</b>
3.1. Les protéines effectrices impliquées dans le contrôle et la régulation du cycle cellulaire .....	<b>8</b>
3.2. Les cyclines et les kinases .....	<b>8</b>
3.2.1. Cyclines-dépendantes des kinases.....	<b>8</b>
<b>4. Le cycle cellulaire et apoptose</b> .....	<b>10</b>
4.1. Définition de l'apoptose .....	<b>10</b>
4.2. La mort cellulaire .....	<b>10</b>
<b>5. le cycle cellulaire et le cancer</b> .....	<b>12</b>
5.1. Division cellulaire et métastase .....	<b>12</b>
5.2. Traitement du cancer en visant la mitose .....	<b>12</b>
5.3. Dysfonctionnement de la cellule .....	<b>13</b>
5.4. Les mutations.....	<b>13</b>
5.5. Des gènes mutés reliés à l'apparition du cancer .....	<b>14</b>
<b>Chapitre II : LES LEUCEMIES AIGUES</b>	
<b>1. Généralités sur les leucémies aiguës</b> .....	<b>16</b>
1.1. Leucémies aiguës lymphoblastique (LAL) .....	<b>17</b>
1.2. Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) .....	<b>17</b>
<b>2. Diagnostic biologique</b> .....	<b>17</b>
<b>Chapitre III : LA CYTOMETRIE EN FLUX</b>	
<b>1. Définition</b> .....	<b>21</b>
<b>2. Principe de la CMF</b> .....	<b>21</b>
2.1. Système fluidique.....	<b>22</b>
2.2. Système optique .....	<b>23</b>

2.2.1 Les paramètres mesurés par la CMF.....	23
2.2.1.1 La lumière diffusée .....	23
2.2.1.2 La fluorescence .....	24
2.2.2. Sources lumineuses.....	24
2.2.3. Filtres et éléments optiques .....	24
2.2.4. Détecteurs .....	25
2.2.5. L'immunofluorescence.....	25
2.3. Système électronique .....	26
2.4 Le système informatique.....	28
<b>3. Applications de la CMF.....</b>	<b>28</b>
3.1. Immunophénotypage.....	29
3.2. Quantification de l'ADN.....	29
3.3. L'étude du cycle cellulaire.....	29
<b>4. Avantage de la CMF.....</b>	<b>30</b>

## **Chapitre VI: L'APPLICATION DE LA CYTOMETRIE EN FLUX**

<b>1. Analyse du contenu en ADN : intérêt dans l'étude du cycle cellulaire.....</b>	<b>32</b>
1.1. Le principe .....	32
1.2. Analyse monoparamétrique .....	32
1.3. Analyse multiparamétrique .....	33
1.4. Analyse des histogrammes du contenu en ADN.....	33
1.4.1. Méthode de calcul .....	33
1.4.2. Analyse informatique des histogrammes d'ADN .....	34
<b>2. Aspects critiques du contenu en ADN et analyse du cycle cellulaire.....</b>	<b>34</b>
2.1. Modélisation des débris .....	34
2.2. Modélisation de l'agrégation cellulaire ou nucléaire .....	34
<b>3. Interprétation du contenu en ADN et des histogrammes du cycle cellulaire .....</b>	<b>34</b>
3.1. Les critères d'évaluation des résultats .....	34

## **DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE**

### **Chapitre I : MATERIEL ET METHODES**

<b>1. La population étudiée .....</b>	<b>37</b>
<b>2. Les critères d'inclusions .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Matériel .....</b>	<b>38</b>
3.1. La cytométrie en flux (Attune® NxTAcousticFocusingCytometer) .....	38
3.2. Beckmancoulter LH780 .....	39
3.3. Centrifugeuses de paillasse : Thermo CR3i .....	40
<b>4. Méthodes .....</b>	<b>41</b>
4.1 Recueil et préparation des échantillons .....	41
4.1.1 Le prélèvement.....	41
4.1.2 Hémogramme (examen biologique) .....	41
4.1.3. La numération cellulaire (FNS) .....	41
4.1.4. Le frottis sanguin.....	42
4.1.5. L'étude cytologique .....	42
4.2. Marquage de surface L'immunophénotypage .....	43
4.2.1. Marquage de surface .....	43
4.2.2. Marquage en intracytoplasmique.....	43
4.3. Etude du cycle cellulaire et du contenu d'ADN par cytométrie en flux .....	44
4.3.1 Le premier Protocole : l'analyse des cellules par l'iodure de propidium .....	44

4.3.2 Le deuxième protocole : l'analyse des cellules par Vybrant™ DyeCycle™ RedStain .....	45
<b>5. L'Analyse des données</b> .....	<b>46</b>
5.1. Kaluza® (version 2.1) de la société Beckman Coulter®.....	46
5.2 Représentation des données .....	46
5.3 La représentation graphique.....	46
5.4 Stratégie de fenêtrage .....	47
5.5. Identification des blastes .....	48
5.6. L'analyse du cycle cellulaire sur Kaluza® .....	48
<b>6. Méthodes statistiques</b> .....	<b>49</b>
<b>Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>I. Résultats</b> .....	<b>51</b>
<b>1. Caractéristiques de la population étudiée</b> .....	<b>51</b>
<b>2. La répartition de la population selon le sexe</b> .....	<b>51</b>
<b>3. Répartition des patients selon la catégorie d'âge</b> .....	<b>51</b>
<b>4. La répartition selon le type du diagnostic de l'hémopathie maligne</b> .....	<b>52</b>
<b>5. La répartition selon la nature du prélèvement</b> .....	<b>52</b>
<b>6. Exemple d'analyse de la quantification d'ADN chez un témoin par PI</b> .....	<b>53</b>
<b>7. L'analyse du contenu d'ADN par cytométrie en flux avec un logiciel kaluza     chez un patient leucémique par PI</b> .....	<b>58</b>
<b>8. Caractéristiques de la quantification d'ADN</b> .....	<b>60</b>
8.1. La moyenne du CV chez les témoins par iodure de propidium .....	60
8.2. La détermination de la valeur d'index d'ADN chez les témoins par PI .....	60
8.3. La fréquence de l'aneuploïdie des blastes selon les types LA par iodure de propidium .....	61
8.4. La fréquence de l'aneuploïdie des granuleux chez les patients par iodure de propidium .....	61
8.5. La comparaison d'aneuploïdie entre les LALB et les autres types de leucémie aigüe PI .....	62
8.6. Le rapportG0/G1-G2M-et phase S par rapport aux témoins avec les types LA.	63
<b>II. Discussion</b> .....	<b>64</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>71</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>74</b>
<b>Annexes</b>	

## LISTE DES FIGURES

Titre	Page
<b>Figure. 1 :</b> la chronologie des phases du cycle cellulaire.....	6
<b>Figure. 2 :</b> Les différents complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire.....	9
<b>Figure. 3 :</b> Schéma d'un cytomètre en flux.....	21
<b>Figure. 4 :</b> la focalisation hydrodynamique.....	22
<b>Figure. 5 :</b> Dot plot de la FSC par apport à la SSC.....	24
<b>Figure. 6 :</b> Exemple de chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes.....	26
<b>Figure. 7 :</b> Présentation de l'échantillon : impulsion de tension.....	27
<b>Figure. 8 :</b> Mesure d'impulsion.....	27
<b>Figure. 9 :</b> Présentation des résultats de CMF.....	28
<b>Figure. 10:</b> Cytomètre (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer) .....	38
<b>Figure. 11 :</b> Système acoustique fluidique de l'Attune NxT.....	39
<b>Figure. 12 :</b> Analyseurs d'hématologie Beckmancoulter DxH500.....	39
<b>Figure. 13:</b> Centrifugeuse Thermo CR3i.....	40
<b>Figure. 14 :</b> Répartition des cas selon le sexe.....	51
<b>Figure. 15 :</b> La répartition des patients selon la catégorie.....	51
<b>Figure. 16 :</b> Répartition des patients selon diagnostic.....	52
<b>Figure. 17 :</b> Répartition des patients selon la nature de prélèvement.....	52
<b>Figure. 18 :</b> Fenêtrage d'élimination des doublets avant l'analyse du cycle cellulaire...	53
<b>Figure. 19 :</b> Fenêtrage des différentes populations les blastes, les lymphocytes et les granuleux.....	54
<b>Figure. 20 :</b> Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un témoin des blastes ; des lymphocytes et des granuleux avec duplication.....	54
<b>Figure. 21 :</b> Profil d'une moelle témoin présentant un histogramme d'ADN diploïde ..	56
<b>Figure. 22 :</b> Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un témoin des blastes, des lymphocytes et des granuleux.....	57
<b>Figure. 23 :</b> Profil d'une moelle témoin présentant un histogramme d'ADN diploïde par Vybrant. On remarque que le pic G1/G0 des blastes (en vert) et le pic G1/G0 des lymphocytes normaux sont superposables.....	57



<b>Figure. 24 :</b> Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un malade LALB des blastes ; lymphocytes et des granuleux avec duplication.....	<b>58</b>
<b>Figure. 25 :</b> Profil d'une moelle d'un malade LALB présentant un histogramme d'ADN en état hyperdiploïdie des blastes. On remarque que le pic des blastes en rouge est décalé vers la droite par rapport au pic des lymphocytes en vert dans le cas d'hyperdiploïdie.....	<b>58</b>
<b>Figure. 26 :</b> Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un malade présentant LALB des blastes ; des lymphocytes et des granuleux avec duplication.....	<b>59</b>
<b>Figure. 27 :</b> Profil d'une moelle d'un malade LALB présentant un histogramme d'ADN en état hyperdiploïdie des blastes. On remarque que le pic des blastes en rouge est superposable au pic des lymphocytes en vert dans le cas de diploïdie.....	<b>59</b>
<b>Figure. 28 :</b> Pourcentage de la diploïdie des blastes.....	<b>61</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Titre	Page
<b>Tableau. 1 :</b> La moyenne du CV chez les témoins dans les différentes populations.....	<b>60</b>
<b>Tableau. 2 :</b> La moyenne de l'index d'ADN chez les témoins.....	<b>60</b>
<b>Tableau. 3 :</b> La diploïdie des blastes selon les types LA.....	<b>61</b>
<b>Tableau. 4 :</b> La répartition d'aneuploïdie entre les LALB et tous les types.....	<b>62</b>
<b>Tableau. 5 :</b> Le risque d'hyperdiploïdie dans les LALB.....	<b>62</b>
<b>Tableau. 6 :</b> La moyenne des différentes phases du cycle cellulaire chez les témoins.....	<b>63</b>
<b>Tableau. 7 :</b> La moyenne des différentes phases du cycle cellulaires dans tous les types LA.....	<b>63</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- ACM** : analyses des correspondances multiples.
- APC**: anaphase promoting complex.
- APC-CY7** : Apc-Cyanine7
- ARN** : Acide ribonucléique.
- Cdk** : cyclin-dependent kinase / kinases dépendante des cyclines.
- Cdkl**: cyclin-dependent kinase-like.
- CKI** : Cycline-dependent Kinases-Inhibiteurs.
- CMF** : cytométrie en flux.
- CV** : coefficient de variation
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
- FAB**: French – American – British.
- FITC** : Fluorescéine isothiocyanate.
- FSC**: forwardscatter.
- GB** : globule rouge.
- GR** : globule blanc.
- HLA-DR** : Humain Leukocyte Antigène Dr
- HYL** : Hight Yield Lyse
- ID** : index d'ADN.
- INK4**: Inhibitor-Kinase 4.
- Kip**: kinase inhibiting protein.
- LA** : leucémie aigue
- LAL** : Leucémie aigüe lymphoblastique.
- LAM** : Leucémie aigüe myéloïde.
- LB**: lymphocytes B.

**LT:** lymphocytes T.

**M.O :** microscope optique

**MFI :** Mean Fluorescent Intensities

**MO :** Moelle Osseuse

**NFS :** Numération De La Formule Sanguine

**p21Waf1/Cip1:** cyclin-dependent kinase inhibitor 1 or CDK-interactingprotein 1.

**PBS :** Phosphate Buffered Saline

**PD:** photodiodes.

**PE :** Phycoérythrine.

**PMT :** Photomultiplicateurs.

**Re:** Reynolds Number.

**SSC:** sidewardscatter.

**VIH :** Virus de l'Immunodéficience Humaine.

**Résumé :****Contexte et objectifs :**

Les leucémies aigües sont des hémopathies malignes qui nécessitent un diagnostic et une prise en charge rapide. Avec la CMF, le diagnostic et le suivi de ces maladies est de plus en plus facile, rapide et complet.

Notre objectif basé sur la mise au point de la technique dans l'analyse de la quantification d'ADN et du cycle cellulaire chez les personnes en suspicion d'une leucémie aigüe en déterminant l'index d'ADN des blastes et la valeur pronostiques de l'état d'aneuploïdie dans LA.

**Matériel et méthodes :**

Notre étude prospective inclus 53 échantillons 39 provenant d'une ponction de la moelle osseuse et du sang périphérique (39 présentant une leucémie aigüe 15 étaient témoins) nouvellement diagnostiqués par la technique de cytométrie en flux au niveau du service d'hématologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine.

**Résultats :**

Dans cette étude de recherche d'anomalie dans le contenu d'ADN nous avons indiqué les valeurs MFI et à partir duquel on a trouvé l'état d'aneuploïdie ; pour identifier l'état de nos malades, cela se fait par la technique de cytométrie en flux avant d'indiquer le type de la leucémie aigüe à l'aide des anticorps monoclonaux pour l'identification de notre population blastique. Sur cette population blastique nous avons réalisé l'analyse du contenu d'ADN par un double marquage : anticorps avec le PI. En prenant en considération la valeur de nos témoins d'index d'ADN était [0.9-1.28] pour la comparaison avec nos malades et nous avons trouvé que l'aneuploïdie existe chez les leucémies aigües lymphoblastiques de type B avec un pourcentage de 36,6% est la plus fréquentes avec un index supérieur à 1.28 et donc cela explique l'hyperdiploïdie.

**Conclusion :**

Nous avons noté une nette prédominance significative de l'hyperdiploïdie dans les LAL-B par rapport aux autres types d'hémopathies malignes.

**Mots clés :**

Quantification d'ADN ; leucémie aigüe ; immunophénotypgae ; quantification d'ADN.

**Abstract :****Background and Objectives :**

Acute leukemias are hematologic malignancies that require rapid diagnosis and management. With CMF, the diagnosis and follow-up of these diseases is becoming easier, faster and more complete.

Our objective based on the development of the technique in the analysis of DNA quantification and cell cycle in suspected acute leukemia by determining the DNA index of blasts and the prognostic value of the aneuploidy status in LA.

**Material and Methods :**

Our prospective study included 53 samples 39 from bone marrow and peripheral blood puncture (39 with acute leukemia 15 were controls) newly diagnosed by flow cytometry technique at the hematology department of the regional military university hospital of Constantine.

**Results :**

In this study of search for abnormality in the DNA content we indicated the MFI values and from which we found the aneuploidy state ; to identify the state of our patients, this is done by the flow cytometry technique before indicating the type of acute leukemia using monoclonal antibodies for the identification of our blast population. On this blastic population we performed the analysis of the DNA content by a double labeling : antibody with PI. Taking into consideration the value of our DNA index controls was [0.9-1.28] for comparison with our patients and we found that aneuploidy exists in acute lymphoblastic leukemia type B with a percentage of 36.6% is the most frequent with an index greater than 1.28 and therefore this explains the hyperdiploidy.

**Conclusion :**

We noted a clear significant predominance of hyperdiploidy in B-ALL compared to other types of hematological malignancies.

**Key words :**

DNA quantification ; acute leukemia ; immunophenotypgae ; DNA quantification.

## الملخص:

### الخلفية والأهداف:

سرطان الدم الحاد هو الخرف الدموي التي تتطلب التشخيص السريع والإدارة. وقد أصبح تشخيص هذه الأمراض ورصدها أسهل وأسرع وأكمل.

ويستند هدفنا إلى تطوير التقنية في تحليل كمية الحمض النووي ودورة الخلايا في الأشخاص المشتبه في إصابتهم بسرطان الدم الحاد عن طريق تحديد مؤشر الحمض النووي للانفجارات والقيمة الإثباتية للحالة الاستفزازية في لوس أنجلوس.

### المواد والأساليب:

وشملت دراستنا المرتقية 53 عينة 39 من نخاع عظمي وثقب دموي طرفي (تم تشخيص 39 مصاب بسرطان الدم الحاد (15) حديثاً بواسطة تقنية قياس التدفق الخلوي في قسم طب الدم في مستشفى جامعة قسنطينة العسكرية الإقليمية).

### النتائج:

MFI إلى قيم (DNA) ولقد أشرنا في هذا البحث عن الشذوذ في محتوى الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين والتي وجدنا منها حالة الاستنزاف؛ ولتحديد حالة مرضانا، يتم ذلك بواسطة تقنية قياس التدفق الخلوي قبل الإشارة إلى نوع اللوكيميا الحادة باستخدام الأجسام المضادة أحادية اللون لتحديد هوية سكاننا الكنييين. وفي هذا العدد من السكان المطاطي قمنا بتحليل محتوى الحمض النووي بواسطة علامة مزدوجة: الأجسام المضادة التي تحتوي على برمجية. وإذا أخذنا بعين الاعتبار قيمة مؤشر الحمض النووي لدينا كانت [0.9-1.28] على سبيل المقارنة مع مرضانا ووجدنا أن مرض الاستنزاف يوجد في سرطان الدم الليمفاوي الحاد من النوع باء بنسبة 36.6% هو الأكثر شيوعاً مع مؤشر أكبر من 1.28 وبالتالي فإن هذا يفسر فرط الاستنزاف.

### الاستنتاج:

وقد لاحظنا وجود هيمنة كبيرة واضحة على الاستنزاف في جميع الحالات مقارنة بأنواع أخرى من أمراض الدم الخبيثة.

### الكلمات الرئيسية:

وتحديد كمية الحمض النووي؛ وسرطان الدم الحاد؛ والنمط المناعي؛ تقدير كمية الحمض النووي

# **Introduction Générale**



### Introduction

Les globules blancs sont issus de la différenciation (ou maturation) progressives des cellules souches de la moelle osseuse. La différenciation se déroule parfois de façon anormale et des parties de chromosomes font l'objet de réarrangement.

Toutefois, tout évènement du cycle cellulaire doit être opéré sous contrôle et toute erreur d'exécution sera compensée. La précision avec laquelle les phases du cycle cellulaires sont exécutées assure la survie les organismes vivants. Il en résulte que toute perte de précision augmente l'instabilité génétique qui est notamment un des principaux facteurs en faveur de la formation des cancers (Elledge, 1996).

Les chromosomes qui présentent ces anomalies perturbent la division cellulaire normale, de sorte que les cellules touchées se multiplient de manière incontrôlée ou deviennent résistantes à la mort cellulaire normale, ce qui est à l'origine de la leucémie. Les cellules leucémiques vont envahir la moelle osseuse et remplacent ou suppriment le développement cellulaire normal.

La cause de la plupart des leucémies est inconnue, le risque d'apparition de certains nombres de leucémies peut augmenter à l'exposition à des radiations, à certains produits chimiques, chimiothérapies, tel que certaine maladie comme le syndrome de DOWN et l'anémie de FANCONI augmente le risque d'apparition des leucémies.

Il existe 2 types des leucémies aigue myéloïdes (LAM) et lymphoblastique (LAL). Le traitement de ces leucémies est en général une chimiothérapie, une immunothérapie, ou une thérapie ciblée, et parfois une radiothérapie ou une intervention chirurgicale.

La détection des leucémies se fait par le myélogramme qui est l'examen clé permettant la pose d'un diagnostic de leucémie aigüe, il consiste à analyser les cellules de la moelle osseuse au microscope optique, le prélèvement de moelle osseuse est effectué par une ponction dans le sternum ou dans l'os du bassin sous anesthésie locale.

Le diagnostic est confirmé si l'analyse montre que la moelle contient plus de 20 % de cellules immatures. L'analyse morphologique des cellules permet alors de définir la sous-catégorie de leucémie aiguë.

Un examen nommé « Immunophénotypage des cellules » est alors indispensable : il caractérise précisément le profil des lymphocytes grâce à des réactifs biologiques. Associées à l'examen clinique du patient, ces données biologiques permettent de déterminer le stade d'avancée de la maladie et donc le traitement le plus approprié :

Pour une LAL : l'augmentation des lymphocytes est la seule anomalie identifiée au stade A, un patient est au stade B lorsqu'il présente une augmentation du volume de la rate ou des ganglions dans trois régions différentes du corps (ganglions cervicaux, axillaires, inguinaux...).

Un patient est au stade B lorsqu'il présente une augmentation du volume de la rate ou des ganglions dans trois régions différentes du corps (ganglions cervicaux, axillaires, inguinaux...). Pour une leucémie myéloïde chronique : la phase chronique qui peut rester stable durant plusieurs années et qui reste asymptomatique. Moins de 6 % des cellules du sang ou de la moelle osseuse sont alors anormales.

Durant la phase accélérée, on compte 6 à 30 % de cellules anormales. Elles commencent à perturber la différenciation des autres cellules du sang. La phase dite « blastique » de la maladie est atteinte lorsqu'il y a plus de 30 % de cellules anormales dans le sang. Ce stade, qui évolue rapidement, met en jeu la vie du patient (Pr Didier Blaise).

La technique de l'immunophénotypage réalise à l'aide d'un cytomètre en flux une étude multiparamétrique de chaque cellule assurée par ses trois systèmes « fluide, optique et électronique ». Les cellules sont mises en suspension dans un fluide et passent dans une gaine. Le liquide progresse et chaque cellule est excitée par le faisceau d'un laser. La cellule émet alors des signaux lumineux qui sont analysés.

Les cellules vont passer séparément par un point d'interrogation où le cytomètre collecte des différentes informations liées aux caractéristiques intrinsèques et extrinsèques des événements qui seront traduits grâce à un système informatique en résultats facilement interprétables.

La lumière émise donne des informations sur la morphologie de la cellule et la présence de marqueurs fluorescents. Pour cela, il faut aussi utiliser des fluorochromes associés à des anticorps qui reconnaissent des antigènes particuliers sur la cellule (Blanchet P, 1992).

L'immunophénotypage est devenu un examen indispensable au diagnostic des leucémies aiguës lymphoïdes comme myéloïdes. L'introduction du marqueur du CD45 permet une meilleure individualisation des populations cellulaires et une précision accrue du fenêtrage des blastes (Jouault H, 2002). Notre étude a été réalisée dans le but de :

- La mise au point de la technique de quantification d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) et de l'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux, sur des cellules hématopoïétiques en prolifération maligne (blastes).
- Une étude comparative du cycle cellulaire entre les cellules blastiques normales et malignes.

- L'évaluation du cycle cellulaire dans les différentes classes phénotypiques des leucémies aigues.
- La détermination de l'index d'ADN des blastes et la valeur pronostiques de l'état d'aneuploïdie dans la leucémie aigüe.

**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I**

# **LE CYCLE CELLULAIRE**

## Généralité :

Quand une cellule apparaît, il doit y avoir une cellule antérieure, tout comme les animaux ne peuvent provenir que d'animaux et les plantes de plantes ».

Cette doctrine cellulaire proposée par certains anatomopathologistes constitue à la base un profond message en faveur de la continuité de la vie (Bruce Albert et al., 1999). En effet, la cellule se reproduit selon une séquence ordonnée d'évènements pendant lesquels elle duplique son contenu puis se divise en deux cellules filles. Ainsi elle copie et transmet l'information génétique en répliquant l'ADN durant la phase de synthèse et en séparant les chromosomes répliqués durant la mitose (Chen et al., 2000). Ce cycle de duplication et de division est appelé : cycle cellulaire (Hunt et al., 1997). Il constitue le processus universel par lequel les cellules se reproduisent et met l'accent sur la croissance et le développement de tous les organismes vivants. Durant la formation des gamètes le cycle cellulaire mitotique est modifié en cycle méiotique où il y a réduction du nombre de chromosomes pour la reproduction génétique. Ceci constitue une force majeure de l'évolution (Honigberg et al., 1993).

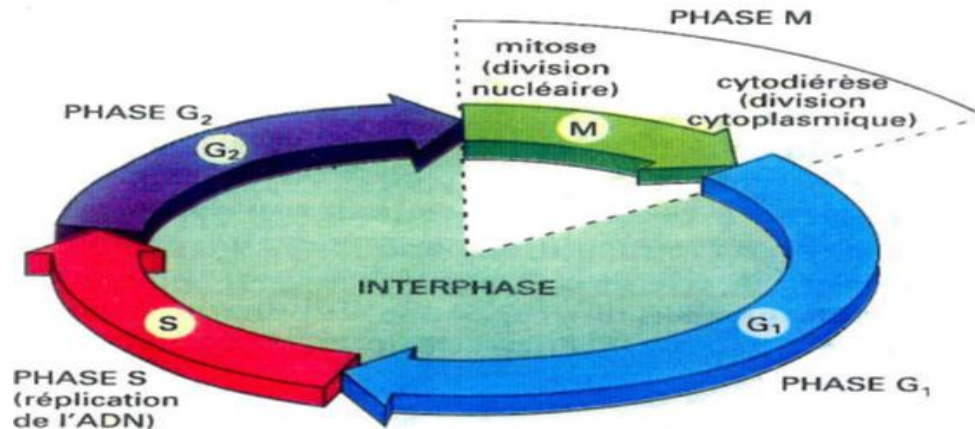
Le cycle cellulaire joue donc un rôle central dans le développement et l'assurance de la continuité de la vie au fil des générations.

### 1. Définition :

Le cycle cellulaire constitue l'ensemble des événements qui séparent la naissance d'une cellule de celle des deux cellules filles qui en sont issues. Il intègre un cycle de croissance continu (augmentation de la masse cellulaire) et un cycle de division ou cycle chromosomique discontinu (réplication de l'ADN et répartition du génome dans les deux cellules filles).

L'entrée dans le cycle de division représente donc l'exécution du programme de prolifération cellulaire, en réponse aux messages apportés par des facteurs de croissance. La transduction de ces messages aboutit en effet, entre autres, à la transcription de gènes nécessaires à l'initiation du cycle cellulaire, la cycline D1 par exemple. Le contrôle du cycle cellulaire est d'une importance capitale dans l'oncogenèse, qui s'accompagne d'une perturbation de la régulation normale du cycle.

## 2. Chronologie des différentes phases du cycle cellulaire :



**Figure. 1** : la chronologie des phases du cycle cellulaire (Bruce Alberts, 1999)

Le cycle cellulaire se compose de cinq phases distinctes : trois phases d'intervalle. G<sub>0</sub>, dans laquelle les cellules restent dans un état de quiescence ou de repos. G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>, au cours desquelles se produisent la synthèse d'ARN (Acide ribonucléique) et la synthèse de protéines. La phase S, pendant laquelle l'ADN est répliqué.

La phase M, dans laquelle les cellules subissent la mitose et la cytokinèse, Les phases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub> sont désignés collectivement comme l'interphase.

### 2.1.La phase G<sub>0</sub> :

Cette phase représente l'état de quiescence cellulaire où les cellules quittent le cycle jusqu'à ce que l'environnement devienne favorable à une nouvelle entrée dans le cycle. Elle représente les cellules à activité métabolique minimale et dont les teneurs en ARN et en protéines sont très faibles (Jeroen et al ; 1999).

### 2.2.La phase G<sub>1</sub> :

La phase G<sub>1</sub> (pour GAP1 ou Jonction 1) est définie comme le premier cap atteint par la cellule après la division cellulaire. La phase G<sub>1</sub> est une phase pendant laquelle la cellule décide de sortir du cycle, d'attendre, de se différencier ou de proliférer. Deux déterminants jouent un rôle crucial lors de cette phase : la croissance cellulaire et les facteurs environnementaux et physiologiques (agents mitogènes, disponibilité des nutriments, hormones, augmentation de la taille cellulaire).

- **La transition G1-S :**

Le Point de restriction pendant lequel la cellule passe de G1 précoce à une phase G1 tardive est désigné par Arthur Pardée : point de restriction (Planas-Silva et al., 1997). Lorsque les cellules sont stimulées par les facteurs de croissance pour s'engager dans le cycle cellulaire et sortir de l'état quiescent, elles génèrent généralement des stimulations mitogéniques continues pour atteindre le point de restriction et entamer la phase S en l'absence des mitogènes et des facteurs de croissance (Reed., 1997). Le point de restriction est hautement régulé et constitue une importante transition du cycle cellulaire. Les régulateurs de la phase G1 sont, en effet, les moteurs les plus importants de l'accélération ou de l'arrêt du cycle cellulaire.

**2.3.La phase S :**

La phase S correspond à la phase de synthèse de l'ADN (réplication des chromosomes à l'identique). Le brin néo-synthétisé étant exactement complémentaire à la matrice. Sa durée, peu variable, dépend principalement de la quantité d'ADN à répliquer et du nombre de sites de réplication actif. Ainsi, elle se trouve particulièrement allongée chez les cellules polyploïdes (ayant un bagage chromosomique en excès). La synthèse de l'ADN est coordonnée avec celle des histones.

Les ARNm des histones sont générés au cours de la phase S puis détruits immédiatement après la réplication. Cette phase se caractérise par la fin de synthèse des autres ARNm.

**2.4.La phase G2 :**

C'est la phase de préparation des cellules à la mitose et la division cellulaire. Elle est caractérisée par une augmentation de la teneur en protéines et l'initiation des modifications dans la conformation chromatinienne précédant la mitose (Thomas., 1998).

**2.5.La phase M :**

Au cours de la phase M (ou mitose) et de la cytokinèse qui s'ensuit, les chromosomes et le cytoplasme se divisent pour former deux cellules filles. La ségrégation des chromosomes est contrôlée par le point de contrôle de la métaphase, qui retarde le début de la séparation des chromatides sœurs jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement alignés sur le fuseau mitotique. La mitose se compose de cinq phases distinctes : (Gerard Tortora., 1993).

**2.5.1 La prophase :** Début de condensation des chromosomes et formation du fuseau mitotique.



**2.5.2 La prométaphase :** la résorption de l'enveloppe nucléaire et fixation aléatoire des chromosomes aux microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique.

**2.5.3 La métaphase :** L'alignement des chromosomes à mi-distance entre les deux pôles.

**2.5.4 L'anaphase :** Phase de séparation des deux chromatides sœurs et migration en direction des deux pôles du fuseau.

**2.5.5 La télophase :** La reformation de l'enveloppe nucléaire autour de la chromatine. Au cours de cette phase, un anneau contractile d'actine et de myosine s'assemble dans le cortex, à mi-distance entre les deux pôles, et resserre la zone équatoriale. Ce processus, appelé cytokinèse, sépare les deux cellules filles l'une de l'autre.

### **3. Contrôle et régulation du cycle cellulaire :**

Le processus de reproduction et de division d'une cellule peut être décrit comme une série d'événements coordonnés qui composent le cycle de division d'une cellule. La progression et la coordination du cycle cellulaire sont soumises à un sérieux système de contrôle. Au moins deux types de mécanismes de contrôle du cycle cellulaire sont reconnus : une cascade de phosphorylations de protéines qui retransmet une cellule d'une étape à la suivante et un jeu de points de contrôle qui surveillent l'achèvement d'événements critiques et la progression du cycle (Nasmyth, 1996).

#### **3.1. Les protéines effectrices impliquées dans le contrôle et la régulation du cycle cellulaire**

**3.2. Les cyclines et les kinases :** par exemple pendant l'interphase, la cycline B1 est principalement dans le cytoplasme. En revanche, au moment de la transition G2/M, la phosphorylation de la cycline B1 bloque sa sortie du noyau, ce qui concentre les complexes Cdk1-cycline (cyclin-dependent kinase-like) B1 au niveau nucléaire et leur permet d'activer leurs substrats (Nigg, 2001).

**3.2.1. Cyclines-dépendantes des kinases :** Ce sont des petites protéines qui forment une nouvelle classe de kinase. En effet, ces kinases ne sont actives qu'associées à des cyclines (Morgan, 1997).



**Figure. 2** : Les différents complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire

(Morgan, 1997)

- **La régulation des CDKS** : La régulation des Cdk (kinases dépendantes des cyclines) comporte de multiples facettes, notamment la liaison des cofacteurs cyclines, l'inhibition et l'activation par phosphorylation, la liaison de molécules inhibitrices et la distribution cellulaire des cyclines (Morgan., 1997).
- **Les activateurs des CDKS** : L'activation des Cdk peut également être obtenue par déphosphorylation de leur résidu tyrosine 15 ou thréonine 14 par les phosphatases de la famille Cdc25 (Nelsson., 2000). La distribution cellulaire des cyclines est également un élément régulateur de l'activité des complexes Cdk-cycline.
- **Les inhibiteurs des CDKS (CKI)** : l'activité des complexes Cdk-cycline est contrôlée par les CKI (Cycline-dependent Kinases-Inhibiteurs), appartenant aux familles INK4 (Inhibitor-Kinase 4) et Cip/kip (Cip : Cdk inhibiting protein, kip : kinase inhibiting protein) (Borgne., 1999) (Sherr, 1999).
- **Rôle de la protéolyse dans le contrôle du cycle cellulaire** : La protéolyse constitue un mécanisme majeur qui régule l'activité des CDKs en dégradant leurs activateurs et leurs inhibiteurs et contribue directement aux différentes transitions du cycle cellulaire. Elle est médiée durant le cycle cellulaire par deux voies distinctes de conjugaison à l'ubiquitine : la première voie initie la réplication de l'ADN (Progression G1-S). La deuxième

voie initie la ségrégation chromosomique et la sortie de la mitose en dégradant les inhibiteurs de l'anaphase et les cyclines mitotiques.

#### **4. Le cycle cellulaire et apoptose :**

##### **4.1. Définition de l'apoptose :**

L'apoptose est un mécanisme intracellulaire, aussi important que la mitose génétiquement déterminée, de destruction de la cellule, sans réaction inflammatoire, appelé aussi mort cellulaire programmée, qui est caractérisée par une réorganisation nucléaire (densification de la chromatine), des altérations de la membrane plasmique et une ultime fragmentation de la cellule en corps apoptotique.

L'apoptose est un mécanisme régulateur essentiel, qui intervient dans l'homéostasie tissulaire. Il permet l'élimination des cellules superflues ou indésirables (Maillet, 2000).

##### **4.2. La mort cellulaire :**

Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. L'apoptose joue un rôle déterminant au cours de processus physiologiques aussi différents que le développement, le fonctionnement de l'homéostasie du système immunitaire, le contrôle des tissus hormono-dépendants ou du renouvellement cellulaire (Ellis et al., 1991).

L'apoptose et la progression du cycle cellulaire sont deux processus étroitement reliés grâce à un contrôle rigoureux. L'ADN endommagé ou non répliqué et la mal formation du fuseau mitotique peuvent induire la cellule en apoptose prévenant la production de cellules génétiquement anormales.

Un mécanisme moléculaire impliquant notamment des molécules régulatrices qui interfacent entre les deux processus biologiques a largement été étudié (Kenichi et al., 2000).

Parmi les protéines participant à la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire, se trouve la protéine de suppression des tumeurs p53. P53 active la transcription du gène inhibiteur du cycle cellulaire p21Waf1/Cip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1 or CDK-interactingprotein 1) qui, à son tour active les gènes de la pro-apoptose à savoir, bax, caspase et fas, et permet aux cellules de quitter le cycle cellulaire et d'accéder à l'apoptose.

Une autre catégorie de molécules qui participe à la régulation des deux processus sont les protéines de la famille E2F facteurs de transcription sont composés de E2F 1 – E2F 5. En plus de son important rôle dans la régulation du cycle cellulaire, E2F 1 (l'une des protéines de la famille E2F) fonctionne comme régulateur de l'apoptose. C'est la surexpression d'E2F 1 qui déclenche l'apoptose.

Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose. Ce programme met en œuvre l'interruption planifiée des processus biologiques et la destruction des microstructures de manière à faciliter l'élimination de celles-ci.

## 5. Le cycle cellulaire et le cancer :

### 5.1.Division cellulaire et métastase :

Une fois les cellules dans un tissu commencent à proliférer sans encombre par des procédés tels que l'apoptose, la tumeur qu'il produit est souvent au commencement bénin. Tandis que la division cellulaire non réprimée mène à la formation d'une tumeur dans un tissu, au début, la tumeur est souvent contenue par les limites du tissu.

Avec le temps, et les cellules dans la tumeur continuent à se diviser et sécréter souvent des protéases puis décomposent la matrice extracellulaire à la limite du tissu. En ce point, le cancer peut se briser librement des confins du tissu originel et infiltrer le tissu environnant. C'est quand la tumeur devient maligne.

Après ceci, le cancer peut métastaser pendant qu'il entre dans la circulation sanguine ou le système lymphatique du fuselage, lui permettant de traverser et développer des tumeurs secondaires dans l'emplacement neuf à partir d'où la tumeur s'est développée la première fois. La tumeur continue à reproduire par le procédé de la division cellulaire, produisant plus de tumeurs dans tout le fuselage. La métastase est considérée l'un des stades de cancer terminaux, une fois que diagnostiquée, une personne avec le cancer métastatique fait face à des taux de survie et à des espérances de vie faibles (Robert J, 2013).

### 5.2.Traitement du cancer en visant la mitose :

Vu que la division cellulaire est au cœur de l'amorçage et du développement de cancer, les scientifiques ont développé des stratégies aux cellules cibles que l'étalage a augmenté l'activité mitotique tout en endommageant minimal le tissu environnant.

Depuis de nombreuses années, les médicaments anti-prolifératifs ont été la classe de médicaments principale employée pour traiter le cancer. Ces médicaments visent le cycle prolifératif des cellules tumorales aux marques variées du cycle cellulaire. Les types de médicaments anti-prolifératifs comprennent les agents ADN-dommageables, les inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes, et les médicaments antimitotiques (Dominguez Brauer C, 2015).

Cette dernière classe de médicaments vise et touche à la mitose, évitant l'étape progressive des tumeurs en étouffant la division de mitotique qui leur permet de proliférer. Supplémentaire, des

médicaments ont été développés pour traiter le cancer en empêchant les signes d'accroissement du type de cellule influencé par la tumeur.

### **5.3. Dysfonctionnement de la cellule :**

Des points de contrôle sont programmés entre chaque phase du cycle cellulaire, afin de vérifier que le processus en cours se déroule de façon normale.

C'est l'occasion pour la cellule d'identifier la survenue d'éventuelles anomalies dans son cycle cellulaire et de déclencher soit une action de correction de ces erreurs, soit son autodestruction (apoptose).

Si ces erreurs ne sont pas réparées, elles s'accumulent. C'est cette accumulation au fil des divisions qui est à l'origine du cancer. On considère qu'il faut environ une dizaine de mutations pour que le phénomène de cancérisation apparaisse.

Les anomalies qui se produisent sont des mutations génétiques, engendrées par des erreurs lors de la réplication (ou reproduction) de l'ADN, et donc des gènes, lorsque la cellule se divise.

Dans la majorité des cas, ces mutations surviennent sur l'ADN d'une cellule somatique d'un tissu particulier, par exemple sur l'ADN d'une cellule du colon.

Les cellules somatiques désignent l'ensemble des cellules de l'organisme qui ne sont pas impliquées dans la reproduction et la fécondation, autrement dit toutes les cellules de l'organisme sauf les ovules et les spermatozoïdes.

Pour cette raison, la mutation ne sera pas transmise à la descendance. On parle de forme sporadique lorsque ce sont ces mutations, dites somatiques, qui sont impliquées dans un cancer.

### **5.4. Les mutations :**

Ces mutations sont dues soit au hasard, soit à l'exposition à un facteur de risque. On dit qu'elles sont acquises.

L'erreur qui se produit au niveau de l'ADN peut prendre différentes formes et conduire à différents types de mutations.

Il peut s'agir de mutations ponctuelles qui entraînent des variations très légères sur l'ADN et génèrent des polymorphismes, sans conséquence dans la plupart des cas. On dit que la mutation est silencieuse. Cependant, il est à noter que des recherches sont en cours pour élucider le rôle de certains polymorphismes dans la survenue, par exemple, des cancers bronchiques.

Il peut s'agir de mutations ponctuelles plus complexes entraînant des effets plus graves.

Il peut s'agir, enfin, d'anomalies plus importantes impliquant des gènes entiers comme des délétions (pertes) ou des translocations (échanges) de chromosome ou de parties de chromosome. Par exemple, une partie d'un chromosome peut se détacher pour aller se déposer sur un autre. C'est ce type de phénomène que l'on retrouve dans les leucémies myéloïdes chroniques où se produit une translocation entre les chromosomes 9 et 22. (Preston-Martin, S., Pike, M., Ross, R., et Henderson, B., 1993).

### **5.5. Des gènes mutés reliés à l'apparition du cancer :**

On a identifié trois catégories de gènes qui, une fois altérés par des mutations, peuvent participer à l'apparition du processus de cancérisation.

Il s'agit : des « proto-oncogènes » ; ils ont pour rôle de favoriser la prolifération normale des cellules. Une mutation sur ces gènes - qui deviennent alors des « oncogènes » (Janssen, A., et Medema, R., 2011)

Peut avoir pour conséquence une activation de leur fonctionnement, ce qui entraîne une stimulation anormale de la prolifération cellulaire ;

Gènes « suppresseurs de tumeur » ; ils ont, au contraire, pour rôle de freiner la prolifération normale des cellules. Une mutation sur ces gènes peut entraîner une inactivation ou une diminution de leur fonctionnement, ce qui aboutit aussi à une stimulation anormale de la prolifération cellulaire.

Des gènes qui permettent à la cellule de réparer son ADN lorsqu'il est endommagé : la déficience de ces gènes joue un rôle-clé dans l'apparition des cancers.

**Chapitre II**

**LES LEUCEMIES  
AIGUES**



## 1. Généralités sur les leucémies aigues :

Les leucémies aigues sont des hémopathies du sang qui touchent les cellules de la moelle osseuse, où la production de différentes cellules GB (globules blancs), GR (globules rouges), plaquettes).

Les leucémies aigues sont un ensemble d'hémopathies aigues caractérisées par :

- L'expansion clonale dans la moelle osseuse de précurseurs des cellules sanguines bloquées à un stade précoce de leur différenciation, on parle des blastes.
- Le blocage de maturation des lignées médullaires normales.
- Les cellules leucémiques envahissent la moelle osseuse, ensuite le sang, les ganglions, les reins et le système nerveux central
- L'aigu de la leucémie est défini par le potentiel évolutif rapide de la maladie

On distingue deux grands types de leucémies aigues :

- Leucémie aigüe lymphoblastique (LAL).
- Leucémie aigüe myéloïde (LAM).

Néanmoins, certains facteurs ont été incriminés :

- Des facteurs génétiques supportés par l'association entre anomalies chromosomiques constitutionnelles (Trisomie 21) et LAL de l'enfant et par l'existence de cas familiaux de leucémie.
- Des facteurs immunologiques (syndrome de Wiskott-Aldrich).
- Des facteurs toxiques chimiques (Benzène, solvant organique...)
- L'effet des radiations (étude sur les survivants des explosions atomiques)
- Des facteurs viraux bien qu'il n'y ait pas de preuve du rôle des infections virales dans la pathogénie des LAL de l'enfant.

Les conséquences sont la survenue d'une anémie (diminution des GR et de l'hémoglobine) qui entraîne :

- Fatigue.
- Pâleur.
- Essoufflement.
- Palpitations.

En raison de la baisse d'autres globules blancs appelés polynucléaires neutrophiles (neutropénie), l'organisme est plus sensible aux infections.

### 1.1. Leucémies aiguës lymphoblastique (LAL) :

La leucémie aiguë la plus fréquente chez l'enfant, elle survient surtout entre 2 et 15 ans, rare chez l'adulte. Les phénomènes intervenant dans le développement des LAL sont mal connus. La transformation maligne d'un progéniteur lymphoïde produit une descendance de cellules lymphoïdes bloquées à un stade précoce de la différenciation cellulaire et incapables d'arriver à maturation terminale (Précurseurs lymphoïdes B ou T).

### 1.2. Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) :

La leucémie aiguë myéloïde est de nature cancéreuse, elle est liée à la multiplication incontrôlée de blastes anormaux. Celle-ci ne peut alors plus fonctionner correctement et, notamment, assurer la production des cellules sanguines normales.

La LAM est une maladie qui peut survenir à tout âge, mais seulement 25 % des cas sont diagnostiqués avant 25 ans. C'est surtout après 40 ans que la fréquence de la maladie augmente, l'âge moyen au moment du diagnostic étant de 65 ans.

Selon la classification FAB (French – American – British) il existe 8 classes des LAM :

- M0 Indifférenciés.
- M1 Myéloblastique sans différenciation.
- M2 Myéloblastique avec différenciation.
- M3 Promyélocytaire.
- M4 Myélomonocytaire.
- M5 Monoblastique.
- M6 Erythroblastique ou Erythroleucémie.
- M7 Mégacaryo-blastique.

## 2- Diagnostic biologique :

Il repose généralement sur hémogramme, myélogramme et les autres examens complémentaires : immunophénotypage, caryotype et biologie moléculaire. Ces examens aident à identifier le type de la leucémie aiguë

- **Hémogramme** : Il est toujours anormal et représente l'examen d'orientation majeur du diagnostic.

- **Myélogramme** : La ponction médullaire permet l'étude morphologique des cellules médullaires sur étalements, après une coloration classique de type May-Grünwald-Giemsa ou Wright.
- **Etude cytochimique** : Les études cytochimiques complètent l'interprétation cytologique, donc, elle a pour but de confirmer la lignée d'appartenance des blastes. L'étude cytochimique est généralement réalisée sur des frottis sanguin ou médullaire. Étudiée en un produit insoluble et coloré observable en microscopie optique.
- **Immunophénotypage des blastes** : L'immunophénotypage recherche par CMF (cytométrie en flux) l'expression de divers antigènes de différenciation membranaires ou intracytoplasmique pour établir le bon diagnostic et pronostic ainsi de définir la lignée des cellules leucémiques.

Les cellules à analyser, étant déjà en suspension, sont faciles à recueillir à partir du sang ou de la moelle osseuse. Cette technique est devenue dans le domaine de la routine hématologique grâce à la simplification et à l'amélioration des performances des cytomètres associée à la disponibilité de nombreux anticorps couplés à différents fluorochromes permettant une analyse multiparamétrique.

Il permet de déterminer :

- La classification de leucémie.
- Le type de lignée : lignée B ou T, ainsi que le stade de maturation.
- Il permet également de chercher l'existence ou non de marqueurs myéloïdes associés (le CD13, le CD33 et parfois le CD34 un marqueur de progéniteur).
- Repérer les cellules anormales, de déterminer leur lignée d'origine, analyser leur degré d'hétérogénéité et d'en déterminer les caractéristiques phénotypiques.

75 % des LAL de l'adulte sont de la lignée B (pro-B, pré-B et B mature) alors que les LAL T (pré-T et T) ne représentent que 25 % des cas.

- **Etude cytogénétique :**

L'analyse cytogénétique d'une leucémie aiguë chez un patient suspecté est devenue un élément essentiel du diagnostic. Ses résultats, qui doivent être obtenus tôt, permettent de déterminer, certaines entités pathologiques et d'engager une thérapeutique plus spécifique.

- **Biologie moléculaire :**

La biologie moléculaire permet de :

- Mettre en évidence des anomalies (translocations ou mutations) lorsque le caryotype est normal ou en cas d'échec.
- Rechercher de nouveaux facteurs pronostiques moléculaires : mutations ou surexpression d'oncogènes (FLT3, NPM1...).

## **Chapitre III**

# **LA CYTOMETRIE EN FLUX**

## 1. Définition

La cytométrie (cyto = cellule ; métrie = mesure) en flux est définie selon Howard Shapiro en 1948 : « La cytométrie en flux est un processus dans lequel chaque cellule ou autre particule passe en une seule file dans un courant liquide devant un ou plusieurs détecteur(s) qui va ou vont mesurer ses caractéristiques chimiques et/ou physiques ».

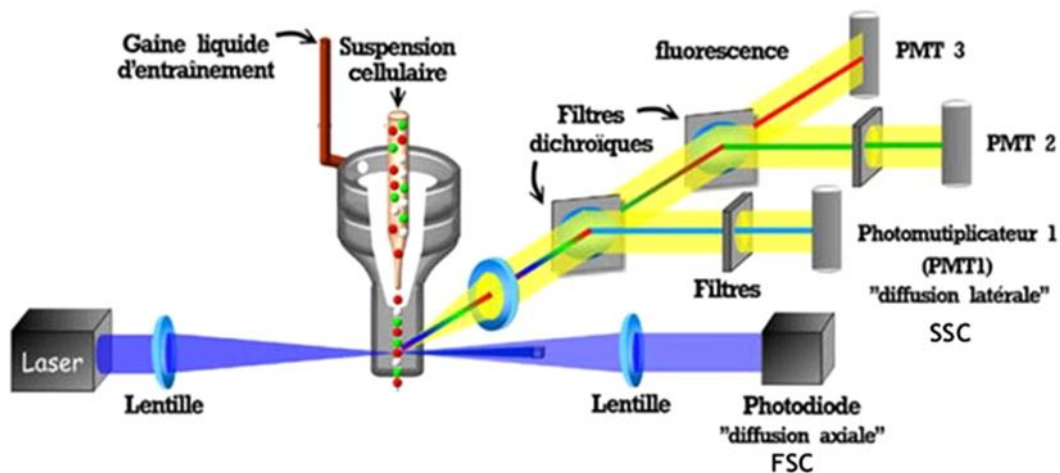
C'est un outil puissant pour identifier et caractériser les populations cellulaires dans des mélanges hétérogènes par sa capacité à mesurer de nombreuses caractéristiques de chaque cellule individuelle. Il réunit les subtilités de la biologie, les principes de la physique, la dispersion de la lumière et la fluorescence, et les mailles qui avec la sophistication de la technologie d'aujourd'hui de la quantification, permet d'identifier et dans certains cas trier les particules, y compris les cellules, les particules cellulaires, Algues, levures et bactéries. Une seule cellule de suspension est la clé.

L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes mono ou bi paramétriques sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

## 2. Principe de la CMF

Il est basé sur la combinaison de trois systèmes (Figure 3) :

- Un système fluïdique : distribution de l'échantillon.
- Un système optique : source d'excitation et de récupération des signaux.
- Un système électronique : traitement électronique des données.



**Figure. 3** : Schéma d'un cytomètre en flux (Cindy Celeste et al., 2013-2014).

### 2.1. Système fluide

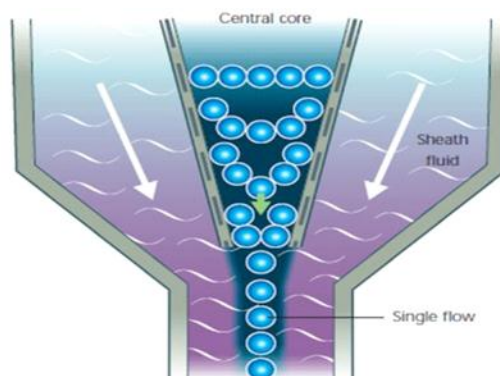
Ce système de distribution permet de passer des cellules en suspension, les uns derrière les autres, à très grande vitesse, devant une source laser afin de les analyser séparément.

Essentiellement, le système fluide comprend un canal central / noyau par lequel l'échantillon est injecté, enfermé par une gaine extérieure qui contient un fluide plus fluide ce que veut dire qu'il y a une pression différentielle entre ces deux fluides dont le rôle est d'assurer le déplacement des cellules, ceci est réalisé dans un système à pression, sous vide ou à pompe (la pression doit être plus grande sur le liquide de gaine que sur la suspension cellulaire (différentiel positif).

À mesure que le fluide de gaine se déplace, il crée un effet de traînée massive sur la chambre centrale rétrécie. Ceci modifie la vitesse du fluide central dont le front d'écoulement devient parabolique avec une vitesse maximale à son centre et une vitesse presque nulle à la paroi (Figure. 4).

Également il est préférable de choisir les liquides de gaine ayant une densité inférieure ou identique à celle de l'échantillon, pour que la gaine garde les indices de réfraction de l'échantillon et de la gaine le plus proche possible, minimisant ainsi les aberrations optiques puisque les différences de réfraction à l'interface tampon peuvent agir comme une lentille entraînant une perte du signal.

L'effet crée un seul fichier de particules et il est appelé focalisation hydrodynamique. Dans des conditions optimales (écoulement laminaire), le fluide dans la chambre centrale ne se mélange pas avec le fluide de la gaine.



**Figure. 4 :** La focalisation hydrodynamique (Misha Rahman , et al., 2006).

## 2.2. Système optique

Fondamentalement, pour les mesures optiques, un cytomètre en flux est un dispositif de détection de photons. Il détecte les photons résultants de la diffusion de la lumière et les émissions de fluorescence des fluorochromes excités par le laser. Les composants des éléments optiques d'un cytomètre en flux comprennent : la source de lumière d'excitation, les éléments de configuration de faisceau, la zone d'interrogation, les filtres qui sont utilisés pour déplacer et contrôler les photons qui arrivent au détecteur et enfin les détecteurs.

Les différents composants optiques de la CMF sont là pour aider à guider, façonner, focaliser et collecter la lumière dans le système.

### 2.2.1 Les paramètres mesurés par la CMF

L'interaction faisceau-cellule qui résulte au niveau du point d'interrogation permet l'obtention d'une lumière dispersée et d'une fluorescence, avec ces deux types de mesures, les chercheurs peuvent classer les cellules en un grand nombre de populations définissables.

#### 2.2.1.1 La lumière diffusée

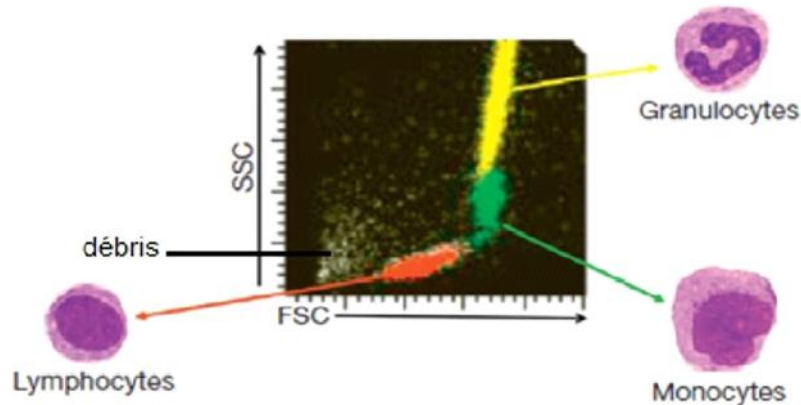
Le passage des cellules ou particules devant le faisceau laser entraîne une diffusion de la lumière en fonction de leurs caractères physiques. Le signal est capturé par deux photodiodes.

La première est disposée dans le prolongement du laser (forwardscatter, FSC) à faible angle (5-10°). Le signal capté reflète approximativement la taille de la cellule ;

La seconde est placée latéralement, à 90 ° (sidescatter, SSC). Le signal capté reflète l'hétérogénéité des cellules (granularité du cytoplasme). C'est une dispersion par les composants de la cellule.

A noter la présence de l'émission Raman (ressemble à la fluorescence), ce qui sera responsable de la présence d'un fond constant.





**Figure. 5 :** Dot plot de la FSC par rapport à la SSC (LEOPOLD, 2011).

### 2.2.1.2 La fluorescence

Le signal fluorescent émis par les cellules marquées est relatif. Il s'agit d'une combinaison de toute fluorescence intrinsèque (autofluorescence) et la fluorescence extrinsèque des colorants ajoutés.

L'autofluorescence est liée de la composition chimique des cellules. En général, contribue à divers niveaux de fond optique.

La fluorescence extrinsèque est le résultat de l'interaction du fluorochrome avec la lumière.

### 2.2.2. Sources lumineuses

La source de la lumière peut être un laser, lampe à arc ou même une Light-Emitting Diode LED.

### 2.2.3. Filtres et éléments optiques

L'ensemble des filtres optiques sont des éléments importants pour traiter la lumière dans le système optique. Ces filtres sont accessibles et manipulables par l'utilisateur final. On note la présence de trois types de filtre utilisés dans la CMF : Filtre passe-haut (LP), Filtre passe-bas (SP), Filtre bande-passe, dichroïque (séparateur de faisceau)

#### 2.2.4. Détecteurs

Ils constituent le point de liaison entre le système optique et le système électronique, ont pour rôle de convertir les signaux lumineux (photons) en un signal électrique qui sera transmis vers le système électronique. Ce sont de deux natures :

- Les photodiodes PD : sont peu coûteuses, mais de faible sensibilité. Sont donc généralement utilisées avec les signaux les plus énergétiques (FSC, SSC).
- Photomultiplicateurs PMT : sont des détecteurs à gain élevés, à faible bruit, coûteux, mais plus sensibles aux signaux de faible énergie ce qui permet leur utilisation pour la détection de la fluorescence.

Ces deux types de détecteurs sont associés à un bruit de fond (background) constant qui oblige l'utilisateur de réaliser des études et des réglages permanents pour améliorer la qualité des résultats.

#### 2.2.5. L'immunofluorescence

C'est l'une des applications les plus importantes de la CMF, basée sur le couplage d'un ou des ACM (analyses des correspondances multiples) avec des fluorochromes permettant une émission lumineuse ciblée et spécifique pour un ou des AG (antigène(s)) d'intérêt au niveau des cellules.

- Les anticorps monoclonaux et les fluorochromes :

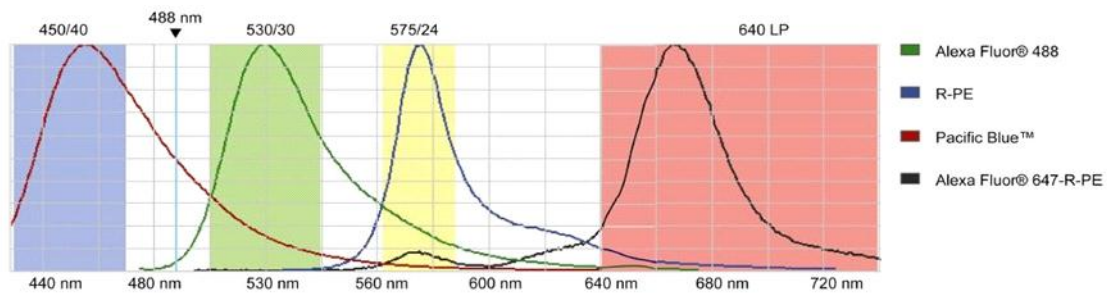
Ils sont obtenus par fusion des lymphocytes de la rate avec des cellules du myélome. On clone les cellules hybridées isolées et chacun des clones, sécrète un anticorps monoclonal adapté spécifiquement à un seul déterminant antigénique de la molécule d'antigène.

L'immunophénotypage est devenu depuis sa découverte nécessaire au diagnostic des lymphomes et des leucémies. Il apporte des renseignements sur leur pronostic et leur évolution après traitement (suivi de la MDR maladie résiduelle).

L'intensité de la fluorescence donne des informations sur la densité antigénique à la surface des cellules. L'emploi de plusieurs fluorochromes, chacun pouvant être excité avec la même longueur d'onde mais émettant à des longueurs d'onde différentes, permet de mesurer plusieurs propriétés cellulaires à la fois.

- **La Compensation :**

Chaque fluorochrome a un large spectre d'émission. Lorsque plusieurs fluorochromes sont utilisés, des parties de leurs spectres d'émission seront probablement aux mêmes longueurs d'onde. Ceci est appelé « chevauchement spectral », ce qui rend la mesure de la fluorescence vraie émise par chacun d'eux difficile. Ceci peut être évité en utilisant des fluorochromes à des extrémités très différentes du spectre, par ex. AF® 405 et PE ; Cependant, ce n'est pas toujours pratique. En revanche, un processus appelé compensation de fluorescence est appliqué pendant l'analyse des données, qui calcule la quantité d'interférence (en%) d'un fluorochrome dans un canal qui n'a pas été spécifiquement affecté à la mesure.



**Figure. 6 :** Exemple de chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes (Merle-Béral H, 2008).

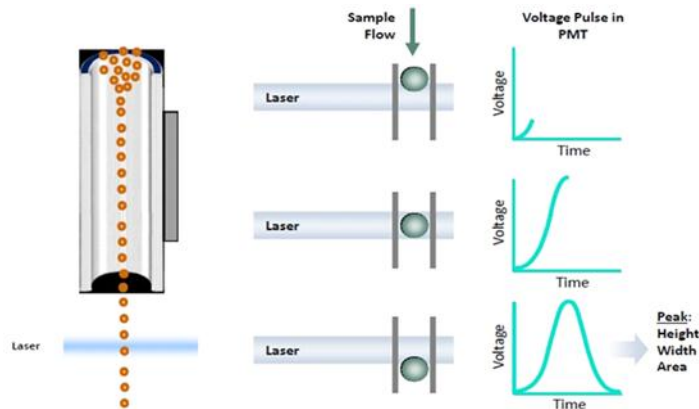
### 2.3. Système électronique

Lorsqu'une cellule ou une particule traverse un faisceau laser focaliser, elle réfracte ou diffuse la lumière dans toutes les directions et peut émettre de la fluorescence. La dispersion et la fluorescence ne durent que quelques microsecondes, car les cellules ou particules se déplacent très Rapidement à travers le faisceau laser focalisée. Les détecteurs convertissent le moment Flash de lumière en un signal électrique appelé impulsion de tension.

Lorsque la cellule ou la particule commence à pénétrer dans le faisceau laser d'interception, l'intensité de signal est faible, car seule une petite partie de la particule disperse la lumière.

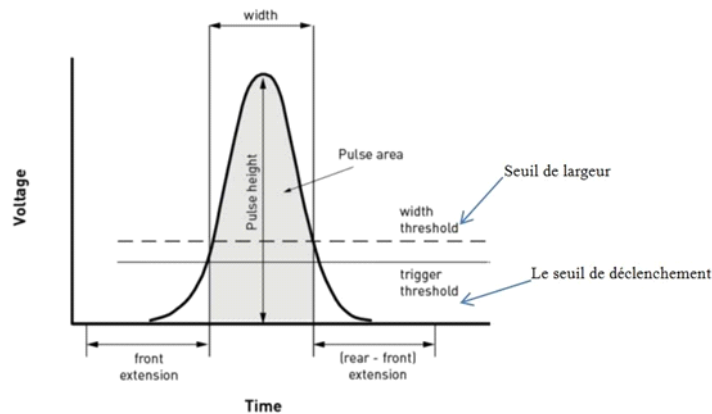
L'impulsion atteint son maximum lorsque la cellule ou la particule est au milieu du faisceau laser, et la particule entière diffuse la lumière. En outre, le faisceau laser est plus lumineux au milieu, ce qui provoque plus de lumière à disperser hors de la particule Lorsque la

cellule ou la particule sort du faisceau, le signal commence à diminuer et finalement traînée au-dessous du seuil.



**Figure. 7 :** Présentation de l'échantillon : impulsion de tension (Ouafae IBBA, 2008).

Le signal analogique issu des détecteurs est amplifié et relayé sur le signal 16 bits Convertisseur analogique-numérique (ADC), Les données sont ensuite traitées par la matrice de portes programmable (FPGA), qui calcule simultanément la hauteur, la surface et la largeur de l'impulsion lorsque l'impulsion dépasse les valeurs de seuil spécifiées par l'utilisateur.

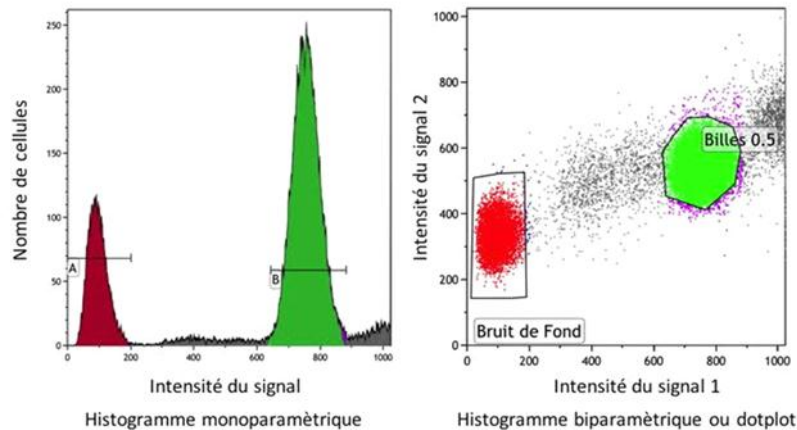


**Figure. 8 :** Mesure d'impulsion (Lizard G et al., 2003).

La hauteur est définie par la tension de crête de l'impulsion, la surface est la valeur intégrée de l'impulsion s'étendant vers l'avant et vers l'arrière des extensions. La largeur de l'impulsion (en unités de points ADC) est mesurée à La valeur de seuil de largeur spécifiée par l'utilisateur.

L'utilisateur final peut définir une valeur de seuil pour définir le niveau de signal au-dessus duquel nous avons un événement à mesurer, Le seuil électronique est réglé sur un (mais peut être réglé sur plusieurs) paramètres et seuls les signaux ayant un niveau supérieur à la valeur réglée sont traités. Dans le tri de cellules, un seuil bas est critique pour éviter une contamination possible par des événements invisibles.

## 2.4 Le système informatique



**Figure. 9 :** Présentation des résultats de CMF (Béné MC, 2013).

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par l'informatique dans des supports divers et présentées sur les écrans des cytomètres sous forme d'histogrammes (2 paramètre) où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules ou de cytogrammes (2 paramètres).

- Logiciel :

Il existe plusieurs logiciels d'acquisition et d'analyse en cytométrie en flux, on cite par exemple le Cyview, le Cellquest, le Flomax. Les logiciels permettent donc l'acquisition (réglages des compensations...), l'analyse (pourcentages des populations et comparaison des résultats) et la mise en forme des informations obtenues (date, heure, informations relatives à l'échantillon). Ils permettent de faire apparaître des « fenêtres » dont la forme est propre à chacun.

## 3. Applications de la CMF

Le cytomètre en flux est un outil polyvalent avec un énorme potentiel pour l'étude des cellules et des particules. En raison de ses capacités analytiques uniques, la CMF est devenu

une partie intégrante du laboratoire de recherche médicale au cours des deux dernières décennies, de nombreuses applications de la CMF ont montré une grande utilité clinique, principalement :

### 3.1 Immunophénotypage

C'est l'une des applications les plus importantes de la CMF avec l'expression quantitative des antigènes cellulaires identifiés par des ACM conjugués aux fluorochromes. L'analyse immunphénotypique est essentielle pour le diagnostic initial et le suivi de certaines pathologies. En outre, elle fournit des informations pronostiques qui ne sont pas disponibles par d'autres techniques. Parmi ces analyses citant :

- Le diagnostic et la classification des LA, ainsi que le suivi et le pronostic.
- Diagnostic étiologique et la surveillance des anémies Diagnostic des troubles congénitaux de la fonction plaquettaire et des thrombocytopénies immunitaires.
- Détection de stade de progression en cas de sérologie VIH (+) (Virus de l'Immunodéficience Humaine), faire aussi le suivi et la surveillance.
- La surveillance de l'activité régénératrice de la MO (moelle osseuse) après chimiothérapie ou transplantation de MO.
- Diagnostic et suivi des différentes maladies comme : Désordre lymphoprolifératif chronique (CLPD), Myélodysplasie (MDS), Hémoglobinurie paroxystique nocturne (PNH).
- Détection et suivi de la MDR.

### 3.2. Quantification de l'ADN

Cette application repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale, la CMF permet de préciser le taux de la prolifération de la tumeur (mesuré par le pourcentage des cellules en phase S) et l'agressivité de la tumeur.

### 3.3. L'étude du cycle cellulaire

La prolifération cellulaire et la caractérisation d'agents qui favorisent ou retardent la prolifération cellulaire sont des domaines extrêmement importants de la biologie cellulaire et de la recherche de découverte de médicaments

#### 4. Avantage de la CMF

Ce qui distingue la CMF des autres techniques est qu'elle possède, les six caractéristiques suivantes :

- **L'analyse quantitative :**

C'est un atout majeur par rapport à la microscopie optique courante, de pouvoir quantifier les paramètres observés. Mais des paramètres intervenant dans toute analyse par la CMF imposent, dans le cadre d'une quantification absolue, l'utilisation de standards calibrés : billes fluorescentes.

- **La sensibilité de détection des signaux de fluorescence :**

En immunofluorescence, il est possible de discerner entre le bruit de fond, et une population de cellules lymphoïdes, portant environ 1000 déterminants antigéniques par cellule.

- **La 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 événements par seconde sur plusieurs paramètres.

- **L'analyse simultanée de plusieurs paramètres :**

CMF offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres, ce qui permet de mesurer, deux ou trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire du sang ou de la moelle.

- **Tri cellulaire :**

Les cytomètres sont équipés d'une option préparatrice permettant de trier et de purifier des populations cellulaires après leur analyse. Le principe du tri est simple : le jet liquide, contenant les cellules, est fractionné par la vibration d'un cristal, puis les gouttelettes sont chargées électriquement et seront déviées lors de leur passage dans un champ électrique créé entre les deux plaques d'un condensateur. Le choix de la gouttelette à charger et le sens de la charge sont effectués par le système informatique.

- **La maladie résiduelle :**

Le concept de « maladie résiduelle » désigne habituellement l'identification, à l'aide des techniques sensibles, de cellules pathologiques chez un patient en rémission clinique complète.

**Chapitre VI**

**L'APPLICATION  
DE LA  
CYTOMETRIE EN  
FLUX SUR LE  
CYCLE  
CELLULAIRE**



L'étude du cycle cellulaire a beaucoup progressé ces dernières décennies grâce à l'apport des techniques d'autoradiographie, d'histochimie, de synchronisation cellulaire et a bénéficié ces dernières années de l'essor de la cytométrie en flux (CMF). Depuis 1979, il est possible d'étudier par CMF le cycle cellulaire au moyen de marqueurs fluorescents spécifiques de l'ADN, utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres marqueurs cellulaires (ARN, antigènes de membranes ou nucléaires, protéines...) (Lacombe, 1991). Grâce à cette technique, l'analyse mon paramétrique a permis d'établir une caractérisation plus fine des diverses phases du cycle cellulaire, ainsi que de calculer, grâce à des logiciels spécifiques, les pourcentages des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire et donc leur index de prolifération (Lacombe, 1991 ; Baisch et al, 1975).

L'application de ces techniques à l'analyse de la prolifération tumorale, à la détermination de clones malins, à l'étude de l'action de drogues sur les cellules cancéreuses, conduit à l'élaboration d'une meilleure stratégie thérapeutique adaptée à chaque type de cancer et d'exploiter ces fonctions qui sont actuellement utilisées comme outil de pronostic (Batsakis et al, 1993 ; Baldetorp et al ; 1998).

## **1. Analyse du contenu en ADN : intérêt dans l'étude du cycle cellulaire**

### **1.1. Le principe :**

La teneur en ADN de chaque cellule d'un organisme est généralement très uniforme. Dans la phase de repos ( $G_1$ ) du cycle cellulaire, il y a exactement 23 chromosomes par cellule somatique humaine, et une teneur en ADN d'environ 7 pg/cellule. Ce diploïde La teneur en ADN est désignée en cytométrie de flux par l'indice d'ADN (DI) 1. O (Hiddeman et al., 1984).

Lorsque les cellules diploïdes qui ont été colorées avec un colorant qui stoechiométriquement les liaisons à l'ADN sont analysées par cytométrie en flux, une distribution « étroite » d'intensités de fluorescence est obtenue. Ceci est affiché sous forme d'histogramme de fluorescence intensité (axe des x) en fonction du nombre de cellules avec chaque intensité observée.

Depuis toutes les cellules G ont le même contenu en ADN, la même fluorescence devrait (en théorie) être détecté, et un seul canal de l'histogramme doit être rempli (Figure.1).

### **1.2. Analyse monoparamétrique :**

La plupart des applications concernant le cycle cellulaire utilisent la mesure d'un seul paramètre :

La teneur en ADN. Ces études nous permettent une estimation de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire avec une plus ou moins grande précision (Rabinovitch, 1994).

### **1.3. Analyse multiparamétrique :**

Afin de mieux identifier tous les compartiments du cycle cellulaire et de déterminer la fraction de cellules hors du cycle, des techniques de coloration permettent de mesurer d'autres constituants cellulaires. Cette analyse se fait le plus souvent en associant un marqueur de l'ADN (par exemple le PI) et un autre marqueur cellulaire couplé à un fluorochrome (par exemple (FITC).

### **1.4. Analyse des histogrammes du contenu en ADN**

Les histogrammes de contenu d'ADN nécessitent une analyse mathématique afin d'extraire les distributions de phase sous-jacentes G1, S et G2 ; à fin d'avoir 2 pics d'histogramme.

Les deux méthodes supposent que les pics G1 et G2 sont symétriques (coloration de l'ADN).

#### **1.4.1. Méthode de calcul :**

##### **➤ Analyse mathématique des histogrammes :**

Les méthodes analytiques utilisées peuvent être divisées en quatre types comme suit :

- **Type 1 :**

Méthodes d'estimation de fraction de phases dans lesquelles la somme de plusieurs distributions normales est adapté à l'histogramme de l'ADN.

- **Type 2**

Méthodes d'estimation de fraction de phases dans lesquelles la somme de deux distributions normales plus Les intégrales gaussiennes sont ajustées à l'histogramme de l'ADN.

- **Type 3 :**

Méthodes d'estimation de fraction de phase dans lesquelles la somme de deux distributions normales et d'un polynôme élargi sont ajustés à l'histogramme de l'ADN.

- **Type4 :**

Méthodes d'estimation de la durée de phase et de la dispersion dans lesquelles les séquences d'ADN des histogrammes basés sur une distribution des âges de cellules à croissance synchrone.

### **1.4.2. Analyse informatique des histogrammes d'ADN :**

La fluorescence d'ADN doit être enregistrée employant l'amplification linéaire dans des instruments employant l'électronique analogue. L'électronique reconnaîtra un signal comme étant d'intérêt seulement s'il dépasse un seuil défini d'avance.

La valeur du seuil doit être comprise entre 5 % et 10 % du nombre de canaux d'une cellule diploïde en G1.

Les histogrammes d'ADN donnent une information sur les phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire.

## **2. Aspects critiques du contenu en ADN et analyse du cycle cellulaire**

### **2.1. Modélisation des débris :**

Les débris produisent des événements qui sont les plus visibles sur le côté gauche de l'histogramme. (Rabinovitch, 1993). Les débris peuvent affecter les calculs de la phase S (1) et les différences dans la précision des estimations de la phase S peuvent compromettre la prédiction de l'évolution du patient, la survie ou réponse thérapeutique.

### **2.2. Modélisation de l'agrégation cellulaire ou nucléaire :**

Bien que l'analyse du (des) cycle(s) cellulaire(s) avec les débris soit parfois suffisante pour modéliser l'histogramme de la teneur en ADN, une inspection minutieuse de nombreux histogrammes révéleront, en outre, des preuves d'agrégation cellulaire.

## **3. Interprétation du contenu en ADN et des histogrammes du cycle cellulaire :**

Avant que la standardisation puisse avoir lieu, les définitions de l'état de la ploïdie, les critères d'évaluation des résultats et de la capacité et les paramètres de modélisation pour la phase S doivent être compris et bien décrit. Les directives suivantes se sont avérées efficaces et pratiques et assurées la cohérence et le contrôle de la qualité dans l'interprétation des histogrammes d'ADN (Dressler et al., 1994).

### **3.1. Les critères d'évaluation des résultats :**

Afin de distinguer les résultats obtenus par cytométrie en flux d'ADN des données obtenus par des techniques cytogénétiques, il a été recommandé par la Convention sur la nomenclature en 1984, que les termes « normal » et « ligne de tige anormale » être utilisé à la place de la diploïdie et de l'aneuploïdie, respectivement (Hiddeman et al., 1984)

**DEUXIEME PARTIE**  
**PARTIE PRATIQUE**

**Chapitre I**

**MATERIEL ET**

**METHODES**

## 1. La population étudiée :

La réussite de cette étude est le fruit d'un travail acharné qui a duré 7 mois. Entamée en date du 22/02/2021 jusqu'à 25/09/2021. Notre stage s'est déroulé dans le centre de transfusion sanguine et hématologie (CHTS) de l'Hôpital Militaire Universitaire de Constantine.

Ce service est divisé en 4 unités. Ils s'agissent de :

-Cytologie et Hémostase

-Transfusion sanguine

-Sérologie

-Immunohématologie.

Nous avons effectué une étude prospective sur des patients présentant une suspicion d'une leucémie aigüe.

Notre population contient 53 cas : (39 sont des cas pathologiques et 15 sont des cas témoins) ;

Cette population inclut des échantillons provenant du prélèvement du sang périphérique et de la ponction de la moelle osseuse de patients en suspicion d'une leucémie aigüe.

## 2. Les critères d'inclusions :

Notre étude inclut, les patients des deux sexes, sans limite d'âge, remplissant les critères suivants :

- **Critères d'inclusion (population malade) :**

1- Patients présentant une hémopathie maligne confirmée par :

\*un médullogramme + immunophénotypage sur suc médullaire pour les ponctions de moelle.

\* un médullogramme + frottis sanguin + immunophénotypage sur sang périphérique pour les prélèvements sanguins.

2- Les patients consultant dans le cadre du suivi d'une leucémie aigüe pour une évaluation de la réponse à la chimiothérapie.

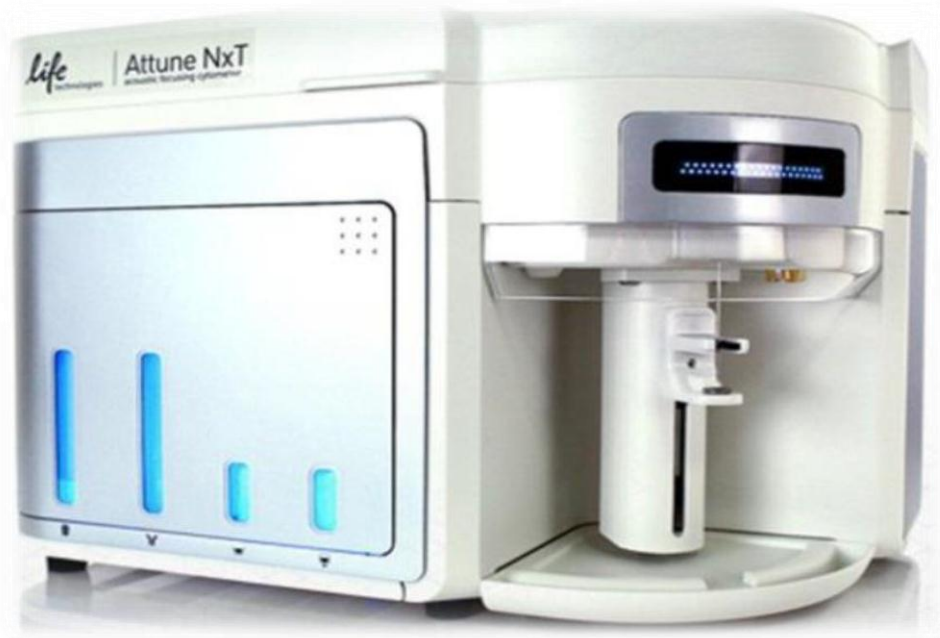
- **Critères d'inclusion population témoins :**

1- patients présentant une pathologie (anémie mégaloblastique, PTI Le purpura thrombopénique immunologique).

2- Patients présentant une blastose périphérique réactionnelle non néoplasique.

### 3. Matériel :

#### 3.1. La cytométrie en flux (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer) :



**Figure. 10:** Cytomètre (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer).

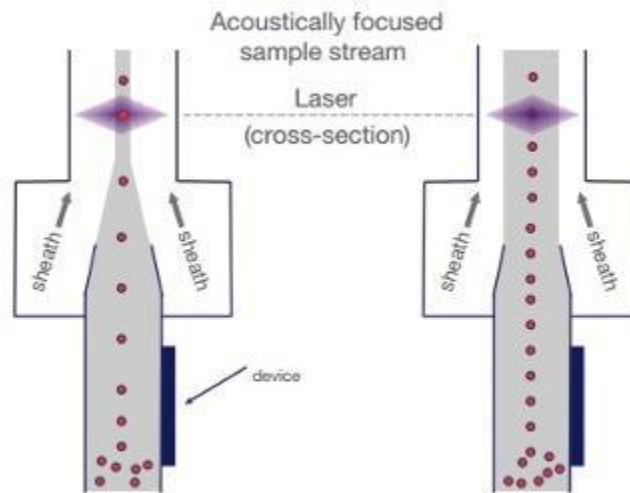
#### ❖ **Principe et fonctionnement:**

-C'est un cytomètre de recherche munie de deux lasers spatialement séparés (deux points d'interrogation d'échantillon) :

- Un laser bleu 488nm / 50 mW, avec 04 canaux de détection de fluorescence 530/30, 574/26, 595/40, 780/60 et un canal SSC 488/10

- Un laser rouge, 637 nm / 100mW, avec trois canaux 670/14, 720/30 et 780/60.

-Le système fluide de l'Attune NxT, est un système de focalisation hydrodynamique, piloté par un système acoustique pour une meilleure précision ; En effet les cellules restent dans un alignement serré même à des taux d'échantillonnage plus élevés, ce qui permet un passage plus rapide (grande vitesse d'acquisition) avec des taux de coïncidence plus faibles, des taux d'abandon inférieurs, et moins de variation de signal et une meilleure qualité des données.



**Figure. 11 :** Système acoustique fluide de l'Attune NxT.

### 3.2. Beckmancoulter LH780 :

C'est un automate d'hématologie cytométrique avec passeur d'échantillon intégré, conçu pour réaliser la numération et la formule sanguine, ainsi que les paramètres réticulocytaires sur un échantillon de sang total prélevé sur un anticoagulant le K2-EDTA.

#### ▪ Beckmancoulter DxH500



**Figure. 12 :** Analyseurs d'hématologie Beckmancoulter DxH500.



C'est un analyseur d'hématologie procure une numération plaquettaire précise et des résultats précis dès le premier passage.

### 3.3. Centrifugeuses de paillasse : Thermo CR3i :



**Figure. 13** : Centrifugeuse Thermo CR3i.

C'est une centrifugeuse polyvalente caractérisée par sa simplicité d'utilisation, microprocesseur, affichage numérique de la vitesse, température, durée et pente

Dont les caractéristiques :

- Centrifugeur polyvalente.
- Changement de rotor en 5 secondes.
- Simplicité d'utilisation
- Microprocesseur
- Affichage numérique de la vitesse, température, durée et pente
- Mémoire 5 programmes personnalisés
- Minuterie 30 s à 99 min.
- Une vitesse de rotation de 4100 tr/min en swing out et 14600 tr/min en angulaire.
- Volume maximal avec rotor swing out de 4x 280ml.
- Volume maximal avec rotor angulaire de 6x 100ml.

## 4. Méthodes :

### 4.1. Recueil et préparation des échantillons :

#### 4.1.1. Le prélèvement :

- **Étude du myélogramme (examen clinique) :**
- **Préparation du matériel :** antiseptie cutanée, compresses stériles, gants stériles, une seringue de 20 cc, 3-5 lames de verre pour le labo, trocart de Mallarmé, un pansement stérile type opsite.

Lors de la prise en charge d'un patient avec suspicion de leucémie aiguë, une ponction médullaire à l'aide d'un trocart Mallarmé et une seringue est réalisée. L'échantillon est d'une part, étalé sur des lames pour la cytologie, et d'autre part, réparti dans différents tubes selon les secteurs analytiques concernés. Pour la cytométrie en flux, 1 à 2 ml de suc médullaire est récupéré dans un tube EDTA.

- **Lieux de ponction :**

-Pour l'adulte : habituellement : manubrium sternal à côté de la ligne médiane au niveau du premier espace intercostal mais c'est psychologiquement difficile. En cas de souvenir désagréable on peut ponctionner l'épine iliaque postéro ou antéro supérieure.

-Pour l'enfant : épiphyse tibiale supérieure ou apophyse épineuse vertébrale.

#### 4.1.2. Hémogramme (examen biologique) :

L'hémogramme permet très souvent d'évoquer d'emblée le diagnostic de leucémie aiguë, il est demandé en premier lieu devant des signes cliniques faisant suspecter une leucémie aiguë.

#### 4.1.3. La numération cellulaire (FNS) :

-Une numération cellulaire du sang périphérique/ponction de moelle au préalable sur un automate d'hématologie est souhaitable.

-Elle permet l'analyse quantitative des éléments figurés du sang, du taux de l'hémoglobine et des réticulocytes et éventuellement le nombre de blastes circulants.

Il est toujours anormal et représente l'examen d'orientation majeur du diagnostic.

#### 4.1.4. Le frottis sanguin :

On met une goutte du prélèvement de ponction de moelle ou du sang périphérique sur la lame, puis on tire la goutte à l'aide d'une autre lame d'une façon continue et on laisse les frottis sécher à l'air libre.

##### ▪ La coloration :

La coloration par le kit RAL555 est une variante rapide de la coloration de May-Grünwald Giemsa en milieu aqueux tamponnée qui permet plusieurs études tels que : l'étude cytologique ;

-Le temps de réalisation :15 secondes.

-Plongez la lame 5 fois pendant une seconde dans le FIX-RAL 555 (flacon numéro 1), égouttez l'excédent sur papier filtre.

-Plongez la lame 5 fois pendant une seconde dans l'EOSINE-RAL 555 (flacon numéro 2), égouttez l'excédent sur papier filtre.

-Plongez la lame 5 fois pendant une seconde dans le BLEU-RAL 555 (flacon numéro 3).

-Rincez rapidement à l'eau déminéralisée.

#### 4.1.5. L'étude cytologique :

Pour l'examen du frottis :

-Mettez la lame avec une goutte d'huile à immersion Sous un microscope optique/fluorescence Leica : LM2000 à un objectif d'agrandissement 100X.

- L'examen microscopique (l'étude cytologique) de frottis médullaires colorés au KIT-RAL 555(kit de coloration rapide) pose le diagnostic de différents types de leucémie aigüe en montrant une infiltration médullaire avec un pourcentage de blaste supérieur ou égal à 20%).

## 4.2. L'immunophénotypage :

### 4.2.1. Marquage de surface :

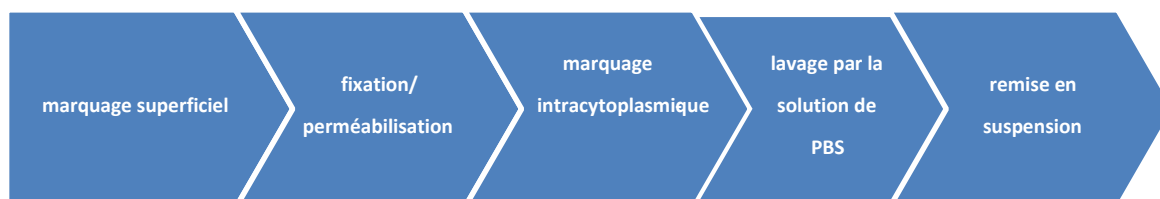
Ce marquage permet de cibler les Ag superficiels par les Acm spécifiques afin d'identifier les différents types cellulaires ; pour le réaliser on suit ces étapes :



- 1- Incuber 50 $\mu$ l du sang avec 2  $\mu$ l de chaque marqueur superficiel pendant 20 minutes à l'abri de la lumière ;
- 2- Ajouter 1 ml de la solution de lyse HYL et mélanger, puis incuber pendant 10 minutes à l'abri de la lumière, sans oublier de mélanger après 5 min ;
- 3- Lancer l'analyse par le cytomètre et faire une lecture directe.

### 4.2.2. Marquage en intracytoplasmique :

Ce marquage est basé sur l'utilisation des solutions de fixation et de perméabilisation, qui permettent respectivement de maintenir le marquage superficiel et la création des pores qui favorisent la pénétration des anticorps vers leurs cibles intracytoplasmiques.



#### ❖ kit de perméabilisation de cellules FIX & PERM® :

Le kit de perméabilisation de cellules FIX & PERM® se compose d'un réactif de fixation adapté (solution A) et d'un réactif de perméabilisation (solution B) pour l'analyse simultanée des Ag intracellulaires et superficiels dans la même population cellulaire. Cette procédure facilite l'accès des anticorps aux structures intracellulaires sans modifier les caractéristiques lumineuses des cellules.

**➤ Méthode :**

1. Incuber 50µl du sang avec 2 µl de chaque anticorps superficiel Pendant 15 minutes à l'abri de la lumière ;
2. Ajouter 50µl de la solution A et incuber l'échantillon pendant 15 minutes à l'abri de la lumière ;
3. Laver l'échantillon par 1.5 ml de PBS, puis centrifuger pendant 5 minutes à 320g ;
4. Eliminer le surnageant par aspiration en utilisant la micropipette de 1000µl ;
5. Remettre le culot en suspension par l'utilisation de 50 µl de la solution B ;
6. Réaliser un dernier lavage par l'utilisation de 1.5ml de PBS, puis centrifuger pendant 5 minutes à 320g ;
7. Eliminer le surnageant par retournement ;
8. Remettre le culot en suspension par l'utilisation de 1 ml de la solution de focalisation.
9. Puis la Lecture au cytomètre.

**4.3. Etude du cycle cellulaire et du contenu d'ADN par cytométrie en flux :****• Principe de l'étude du contenu en ADN**

L'étude du contenu en ADN constitue l'application la plus courante de l'analyse mono-paramétrique par cytométrie en flux.

**4.3.1. Le premier Protocole (l'utilisation de l'iodure de propidium) :**

- 1- Commencez par incubation de 50µl d'échantillon (prélèvement du sang périphérique ; ponction du moelle osseuse) de chaque anticorps (CD45 le plus utilisé) ; pendant 15 à 20 min à l'abri de la lumière ;
- 2- Ajoutez 50µl de la solution A pour la fixation des cellules et incubez l'échantillon pendant 15 minutes à l'abri de la lumière ;
- 3- Lavez l'échantillon une seule fois par 1,5 ml du PBS ; puis centrifuger pendant 5 minutes à 320g ;
- 4- Eliminez le surnageant par aspiration en utilisant la micropipette de 1000µl ;
- 5- Ajoutez 500µl de solution **FxCycle™ PI/RNase** au culot cellulaire ;

- 6- Vortexez doucement pour remettre en suspension le culot cellulaire ;
- 7- Incubez à 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité ;
- 8- Analysez en utilisant une excitation de 488 nm.

✓ **Principe de coloration de l'ADN par l'iodure de propidium :**

L'iodure de propidium (IP) est le colorant se liant à l'ADN le plus utilisé en CMF. Il est excité à 488 nm par le laser Argon ion et donne une fluorescence rouge. Le colorant s'intercale entre les paires de bases aussi bien de l'ADN que de l'ARN. C'est pourquoi une coloration spécifique de l'ADN exige un traitement à la RNase.

#### **4.3.2. Le deuxième protocole : l'analyse des cellules par Vybrant™ DyeCycle™**

##### **RedStain :**

- 1- Retirez le colorant **Vybrant® DyeCycle™ Red stain** du congélateur et laissez le flacon équilibrer à température ambiante.
- 2- Préparez le tube de la cytométrie en flux en ajoutant 50µl d'échantillon (prélèvement du sang périphérique /ponction du moelle osseuse) de chaque anticorps (CD45 le plus utilisé) ; puis incubez le pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.
- 3- Ajoutez 1 ml de la solution de lyse HYL et mélanger, puis incubé pendant 10 minutes à l'abri de la lumière, sans oublier de mélanger après 5 min ;
- 4- Lavez l'échantillon une seule fois par 1,5 ml du PBS ; puis centrifuger pendant 5 minutes à 320g ;
- 5- Eliminez le surnageant par aspiration en utilisant la micropipette de 1000µl ;
- 6- Ajoutez dans le tube 900µl PBS en utilisant les micropipettes de 500µl et 300 µl ;
- 7- Ajoutez 2 µl du réactif **Vybrant® DyeCycle™ Red stain** et bien le mélangez ;
- 8- Incubez à 37°C pendant 30 minutes, au bain marie et gardez les cellules à 37 °C jusqu'à l'acquisition ;
- 9- Analysez les échantillons sans lavage ni fixation sur un cytomètre en flux en utilisant une excitation d'environ 488nm ;

On utilise cette technique pour une deuxième fois avec un mode d'incubation différent à température ambiante dans l'obscurité.

## 5. L'Analyse des données :

-Les données ont été recueillies sur logiciel Attune software, puis analysé sur le logiciel Kaluza 2.1 Beckman Coulter (Version d'évaluation)

**5.1. Kaluza® (version 2.1) de la société Beckman Coulter®**, permet aux données brutes issues du cytomètre (« data ») d'être réinterprétées à l'aide de protocole (« Protocol »). Ce dernier regroupe l'ensemble des histogrammes, fenêtres, réglages, couleurs, tableaux nécessaires à l'interprétation ou à la réinterprétation des données du cytomètre.

### 5.2. Représentation des données :

Les données concernant chaque cellule sont enregistrées par le logiciel d'exploitation du cytomètre sous forme de fichiers portant l'extension FCS (Flow Cytometry Standard). Ces fichiers FCS peuvent par la suite être retraités à distance de la session d'acquisition des données grâce à des logiciels informatiques spécifiques comme Kaluza®,

Trois éléments clés sont à connaître :

**5.3. La représentation graphique :** les données sont principalement affichées sous forme d'histogrammes mono- ou bi-paramétriques :

- **Mono-paramétrique :** oppose en abscisse l'intensité de la fluorescence obtenue pour un marqueur choisi par rapport au nombre d'évènements acquis (Count).
- **Bi-paramétrique ou dot-plot :** oppose en abscisse et en ordonnée deux intensités de fluorescence. On obtient ainsi la représentation de chaque cellule par un point dont les coordonnées dépendent de l'intensité d'expression de chacun des 2 marqueurs étudiés. On obtient ainsi des nuages de points.
- **Le density-plot :** variante du dot-plot, il rajoute une troisième dimension en instaurant un code couleur objectivant le nombre de cellules.

### 5.4. Stratégie de fenêtrage :

-Le 1er histogramme permet de sélectionner les « singles » et donc d'exclure les « doublets » formés par 2 cellules accolées qui n'ont pas été séparées lors du processus de focalisation hydrodynamique et qui sont donc passées simultanément devant le laser.

-L'élimination des doubles sur un histogramme FSC-A/FSC-H ;

- Sur un histogramme BL2A/BL2H pour le vybrant ;
- Sur un histogramme BL3A/BL3H pour le PI.

-Le 2ème histogramme fenêtré sur les « singles » et intégrant les signaux FSC et SSC a pour but de sélectionner uniquement les cellules vivantes

\*Histogramme FSC/SSC permettant l'élimination des débris cellulaires.

- **Fenêtrage des différentes populations d'intérêt :**

➤ La stratégie de fenêtrage mise en œuvre a eu pour but d'atteindre de la manière la plus spécifique, la plus standardisée et la plus reproductible possible les deux objectifs suivants:

Isoler les blastes ; les lymphocytes et les granuleux parmi l'ensemble des éléments cellulaires contenus dans la moelle osseuse,

Des histogrammes bi-paramétriques de type « density plot » ont été utilisés. En effet, si chaque élément est représenté par un point dont les coordonnées dépendent de l'intensité d'expression de chacun des 2 marqueurs étudiés, lorsqu'un très grand nombre de cellules sont analysées, plusieurs vont de fait présenter les mêmes coordonnées, sans que cela ne soit visible sur un histogramme standard. Il est ainsi possible de se retrouver devant une image légèrement biaisée de la population, d'où l'intérêt des représentations de type « density-plot ». Sur ce type d'histogramme, plus le nombre d'événements ayant des coordonnées identiques est important, plus le point correspondant va être représenté par une couleur chaude et inversement. Cela permet donc une meilleure discrimination des populations d'intérêt.

En regardant le niveau d'expression du CD45 AF700 en association avec le SSC, on peut identifier les différentes lignées cellulaires :

Les lymphocytes sont caractérisés par l'intensité la plus forte du CD45AF700 et le signal le plus faible en SSC.

-La lignée érythrocytaire est caractérisée par la négativité du CD45AF700 et un faible signal en SSC.

-Les monocytes montrent une expression du CD45 un peu plus faible que celle des lymphocytes.



-Les blastes montrent une expression faible du CD45 avec des caractéristiques de SSC variables, proche de celles des lymphocytes ou des monocytes.

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

### 5.5. Identification des blastes :

La recherche des blastes est effectuée sur l'histogramme bi paramétrique CD45 AF700/SSC. Ils présentent généralement une expression faible du CD45 et des caractéristiques SSC variables selon leur degré de maturation. Des marqueurs d'immaturité, tels que le CD34, CD117, HLA-DR permettent d'affiner le fenêtrage sur les cellules les moins différenciées.

**Le CD34** est une molécule d'adhésion cellulaire exprimée par de nombreuses cellules progénitrices dont les cellules souches lymphoïdes et hématopoïétiques. Il est exprimé dans la plupart des cas de LAM (42%).

**HLA-DR** est une protéine exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, c'est à dire les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules T activées. HLA-DR est une protéine hétérodimérique transmembranaire composée de deux sous-unités, alpha et beta.

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

### 5.6. L'analyse du cycle cellulaire sur Kaluza® :

En utilisant l'algorithme de : **Michael H. Fox** ou bien par réglage manuel.

❖ **DNA PerCP / DNA PE** : nous avons pu déterminer les paramètres suivants :

-Le taux total des événements de la population étudiée ;

-La proportion de la phase diploïde ;

- Le pourcentage de la phase G0/G1 et la valeur de dMFI G0/G1 ;
- Le pourcentage de la phase S de la prolifération cellulaire ;
- Le pourcentage de la phase G2/M et la valeur de MFI G0/G1 ;
- Le pourcentage du CV qui exprime le degré d'intensité de fluorescence de la phase G0/G1 ;
- Le rapport du G2/G1.

## **6. L'analyse statistique :**

Les différents résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft EXCEL2016 puis transférés vers le logiciel SPSS22.

Nous avons effectué des statistiques élémentaires pour chaque population : fréquences, moyennes, écarts types et intervalles de confiance à 95%.

La comparaison des variables est effectuée par les tests : Khi-deux/Fisher exact, pour des échantillons indépendants.

Les conditions d'applications de chaque test ont été vérifiées. Le seuil de signification alpha est fixé à 5%.

La valeur normale de l'index ADN a été fixée sur la base de la moyenne $\pm$ 2ET.

**Chapitre II**

**RESULTATS ET**

**DISCUSSION**

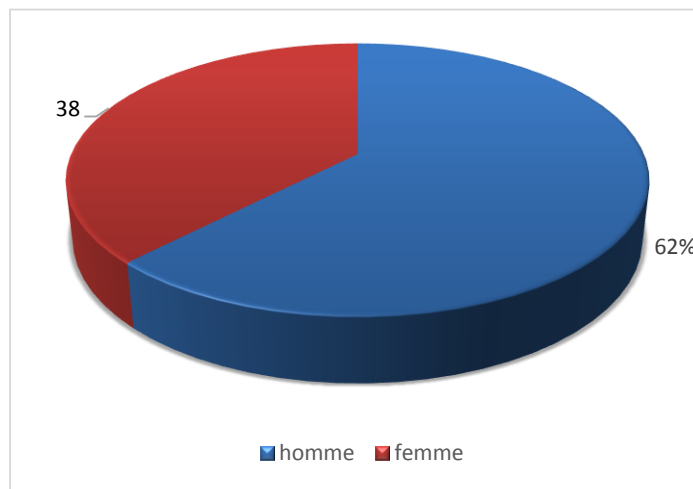
## I. Résultats

### 1. Caractéristiques de la population étudiée :

Notre étude prospective a porté sur un échantillon de 53 cas présentant une suspicion d'hémopathie maligne.

### 2. La distribution de la population selon le sexe :

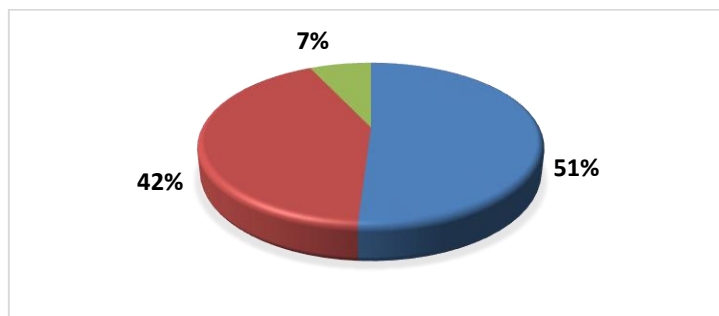
Dans notre série d'étude, la population analysée a montré une prédominance du sexe masculin ; nous avons 33 patients du sexe masculin soit 62% et 20 patientes du sexe féminin soit 38%.



**Figure. 14 :** Répartition des cas selon le sexe.

### 3. La distribution de la population selon la catégorie d'âge :

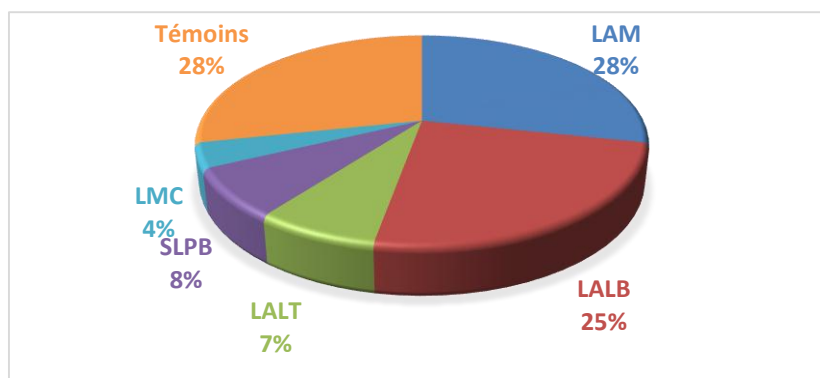
Dans notre série d'étude, la moitié de notre population était des adultes représentés par 27 patients sur 53 soit 51% ; les enfants par 22 sur 53 soit 42% et les nouveaux nés par 4 sur 53 soit 7 avec une moyenne d'âge était  $25 \pm 20,26$  ans.



**Figure. 15 :** Répartition des patients selon la catégorie

#### 4. La distribution selon le type du diagnostic de l'hémopathie maligne :

Notre étude prospective inclus une série de 53 patients ; dont 38 seulement sont des cas des hémopathies malignes ; le type le plus fréquent c'est LAM à 28 % ; LALB à 25 % ; LALT à 7% ; SLPB à 8% ; la LMC à 4%. Les 15 cas restants soient (28%) étaient témoins.

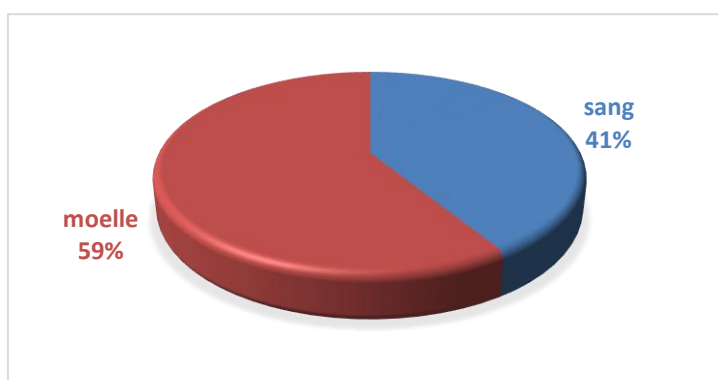


**Figure. 16 :** Répartition des patients selon diagnostic.

LAM : Leucémie aigue myéloïde, LALB : Leucémie lymphoïde B, LALT : Leucémie lymphoïde T, SLPB : Syndrome lymphoprolifératif B, LMC : Leucémie myéloïde chronique

#### 5. La distribution selon la nature du prélèvement :

59 % de nos échantillons provenant d'un prélèvement de moelle et 41% du sang périphérique.

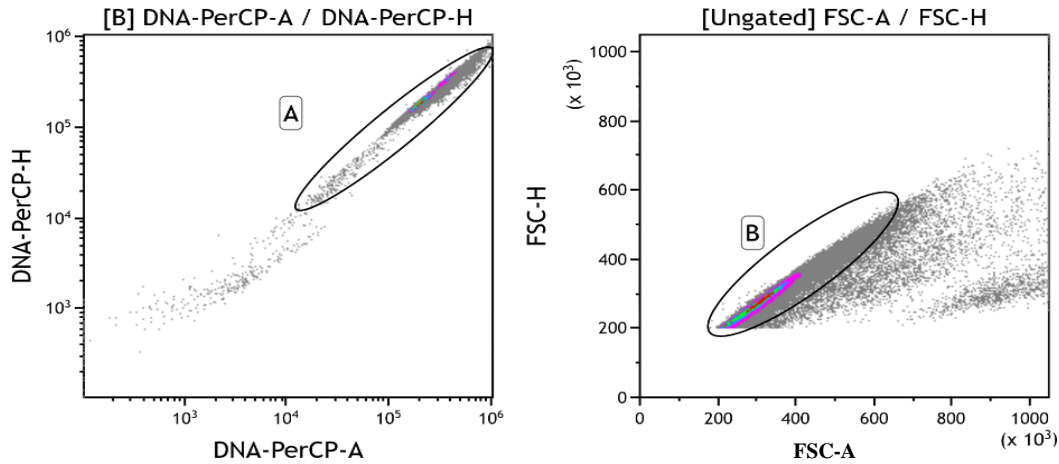


**Figure. 17 :** Répartition des patients selon la nature de prélèvement.

## 6. Exemple d'analyse de la quantification d'ADN avec logiciel cytométrique chez un témoin :

On utilise le logiciel Kaluza® (version 2.1) de la société Beckman Coulter®,

➤ Le premier protocole avec l'iodure du propidium on a :



**Figure. 18 :** Fenêtrage d'élimination des doublets avant l'analyse du cycle cellulaire.

L'histogramme bi-paramétrique représente :

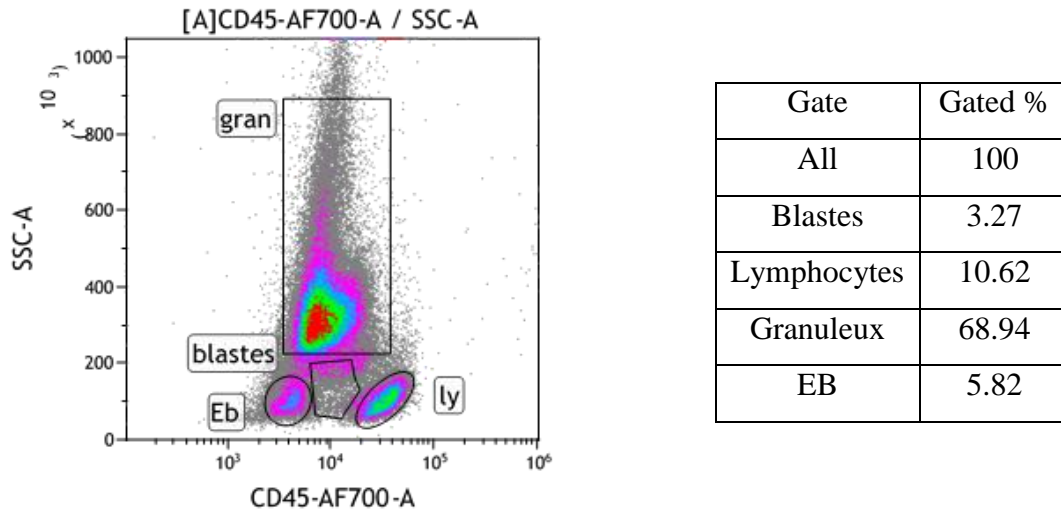
**A :** Un fenêtrage d'élimination des doublets présentés sur la totalité des deux échelles.

**B :** La discrimination des doublets.

La stratégie d'analyse retenue était la suivante :

L'élimination des doublets sur l'histogramme (B) FSC-A/FSC-H permet de sélectionner les « Singles » et donc d'exclure les « doublets gate C » formés par 2 cellules accolées qui n'ont pas été séparées lors du processus de focalisation hydrodynamique et qui sont donc passées simultanément devant le laser.

L'élimination des doublets se fait également sur un histogramme (A) BL3A/BL3H pour l'iodure de propidium.

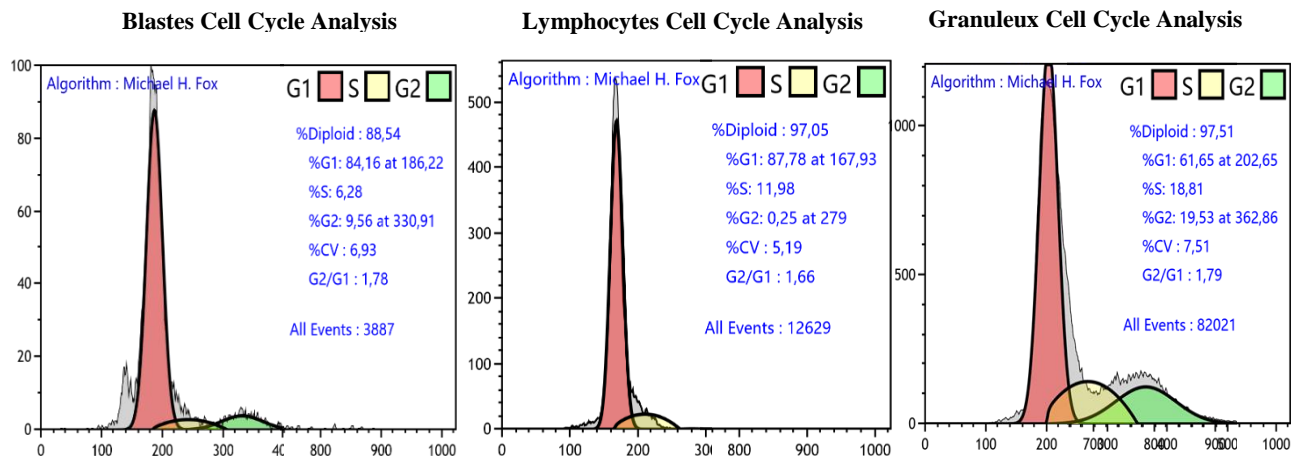


**Figure. 19 :** Fenêtrage des différentes populations les blastes, les lymphocytes et les granuleux.

➤ **Le deuxième histogramme :**

Ciblé sur les cellules isolées et associant le SSC et le CD45 permet :

- De sélectionner les **lymphocytes**, les **blastes** et les **granuleux** sur l’histogramme CD45/SSC.
- Les lymphocytes expriment fortement CD45 et ont une faible granulosité (SSC faible).
- Les blastes ont une intensité de marquage diminuée en CD45 et un SSC faible. Le placement de cette fenêtre est variable selon le type de leucémie aiguë ; ils représentent 3.27% dans cet exemple.
- Enfin, les cellules granuleuses sont caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45.



**Figure.20 :** Des histogrammes d’ADN d’une moelle d’un témoin des blastes ; des lymphocytes et des granuleux avec duplication

Sur l'algorithme : Michael H. Fox par un réglage on peut déterminer les différentes phases du cycle cellulaire de chaque population cellulaire pour un témoin, à partir de cet histogramme on retient les paramètres suivants :

**❖ Pour l'analyse du contenu d'ADN de la population blastique :**

- Le pourcentage de la phase G0/G1 était 84.16%
- Le pourcentage de la phase S qui indique le taux normal des cellules qui sont en stade de prolifération était 6.28 %.
- Le pourcentage de la phase G2/M était 9.56%
- La valeur de MFI de G0/G1 était 186.22
- La valeur de MFI de G2/M était 330.91
- Le coefficient de variation CV était 6.93% de l'intensité de fluorescence de la phase G0/G1 était 6.93%

**❖ Pour l'analyse du contenu d'ADN de la population lymphocyte :**

- Le pourcentage de la phase G0/G1 était 87.78%.
- Le pourcentage de la phase S qui indique le taux normal des cellules qui sont en stade de prolifération était 1.98%
- La valeur de la phase G2/M était 0.25% donc l'absence du pic de la prolifération cellulaire.
- La valeur de MFI de G0/G1 était 167.93
- La valeur de MFI de G2/M était 279
- Le coefficient de variation du CV 5.19 % de l'intensité de fluorescence de la phase G0/G1

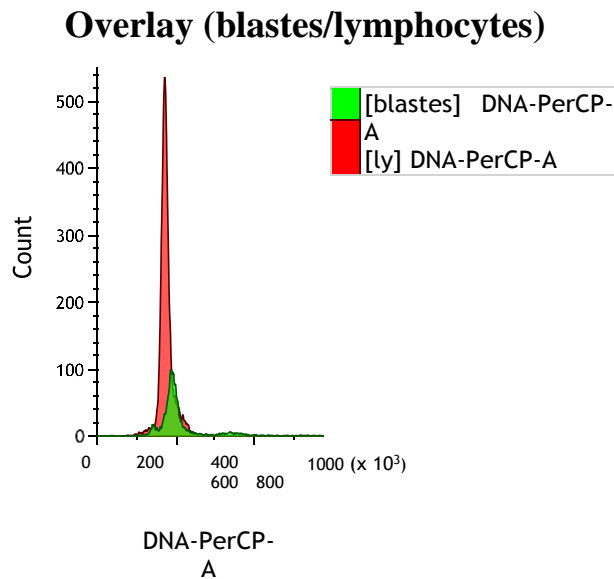
**❖ Pour l'analyse du contenu d'ADN de la population des granuleux :**

- Le pourcentage de la phase G0/G1 était 61.65 %.
- Le pourcentage de la phase S était 18.81% ;
- Le pourcentage de la phase G2/M était 19.53%
- La valeur de MFI de G0/G1 était 202.65



-La valeur de MFI de G2/M était 362.86.

- Le coefficient de variation du CV était 7.51 % de l'intensité de fluorescence de la phase G0/G1



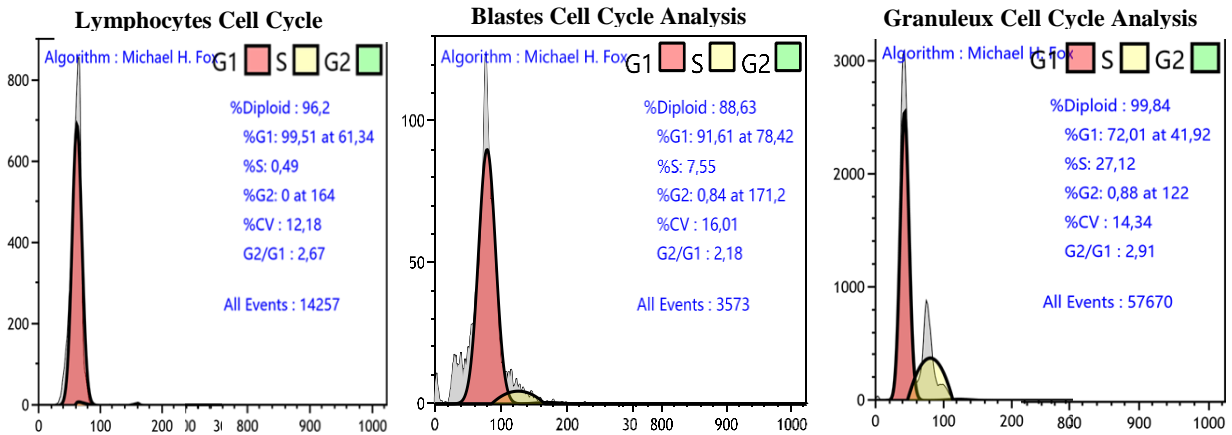
**Figure. 21 :** Profil d'une moelle témoin présentant un histogramme d'ADN diploïde.

On remarque que le pic  $G_1/G_0$  des blastes (en vert) et le pic  $G_1/G_0$  des lymphocytes normaux sont superposables

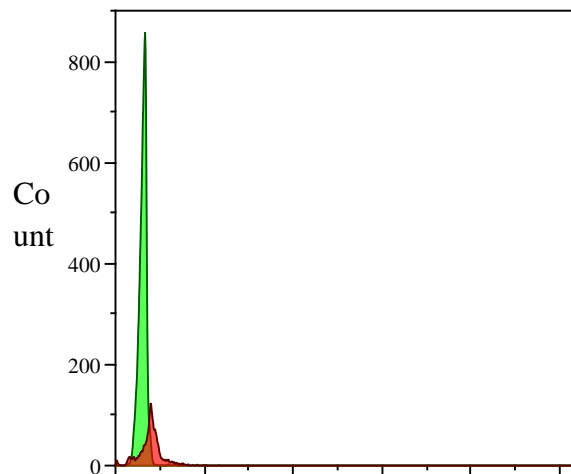
- Ces données ont été obtenues à l'aide d'histogrammes mono-paramétriques de type « overlay » permettant d'indiquer grâce au MFI de l'intensité de fluorescence MFIG0/G1 d'overlay lymphocyte/blastes pour déterminer la ploïdie et l'aneuploïdie des blastes.
- Dans ce sujet sain qui représente un taux de blastes à 3.27% dans les deux modèles d'histogrammes mono-paramétriques en regardant les différents pics on peut dire que le pic des blastes en bleu et le pic des lymphocytes en vert ne sont pas trop différent en intensité.
- Ce qui indique qu'il est en état diploïde.

❖ **Le Deuxième protocole avec Vybrant® DyeCycle™ Red stain :**

L'élimination des doublets et la sélection des populations : lymphocytes, granuleux et blastes sur l'histogramme SSC/CD45 se fait en suivant le même protocole présenté ci-dessus.



**Figure. 22 :** Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un témoin des blastes, des lymphocytes et des granuleux. (La lecture de la fluorescence Vybrant se fait de la même manière que celle du PI sauf que la lumière est récupérée dans le canal BL2 au lieu du BL3)



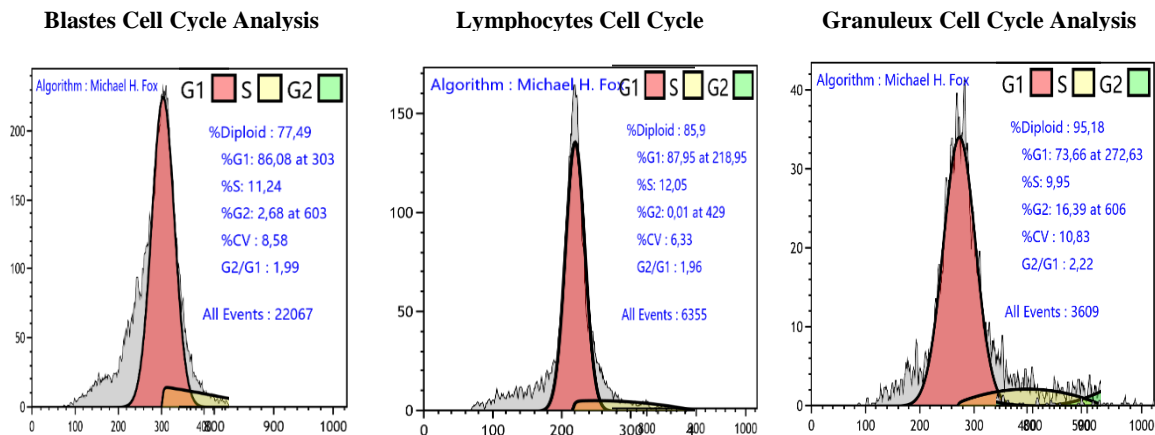
**Figure.23 :** Profil d'une moelle témoin présentant un histogramme d'ADN diploïde par Vybrant. On remarque que le pic  $G_1/G_0$  des blastes (en vert) et le pic  $G_1/G_0$  des lymphocytes normaux sont superposables.

## 7. L'analyse du contenu d'ADN par cytométrie en flux chez un patient présentant une leucémie aigue :

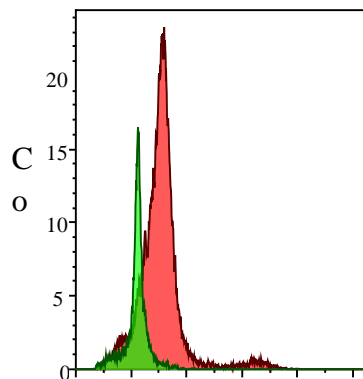
### ❖ Le premier protocole par PI :

Toujours avec l'utilisation du logiciel kaluza :

L'élimination des doublets et la sélection des populations : lymphocytes, granuleux et blastes sur l'histogramme SSC/CD45 se fait en suivant le même protocole présenté ci-dessus.



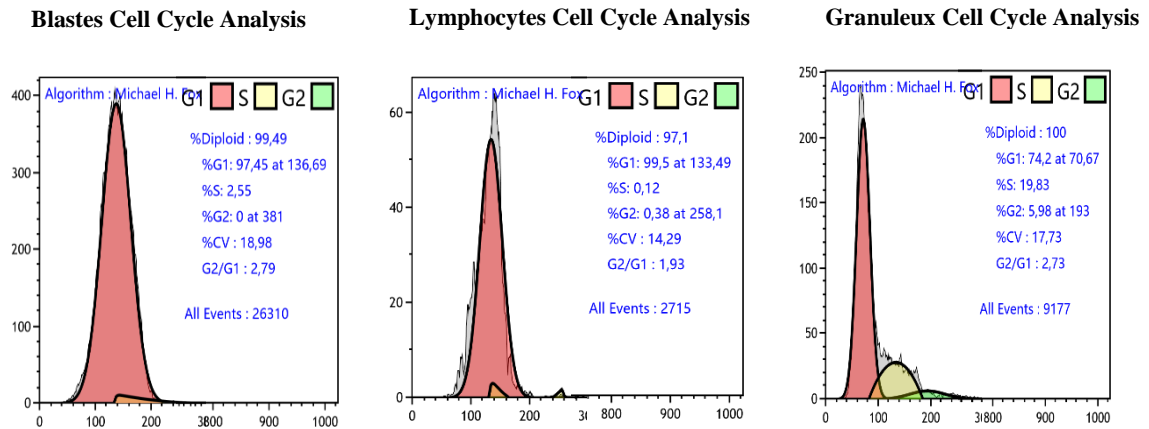
**Figure.24 :** Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un malade LALB des blastes ; lymphocytes et des granuleux avec duplication. (La MFI du pic  $G_1/G_0$  des blastes est à 303 nettement supérieur au pic  $G_1/G_0$  des lymphocytes à 218 ; l'index ADN dans ce cas est à 1.38 ; il s'agit donc d'une LALB hyperdiploïde)



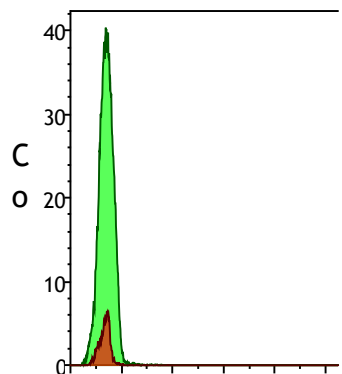
**Figure.25 :** Profil d'une moelle d'un malade LALB présentant un histogramme d'ADN en état hyperdiploïdie des blastes. On remarque que le pic des blastes en rouge est décalé vers la droite par rapport au pic des lymphocytes en vert dans le cas d'hyperdiploïdie.

❖ **Le deuxième protocole Vybrant® DyeCycle™ Red stain :**

Le schéma d'analyse est le même des cas précédents :



**Figure.26 :** Des histogrammes d'ADN d'une moelle d'un malade présentant LALB des blastes ; des lymphocytes et des granuleux avec duplication. (La MFI du pic  $G_1/G_0$  des blastes est à 136 tandis que le pic  $G_1/G_0$  des lymphocytes est à 133 ; l'index ADN dans ce cas est à 1.02 ; il s'agit donc d'une LALB diploïde)



**Figure.27 :** Profil d'une moelle d'un malade LALB présentant un histogramme d'ADN en état hyperdiploïdie des blastes. On remarque que le pic des blastes en rouge est superposable au pic des lymphocytes en vert dans le cas de diploïdie.

## 8. Caractéristiques de la quantification d'ADN :

### 8.1. La moyenne du CV chez les témoins par iodure de propidium :

**Tableau.1 :** La moyenne du CV chez les témoins dans les différentes populations.

Résultat	Intervalle de confiance à 95 %
% CV Témoins lymphocytes PI	[5.82-8.77]
% CV Témoins blastes PI	[6.44-12.71]
% CV Témoins granuleux PI	[5.31-9.57]

Le CV du pic G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> des lymphocytes était avec une moyenne de 7.29% avec un intervalle de confiance de 5.82 à 8.77

### 8.2. La détermination de la valeur d'index d'ADN chez les témoins par PI :

- **Pour les blastes :**

-La moyenne de l'index d'ADN chez les témoins était 1.08/l'ecartype=0.08 ; La valeur normale (qui définit l'état diploïde de blastes) calculé sur la base de la moyenne±2ET était de 1.08±0.08x2= [0.9-1.28]. Donc les valeurs >1.28 sont considérées comme étant hyperdiploïdes, en revanche les valeurs < 0.9 sont considérées comme étant hypodiploïdes.

- **Pour les granuleux :**

-La moyenne de l'index d'ADN chez les témoins était 1.08/l'ecartype=0.06 ; la valeur normale (état diploïde des granuleux) calculé sur la base de la moyenne±2ET était de 1.08 ±0.06x2 [0.9-1.26] donc les valeurs 1.26 sont considérées comme étant hyperdiploïdes, en revanche les valeurs < 0.9 sont considérées comme étant hypodiploïdes.

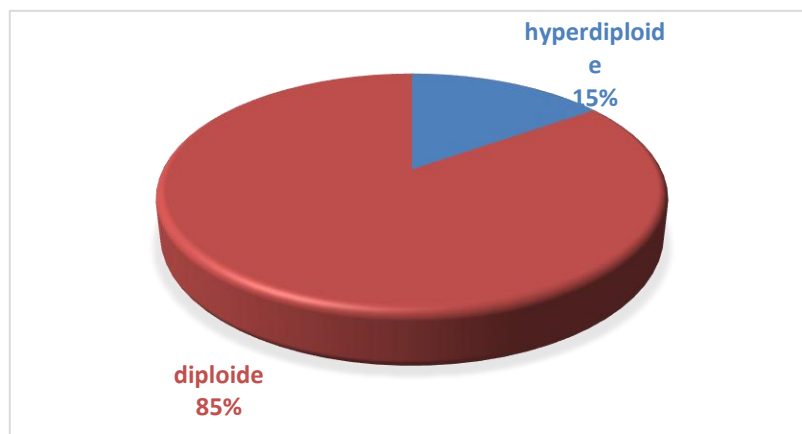
**Tableau.2 :** La moyenne de l'index d'ADN chez les témoins.

L'index d'ADN par PI chez les témoins	Nombre	La moyenne ± 2écartype
Index d'ADN PI blastes	11	1.09 ±0.19= [0.9-1.28]
Index d'ADN PI granuleux	10	1.08±0.13= [0.9-1.26]

### 8.3. La fréquence de l'aneuploïdie des blastes et des granuleux chez les patients :

Dans notre série des patients la plupart étaient en état diploïde 28 cas soient (84.8%).

Les autres étant en état hyperdiploïde 5 cas soient (15.2%).



**Figure. 28 :** Le pourcentage de la diploïdie des blastes.

### 8.4. La fréquence de l'aneuploïdie des blastes selon les types LA par iodure de propidium :

Dans notre échantillon nous avons une fréquence d'aneuploïdie plus élevée 4 cas soit 36 % dans les LALB que les autres types de LA. On peut dire que la majorité des cas étaient diploïdes.

Il n'existe pas une différence significative entre la diploïdes des blastes et les types LA. P=0,06

**Tableau. 3 :** La diploïdie des blastes selon les types LA.

Type LA	LAM		LALB		LALT		SLPB		LMC		Valeur de P
	Fréquence	(%)	F	(%)	F	(%)	F	(%)	F	(%)	
Hyperdiploïde	1	7,14	4	36,36	0	0	0	0	0	0	<b>0,06</b>
Diploïde	13	92,85	7	63,63	5	100	2	100	1	100	
<b>Total</b>	14	100	11	100	5	100	2	100	1	100	

### 8.5. La comparaison d'aneuploïdie entre les LALB et les autres types de leucémie aigüe PI :

En comparaison entre les états : l'analyse des données en fonction de la diploïdie des blastes montre que l'aneuploïdie (36.3%) est plus fréquente dans les LALB que les autres types de LA (4.5%).

La comparaison de la fréquence d'hyperdiploïdie entre les LALB et les autres types de LA par le test de Fischer exact, montre qu'il existe une différence significative entre les 2 groupes.  $P = 0.03$  ( $p < 0.05$ ).

**Tableau. 4 :** La répartition d'aneuploïdie entre les LALB et tous les types

La diploïdie des blastes	LALB		Autres		Valeur de P
	Fréquence	(%)	F	(%)	
Hyperdiploïdie	4	36,4	1	4,5	<b>0,03</b>
Diploïdes	7	63,6	21	95,5	
<b>Total</b>	11	100	22	100	

Le risque d'hyperdiploïdie dans la LAL-B est à 3,2 fois supérieur aux autres types de LA, avec un intervalle de confiance à 95 % situé entre [1.4-6.9].

**Tableau. 5 :** Le risque d'hyperdiploïdie dans les LALB.

Résultat	Valeur	Intervalle de confiance à 95 %	
		Plus bas	Supérieur
Diploïdie blastes PI (hyperdiploïde / diploïde)	12,000	1.142	126.122
Pour cohorte type LA2 = LALB	3.200	1.471	6.959
Pour cohorte type LA2 = autre	0.267	0.046	1.559
N d'observation	33		

### 8.6. Le rapport G0/G1-G2M-et phase S par rapport aux témoins avec les types LA :

Les échantillons témoins négatif montrent une valeur de la moyenne S 13.70%.

**Tableau. 6 :** La moyenne des différentes phases du cycle cellulaire chez les témoins.

Résultats	% la phase G0/G1		% la phase G2/M		% la phase S	
	N	M	N	M	N	M
Témoins	11	85.86	11	18.17	11	13.70

**Tableau. 7 :** La moyenne des différentes phases du cycle cellulaires dans tous les types LA.

Type LA	% de la phase G0/G1 de blastes PI		% de la phase G2/M de blastes PI		% de la phase S de blastes PI	
	N	M	N	M	N	M
<b>LAM</b>	14	83.09	14	10,11	14	6,78
<b>LALB</b>	12	87.42	12	5,29	12	7,27
<b>LALT</b>	5	69.11	5	18,87	5	12,01
<b>SLPB</b>	2	67.16	2	29,12	2	3,72
<b>LMC</b>	1	44,72	1	16,28	1	38,99
<b>Total</b>	34	19.17	34	15.47	34	8,49



## II. Discussion

Dans cette étude nous avons quantifié l'ADN et déterminé les différentes phases du cycle cellulaire des cellules blastiques hématopoïétiques en prolifération maligne. Nous avons ciblé une population présentant une hémopathie maligne (leucémie aigüe) nouvellement diagnostiquée ou bien des leucémies aigües en rechute.

La détermination du cycle cellulaire des blastes et la quantification de l'ADN permettent la mesure de l'index ADN de cette population à la recherche d'un éventuel état d'aneuploïdie. En effet, l'hyperdiploïdie et l'hypodiploïdie fournissent des renseignements pronostiques très importants selon les dernières études. L'OMS a rajouté dans sa dernière mise à jour (2016) de classification des leucémies aigües deux classes entières dans les leucémies aigües lymphoblastiques B (LAL-B), basées sur la présence d'état d'aneuploïdie. Une classe des LAL-B avec hyperdiploïdie qui est une classe de très bon pronostic ; une seconde classe LAL-B avec hypodiploïdie de mauvais pronostic.

La détermination de l'index ADN se fait classiquement par un examen de cytogénétique conventionnelle qui est le caryotype. La réalisation du caryotype est une technique laborieuse et souvent contraignante nécessitant un personnel hautement qualifié et une analyse très attentive. Le décompte des chromosomes doit se faire sur environ 20 différentes mitoses, et l'anomalie du nombre doit être présente sur plusieurs mitoses afin de la valider. On rajoute à cela le problème d'identification du clone à analyser, où on ne peut pas identifier la lignée cellulaire d'appartenance des images de mitose traités au caryotype réalisé sur un prélèvement de moelle ou bien du sang périphérique.

La cytométrie en flux offre un moyen de quantification d'ADN et mesure du cycle cellulaire très rapide et précis. En utilisant des colorants d'ADN fluorescents, elle nous permet de quantifier l'ADN, par mesure de l'intensité de la fluorescence provenant de la cellule. Dans notre étude nous avons utilisé deux colorants :

L'iodure de propidium (FxCycle™ PI/RNase Staining Solution Invitrogen™), qui est un colorant non perméable, nécessitant une fixation des cellules avant le marquage. Son spectre d'excitation passe par notre laser bleu (488nm-50mW), et son maximum d'émission est à 617nm. Nous avons utilisé un filtre 695nm/40 de la configuration par défaut du cytomètre Attune Nxt™, qui n'est pas le filtre idéal pour la fluorescence PI, mais nous l'avons utilisé comme une solution alternative. La coloration de l'ADN par iodure de propidium (PI) en général et avec ce kit en particulier, n'est pas destinée au marquage multiparamétrique. Devant

le besoin d'identification de différentes populations cellulaires nous avons essayé, dans cette étude, de réaliser un marquage multiparamétrique avec le PI. Comme il s'agit d'un colorant qui émet sa fluorescence dans le spectre vert, où la plupart des fluorochromes classique qui s'excitent par le laser bleu sont récupérer, il était impossible d'associer un autre marqueur couplé à : FITC, PE, PerCp ou équivalent. Nous avons même testé des marqueurs comme le CD34 et CD117 couplés au PE-C7, où le filtre correspondant (780/60) est loin de la lumière du PI, mais les résultats n'étaient pas concluants (résultats non présentés). Le seul marquage que nous l'avons réussi avec le PI est celui du CD45 couplé à l'AF700 (*CD45 HI30, Alexa Fluor 700, MHCD4529 Invitrogen<sup>TM</sup>*), ce fluorochrome est excité par le laser rouge (637nm – 100mW) et émit sa lumière dans le filtre (720/30). Nous nous sommes donc basés sur le niveau d'expression du CD45 d'une part et l'intensité du signal SSC d'autre part afin d'identifié les différentes populations cellulaires : lymphocytes, blastes et granuleux. Cette technique nous a permet d'analyser la plupart de nos échantillons. Les échantillons dont le marquage multiparamétrique par le CD45 n'était pas concluant ont été exclu de l'étude. Nous n'avons pas rajouté un autre marqueur dans le laser rouge avec le CD45 afin de continuer l'analyse sans effectuer un réglage de compensation. En effet la modification du réglage des PMT influence sensiblement le signal du PI. Donc dans un premier temps nous avons décidé de continuer avec un marquage par le CD45 AF700 Invitrogen<sup>TM</sup> uniquement. L'analyse des blastes avec un profil habituel, CD45 faible et SSC bas, était très satisfaisante par cette technique, vue que c'est la région habituelle des blastes dans la majorité des cas des leucémies aigues. Néanmoins, dans certain cas, les blastes ont un CD45 plus fort (cas de certain LAL-T) se mélangeant à la population lymphocytaire mature ; ou bien un CD45 très faible voir négatif (cas de certain LAL-B) se mélangeant aux érythroblastes et débris cellulaires ; dans d'autres situations le SSC est trop élevé (cas des LAM) qui peut se croiser avec la population des granuleux matures. Dans ces différentes situations l'analyse des blastes par le PI est très difficile voir impossible. Dans notre étude les cas où l'analyse des blastes sur un histogramme SSC/CD45 n'était pas possible ont été exclus de l'analyse.

On note également que la détermination du cycle cellulaire, surtout après une culture cellulaire nécessite une vérification de la viabilité des cellules. Dans notre cas l'analyse a été effectué directement sans culture. La vérification de la viabilité cellulaire était donc facultative, cependant nous avons utilisé le colorant 7AAD pour quelques échantillons (résultats non présentés), la viabilité cellulaire était supérieure à 96% pour les échantillons cellulaires (moelle ou sang) de moins de 24h.

Nous avons également utilisé un deuxième colorant d'ADN. (Vybrant® DyeCycle™ Green Stains Invitrogen™), est un colorant perméable, ne nécessite pas une fixation de cellules pour son utilisation ni traitement par l'ARNase. Ce colorant est excité par le laser bleu à 488nm, son émission maximale est à 534nm. Donc sa lumière est facilement récupérée dans le filtre (574/26). Ce colorant permet un marquage multiparamétrique dans le laser rouge, avec les fluorochromes (APC, AF700 ou APC-Cy7). Nous avons acquis ce colorant un certain temps après le début de cette étude, nous ne l'avons pas utilisé pour l'ensemble de notre population. Par ailleurs, aux premiers essais du Vybrant nous avons remarqué une perte importante de la richesse cellulaire au moment de l'analyse, où le nombre de cellules récupérées ne permet pas une analyse optimale du cycle cellulaire, après plusieurs ajustements nous avons changé le milieu d'incubation de l'échantillon de 37°C (recommandation du fabricant) à la température ambiante, nous avons enregistré une nette amélioration du nombre d'évènements et de la qualité des profils ADN obtenus. Malheureusement le nombre d'échantillons traités par cette procédure n'était pas important, ne permettant pas une analyse adéquate des résultats. De ce fait nous continuons dans cette partie la discussion des résultats obtenus par le PI uniquement.

Avant de passer à la coloration d'ADN par le PI, une étude cytologique (frottis sanguin et/ou médullogramme) a été réalisé pour chaque échantillon suivi d'un immunophénotypage par cytométrie en flux. Il est indispensable d'analyser le profil d'immunophénotypage avant la coloration d'ADN par le PI, afin de repérer les différentes populations cellulaires de l'échantillon ; déterminer la richesse en lymphocytes et en cellules immatures (blastes) ; vérifier l'emplacement des blastes sur l'histogramme SSC/CD45 et voir si le CD45 est suffisant pour le « gating » des blastes. Il est à noter que dans certaines situations le CD45 ne permet pas à lui seul la séparation des blastes, principalement dans le cas des LAM, où on a fréquemment besoin d'utiliser le CD117 et/ou CD34 en plus du CD45 afin de repérer les blastes.

Il est recommandé dans l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, d'utiliser une faible vitesse d'acquisition et de collecter le maximum d'évènements ( $10^4$  cellules au minimum), le cytomètre Attune NXT™ est équipé d'un système de focalisation hydrodynamique assisté par une sonde acoustique, nous permet d'aller à des vitesses d'acquisitions supérieures sans problème majeur. Nous avons utilisé dans notre étude une vitesse d'acquisition de 100µl/min après avoir vérifié qu'elle n'a pas d'influence sur la qualité du résultat obtenu en comparaison avec la vitesse de 25µl/min.

Nous avons analysé 53 échantillons dont 38 hémopathies malignes et 15 témoins. Les témoins se sont des prélèvements de moelle de patients atteints de pathologie non néoplasique, nous avons principalement des cas de : PTI ; leucémie en rémission pour la recherche de maladie résiduelle ; cytopénies périphériques dont la moelle elle est revenue normale. Sur les 15 témoins nous avons obtenu un profil du cycle cellulaire valide par le PI dans 11 cas, pour les 4 cas restants le profil était ininterprétable principalement par absence de la population blastique. Quant aux patients nous avons validé 33 profils sur les 38 hémopathies malignes pour la même raison. Les hémopathies malignes analysées étaient constituées de : 15 cas de leucémie aigue myéloïde (LAM) ; 17 cas de leucémie aigue lymphoïde (LAL) ; 4 cas de syndrome lymphoprolifératif B (SLPB) et et deux cas de leucémie myéloïde chronique (LMC). Dans les cas de leucémies aigues notre population cellulaire cible était les blastes, ainsi que les deux cas de LMC où un excès de blastes a été mis en évidence et analysé. Concernant les syndromes lymphoprolifératifs le clone tumoral est constitué de lymphocytes matures dont l'expression du CD45 est souvent de forte intensité, rendant leur séparation des lymphocytes normaux très difficile. Nous avons tenté l'utilisation d'autres marqueurs comme le CD19 APC-Cy7, CD3 PE-Cy7 ou le CD3 AF700, cependant leur association au marquage d'ADN par le PI était très difficile et compliqué. Par ailleurs les 4 cas de SLPB inclus dans notre étude étaient des cas de LLC-B (leucémie lymphoïde chronique) où le clone lymphoïde tumoral présente un CD45 d'intensité intermédiaire permettant sa sélection sur un histogramme SSC/CD45.

La quantité d'ADN dans des cellules normales diploïdes est la même, la fluorescence émise après marquage par le PI, devrait être homogène et stable. Le CV du pic de la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est généralement inférieur à 03%, plus que le CV est diminué plus que la précision de la quantification d'ADN est meilleure. Dans notre cas le CV de MFI G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> des lymphocytes témoin était 7.29% ; IC95% [5.82-8.77]. Donc supérieur à 03%. Ceci est dû d'une part à l'énergie du laser bleu du cytomètre Attune Nxt à 50mW qui est deux fois supérieur à ce qui utilisé sur les autres cytomètres, dont l'énergie du laser bleu est entre 13 et 25mW ; d'autre part elle est due au filtre du BL3 695nm/40 qui ne récupère théoriquement que 16.9% de la lumière émise par le PI, tandis que le filtre recommandé par le fabricant est le 585nm/42 qui récupère environ 50% de la lumière PI.

L'index ADN calculer par le rapport MFI du pic G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> des blastes divisé par la MFI G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> des lymphocytes. La valeur normale dans la littérature de l'index ADN dans l'état diploïde est compris entre 0,95 et 1,06. Dans notre étude nous avons obtenu des valeurs un peu plus élevées, chez les témoins la moyenne de l'index ADN des blastes était à 1,09 avec un

intervalle de confiance à 95% [1,04-1,14]. L'index ADN des cellules granuleuse des témoins était de 1,08 IC95% [1,05-1,11]. Ces valeurs élevées sont concordant avec les CV élevés obtenus.

Afin de pouvoir interpréter les résultats de nos patients, nous avons calculé les valeurs normales de l'index ADN sur la base de la moyenne de l'index chez les témoins  $\pm 2ET$ , soit pour les blastes un intervalle [0,9-1,28], où l'hyperdiploïdie est définie par un  $ID > 1,28$  et l'hypodiploïdie par un  $ID < 0,9$ . Ces valeurs sont certainement plus élevées que celle de la littérature, donc le test va perdre un peu de sensibilité mais il gagne de spécificité ce qui nous permettra de faire une évaluation primaire de cette technique.

L'interprétation de nos résultats par ces valeurs nous a permis la mise en évidence de 5 cas d'hyperdiploïdie sur les 33 cas soit un pourcentage de 15,2% dans la population générale des hémopathies malignes analysées. Nous avons noté une nette prédominance significative de l'hyperdiploïdie dans les LAL-B par rapport aux autres types d'hémopathies malignes. En effet nous avons 4 cas d'hyperdiploïdie parmi les 11 cas de LAL-B soit un pourcentage de 36,3% et un seul cas d'hyperdiploïdie parmi 14 cas de LAM soit un pourcentage de 7,14%. Ces résultats sont très similaires à ce qui a été décrit dans la littérature où l'hyperdiploïdie est mise en évidence dans environ 30% des cas LAL-B (Anthony V et al., 2003).

Dans une étude récente menée à Taiwan sur 233 cas de LAL-B, le taux d'hyperdiploïdie retrouvé par cytométrie en flux était de 31,2% (Yu et al., 2020).

Dans une étude plus ancienne menée en Espagne sur 205 cas de leucémie aigue myéloblastique la fréquence d'hyperdiploïdie (Vidriales et al., 1995) était à 4%. Les résultats obtenus sur notre petite série sont donc satisfaisants, néanmoins la technique nécessite des améliorations afin d'obtenir un CV des pics  $G_0/G_1$  plus aligné avec les recommandations internationales.

La quantification d'ADN et la détermination du cycle cellulaire par cytométrie en flux est une technique très prometteuse qui pourra avoir plusieurs domaines d'applications surtout en cancérologie. La détermination de l'index ADN dans le cas des LAL-B, a un intérêt pronostique considérable, il a été démontré qu'il offre une meilleure sensibilité par rapport à la technique de cytogénétique conventionnelle. En outre, la quantification de la phase S du cycle cellulaire des cellules tumorales en culture, permet à son tour l'évaluation de leur pouvoir prolifératif. La CMF est une technique très rapide à réaliser et moins laborieuse que les techniques de cytogénétique conventionnelle, cependant dans l'analyse des hémopathies

malignes il est très pertinent de réaliser un marquage multiparamétrique, afin de bien séparer les différentes populations cellulaires et sélectionner la population d'intérêt. Actuellement il existe d'autres réactifs colorants d'ADN, offrant la possibilité de marquage multiparamétrique comme le « FxCycle Far Red Stain » ou le « Vybrant® DyeCycle™ Green Stains ».

# **Conclusion**

## Conclusion

L'étude du cycle cellulaire et du contenu en ADN par cytométrie en flux est une technique parfaitement maîtrisée standardisée dans de plusieurs laboratoires et constitue actuellement un moyen d'étude d'un intérêt certain.

L'immunophénotypage par cytométrie en flux a connu un essor très important et est devenu de plus en plus multiparamétrique, permettant l'analyse simultanée de multiples paramètres à l'échelon cellulaire. C'est une technique de haute performance qui joue un rôle primordial dans les laboratoires cliniques facilitant le diagnostic des hémopathies malignes dont la leucémie aiguë.

A travers notre étude, nous avons contribué à la mise au point de l'analyse mono-paramétrique du cycle cellulaire. Ce qui nous a permis d'une part la détermination du contenu en ADN dans les différentes phases du cycle aussi bien pour des cellules normales que pour des cellules tumorales des hémopathies malignes qui signifie une leucémie aiguë.

Dans notre analyse de la quantification d'ADN chez les personnes présentant une suspicion d'une leucémie aiguë nous avons pu trouver à l'aide des histogrammes d'ADN la valeur d'index d'ADN, le CV (coefficient de variation) et le pourcentage de la phase S.

La comparaison entre la valeur d'index d'ADN chez nos témoins et des patients atteints d'une leucémie aiguë nous a permis de différencier l'ADN entre l'état diploïde et l'hyperdiploïde.

Le contenu d'ADN de nos témoins conserve la ploïdie alors que l'ADN anormal indique la présence d'une anomalie soit l'hyperdiploïdie et l'hypodiploïdie.

Dans notre catégorie des malades atteints de la leucémie aiguë et en comparaison avec les témoins nous avons trouvé un pourcentage élevé d'hyperdiploïdie et notamment dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B qui sont en stade de maturation de type 2.

Avec cette étude de comparaison le risque d'hyperdiploïdie dans la LAL-B est à 3 fois supérieur aux autres types de LA. Le contenu en ADN conserve la diploïdie et l'index prolifératif est très bas contrairement aux témoins positifs de prolifération dont l'index prolifératif indique la présence d'une prolifération élevée.

L'étude des histogrammes mono-paramétrique du contenu d'ADN des cellules tumorales a révélé la présence de clones cellulaires anormaux à ADN aneuploïde. L'étude du cycle cellulaire par CMF est d'un intérêt indiscutable dans la biologie clinique et constitue un outil de rigueur en



## Conclusion

---

oncologie clinique. Cette technique permet d'une part la contribution au diagnostic du cancer par l'identification et la classification des cellules anormales, d'autre part, de donner un pronostic selon la phase proliférative de synthèse de l'ADN.

# **Références Bibliographiques**

## Références Bibliographiques

- Anthony V. Moorman., Sue M. Richards., Mary Martineau., Kan Luk Cheung., Hazel M., Robinson, G., Reza Jalali, Zoë J., Broadfield ., Rachel L., Harris Kerry E., Taylor ., Brenda E ., S Gibson ., Ian M., Hann ., Frank G H ., Hill Sally E., Kinsey , Tim O. B. Eden, Christopher D. Mitchell., Christine J., Harrison. 2003. « for the United Kingdom Medical Research Council's Childhood Leukaemia Working Party Out come heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lympho blastic leukemia ». *Blood* 102 (8): 2756–2762.
- Bagwell, C. B. 1993. « Clinical Flow Cytometry : Principles and Applications » (K. D. Bauer.R. E. Duque, and T. V. Shankey. eds.), Williams & Wilkins. Baltimore, MD, pp. 41-62.
- BAISCH H ., Becb H P. 1978. « Comparison of cell kinetic parameters obtained by flow cytometry and autoradiography ». *Biomathematics and Cell Kinetics* ,Eds A.-J. Valleron and P. D. M. Macdonald, p : 4, 1, 1. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- BAISCH H ., EHDE .,W hNDEN.,W.A. 1993. « Analysis of PCP data to determine the fraction of cell in the various phases of cell cycle ». *Rad. Environ. Bbphys.* 153 1.
- BAISCH H., Becb H.P. 1978. « Comparison of cell kinetic parameters obtained by flow cytometry and autoradiography ». *Biomathematics and Cell Kinetics* . 41 : 1.
- Baish H., Gohde W., Linden W.A. 1976. « Mathematic alanalysis of pulse-cytophotometric data to determine the fraction of cells in a various phases of cell cycle ». *Radiat. Environ. Biophys*, 12: 31-39.
- Baldetorp Bo., Olle Stal., Olfa Ahrens., CeesCornelisse., Willem Corver., Ursula Falkmer., Marten Ferno. 1998 « different calculation methods for flow cytometric S-phase fraction » . prognostic implications in breast cancer The Swedish Society of Cancer Study Group *Cytometry*, 33: 385-393.
- Batsakis JG., MD ., Nour Sneige, MD ., Adel K. El-Naggar. 1993. « Flow cytometric (DNA content and S-phase fraction) analysis of breast cancer ». *CANCER Supplement*, 71 : 2151-2153.
- BECK., H.P. 1977. « Proliferation skinetische Unter suchungen an Zellkul turen ». Thesis, University Hamburg , 1 I, 139.
- Béné MC, Lacombe F. 2013 .« Leucémies aiguës : immunophénotypage leucocytaire par cytométrie en flux ». *EMC – Biologie médicale* , 8(3) : 1-11.

## Références Bibliographiques

- Béné MC., Lacombe F. 2013 . « Leucémies aiguës : immunophénotypage leucocytaire par cytométrie en flux ». EMC - Biologie médicale 8(3) : 1-11 Article 90-15-0096.
- Blanchard Frederic., Michael E., Rusiniak . 2002 « Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals and yeast ». Mol. Biol. Cell, Vol 13, 5 : 1536-1549
- Blanchet P., Brown S., Hirsch A.M ., Marie D., et Watanabe K. 1992. «Détermination des niveaux de ploïdie dans le genre *Actinidia* Lindl». par cytométrie en flux, Fruits, 47, 451-460.
- Botchan Michael. 1996. « Coordinating DNA replication with cell division : current status of the licensing concept ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 9997-10000
- Brinkley, B. 2001. «Management du jeu de numéros de centrosome : du chaos à la stabilité dans la division cellulaire de cellule cancéreuse». Tendances en biologie cellulaire, 11(1) : 18-21.
- Brinkley, B., 2001. « Management du jeu de numéros de centrosome : du chaos à la stabilité dans la division cellulaire de cellule cancéreuse ». Tendances en biologie cellulaire, 11(1) : 18-21.
- Broca, P. 1869. «Traité des tumeurs: Des tumeurs en particulier. Première partie. Tome deuxième». P. Asselin.
- Bruce Alberts .1999 . « L'essentiel de la biologie moléculaire de la cellule ». Paris : Flammarion.
- Bushnell., Rochester., J Trotter., La Jolla. « Inside the Flow Cytometer : Hardware » . Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of DiseaseMechanisms. 3642-22
- Chen K.C., Attila Csikasz-Nagy. 2000. « Kineticanalysis of molecular model of the budding yeast cell cycle ». Mol Biol. Cell 11 (1) : 369-391.
- Cindy Celeste ; Réhane Delisle. 2013-2014. « Travail de diplôme Optimalisation de procédures analytiques en vue d'analyses en cytométrie de flux ». Ecole Supérieure de la Santé, TAB 53<sup>ème</sup>.
- Cohen-Fix Orna and Douglas Koshland. 1997. « The metaphase to anaphase transition : avoiding a mid life crisis ». Current Opinion in Cell Biology , 9:800-806.
- Cooper S. 1988 . « The continuum model and c-myc synthesisduring the division cycle ». J Theor Biol. Dec7, 135(3) : 393-400.

- Craig F. E., Foon K. A. 2008. « Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms ». *Blood* , vol 111, 8.
- Craig F., E Foon K A . 2008 . « Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms, *Blood* vol : 111, 8.
- Crissman H.A. 1995. « Cell cycle analysis by flow cytometry in Cell growth and apoptosis (a practical approach series) ». Edit. G.P, Studzinski. USA: IRL press :21-40.
- Dean, P. N. 1985. « In Flow Cytometry : Instrumentation and Data Analysis » Academic Press, New York , 195-221.
- Dean, P. N. 1990. « Flow Cytometry and Sorting » Wiley-Liss, New York : 415-444.
- DEAN, P.N ., JEIT., J.H. 1974. « Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry ». *J. Cell Biol.* 60,523.
- Diffley JFX . 2001. « DNA replication: building the perfect switch. *Curr. Biol* ». 11 : 367-370
- Dominguez-Brauer C., Thu K., maçon J., Blaser H., Braillement M. 2015. « valeurs maximales de concentration au poste de travail, T. Désignation d'objectifs de la mitose dans le cancer » .Stratégies apparaissantes, *Cellule moléculaire*, 60(4) : 524-536.
- Dutta A., and Bell SP.1997. « Initiation of DNA replication in eukaryotic cells ». *Annu Rev Cell Dev. Biol*, 13 : 293-332
- Eddaoudi A., Canning SL ., Kato I.2018. « Flow Cytometric Detection of G0 in Live Cells by Hoechst 33342 and Pyronin Y Staining ». *Methods Mol Biol* , 1686 : 49-57.
- Elledge S.P. 1996. « Cell cycle checkpoints : preventing an identity crisis ». 274 : 1664-72.
- Fang Fang ., John W Newport. 1991. « Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes ». *Cell*, 66: 731-742.
- FRIED J. 1976. « Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry ». *Comp. Biomed Res.* 9 : 263.
- FRIED J. 1977. « Analysis of deoxyribonucleic acid histograms from flow cytofluorometry ». *J. Histochem. Cytochem.* 25,942.
- FRIED, J. & MANDEL, M. 1979. « Multi-user system for analysis of data from flow cytometry ». *Comput. Programs Biomed.* 10,218.
- GRAY J.W. 1974. « Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms ». *J. Histochem. Cytochem.* 22,642.

## Références Bibliographiques

- GRAY, J.W. 1976 « Cell-cycle analysis of perturbed cell populations : computer simulation of sequential DNA distributions ». *Cell Tissue Kinet.* 9,499.
- Guacci V., Hogan E., Koshland D .1997. « Centromere position in budding yeast : evidence for anaphase A. *Mol Biol Cellin budding yeast : evidence for anaphase A* ». *Mol Biol Cell* , 8:957-972
- GUENNOUN H., 2019. «LES PERTURBATIONS DU CYCLE CELLULAIRE ET CANCER». *Journal of Pathology, J Pathol*, 226 : 352–364
- Hardware Bushnell., Rochester., NY USA and J Trotter., La Jolla., CA USA, « Inside the Flow Cytometer, Published by Elsevier Inc ». electronics, threshold , page : 3655.
- Holtt Shown E ., Dara L., Aisner ., Jerry W., Shay., and Wooding E., Wright. 1997 .« Lack of cell cycle regulation of telomerase activity in human cells » . *P.N.A.S. USA* , 94: 10687-10692
- Honigberg Saul M., Robert M., Mc Carroll ., Rochelle Easton Esposito.1993. « Regulatory mechanisms in meiosis ». *Current Opinion in Cell Biology* , 5 : 219-225
- Hunt Tim and Nasmyth Kim. 1997. « Cell multiplication: Editorial overview » . *Current Opinion in Cell Biology*, 9 : 765-767
- Ishimi Y., Claude A., Bullock P and Hurwitz J. 1988. « Complete enzymatic synthesis of DNA containing the SV40 orig in of replication ». *J. Biol. Chem*, 263(36) : 19723-19733
- J.F. Viallard., F. Lacombe., F. Belloc., J.L. Pellegrin., J. Reiffers . «Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire » aspects fondamentaux et implications en cancérologie, *Cancer/Radiothérapie*, Volume 5, Issue 2 : 2001.
- Janssen A., et Medema R., 2011. « Mitose comme objectif anticancéreux ». *Oncogene*, 30(25) : 2799-2809.
- JEIT J.H. 1978. « Mathematical analysis of DNA histograms from asyni hronous and synchronous cell populations ». *Third Internutional Symposium on Pulse Cytophotometry* , 93. EuropeanPress, Ghent.
- JOHNSTON D.A ., WHITE, R.A. & BARLOGIE, B. 1978. « Automatic processing and interpretation of DNA distributions : comparison of several techniques. *Comp* ». *Biomed. Res.* 11 : 393.
- Jouault H. 2002. «Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës». *Revue française des laboratoires*, 344, 25-30.

- Kallioniemi P., Visakorpi T., Holli K., Heikkinen A., Isola J., Koivula T. 1991. « Improved prognostic impact of S-phase values from paraffin-embedded breast and prostate carcinomas after correcting for nuclear staining ». *Cytometry* 12:413-421, 1991
- Kami Ahmad., Kent G. Golic. 1999. « Telomere loss in somatic cells of drosophila causes cell cycle arrest and apoptosis ». *Genetics*, 151:1041-1051
- Kimberley A. Gavin., Masumi Hidaka., Bruce Stillman. 1995. « Conserved initiator proteins in eukaryotes ». *Science*, 270 : 1667-70
- Kubie M.A., A. Radbruch., Springer Verlag., Hong Kong. 2000. « Flow cytometry and cell sorting. 2nd edition ».
- Lacombe F. 1991. « Techniques d'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux en hématologie et en cancérologie ». *Revue française des laboratoires*, N 218.
- Lacombe F. 1991. « Techniques d'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux en hématologie et en cancérologie ». *Revue française des laboratoires*, N 218.
- LEES O. 2000. « Immunophénotypage : apport de la cytométrie en flux à la biologie clinique ». *Revue Française des Laboratoires*, 327 : 91-103.
- LEES O. Immunophénotypage. 2000. « apport de la cytométrie en flux à la biologie clinique ». *Revue Française des Laboratoires*, 327 : 91-103.
- LEOPOLD GUSTAVE LEHMAN. 2011. « COURS DE CYTOMETRIE ». Université Catholique d'Afrique Centrale Centre Supérieur des Sciences de la Santé.
- Li R., Murray AW. 1991. « Feedback control of mitosis in budding yeast ». *Cell*, 66 : 519-531.
- Lizard G et al. 2003. « Microbilles, nanobilles et cytométrie : application à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire ». *Pathologie Biologie*, 51: 418-427.
- Lizard G. 2003. « Microbilles, nanobilles et cytométrie : application à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire ». *Pathologie Biologie*, 51: 418-427.
- Malumbres M., Barbacid M. 2001. « To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer ». *Nature Rev Cancer* 1: 222-31.
- Meijer L., Jezequel A., Ducommun B. 2000. « Progress in Cell Cycle Research ». vol. 4, Plenum Press, New York, (21 chapitres) p : 248.
- Meijer L., Jezequel A., Roberge M. 2003. « Cell Cycle Regulators as Therapeutic Targets ». *Progress in Cell Cycle Research*, vol. 5, (54 chapitres), 549.

- Merle-Béral H., Graff-Tavernier M. 2008 .« Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux (Elsevier Masson SAS, Paris) ».Hématologie, 13-000-L-10.
- Misha Rahman. « Ph.D Principles of fluorescence ». Introduction to Flow Cytometry.
- Misha Rahman. 2006. « Ph.D. Principal of flow cytometer ». Introduction to Flow Cytometry.
- Misha Rahman., Ph.D.2006 . « Principal of flow cytometer » . Introduction to Flow Cytometry, Edition.
- Müller W .2000. « Simultaneous flow cytometric detection of bromodeoxyuridine incorporation in Flow cytometry and cell sorting ». 2nd edition. Edit. A. Radbruch. Springer Verlag, Hong Kong : 105-111
- Nam Koh K., Park M., Kim BK., Joon Im H., Park C., J Jang S., Sook Chi ., H, Seo JJ. 2010 . « Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow Cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia ». Korean J Pediatric ,53 (11) :957-964.
- Nam Koh K., Park M., Kim BK., Joon Im H., Park C.J., Jang S., Sook Chi ., H Seo JJ. 2010 . « Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow Cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia ». Korean J Pediatric , 53(11) : 957-964.
- Nurse Paul. 2000. « A long twentieth century of the cell cycle and beyond ». Cell, 100:71-78.
- Ormerod M.G. 2003. « DNA flow cytometry ». Molecular Biology in Cellular Pathology.
- Ormerod M.G. 2003. « DNA flow cytometry ». Molecular Biology in Cellular Pathology.
- Ouafae IBBA, « APPLICATIONS DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS » THESE N° : 35,2012
- Pardee AB ., J Pathol. 1986. « Biochemical and molecular events regulating cell proliferation ». 149(1) : 1-2.
- Pardee AB. 1974. « A restriction point for control of normal animal cell proliferation ». Proc Natl Acad Sci USA , 71 (4) : 1286-90.
- Planas-Silva M.D., Weinberg R.A. 1997. « The restriction point and control of cell proliferation ». Current Opinion in Cell Biology, 9 : 768-772



- Preston-Martin S., Pike M., Ross R., et Henderson B. 1993. « Preuve épidémiologique pour le plus grand modèle de prolifération cellulaire de la carcinogenèse ». Points de vue de santé environnementale, 101 (supplément 5) : 137-138.
- Rabinovitch P .S. « DNA content histogram and cell-cycle analysis in methods in cellbiology. Edit. Robinson ». USA:Academic press, 1994, VOL 41.
- Rebillard, A. 2007. «Rôle des caractéristiques membranaires et du récepteur de mort Fas dans l'apoptose induite par le cisplatine» . Doctoral dissertation, Rennes 1.
- Reed S.I.1997. « Control of the G1/S transition ». Cancer Surv, 29 : 7-23.
- Rieko Ohki., ToshikiTsurimoto., and Fuyuki Ishikawa. 2001 .« In vitro reconstitution of the end replication problem ». Mol .Cell Biol, 21 : 5753-5766
- Robert, J. 2013. « Biologie de la métastase. Bulletin du cancer ». 100(4), 333-342.
- Roger D ; Riley S ; Edwin M ; Mahin J. 1988. « Clinical applications of flow cytometry ». ASCP national meeting, Las Vegas, Nevada,.
- ROGER D., RILEY S., EDWIN M., MAHIN J. 1988 . « Clinical applications of flow cytometry ». ASCP national meeting, Las Vegas, Nevada.
- Roger S Riley., MD. « Ph.D. and Michael Idowu, M.D. Principles and Applications of Flow Cytometry Department of Pathology Medical College of Virginia/VCU Health Systems Virginia Commonwealth University Richmond » VA.
- Ronot X ., Aubry JP., Banchereau J.1988. « La cytométrie de flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique ». Medsi mc grow-Hill, Volume 1 : 80-82.
- Rudner AD., Murray AW. 1996. « The spindle assembly checkpoint ». Current Opinion in Cell Biology, 8 : 773-780.
- S. Wulff. 2006. « Guide to flow cytometry ».2nd Edition Dako.
- Schutte B., Monique M.F.J. Tinnemans., Gio F.P Pijpers., Marie-Hélène J.H Lenders., Frans C.S. Remaekers.1995. « Three parameter flow cytometric analysis for simultaneous detection of cytokeratin, proliferation associated antigen sand DNA content ».Cytometry, 21: 177-186
- Schutte B., Monique MFJ., Tinnemans ., Gio FP Pijpers., Marie-Hélène JH Lenders ., Frans CS Remaekers. 1995. « Three parameter flow cytometric analysis for simultaneous detection of cytokeratin, proliferation associated antigensand DNA content » .Cytometry, , 21 : 177-186
- Sherr C J. 1993 . « Mammalian G1 Cyclins ». Cell 73:1059-1065.

- Sorger Peter K., Max Dobles., Regis Tournebize and Anthony A Hyman.1997. « Coupling cell division end cell death to microtubule dynamics ». *Current Opinion in Cell Biology*, 9 : 807-814.
- Straight AF., Marshall WF., Sedat JW., Murray AW. 1997. « Mitosis in living budding yeast : anaphase A but no metaphase plate ». *Science* , 277:574-578.
- T Bushnell., Rochester., J Trotter., La Jolla. « Inside the Flow Cytometer : Hardware » . *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of DiseaseMechanisms*. 3642-22 .
- Thomas PN ., Bruce A., Edgar. 1998. « Connections between growth and cell cycle ». *Current opinion in Cell Biology*, 10:784-790
- Vidriales, M. B. 1995 « DNA aneuploidy in acute myeloblastic leukemia is associated with a high expression of lymphoid markers ». *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 22.1 : 22-25.
- Watson JV. 2001 . « Flow Cytometry ». 43: 55-68.
- Watson JV. 2010. « Flow Cytometry » 43: 55-68p
- WATSON, J.V. 1977. « The application of age distribution theory in the analysis of cytofluorometric DNA histogram data ». *Cell Tissue Kinet.* 10, 157.
- Yu, Chih-Hsiang . 2020. « MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia ». *Scientific reports* 10.1 : 1-11.
- ZIETZ, S., NICOLINI, C. 1978. « Flow microfluorometry and cell kinetics : areview ». *Blomathematics and Cell Kinetics* (Fds A.-J. Valleron and P. D. M. Macdonald), p. 357. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

# **Annexes**

## **Les Réactifs :**

- **Liquide de focalisation Attune™** : 1X tamponné, solution sans azide qui transporte les particules focalisées vers la cellule d'écoulement pour l'interrogation au laser.
- **Solution de lavage Attune™** : solution 1X pour minimiser le bruit de fond en enlevant les débris cellulaires et les colorants du système fluide de l'instrument ;
- **Solution d'arrêt Attune™** : solution 1X pour minimiser la formation de bulles et le dépôt de cristaux dans le système fluide lorsque l'instrument est arrêté ;
- **Solution Attune™ De-Bubble** : solution 1X pour éliminer les bulles et les particules collantes du système fluide ;
- **Solution de lyse à haut rendement HYL** « HIGHT YIELD LYSE » ;
- **Solution tampon de PBS** ;
- **Les solutions des Anticorps monoclonaux conjugués aux fluorochromes** ;
- **10% Bleach** : Pour décontaminer les lignes fluidiques. Être préparé chaque jour ;  
10% d'eau de Javel est définie comme une dilution de 1 dans 10 (1 partie d'eau de Javel à 9 parties d'eau) d'hypochlorite de sodium à 5,25% dans l'eau ;
- **Eau désionisée** : Utilisée pour diluer l'eau de Javel. Doit être très filtré et stérile ;
- **Les billes de contrôle de la performance Attune**, lot N° : 1759476 ;
- **Kit de perméabilisation de cellules FIX & PERM®** : La Solution A et la Solution B ;
- **FxCycle™ PI/RNase** ;
- **Vybrant® DyeCycle™ Red stain** ;
- **Kit RAL 555 : Fix-RAL 555 ;**  
**EOSIN-RAL 555 ;**  
**BLUE-RAL 555 ;**
- **7-aminoactinomycine-D (7-AAD).**

<b>Année universitaire 2020 – 2021</b>	<b>Présenté et soutenu par : BENMERZOUG Cheima FILALI kaltoum</b>
<b>Quantification d'ADN par cytométrie en flux pour les patients atteints d'une leucémie aigue</b>	
<b>Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Physiologie Cellulaire et Physiopathologie</b>	
<b>Contexte et objectifs :</b>	
<p>Les leucémies aigües sont des hémopathies malignes qui nécessitent un diagnostic et une prise en charge rapide. Avec la CMF, le diagnostic et le suivi de ces maladies est de plus en plus facile, rapide et complet.</p>	
<p>Notre objectif basé sur la mise au point de la technique dans l'analyse de la quantification d'ADN et du cycle cellulaire chez les personnes en suspicion d'une leucémie aigüe en déterminant l'index d'ADN des blastes et la valeur pronostiques de l'état d'aneuploïdie dans LA.</p>	
<b>Matériel et méthodes :</b>	
<p>Notre étude prospective inclus 53 échantillons 39 provenant d'une ponction de la moelle osseuse et du sang périphérique (39 présentant une leucémie aigüe 15 étaient témoins) nouvellement diagnostiqués par la technique de cytométrie en flux au niveau du service d'hématologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine.</p>	
<b>Résultats :</b>	
<p>Dans cette étude de recherche d'anomalie dans le contenu d'ADN nous avons indiqué les valeurs MFI et à partir duquel on a trouvé l'état d'aneuploïdie ; pour identifier l'état de nos malades, cela se fait par la technique de cytométrie en flux avant d'indiquer le type de la leucémie aigüe à l'aide des anticorps monoclonaux pour l'identification de notre population blastique. Sur cette population blastique nous avons réalisé l'analyse du contenu d'ADN par un double marquage : anticorps avec le PI. En prenant en considération la valeur de nos témoins d'index d'ADN était [0.9-1.28] pour la comparaison avec nos malades et nous avons trouvé que l'aneuploïdie existe chez les leucémies aigües lymphoblastiques de type B avec un pourcentage de 36,6% est la plus fréquentes avec un index supérieur à 1.28 et donc cela explique l'hyperdiploïdie.</p>	
<b>Conclusion :</b>	
<p>Nous avons noté une nette prédominance significative de l'hyperdiploïdie dans les LAL-B par rapport aux autres types d'hémopathies malignes.</p>	
<b>Mots clés :</b>	
<p>Quantification d'ADN ; leucémie aigue ; immunophénotypgae ; quantification d'ADN.</p>	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire d'hémobiologie à l'hopital militaire regional universitaire de Constantine.	
<b>Présidente :</b> Pr ROUABAH Leila (Pr-UFM Constantine-1)	
<b>Encadrants :</b> Dr OUNIS Leyla (MCB-UFM Constantine-1)	
Dr ZOUITEN Raouf (MAHU en Hémobiologie Faculté de medecine)	
<b>Examinatrice :</b> Dr DAHMANI DAHBIA Ines (MCB-UFM Constantine-1)	