

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional
le 3 Juillet 1990

par

Marie-Pierre HAYETTE

**IMMUNOCYTOCHIMIE ET DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES
AIGUES : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE UTILISANT
LE COMPLEXE PHOSPHATASE ALCALINE ANTICORPS
ANTI-PHOSPHATASE ALCALINE**

Jury : Président : Monsieur le Professeur DUTHILLEUL

Membres : Monsieur le Professeur DURIEZ
Monsieur le Professeur COSSON
Monsieur ARROCK, Maitre de conférences à
l'Université Paris V
Madame LEPELLEY, Praticien hospitalier à
l'Hôpital Calmette de Lille

Directrice : Marie Hélène ESTIENNE

PLAN

	PAGE
INTRODUCTION.....	1
I -LES LEUCEMIES AIGUES : RAPPELS...	3
I.1 - LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES.....	4
I.1.1 - CLINIQUE.....	4
I.1.2 - CYTOLOGIE.....	5
I.1.3 - CYTOCHIMIE.....	5
I.1.4 - LA CLASSIFICATION FAB.....	5
I.1.4.1 - FAB et LAL.....	6
I.1.4.2- FAB et LAM.....	6
I.1.5 - ULTRASTRUCTURE.....	7
I.1.6 - CYTOGENETIQUE.....	7
I.1.7 - IMMUNOLOGIE	9
I.1.7.1 - Cytométrie en flux.....	9
I.1.7.2 - Immunogold.....	10
I.1.7.3 - Immunocytochimie : APAAP - ABC.....	10
I.2 - LES PROFILS IMMUNOLOGIQUES.....	12
I.2.1 - PROFILS IMMUNOLOGIQUES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION MEDULLAIRE.....	12 12
I.2.1.1 - Myélomonocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire.....	12 12
I.2.1.2 - Des cellules T et B.....	12
I.2.2 - PROFILS IMMUNOLOGIQUES AU COURS DES LA.....	12
I.2.2.1 - LAL.....	12
I.2.2.2 - LAM.....	13

II - IMMUNOCYTOCHIMIE.....	14
II.1 - HISTORIQUE.....	15
II.2 - IMMUNOTOCHIMIE EN APAAP.....	15
II.2.1 - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE APAAP.....	15
II.2.2 - MATERIEL.....	17
II.2.2.1 - Echantillons.....	17
II.2.2.2 - Anticorps monoclonaux.....	18
II.2.2.3 - Fixateurs.....	19
II.2.2.4 - Réactifs APAAP.....	20
II.2.2.4.1- Le kit Immunotech.....	20
II.2.2.4.2- Les réactifs Dakopatts.....	21
II.2.2.4.3- Substrat.....	22
II.2.3 - METHODE.....	23
II.2.3.1 - Schéma général de la technique.....	23
II.2.3.2 - Fixation.....	23
II.2.3.3 - Précautions.....	24
II.2.4 - RESULTATS.....	25
II.2.4.1 - Immunophénotypage avec Immunotech.....	25
II.2.4.2 - Essai d'un nouveau substrat de la phosphatase alcaline.....	26
II.2.4.3 - Immunophénotypage avec Dakopatts.....	28
II.2.4.3.1-Validation.....	28
II.2.4.3.2-Etudes des paramètres techniques....	29
1) Dilution.....	29
2) Fixation.....	31
3) Amplification.....	33
4) Diminution du bruit de fond.....	34

5) Essai d'un Ac anti GP IIIa.....	35
6) Contre-coloration à l'Hématoxyline de Mayer.....	36
7) Conclusion sur la technique APAAP.....	37
II.2.4.3.3- Immunophénotypage de LAM.....	37
CAS N°1.....	37
CAS N°2.....	38
CAS N°3.....	39
CAS N°4.....	40
CAS N°5.....	41
CAS N°6.....	41
CAS N°7.....	42
II.2.4.4 - Bilan.....	43
II.3 - IMMUNOCYTOCHIMIE EN ABC.....	46
II.3.1 - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ABC.....	46
II.3.2 - MATERIEL.....	46
II.3.2.1 - Echantillons.....	46
II.3.2.2 - Anticorps monoclonaux.....	46
II.3.2.3 - Fixateurs.....	46
II.3.2.4 - Réactifs ABC.....	47
II.3.3 - METHODE.....	48
II.3.3.1 - Schéma général de la technique.....	48
II.3.3.2 - Fixation.....	49
II.3.4 - RESULTATS.....	49

III - DISCUSSION / CONCLUSION...	50
ANNEXE.....	57
ICONOGRAPHIE.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	62

Le diagnostic des leucémies aiguës (LA), bénéficie à l'heure actuelle de différents outils complémentaires. Même si la classification FAB (Franco-Américaine-Britannique) reste la référence, il n'en demeure pas moins vrai que l'introduction des anticorps (Ac) monoclonaux a ouvert des perspectives nouvelles en associant des profils immunologiques aux différents types de leucémies aiguës.

Des techniques immunocytochimiques utilisant différents enzymes, phosphatase alcaline et peroxydase, associés à des systèmes d'amplification, complexes phosphatase alcaline anticorps anti-phosphatase alcaline (APAAP) ou peroxydase anticorps anti-peroxydase (PAP) ou avidine-biotine peroxydase (ABC), permettent de travailler directement sur frottis sanguins ou médullaires.

Ce travail propose une mise au point de la technique à l'APAAP sur lame, afin de répondre au problème posé par les moelles pauvres en blastes dont l'étude est difficile à réaliser par immunofluorescence en cytométrie de flux.

- 1 -

LES LEUCEMIES AIGUES :

RAPPELS

I. 1 - LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES

=====

Les leucémies aiguës (LA) sont dues à la prolifération incontrôlée de clones cellulaires transformés, qui envahissent les organes hématopoiétiques et parfois le sang.

Les clones cellulaires sont constitués de cellules souches hématopoiétiques appelées leucoblastes ou blastes, qui ont perdu leur capacité de maturation.

En l'absence de traitement, ce type d'affection conduit généralement vers la mort de façon rapide.

Aussi, il est essentiel de poser un diagnostic dont la précision permettra d'adapter le traitement : pour cela, on dispose de plusieurs moyens complémentaires qui associent la clinique, la cytologie, la cytochimie, l'étude ultrastructurale, la cytogénétique et l'immunologie.

I.1.1 - CLINIQUE

=====

Il est difficile de dresser un tableau clinique typique des LA à cause de la très grande variabilité des lésions tumorales, des complications et des degrés de gravité.

L'installation des troubles est rapide et le plus souvent, le patient arrive dans un état grave.

Le diagnostic doit être évoqué devant l'association d'une pancytopenie, d'un état infectieux et d'un syndrome tumoral touchant les organes hématopoiétiques : ces trois signes représentant le cas le plus classique.

Par ailleurs, il est indispensable pour poser le diagnostic de LA de confirmer les signes cliniques grâce à l'analyse des cellules tumorales qui débute toujours par l'étude cytologique.

I.1.2 - CYTOLOGIE

=====

Dans la majorité des cas, l'hémogramme montre une pancytopenie avec hyperleucocytose due essentiellement à la présence de cellules blastiques. Néanmoins, devant toute pancytopenie, avec ou sans blastose périphérique, le myélogramme s'impose. C'est sur celui-ci que s'effectuera le diagnostic cytologique.

Habituellement, le frottis médullaire est riche et permet une étude morphologique précise. En cas de myélofibrose, la réalisation d'une biopsie médullaire est nécessaire mais rend l'étude cytologique plus difficile.

A l'heure actuelle, le typage morphologique des LA repose sur la classification FAB (cf I.1.4.), qui associe également l'analyse cytochimique.

I.1.3 - CYTOCHIMIE

=====

Les réactions cytochimiques, indispensables et réalisées sur frottis médullaire, permettent de révéler la présence d'enzymes spécifiques d'une ou plusieurs lignées cellulaires.

On recherche principalement la myéloperoxydase, les estérases et la coloration au PAS (acide périodique et réactif de Schiff). La présence d'une myéloperoxydase signe le caractère myéloïde des blastes : c'est la première réaction cytochimique mise en oeuvre à la suite du diagnostic cytologique.

Néanmoins, la positivité de ces réactions pour un type cellulaire est inconstante : une réaction négative n'exclut pas le diagnostic de LAM.

I.1.4 - CLASSIFICATION FAB

=====

Jusqu'au milieu des années 1970, le diagnostic des LA ne bénéficiait d'aucune classification bien standardisée.

Aussi, afin d'uniformiser les résultats et comparer les séries sur le plan international, un groupe de coopération franco-américain-britannique (FAB) a proposé en 1976 une première classification des LA (BENNETT et coll. 1976), qui a été modifiée et complétée par la suite, en 1981 pour les LAL (BENNETT et coll. 1981) puis en 1982 pour les LAM (BENNETT et coll. 1982).

A l'heure actuelle, la classification FAB est pratiquement admise et appliquée dans tous les laboratoires.

I.1.4.1 - FAB et LAL

Depuis la première classification FAB des LA en 1976 (BENNETT et coll. 1976) définissant trois types morphologiques L1, L2, L3, les critères ont été révisés en introduisant un système de scores pour les L1 et L2 (BENNETT et coll. 1981). Celui-ci tient compte du rapport nucléocytoplasmique, de la présence, de la visibilité et du nombre de nucléoles, de la régularité de la membrane nucléaire et de la taille des cellules.

I.1.4.2- FAB et LAM

Le groupe FAB a classé les LAM en sept types morphologiques de M1 à M7 (BENNETT et coll. 1976) : nous insisterons sur la mise en évidence de la myéloperoxydase nécessaire à l'exclusion d'une LAL ou d'une M7. Le tableau I donne les pourcentages des cellules présentes dans les LAM, M1 à M6, et entrant dans leur classification.

Aussi, afin d'uniformiser les résultats et comparer les séries sur le plan international, un groupe de coopération franco-américain-britannique (FAB) a proposé en 1976 une première classification des LA (BENNETT et coll. 1976), qui a été modifiée et complétée par la suite, en 1981 pour les LAL (BENNETT et coll. 1981) puis en 1982 pour les LAM (BENNETT et coll. 1982).

A l'heure actuelle, la classification FAB est pratiquement admise et appliquée dans tous les laboratoires.

I.1.4.1 - FAB et LAL -----

Depuis la première classification FAB des LA en 1976 (BENNETT et coll. 1976) définissant trois types morphologiques L1, L2, L3, les critères ont été révisés en introduisant un système de scores pour les L1 et L2 (BENNETT et coll. 1981). Celui-ci tient compte du rapport nucléocytoplasmique, de la présence, de la visibilité et du nombre de nucléoles, de la régularité de la membrane nucléaire et de la taille des cellules.

I.1.4.2- FAB et LAM -----

Le groupe FAB a classé les LAM en sept types morphologiques de M1 à M7 (BENNETT et coll. 1976) : nous insisterons sur la mise en évidence de la myéloperoxydase nécessaire à l'exclusion d'une LAL ou d'une M7. Le tableau I donne les pourcentages des cellules présentes dans les LAM, M1 à M6, et entrant dans leur classification.

CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE		M1	M2	M4	M5	M6
BLASTES Cellules nucléées totales Cellules non érythroblastiques	...	>30	>30	>30	...	<30 ou >30
	90 (I + II) T	>30	>30	>30	>80 [†]	>30
ERYTHROBLASTES ET CELLULES NUCLEES TOTALES GRANULOCYTES *, CELLULES NON ERYTHROBLASTIQUES MONOCYTES **, CELLULES NON ERYTHROBLASTIQUES	...	<50	<50	<50	...	>50
	< 10	>10	>20	<20	<20	Variable
	< 10	<20	>20	>80 [†]	>80 [†]	Variable

T : Blastes de type I et II selon BENNETT (1982)

† : Monoblastes dans M5a ; dans M5b, les cellules prédominantes sont des promonocytes et monocytes

* : Promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes et neutrophiles

|| : Peut inclure des myéloblastes

** : Promonocytes et monocytes

Tableau I : Critères quantitatifs proposés pour la classification des L.A. en 1985
(d'après BENNETT et coll. 1985a)

En ce qui concerne la LAM6, BENNETT (1985a) a proposé une nouvelle classification pour faciliter sa différenciation avec un syndrome myélodysplasique (cf figure 1).

Le diagnostic de la LAM7 repose sur l'examen de frottis sanguin et la mise en évidence en microscopie électronique à transmission de peroxydase plaquettaire dans les blastes (BENNETT et coll. 1985b).

I.1.5 - ULTRASTRUCTURE

=====

L'étude ultrastructurale des blastes en microscopie électronique à transmission a été riche d'enseignement.

En effet, la cytochimie ultrastructurale a permis d'identifier des blastes d'aspect cytologique indifférencié notamment par la mise en évidence des peroxydases, myéloperoxydase ou peroxydase plaquettaire (BRETON, GORIUS et coll. 1981).

Par ailleurs, la présence de ferritine liée à la membrane permet d'identifier les érythroblastes dans les leucémies érythroblastiques (REIFFERS et coll. 1985). Néanmoins, cette technique est lourde et nécessite un appareillage coûteux associé aux compétences d'un spécialiste.

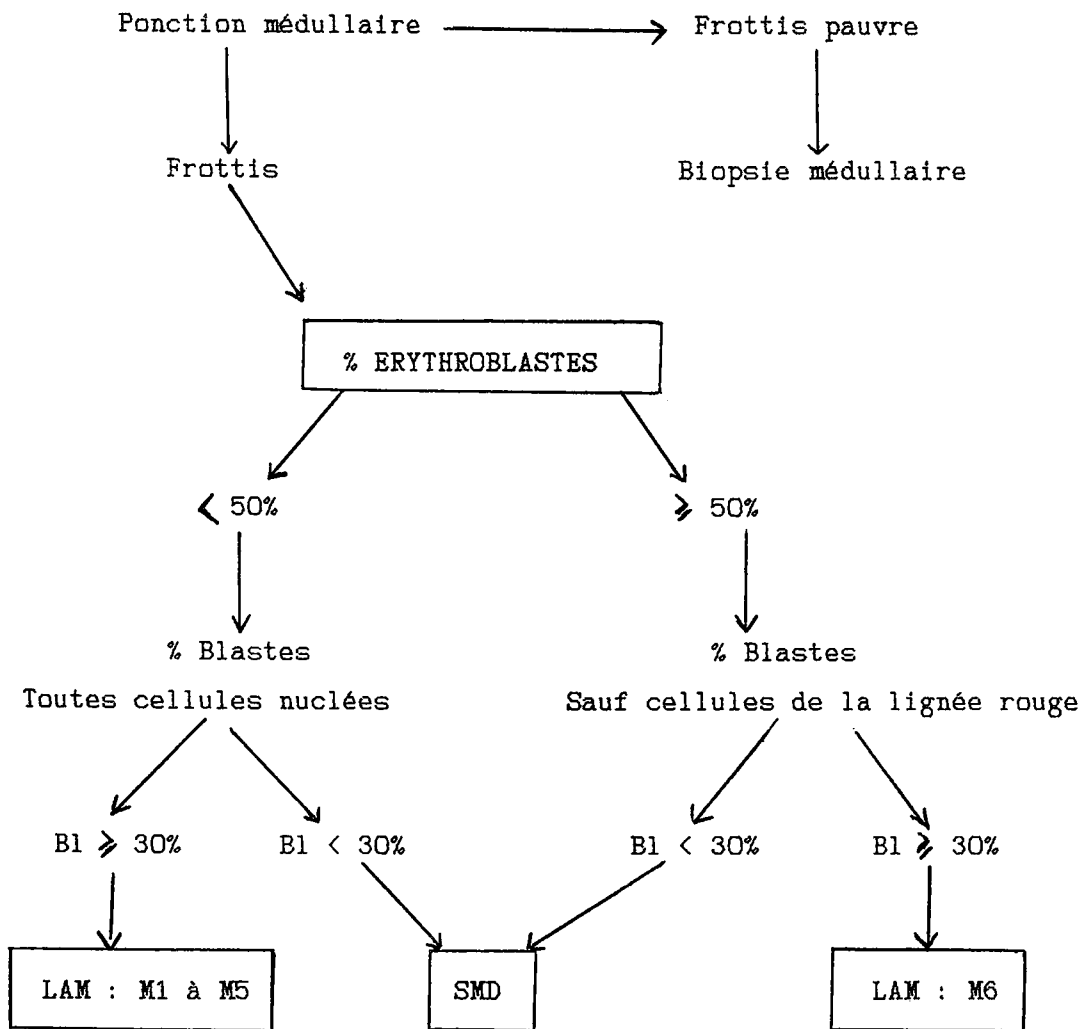
I.1.6 - CYTOGENETIQUE

=====

L'étude du caryotype dans les LA montre souvent des anomalies. Celles-ci sont variables, sans caractère systématique, présentes seulement dans une partie des cellules et disparaissent avec la rémission complète.

Certaines de ces anomalies permettent cependant d'identifier les blastes : par exemple, le chromosome 14q+ serait spécifique de la lignée lymphoïde B (CIMINO et coll. 1978) ; la translocation 15-17 [t(15q+ ; 17q-)] se rencontre uniquement dans la LAM3 (COLOMB et coll. 1976).

Néanmoins, l'étude cytogénétique n'est réalisée qu'à titre exceptionnel et dans ce cas, à visée épidémiologique.



LAM = Leucémie aiguë myéloïde
SMD = Syndrome myélodysplasique
M6 = Leucémie aiguë érythroblastique
B1 = Blastés

Figure 1 : Séparation entre M6 et syndrome myélodysplasique (SMD)

I.1.7 - IMMUNOLOGIE

=====

L'étude immunologique des blastes a tout d'abord bénéficié de la mise au point de techniques de marquage des lymphocytes. Les techniques usuelles, rosettes de mouton (lymphocytes T) et mise en évidence des immunoglobulines de surface sur les lymphocytes B, ont fait apparaître trois groupes de LAL (T, B, non B- non T) qui restent à l'heure actuelle l'élément majeur de leur classification. En ce qui concerne les LAM, l'apport de l'immunologie apparaît secondaire.

L'application des anticorps monoclonaux dans le domaine de l'hématologie, quelques années seulement après leur découverte (TRAGER et JENSEN 1976), a été le détonateur qui a permis l'établissement des premiers profils immunologiques des LA. La révélation des antigènes par les anticorps monoclonaux utilise des marqueurs différents, ce qui permet de distinguer trois techniques principales :

- l'immunofluorescence
- l'immunogold
- l'immunoenzymologie.

I.1.7.1 - Cytométrie en flux

A l'heure actuelle, l'immunofluorescence bénéficie de l'automatisation grâce au cytomètre en flux. Ce dernier analyse les cellules à partir d'une suspension cellulaire qui doit comporter 10^5 à 10^6 cellules par millilitre. L'étude des échantillons pauvres en cellules est exclue de la technique.

Les cellules (sang, moelle osseuse, ganglion) sont pré-enrichies au Ficoll, en gradient de centrifugation, avant d'être triées par l'appareil : ceci améliore le rendement et la qualité du marquage. Après leur mise en suspension, les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal, puis avec l'antiglobuline fluorescente, et injectée par pression en flux laminaire, ce qui les aligne à la vitesse de 100 à 5000 par seconde sur le trajet d'un faisceau laser. Chaque cellule est analysée sur plusieurs paramètres parmi lesquels la taille, la densité et l'intensité de la fluorescence émise.

Cette technique d'immunofluorescence indirecte présente l'avantage d'être rapide ; elle donne une quantification précise et analyse une large population cellulaire. De plus, elle permet le double ou triple marquage d'une même cellule.

L'étude de plusieurs marqueurs en parallèle permet d'établir le profil immunologique d'une hémopathie. En pratique courante, la procédure s'effectue en deux temps : tout d'abord, on utilise un panel de dépistage regroupant marqueurs myéloïdes et lymphoïdes ; par exemple CD2, CD7, (cellules T), CD10, CD19 (cellules B), CD13, CD14 (cellules myéloïdes), HLA-DR (cellules myéloïdes et lymphoïdes), puis d'autres marqueurs complémentaires affinent le diagnostic dans un deuxième temps.

L'immunocytométrie en flux est sans doute dans ce domaine la technique la plus utilisée en pratique médicale courante.

I.1.7.2 - Immunogold

Le marquage à l'immunogold est une méthode indirecte qui utilise un anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal. La forte densité aux électrons de l'or colloïdal associée à la possibilité de sélectionner la taille des particules en font une technique particulièrement adaptée aux études ultrastructurales (ROTH J. 1983).

I.1.7.3 - Immunocytochimie : APAAP - ABC

Les méthodes immunocytochimiques permettent de révéler des antigènes cellulaires sur frottis par des techniques directes ou indirectes. Ce dernier type de marquage est beaucoup plus sensible et l'utilisation de systèmes amplificateurs abaisse encore le seuil de détection.

En microscopie optique, le marquage des anticorps s'opère couramment avec des enzymes : les plus utilisés sont la phosphatase alcaline et la peroxydase.

On décrit par ailleurs deux systèmes d'amplification :

- système enzyme/anti-enzyme
(Peroxydase / Ac antiperoxydase = PAP)
(Phosphatase alcaline / Ac antiphosphatase alcaline = APAAP)

- système avidine - biotine couplé à la peroxydase
(ABC : avidin biotin complex)

Néanmoins, ces méthodes sont encore peu utilisées en pratique hématologique courante car leur mise en oeuvre est longue et l'interprétation délicate.

Nous avons choisi cependant d'adopter la technique de marquage utilisant l'APAAP, à l'immunophénotypage des L.A. sur lame.

I.2 - LES PROFILS IMMUNOLOGIQUES

=====

Les profils immunologiques des LA ont pu être définis grâce à l'étude de grandes séries et l'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux.

Il faut souligner qu'il n'existe pas de marqueur spécifique des cellules blastiques : tous les antigènes sont exprimés à un stade ou l'autre de la différenciation cellulaire normale.

I.2.1 - PROFILS IMMUNOLOGIQUES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION MEDULLAIRE

=====

I.2.1.1 - Myélomonocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire

Sur la figure 2, sont représentés les principaux antigènes de différenciation exprimés en surface des cellules.

I.2.1.2 - Des cellules T et B

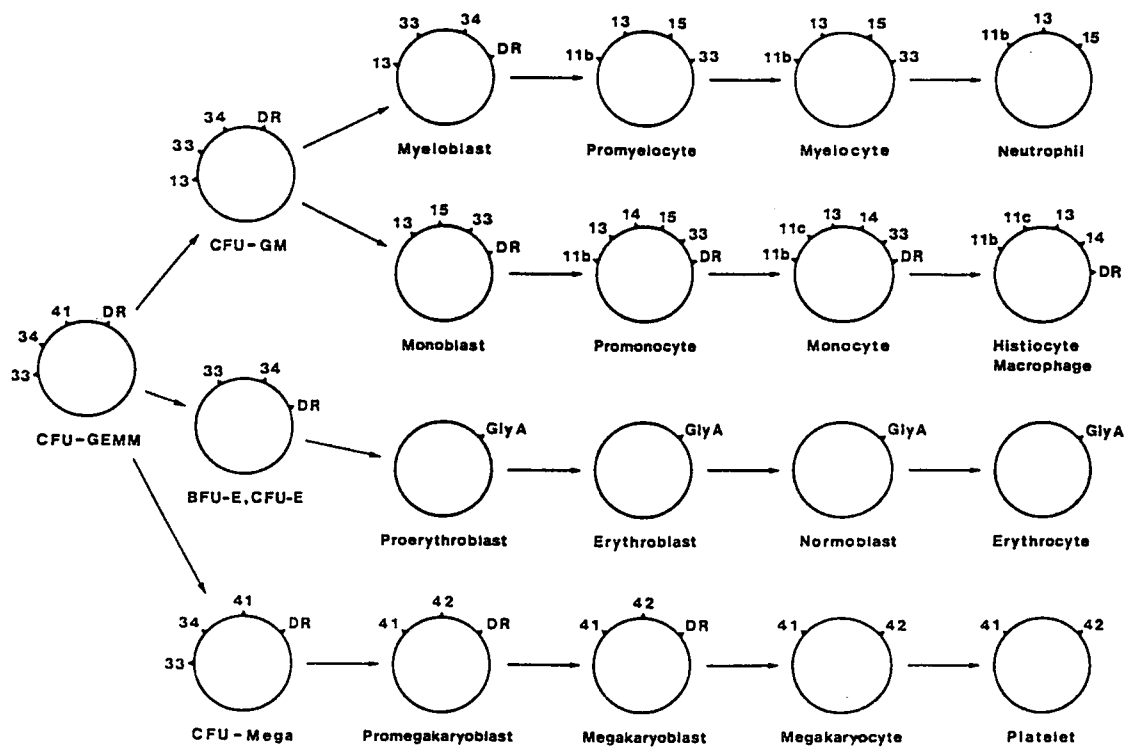
Les figures 3 et 4 permettent de visualiser les antigènes au cours de la différenciation des cellules T et B.

I.2.2 - PROFILS IMMUNOLOGIQUES AU COURS DES LA

=====

I.2.2.1 - LAL

Le classement immunologique des LAL est fondé sur les modèles proposés par REINHERTZ E.L. (1980 et DONGEN J.J.M. (1987), pour les LAL T (cf figure 5), par NADLER (1984) pour les autres LAL (cf figure 6).



DR = HLA - DR

CFU-GEMM = Colony forming unit = progéniteur granulo-érythro-monomyélocytaire

CFU-E = progéniteur érythroblastique

CFU-GM = progéniteur mégacaryocytaire

BFU-E = burst forming unit = progéniteur érythroblastique précoce

Figure 2 : Représentation schématique des profils immunologiques au cours des différenciations des cellules monomyéloïdes, érythrocytaires et mégacaryocytaires (d'après DREXLER et coll. 1988)

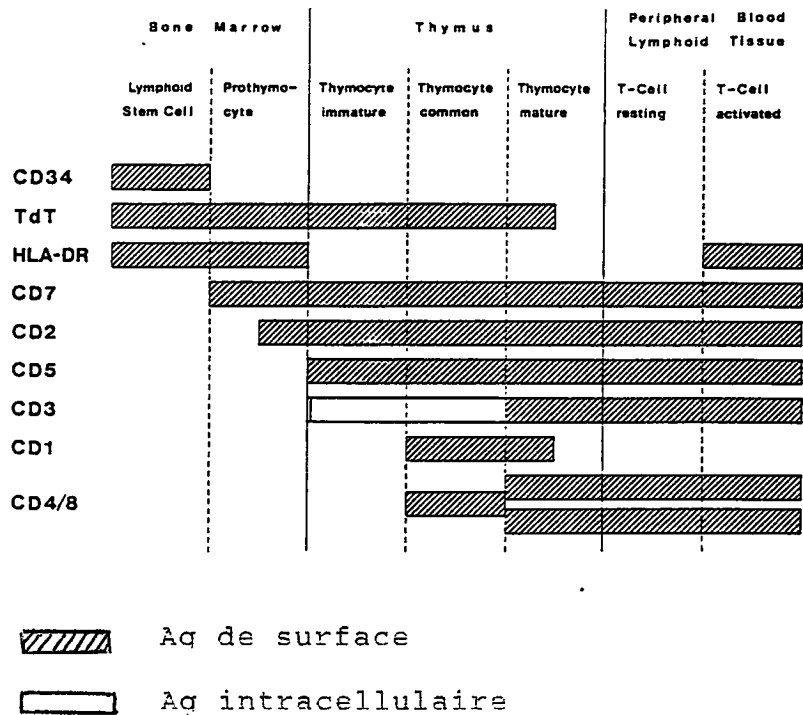


Figure 3 : Profils immunologiques au cours de la différenciation des cellules T (d'après DREXLER et coll. 1988)

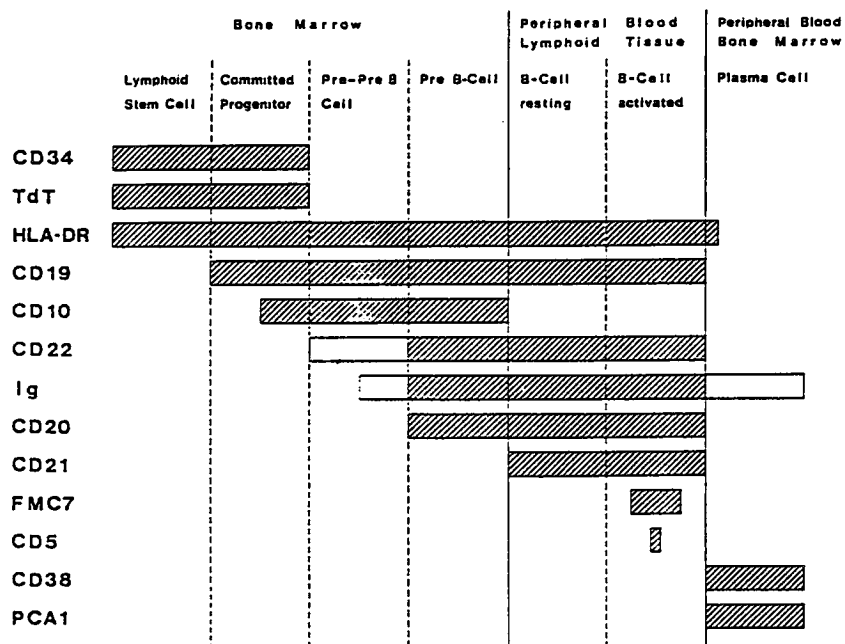


Figure 4 : Profils immunologiques au cours de la différenciation des cellules B (d'après DREXLER et coll. 1988)

Group	HLA-DR	CD10	TdT	CD7	CD2	CD5	CyCD3	SmCD3	CD1	CD4/3
A	■	■	■	■	■					
B		■	■	■	■	■	■			
C		■	■	■	■	■	■		■	■
D			■	■	■	■	■		■	■
E			■	■	■	■	■			■
F				■	■	■	■	■		■

classification de Donnen et al (1987)

Figure 5 : Profils immunologiques des LALT
(d'après DREXLER et coll. 1988)

Group	TdT	HLA-DR	CD19	CD10	CD20	CyCD22	CyIgM	SmIg
I	■	■						
II	■	■	■					
III	■	■	■	■				
IV	■	■	■	■	■	■		
V	■	■	■	■	■	■	■	
VI		■	■		■	■	■	■

classification de Nadler et al (1984)

Figure 6 : Profils immunologiques des LAL B
(d'après DREXLER et coll. 1988)

	Group	CD13	HLA-DR	CD33	CD11b	CD15	CD14
Précursor myéloïde	I	+	+	+	-	-	-
Myéloblaste	II	+	+	+	+	+	-
Promyélocyte	III	+	-	-	+	+	-
Promonocyte monocyte	IV	+	+	+	+	+	+

Classification de Griffin

Figure 7 : Profils immunologiques des LAM
(d'après DREXLER et coll. 1988)

L'intérêt pronostique des profils immunologiques des LAL a été nettement défini pour les quatre LAL les mieux définies sur le plan immunologique. Ainsi, du meilleur pronostic au plus défavorable, on classe:

- chez les enfants : c LAL > Null-LAL > T-LAL > B-LAL
(C LAL = Common LAL = blastes portant l'antigène CALLA
= common acute lymphoblastic leukemia antigen) ; cet antigène
est commun aux lymphocytes des LLC et aux thymocytes.
- chez les adultes : T-LAL > c LAL > Null-LAL > B-LAL

(DREXLER et coll. 1988)

I.2.2.2. - LAM

Les profils immunologiques des LAM semblent présenter un moindre intérêt pronostique. Néanmoins, la classification immunologique des LAM est fondée sur les modèles de GRIFFIN (1983) (cf figure 7).

Pour conclure cette première partie, il faut souligner que l'on tente actuellement de plus en plus d'établir des corrélations entre les différentes approches diagnostiques. Cela a débouché sur une nouvelle classification morphologique, immunologique et cytogénétique : la classification MIC. La première réunion du First MIC Cooperative Study Group a eu pour thème les leucémies aiguës lymphoblastiques (First MIC Cooperation Study Group, 1986), la seconde a traité des LAM (Second MIC Cooperation Study Group 1986).

Néanmoins, jusqu'à nos jours, la classification FAB reste la plus largement utilisée dans les laboratoires d'hématologie pour le diagnostic des LA.

L'intérêt pronostique des profils immunologiques des LAL a été nettement défini pour les quatre LAL les mieux définies sur le plan immunologique. Ainsi, du meilleur pronostic au plus défavorable, on classe:

- chez les enfants : c LAL > Null-LAL > T-LAL > B-LAL
(C LAL = Common LAL = blastes portant l'antigène CALLA = common acute lymphoblastic leukemia antigen) ; cet antigène est commun aux lymphocytes des LLC et aux thymocytes.
- chez les adultes : T-LAL > c LAL > Null-LAL > B-LAL

(DREXLER et coll. 1988)

1.2.2.2. - LAM

Les profils immunologiques des LAM semblent présenter un moindre intérêt pronostique. Néanmoins, la classification immunologique des LAM est fondée sur les modèles de GRIFFIN (1983) (cf figure 7).

Pour conclure cette première partie, il faut souligner que l'on tente actuellement de plus en plus d'établir des corrélations entre les différentes approches diagnostiques. Cela a débouché sur une nouvelle classification morphologique, immunologique et cytogénétique : la classification MIC. La première réunion du First MIC Cooperative Study Group a eu pour thème les leucémies aiguës lymphoblastiques (First MIC Cooperation Study Group, 1986), la seconde a traité des LAM (Second MIC Cooperation Study Group 1986).

Néanmoins, jusqu'à nos jours, la classification FAB reste la plus largement utilisée dans les laboratoires d'hématologie pour le diagnostic des LA.

Group	CD13	HLA-DR	CD33	CD11b	CD15	CD14
I	shaded	shaded	shaded	white	white	white
II	shaded	shaded	shaded	shaded	shaded	white
III	shaded	white	white	shaded	shaded	white
IV	shaded	shaded	shaded	shaded	shaded	shaded

Figure 7 : Profils immunologiques des LAN
(d'après DREXLER et coll. 1988)

- II -

IMMUNOCYTOCHIMIE

II. 1 - HISTORIQUE

=====

L'introduction des anticorps monoclonaux en hématologie, au cours de l'année 1981, a fait entrer l'analyse immunologique dans la pratique hématologique courante.

Les premières études ont été réalisées en immunofluorescence indirecte, sur cellules fraîches de sang ou de moelle. Mais malgré leur simplicité et leur fiabilité, elles souffrent de quelques inconvénients en utilisation de routine.

En effet, les échantillons doivent être traités dans les 24 heures; de plus, il n'est pas possible d'observer la morphologie des cellules marquées ; les préparations ainsi traitées ne peuvent pas être conservées longtemps ni réexaminées et il faut une population cellulaire assez homogène.

Les techniques immunoenzymatiques sur frottis se sont donc développées parallèlement, offrant l'avantage d'un examen simultané de la morphologie cellulaire, d'une bonne conservation des échantillons, marqués ou non, et de l'analyse possible des échantillons contenant peu de blastes.

II. 2 - IMMUNOCYTOCHIMIE EN APAAP

=====

II.2.1 - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE APAAP

=====

La technique de marquage à l'APAAP est une méthode de détection immunologique indirecte sur lame (MOIR D.J et coll. 1983, CORDELL J.L. et coll. 1984).

L'anticorps de liaison est lié au complexe APAAP, constitué par de la phosphatase alcaline animale liée à un anticorps monoclonal de souris antiphosphatase alcaline (cf figure 9).

II. 1 - HISTORIQUE

=====

L'introduction des anticorps monoclonaux en hématologie, au cours de l'année 1981, a fait entrer l'analyse immunologique dans la pratique hématologique courante.

Les premières études ont été réalisées en immunofluorescence indirecte, sur cellules fraîches de sang ou de moelle. Mais malgré leur simplicité et leur fiabilité, elles souffrent de quelques inconvénients en utilisation de routine.

En effet, les échantillons doivent être traités dans les 24 heures; de plus, il n'est pas possible d'observer la morphologie des cellules marquées ; les préparations ainsi traitées ne peuvent pas être conservées longtemps ni réexaminées et il faut une population cellulaire assez homogène.

Les techniques immunoenzymatiques sur frottis se sont donc développées parallèlement, offrant l'avantage d'un examen simultané de la morphologie cellulaire, d'une bonne conservation des échantillons, marqués ou non, et de l'analyse possible des échantillons contenant peu de blastes.

II. 2 - IMMUNOCYTOCHIMIE EN APAAP

=====

II.2.1 - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE APAAP

=====

La technique de marquage à l'APAAP est une méthode de détection immunologique indirecte sur lame (MOIR D.J et coll. 1983, CORDELL J.L. et coll. 1984).

L'anticorps de liaison est lié au complexe APAAP, constitué par de la phosphatase alcaline animale liée à un anticorps monoclonal de souris antiphosphatase alcaline (cf figure 9).

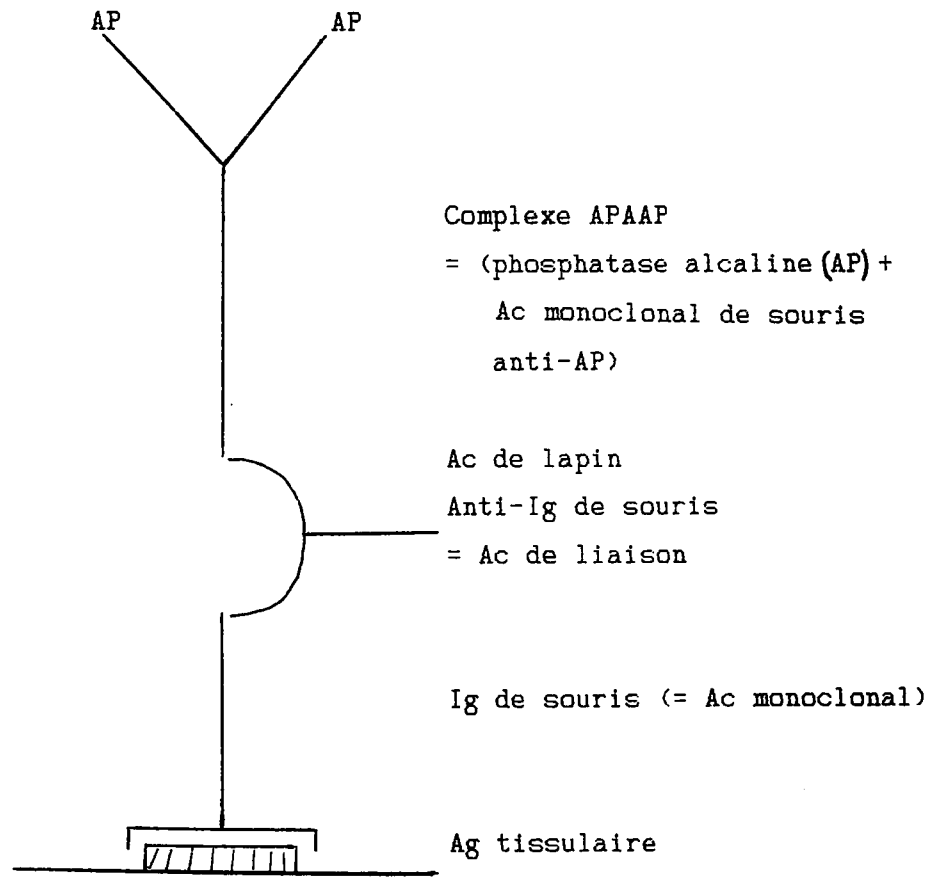


Figure 8 : Représentation schématique de la technique de marquage
à l'APAAP

Cette technique se découpe en quatre étapes :

1. Fixation de l'anticorps monoclonal spécifique de l'antigène
2. Fixation de l'anticorps de liaison
3. Fixation du complexe APAAP
4. Révélation de la réaction par le substrat de la phosphatase alcaline

Il existe également un système analogue à l'APAAP, fondé sur une révélation peroxydasique (PAP method) (MASON D.Y. et coll. 1977). Néanmoins, cette méthode, malgré sa très grande sensibilité, pose un problème quand on a affaire à un échantillon riche en éléments myéloïdes dotés d'une peroxydase puissante : ceci nécessite une étape d'inhibition de la peroxydase endogène au cours de la manipulation (par le méthanol + H₂O₂). De plus, l'observation est plus facile avec le marquage APAAP qui offre une coloration rouge, la coloration brune du PAP étant moins contrastée.

Dans la technique APAAP, la phosphatase alcaline endogène des polynucléaires est inhibée par le lévamisole ajouté à la solution substrat.

De plus, on peut augmenter l'intensité de la réaction finale par la répétition des étapes 2 et 3 : on parle d'amplification de la réaction (cf CORDELL et coll. 1984).

II.2.2 - MATERIEL

=====

II.2.2.1 - Echantillons

On travaille sur frottis de sang ou de moelle osseuse.

- Soit sur frottis frais : frottis gardés au moins 24 heures (pour une bonne fixation du frottis) et moins de 7 jours à température du laboratoire, à l'abri de la lumière et de la poussière.

- Soit sur frottis congelés : à -20°C ou -80°C (pour une plus longue conservation), emballés dans du papier aluminium, lames dos à dos, deux lames par paquet. Ne décongeler les lames que le jour de leur utilisation.

Cette technique se découpe en quatre étapes :

1. Fixation de l'anticorps monoclonal spécifique de l'antigène
2. Fixation de l'anticorps de liaison
3. Fixation du complexe APAAP
4. Révélation de la réaction par le substrat de la phosphatase alcaline

Il existe également un système analogue à l'APAAP, fondé sur une révélation peroxydasique (PAP method) (MASON D.Y. et coll. 1977). Néanmoins, cette méthode, malgré sa très grande sensibilité, pose un problème quand on a affaire à un échantillon riche en éléments myéloïdes dotés d'une peroxydase puissante : ceci nécessite une étape d'inhibition de la peroxydase endogène au cours de la manipulation (par le méthanol + H₂O₂). De plus, l'observation est plus facile avec le marquage APAAP qui offre une coloration rouge, la coloration brune du PAP étant moins contrastée.

Dans la technique APAAP, la phosphatase alcaline endogène des polynucléaires est inhibée par le lévamisole ajouté à la solution substrat.

De plus, on peut augmenter l'intensité de la réaction finale par la répétition des étapes 2 et 3 : on parle d'amplification de la réaction (cf CORDELL et coll. 1984).

II.2.2 - MATERIEL

=====

II.2.2.1 - Echantillons

On travaille sur frottis de sang ou de moelle osseuse.

- Soit sur frottis frais : frottis gardés au moins 24 heures (pour une bonne fixation du frottis) et moins de 7 jours à température du laboratoire, à l'abri de la lumière et de la poussière.

- Soit sur frottis congelés : à -20°C ou -80°C (pour une plus longue conservation), emballés dans du papier aluminium, lames dos à dos, deux lames par paquet. Ne décongeler les lames que le jour de leur utilisation.

La décongélation est rapide : il faut laisser les lames emballées dans le papier aluminium pendant une heure à température ambiante : ceci évite la condensation sur le frottis.

II.2.2.2 - Anticorps monoclonaux

Nous avons utilisé un panel d'anticorps monoclonaux, parmi ceux qui sont le mieux adaptés à des techniques sur lames (cf tableau II).

ANTICORPS MONOCLONAL		NOM COMMERCIAL	ISOTYPE
anti-	Source		
CD2	Immunotech	IOT11	IgG
CD3	Immunotech	IOT3	IgG
CD5	Becton Dickinson/ Immunotech	Leu1 / IOT1	IgG
CD7	Immunotech	IOT7	IgG
CD10	Immunotech/Coulter	IOT5 / J5 CALLA	IgG/IgG
CD11b	Immunotech	IOM1	IgG
CD13	Coulter	My7	IgG
CD14	Immunotech/Coulter	IOM2 / My4	IgG/IgG
CD15	Becton Dickinson	LeuM1	IgM
CD19	Immunotech/Dakopatts	IOB4/CD19 Dako	IgM/IgG
CD20	Coulter	B1	IgG
CD22	Dakopatts	CD22 Dako	IgG
CD33	Coulter	L1B1	IgG
HLA-DR	Immunotech	IOT2A	IgG
CDW41	Dakopatts	CDW41 Dako	IgM
Anti IIIa	Dakopatts	IIIa Dako	IgG

Tableau II : Source des AC

Certains Ac sont issus d'un second fabricant lors de leur renouvellement, lorsque le premier ne nous a pas donné entière satisfaction.

II.2.2.3 - Fixateurs

De très nombreux fixateurs potentiels sont disponibles. Néanmoins, la fixation est un compromis entre la préservation de l'antigène et la conservation de la morphologie cellulaire.

Ainsi, la présence de formol dans un fixateur permet de conserver la morphologie mais détruit certains antigènes. L'acétone conserve mieux des antigènes labiles et révèle les antigènes intracytoplasmiques, mais la morphologie cellulaire est moins bien préservée. Le méthanol lèse la membrane et permettrait d'accéder à des Ag cytoplasmiques.

Seront utilisés dans ce travail le BFA, l'acétone, l'acétone-méthanol-formol.

BFA (Buffer formalin aceton)

NaHPO4 12H2O	40 mg
KH2 PO4	120 mg
H2O distillée	30 ml
Acétone	45 ml
Formol 40%	25 ml

Ajuster à ph 6,6

Filtrer

Se conserve un mois à + 4°C

Acétone

Acétone tamponnée : acétone à 10% de TBS (ph 7,6) (cf II.2.2.4)

Acétone pure

Acétone - Méthanol - Formol (AMF) (préparation extemporanée)

Acétone pure	19 volumes
Méthanol	19 volumes
Formol	2 volumes

Acétone - Méthanol - Formol tamponné

AMF à 10% de TBS ph 7,6

II.2.2.4 - REACTIFS APAAP

Nous avons successivement utilisé les produits fabriqués par Immunotech sous forme de kit, puis ceux de Dakopatts livrés sous forme de produits indépendants. Il s'est en effet avéré que les produits en kit ont un coût plus élevé et offrent une moins grande souplesse de travail.

II.2.2.4.1 - Le kit Immunotech (KIT APAAP réf. 0412)

Le kit Immunotech fournit l'anticorps de liaison et le complexe APAAP prédilués, prêts à l'emploi. Le substrat est fourni sous forme de pastilles.

La méthodologie donnée par le fabricant a été suivie :

1. Description des réactifs (kit réf. 0412)

Flacon 1 : 10 ml d'anticorps de chèvre anti-IgG (chaîne lourde et chaîne légère) de souris purifié prédilué en tampon TBS pH 7,6, serum albumine bovine 1 g/l, azide de Na 0,015 M

Flacon 2 : 10 ml de complexe APAAP prédilué en TBS pH 7,6, serum albumine bovine 1 g/l, azide de Na 0,015 M

Flacon 3 : 10 pastilles de substrat de phosphatase alcaline contenant du

- . Naphtol AS-MX phosphate
- . Fast red TR
- . Levamisole

Flacon 4 : 20 ml de tampon Tris HCl 0,1 M à pH 8,2.

2. Préparation du tampon TBS (tampon de lavage)

(Tris buffered saline, tampon de lavage)

(0,05M Tris ; 0,15 M NaCl pH 7,6)

Solution Stock A (0,5 M / pH 7,6)

- . Dissoudre 60,55 g Tris dans 1 l d'H₂O distillée
- . Ajuster à pH 7,6 avec HCl concentré

Solution Stock B (1,5 M)

Dissoudre 87,66 g NaCl dans 1 l d'H₂O distillée

Solution de travail] = TBS pH 7,6

Solution A	100 ml
Solution B	100 ml
Eau distillée	QSP 1 l
Ajuster à pH 7,6	

3. Préparation de la solution substrat

Dissoudre une pastille dans 2 ml de tampon Tris (flacon 4).

Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex. Filtrer.

Nb : cette solution doit être utilisée dans les 30 minutes.

II.2.2.4.2- Les réactifs Dakopatts

Nous avons utilisé l'anticorps de liaison (Référence Z259) et l'APAAP (référence D 651) de Dakopatts (Danemark).

Anticorps de liaison : Immunoglobuline (Ig) de lapin anti IgG
(chaines lourdes et légères) de souris

Complexe APAAP : Complexe formé par la phosphatase alcaline intestinale de veau et une IgG monoclonale de souris anti-phosphatase alcaline.

Ceux-ci seront dilués en tampon TBS, pH 7,6 (cf II.2.2.4.1). Le choix des dilutions sera arrêté après plusieurs essais. On peut ici, dès à présent, insister sur le respect absolu du pH des tampons, afin d'éviter les faux négatifs.

II.2.2.4.3 - Substrat

Le kit Immunotech fournit le substrat. Cependant, il nous a paru intéressant de le préparer au laboratoire à partir des poudres de base selon la méthode suivante :

Substrat : Naphtol AS-MX phosphate 2 mg
à dissoudre
(n'utiliser que des récipients en verre) dans du
Diméthyl Formamide 200 µl
Tampon Tris 0,1 M pH 8,2 9,8 ml

Tampon Tris : (0,1M, pH 8,2)
Tampon Tris 0,4M 2,5 ml
Eau distillée QSP 1 ml

Solution de travail (extemporanée) :

1. Substrat 10 ml
2. Lévamisole 2,4 mg
3. Fast red violet LB salt 10 mg

Mélanger d'abord 1. et 2., puis ajouter 3., mélanger 30 secondes.

Filtrer directement sur les spots.

L'incubation doit se faire sous agitation pour éviter les dépôts et à l'abri de la lumière.

II.2.3 - METHODE

=====

II.2.3.1 - Schéma général de la technique APAAP

La technique APAAP se réalise à température du laboratoire et se décompose en plusieurs étapes :

1. Fixation
2. Réhydratation en tampon TBS : 15 mn
3. Dépôt de l'anticorps monoclonal: 30 mn
4. Rinçage en tampon TBS (10 mn)
5. Dépôt de l'anticorps de liaison : 30 mn
6. Rinçage en tampon TBS (10 mn)
7. Dépôt de l'APAAP: 60 mn
8. Rinçage en tampon TBS (10 mn)
9. Amplification (répétition des étapes 5 à 8)
10. Dépôt du substrat (20 mn)
11. Rinçage en TBS (10 mn)
12. Contre-coloration (5 mn) avec un colorant aqueux (non alcoolique car l'alcool diminue la coloration du substrat de la phosphatase alcaline). On utilise ici l'Hématoxyline de Mayer
13. Montage en glycérine - gélatine (pas d'Eukitt pour la même raison)

II.2.3.2 - Fixation

A chaque fixateur, correspond une méthodologie précise. Au cours du travail, plusieurs fixations ont été essayées pour chaque anticorps afin d'optimiser les résultats.

- La fixation au BFA, s'opère le jour même du marquage. Recouvrir les frottis avec du BFA à +4°C (sortir au moment de la fixation), pendant 20 à 40 secondes. Rincer la lame en la trempant rapidement dans l'eau distillée. Réhydrater en tampon TBS sans sécher avant.

- Les fixations à l'acétone et à l'acétone-méthanol formol (AMF) s'opèrent la veille du marquage.

Acétone : recouvrir les frottis 5 minutes avec l'acétone tamponnée à +4°C, puis 5 minutes à l'acétone pure à +4°C. Sécher les lames plusieurs heures, au mieux toute la nuit (sans rincer).

AMF : Préparer la solution extemporanément.

Recouvrir les lames avec l'AMF pendant 1 mn 30 s.

Rincer en trempant rapidement dans l'eau distillée.

Sécher.

II.2.3.3 - Précautions

Les techniques d'immunocytochimie requièrent une grande minutie et il semble important de souligner certains détails techniques :

1. Les frottis après la réhydratation ne doivent en aucun cas rester secs au cours de la manipulation.
2. La gravure des spots délimitant la partie du frottis qui supporte le marquage peut se faire au dos de la lame afin d'éviter toute détérioration et fragilisation du frottis.
3. Afin d'éviter un gâchis de réactif, on travaille sur des spots tracés dans la partie la mieux étalée du frottis.
4. Il est nécessaire de sécher les contours des spots avec du papier absorbant afin que les gouttes déposés ne soient pas dilués.
5. Eviter de laisser trop de tampon sur les spots, ce qui offre un facteur de dilution des solutions déposées par la suite.
6. Le respect des temps de rinçage est indispensable.
7. Il faut toujours éviter le jet direct sur le frottis lors d'un rinçage à la pissette.

II.2.4 - RESULTATS

II.2.4.1 - Immunophénotypage avec Immunotech

Nous avons successivement étudié 7 LAM avec le kit Immunotech (numérotées de 1 à 7 dans le tableau III). Les formules des frottis sanguins sont précisés dans l'ordre suivant :

Polynucléaires neutrophiles / Polynucléaires éosinophiles /
Polynucléaires basophiles / Lymphocytes / Monocytes / Blastos / Autres.

Pour les frottis de moelle, seul le pourcentage de blastos est donné.

Les résultats sont appréciés en pourcentage de blastos positifs. Pour 2 LAM des marquages au FACS sont présents dans le dossier et notés dans le tableau III (en bas à droite dans chaque case).

Sur le plan technique, voici quelques détails en ce qui concerne :

- la fixation : BFA pour les marqueurs myéloïdes et CDW41
Acétone pour CD20 CD22 et CD7
- les dilutions : Les Ac monoclonaux sont dilués au 1/20ème en TBS

La positivité apparaît sous forme de bâtonnets rouges (cf photo n°1) distribués en périphérie ou sur la totalité de la cellule ; le décompte est réalisé sur 200 cellules.

L'interprétation des lames fait intervenir plusieurs facteurs :

- le bruit de fond qui peut entraîner de fausses positivités dues à la présence de grains en périphérie des cellules,
- le marqueur, puisque l'expérience nous montre de grandes différences dans l'intensité du marquage des antigènes cellulaires par les anticorps monoclonaux.

Ces deux principaux paramètres nous ont poussés à fixer le seuil de positivité à 10% de blastos marqués.

% Blastés positifs LAM (FAB)		HLA-DR	CD 33	CD11b	CD 13	CD 14	CD 15	CD 20	CD 22	CD 7	CDW41	Myéloperoxydase (MPOD) (% blastés positifs)
1	LAM 1 GB: 27600/mm ³ Sang : 4-0-0-6-5 (%) 84 blastés 1 myélocyte	100	-	31	96	93	10	76	-	88	-	26
2	LAM 4 GB: 93200/mm ³ Sang : 9-0-0-4-5 (%) 78 blastés 1 myélocyte 3 plasmocytes	93	-	35	13	90	0	-	-	60	-	79
3	LAM 5 GB: 110 000/mm ³ Sang : 3-1-0-3-20 (%) 71 blastés 2 érythroblastés	15	-	0	5	15	0	-	-	0	-	26
4	LAM 2 MO : 55% blastés	85	-	0	23	75	0	-	-	4	-	100
5	LAM 4 GB: 75000/mm ³ Sang : 10-0-1-13-20 48 blastés 3 métamyélocytes 5 myélocytes	41	-	0	0	100	0	0	0	17	-	35
6	LAM 4 MO : 48% blastés	35	-	32	61	52	40	0	0	+ -	-	85
7	LAM 5 MO : 83% blastés	93	-	86	93	98	62	-	-	-	-	15

Tableau III : A propos de 7 LAM étudiées avec le kit Immunotech

Légende : - : non testé
O : 0%

Remarques :

- Le CD14 est positif dans les 7 LAM, ce qui semble surprenant pour une LAM1 ou LAM 2
- Le cas n°3, LAM5, est négatif en CD13 : néanmoins les pourcentages de la série sont très faibles.
- Le marquage du CD7 donne des résultats très positifs dans les cas n°1 et n°2.

Conclusion

A la lumière de cette première série de résultats, il nous a paru nécessaire d'améliorer les points suivants :

- contre-coloration
- bruit de fond
- sensibilité (CD14)
- spécificité (CD7)

Néanmoins, cette première série nous a encouragés à poursuivre dans la mesure où la morphologie cellulaire est conservée et la positivité facilement distincte grâce à la teinte rouge des bâtonnets.

**II.2.4.2 - Essai d'un nouveau substrat de la
phosphatase alcaline**

Nous avons préparé le substrat de la phosphatase alcaline au laboratoire (cf paragraphe II.2.2.4.3), afin de remplacer celui que fournit le kit Immunotech. Plusieurs types de substrats sont possibles (LY B. et coll. 1988, CORDELL et coll. 1984) : nous avons choisi celui de CORDELL (1984).

Nous avons noté un changement dans l'aspect du marquage qui passe des bâtonnets aux grains rouges (cf photo n°2).

Trois marqueurs CD 15, CD 14, HLA-DR ont été testés en parallèle avec substrat Immunotech et substrat du laboratoire. Il s'avère que les résultats obtenus sont tout à fait comparables.

Aussi, afin de confirmer ces résultats (obtenus sur une moelle normale), nous avons travaillé avec ce substrat sur une LAM 5b, en ne modifiant que ce paramètre dans la technique.

Nous avons utilisé pour cela des frottis de moelle. Ceux-ci comportent 83% de cellules à tous les stades de maturation du monoblaste au monocyte.

Les résultats consignés dans le tableau IV montrent la validité du substrat et concordent avec le profil d'une leucémie aiguë monoblastique (cf figure 2).

AC anti-	Dilution de l'anticorps monoclonal	% Blastés positifs
CD 11b	20	86
CD 13	20	93
CD 14	10	98
CD 15	10	62
HLA DR	10	93

Tableau IV

Conclusion

Le substrat sera désormais préparé au laboratoire, ce qui permettra l'essai des réactifs indépendants.

Aussi, afin de confirmer ces résultats (obtenus sur une moelle normale), nous avons travaillé avec ce substrat sur une LAM 5b, en ne modifiant que ce paramètre dans la technique.

Nous avons utilisé pour cela des frottis de moelle. Ceux-ci comportent 83% de cellules à tous les stades de maturation du monoblaste au monocyte.

Les résultats consignés dans le tableau IV montrent la validité du substrat et concordent avec le profil d'une leucémie aiguë monoblastique (cf figure 2).

AC — anti-	Dilution de l'anticorps monoclonal	% Blastés positifs
CD 11b	20	86
CD 13	20	93
CD 14	10	98
CD 15	10	62
HLA DR	10	93

Tableau IV

Conclusion

Le substrat sera désormais préparé au laboratoire, ce qui permettra l'essai des réactifs indépendants.

II.2.4.3 - Immunophénotypage avec les produits Dakopatts

II.2.4.3.1 - Validation

Nous avons utilisé dans un second temps les réactifs fournis par Dakopatts, employés par ailleurs par de nombreuses équipes de recherche parmi lesquelles CORDELL (1984), LY (1988). Ces produits plus souples d'utilisation ont aussi un coût plus faible.

Avant d'adopter définitivement Dakopatts, nous avons testé en parallèle les réactifs de ce fabricant avec le kit Immunotech utilisé jusqu'ici. Cela a été réalisé sur une moelle normale avec trois anticorps : CD11, CD14, HLA-DR; dilués au 20ème en TBS. L'anticorps de liaison (Dakopatts) est dilué au 25ème dans du TBS à 5% de sérum AB humain (pour éviter les réactions croisées) (MOIR et coll. 1983). Une amplification est réalisée.

Deux dilutions sont utilisées pour l'APAAP : 10ème et 50ème en TBS (cf tableau V)

Ac anti- / Réactifs	Dilution de l'Ac monoclonal	Immunotech	Dakopatts APAAP 10è	Dakopatts APAAP 50è
CD 11b	20	65	70	65
CD 14	20	80	81	78
HLA-DR	20	93	90	95

Tableau V : Comparaison Immunotech / Dakopatts

Dans ce tableau, figurent les pourcentages des cellules positives toutes classes confondues. On ne note pas de différence significative entre les deux types de réactifs.

De plus, chez Dakopatts, on observe une identité de résultats pour les dilutions 10è et 50è de l'APAAP.

Conclusion :

Cela permet d'adopter les réactifs de Dakopatts. La dilution de l'Ac secondaire sera désormais au 25^e en TBS avec du sérum AB neutre humain dont le pourcentage sera réétudié. La dilution de l'APAAP au 50^e semble ici souhaitable mais sera également revue.

Remarques

1. Lors de cette manipulation, le fond des frottis sur lequel se détachent les cellules marquées n'est pas aussi clair qu'on pourrait le souhaiter : ceci peut être dû à un défaut de rinçage, temps respecté ou bain de rinçage non suffisamment renouvelé, mais aussi à un marquage non spécifique. Ces divers points seront explorés par la suite.

2. Nous avons ici prolongé la contre-coloration à l'Hématoxyline de MAYER à 15 minutes afin d'intensifier le contraste nucléaire, ce qui apporte de meilleurs résultats : néanmoins, d'autres essais seront tentés par la suite.

3. Les CD11 et CD14 offrent une très forte positivité

II.2.4.3.2 - Etude des paramètres techniques

1) Dilution

Il nous a paru souhaitable de modifier les dilutions des anticorps monoclonaux et de l'APAAP, afin de comparer les effets de ces paramètres sur l'intensité de la coloration.

Nous avons testé 4 Ac sur une moelle normale (CD11b, CD13, CD14, CD15) ; l'Ac secondaire est dilué au 25^e en TBS à 5% de sérum AB neutre humain (cf tableau VI).

→ Commentaires :

*** Sur l'effet de dilution de l'anticorps monoclonal**

- L'expérience acquise et cette manipulation montre que la dilution de l'Ac monoclonal semble primordiale, ce qui souligne l'importance du rapport optimal entre l'antigène et l'anticorps.

- En ce qui concerne le CD14, la dilution au 20ème est insuffisante créant des faux positifs (93% de cellules positives dans cet essai).

Paramètre Ac anti-	Dilution de l'anticorps monoclonal	Dilution APAAP	Nombre d'amplification	Cellules positives (%)
CD11b	20	100	1	72
CD15	20	50	1	45
CD13	20	10	1	15
	20	20	1	47
	20	50	1	31
CD14	20	100	1	93
	50	100	1	64
	50	50	1	71

Tableau VI

Or, même si l'on sait qu'il n'y a pas de spécificité absolue de la plupart des déterminants antigéniques pour une lignée donnée et que le CD14 (CD11b également) peut marquer des granuleux, monocytes et quelques lymphocytes, il est préférable d'adopter une dilution plus forte pour l'anticorps monoclonal.

Néanmoins, il sera souhaitable d'étudier avec cette dilution les LA, dont les blastes expriment moins fortement cet antigène.

*** Sur la dilution de l'APAAP**

- On peut noter des positivités plus faibles pour le CD13. Les 15% (dilution APAAP au 10è) sont difficilement interprétables.

- Le CD11b donne des résultats comparables à ceux obtenus précédemment sur une autre moëlle normale (cf tableau V). On rappelle que dans

l'expérience précédente figure l'essai de dilution de l'APAAP au 10^e pour cet Ac (CD 11b), ainsi que pour le CD14, les deux Ac monoclonaux étant au 20^e en TBS.

Conclusion

On adoptera désormais la dilution d'APAAP au 50^e en TBS. En effet, même si les résultats obtenus avec la dilution 100^e d'APAAP ne sont pas franchement différents de ceux donnés avec la dilution au 50^e pour les CD11b et CD14 notamment, il nous paraît souhaitable de ne pas diminuer excessivement la quantité de marqueur.

2) Fixation

Nos premiers essais non décrits ici, utilisant un marqueur mégacaryocytaire (CDW41 : GPIIb IIIa) et des marqueurs lymphoïdes, ont été décevants : faible intensité (CDW41, CD19) fausse positivité (CD20, CD22).

Nous étudierons ici le rôle de la fixation des frottis, puis dans un second temps, nous considérerons celui de l'amplification (cf II 2.3.1)

Nous avons testé en parallèle plusieurs fixateurs sur les frottis destinés aux marqueurs mégacaryocytaires.

Le tableau VIIa est une comparaison entre les différents fixateurs utilisés pour le CDW41 sur frottis de moëlle normale.

Fixateur Ac anti-	BFA	AMF	Acétone
CDW41/10è	Mégacaryocytes ++ Non spécifique : Polynucléaires + Morphologie +++	Mégacaryocytes +/- Pas de faux + Morphologie +	Mégacaryocytes +/- Pas de faux + Morphologie +/-
CDW41/20è	Mégacaryocytes +/- Non spécifique : Polynucléaires + Morphologie +++	Mégacaryocytes - Pas de faux + Morphologie +	Mégacaryocytes +/- Pas de faux + Morphologie +/-

Tableau VIIa

Commentaires :

1. La fixation au BFA malgré ses qualités est associée à la présence de faux positifs, ce qui empêche son utilisation future pour le CDW41.

2. Les fixations à l'AMF et à l'acétone ne donnent pas une morphologie aussi nette que le BFA, mais ne donnent pas de faux positifs.

Conclusion :

L'Ac anti-CDW41 sera dilué au 20è en TBS et la fixation des frottis se fera à l'AMF.

3) Amplifications

Le tableau VIIb montre le rôle de l'amplification sur le marquage de frottis de moelle normale, des CDW41 pour les mégacaryocytes, CD20, CD22, pour les lymphocytes.

Ac anti-	Fixateur	Dilution de l'Ac monoclonal	Dilution de l'Ac de liaison	Dilution de l'APAAP	Nombre d'amplification	Positivité
CDW41	BFA	20	25*	20	1	+/-
	AMF	20	25Δ	20	1	+/-
					2	++
					3	+++
3°	+++					
CD20	AMF	5	25	20	2	+
					3	+
CD22	AMF	5	25	20	2	+
					3	+

Tableau VIIb : Rôle de l'amplification

* : Ac de liaison dilué au 25è en TBS à 25% de sérum AB neutre humain

Δ : Ac de liaison dilué au 25è en TBS à 5% de sérum AB neutre humain

° : Temps d'incubation de la dernière amplification réduits à 10 mn

Commentaires :

1. Les amplifications augmentent la sensibilité du marquage pour le CDW41, mais augmentent aussi le bruit de fond.

2. Malgré une faible dilution (1/5è), les CD20 et CD22 ne montrent pas de meilleurs résultats avec les amplifications. De plus, la positivité de la plupart des cellules rend les frottis ininterprétables.

Cela nous conduira à envisager une autre technique pour les marqueurs lymphoïdes.

Conclusion :

1. Le CDW41 sera utilisé avec trois amplifications, dilué au 20è en TBS, sur frottis fixés à l'AMF.

2. La technique actuelle ne permet pas d'utiliser les marqueurs lymphoïdes CD20 et CD22.

4) Diminution du bruit de fond

Les frottis ne donnant pas entière satisfaction, à cause d'un marquage non spécifique, extracellulaire et intracellulaire, nous avons augmenté la concentration en sérum AB neutre du TBS servant de tampon de dilution de l'anticorps de liaison.

Nous avons travaillé sur une moëlle normale, avec des marqueurs myéloïdes et mégacaryocytaires dilués au 20è en TBS. (cf tableau VIII).

Paramètres Ac anti -	Concentration en serum AB dans le tampon de dilution de l'Ac de liaison (%)	Nombre d'ampli- fication	Cellules positives (%)
CD11	25	1	59
CD13	5	2	76
	25	2	92
CD14	25	0	81
CD15	25	2	76
HLA-DR	5	1	48
	25	2	43
CD41	25	2	Mégacaryocytes: +++ Autres cellules : faux positifs
	25	3°	Mégacaryocytes:+++ Autres cellules : faux positifs

Tableau VIII : Diminution du bruit de fond

° : Temps d'incubation de la dernière amplification réduits à 10 mn

Commentaires :

Sur le plan purement qualitatif, il apparaît qu'une concentration supérieure en serum AB du TBS n'améliore pas le bruit de fond.

Conclusion :

Les essais suivants seront réalisés avec l'Ac secondaire dilué en TBS à 5% de serum AB neutre humain. Le respect des temps de rinçage en tampon TBS, renouvelé à chaque fois, avec un rinçage préalable à la pissette (TBS), est indispensable.

5) Essai d'un Ac anti GP IIIa

Devant les résultats décevants, obtenus avec le CDW41, nous avons cherché un autre Ac spécifique de la lignée mégacaryocytaire.

Nous avons donc essayé l'Ac anti-glycoprotéine IIIa en parallèle avec l'Ac CDW41 sur des frottis de moelle normale (cf tableau IX).

Ac	Fixateur	Nombre d'amplification	Intensité du marquage
Anti GP IIIa	AMF	3	+++
	BFA	3	+++
Anti - CDW41	AMF	3	++

Tableau IX : Marquage avec l'Ac anti IIIa

Commentaires :

1. L'Ac anti GP IIIa marque les mégacaryocytes avec une intensité nettement supérieure à l'Ac anti-CDW41 (cf photo n°3).

2. Il faudra peut être diminuer le nombre d'amplifications par la suite : le marquage de micromégacaryocytes permettra de trancher. Cela n'a pas pu être réalisé au cours de notre étude.

Conclusion :

L'affinité du IIIa est nettement meilleure que celle du CDW41. Aussi, nous conseillons l'utilisation de l'anti GP IIIa.

6) Contre-coloration à l'Hématoxyline de MAYER

Parallèlement, à l'étude des paramètres précédemment évoqués, nous avons amélioré la contre-coloration.

De 5 mn, nous sommes passés à 15 mn pour aboutir à :

- 5 mn d'hématoxyline de MAYER
- Rinçage à la pissette d'eau
- 5 mn dans eau (courante).

Cela aboutit à une intensification de la contre-coloration sans surcharger les cellules en colorant risquant de masquer les réactions spécifiques.

7) Conclusion sur la technique APAAP

A la suite de ce travail de mise au point, nous avons abouti à la technique qui sera utilisée sur les frottis de sang ou de moëlle des LAM.

Le détail de la technique est fourni en annexe 1, page 62 .

Nous avons donc appliqué cette technique à des LAM, déjà diagnostiquées au laboratoire et dont on connaît pour certaines l'immunophénotype déterminé par cytométrie en flux (FACS) (seuil de positivité = 30%).

II.2.4.3.3 - Immunophénotypage de LAM

→ CAS N°1

Le premier cas étudié est une LAM, dont la formule sanguine est la suivante (GB = 53000 / mm³):

11-0-0-10-1

74 blastes

3 myélocytes

1 érythroblaste acidophile

Cinq marqueurs myéloïdes, deux marqueurs lymphoïdes, pour lesquels des lames contrôles seront utilisées, sont testés sur les frottis sanguins.

Les contrôles sont constitués par une moelle normale, contrôle du marquage des lymphocytes B par l'antiCD22 et un frottis de sang riche en lymphocytes, contrôle du marquage des lymphocytes par l'antiCD7.

Tous les anticorps monoclonaux sont dilués au 20è, l'Ac de liaison au 25è en TBS à 5% de sérum AB neutre et l'APAAP au 50è.

Ac anti-	LAMES	FIXATEURS	NOMBRE D'AMPLIFICATION	BLASTES POSITIFS (%)
CD 11b	LAM	BFA	1	72
CD 13	LAM	BFA	2	84
CD 14	LAM	BFA	0	75
CD 15	LAM	BFA	2	23
HLA DR	LAM	BFA	1	0
CD 22	LAM	AMF	2	Ininterprétable
	MO	Tamponné à ph=6,6		Ininterprétable
CD 7	LAM	AMF	2	0
	SANG	Tamponné à ph=6,6		0

Tableau X : Cas n°1

Commentaires :

1. Tous les marqueurs myéloïdes et monocytaires sont positifs, tandis que HLA-DR reste négatif de façon surprenante.

2. Les marqueurs lymphoïdes n'ont pas donné de résultat interprétable: si l'antiCD7 ne marque aucune cellule, l'antiCD22 positive toutes les cellules.

Le cas suivant permettra d'étudier les Ac lymphoïdes à une dilution plus faible (1/5^e).

⇒ CAS N°2

Le cas n°2 est une LAM2 ou LAM4 dans la classification FAB, qui constitue l'acutisation d'un syndrome myélodysplasique.

On étudie les frottis sanguins dont la formule est :
(GB = 34000 / mm³)

9-6-2-6-2 / 70 blastes / 5 érythroblastes acidophiles
(cf tableau XI) (pour les fixateurs, cf tableau X)

Ac anti-	Nb d'amplification	Dilution de l'Ac monoclonal	Pré-incubation avec TBS + 5% AB neutre	Blastes Positifs (%)	FACS
CD11	1	20	/	Ininterprétable	-
CD13	2	20	/	16	52
CD13	2	20	15 mn	Faux positifs	
CD14	0	20	/	9	27
CD15	2	20	/	45	-
HLA-DR	1	20	/	Ininterprétable	51
CD33	2	10	/	19	20
CD22	4	5	/	Ininterprétable	-
		5	15 mn	Ininterprétable	
CD7	4	5	/	Ininterprétable	-
		5	15 mn	Ininterprétable	

Tableau XI : Cas n°2

/, - : non testé

Commentaires :

1. Beaucoup de lames sont ininterprétables à cause du bruit de fond trop important, peut-être dû à la nature même sur frottis ou à un défaut de rinçage. Un essai de blocage des sites non spécifiques par pré-incubation après étape 2 en TBS à 5% de sérum AB neutre, sur des CD13, CD22 et CD7 n'apportent aucune solution;

2. Les éléments du dossier n'ont pas permis de trancher entre LAM2 et LAM4 : nos résultats donnent un CD13 très faiblement positif et le CD14 à la limite inférieure du seuil de positivité choisi (10%).

⇒ CAS N°3

Le cas n°3 est une LAM 1 dont on étudie des frottis sanguins, congelés depuis 12 mois, et dont la formule comprend 92% de blastes.

A la suite des résultats précédents, les dilutions des Ac monoclonaux ont été modifiées (cf tableau XII).

Commentaires :

Ce cas n°3, LAM peu différenciée, montre des pourcentages de positivité très faibles dans notre étude. Aussi, nous avons réalisé sur le CD13 et HLA-DR, deux amplifications supplémentaires, au cours d'une autre manipulation, néanmoins rapportée dans le même tableau XII.

Nous constatons encore des réactivités très faibles corrélées avec les résultats du FACS. Cela nous amène à deux hypothèses :

- La dégradation des antigènes par la congélation ancienne.
- L'expression très faible des antigènes par les blastes.

Aussi, le cas n°4 porte sur une LAM dont la date de congélation des frottis est proche du cas n°3.

Ac anti-	Dilution de l'Ac monoclonal	Nombre d'amplification	Blastes positifs (%)	FACS
CD 11b	5	2	7	-
CD 13	5	2	0	30
	5	4	0	
CD 14	20	2	9	23
CD 15	5	2	2	-
HLA-DR	5	2	0	29
	5	4	0	
CDW41	5	2	0	-
CD 22	5	2	0	-
CD 7	5	2	2	-
CD 33	10	2	8	84

Tableau XII : Cas n°3

→ CAS N°4

Cas n°4, LAM1, avec à la numération 380 000 GB/mm³ et dont la formule sanguine est 1-0-0-8-1 / 90 blastes ; les réactions cytochimiques peroxydase, NASDA, PAS, sont négatives.

Les frottis de sang étudiés ont 13 mois de congélation à - 80°C.

Nos résultats sont consignés dans le tableau XIII.

Paramètres Ac monoclonal anti-	Dilution de l'Ac monoclonal	Nombre d'amplification	Blastes positifs (%)	FACS
CD 11b	5	2	1	-
CD 13	5	2	0	66
CD 14	20	2	1	25
CD 15	5	2	0	-
HLA-DR	5	2	67	85
CD 22	5	2	6	-
CD 7	5	2	5	26
CD 33	10	5	0	64

Tableau XIII : Cas n°4

Commentaires :

1. L'hypothèse de la dégradation par le froid (congélation à long terme) ne peut pas être retenue en ce qui concerne l'antigène HLA-DR (67%), la question reste posée pour CD13.

2. Afin d'étudier l'incidence de la fixation dans ce cas précis, nous avons testé la fixation à l'AMF sur les CD13 et HLA-DR : aucun blaste positif n'est observé pour HLA-DR ; 13% pour CD13, ce qui reste faible néanmoins.

Conclusion :

L'amélioration de la sensibilité du CD13 par fixation à l'AMF indique que cet antigène n'a pas été complètement dégradé et donc écarte partiellement l'hypothèse de destruction par le froid pour poser le problème de la fixation par un fixateur autre que le BFA.

⇒ CAS N°5

Le cas n°5, LAM 2 sur frottis médullaire, nous a permis de constater que la qualité du prélèvement était imprévisible. En effet, la fragilité du frottis de richesse augmentée n'a pas permis de rendre un résultat.

Les frottis, âgés de 48 heures ou congelés 15 jours à - 20°C, aboutissent au même échec, alors que les lames d'un autre patient donnent des résultats tout à fait interprétables au cours de la même manipulation, ce qui élimine une erreur technique.

⇒ CAS N°6

L'étude porte ici sur les frottis médullaires d'une LAM5, conservés quatre jours à température du laboratoire.

Le décompte sur la moëlle donne : 50% blastes

35% monocytes

15% autres cellules

Commentaires :

1. L'hypothèse de la dégradation par le froid (congélation à long terme) ne peut pas être retenue en ce qui concerne l'antigène HLA-DR (67%), la question reste posée pour CD13.

2. Afin d'étudier l'incidence de la fixation dans ce cas précis, nous avons testé la fixation à l'AMF sur les CD13 et HLA-DR : aucun blaste positif n'est observé pour HLA-DR ; 13% pour CD13, ce qui reste faible néanmoins.

Conclusion :

L'amélioration de la sensibilité du CD13 par fixation à l'AMF indique que cet antigène n'a pas été complètement dégradé et donc écarte partiellement l'hypothèse de destruction par le froid pour poser le problème de la fixation par un fixateur autre que le BFA.

⇒ CAS N°5

Le cas n°5, LAM 2 sur frottis médullaire, nous a permis de constater que la qualité du prélèvement était imprévisible. En effet, la fragilité du frottis de richesse augmentée n'a pas permis de rendre un résultat.

Les frottis, âgés de 48 heures ou congelés 15 jours à - 20°C, aboutissent au même échec, alors que les lames d'un autre patient donnent des résultats tout à fait interprétables au cours de la même manipulation, ce qui élimine une erreur technique.

⇒ CAS N°6

L'étude porte ici sur les frottis médullaires d'une LAM5, conservés quatre jours à température du laboratoire.

Le décompte sur la moëlle donne : 50% blastes

35% monocytes

15% autres cellules

La myélopéroxydase est positive dans 65% des blastes.

Les N.A.S.D.A. sont positives et inhibées par le NaF dans 25% des blastes (NaF = fluorure de sodium)

Les résultats sont consignés dans le tableau XIV.

Ac anti-	Dilution de l'Ac monoclonal	Nombre d'amplification	Blastes positifs (%)
CD 11b	5	2	76
CD 13	5	2	19
CD 14	20	2	42 (faible)
CD 15	5	2	28
HLA-DR	5	2	67
CD 33	10	2	0

Tableau XIV : Cas n°6

Commentaires :

1. Nos résultats concordent avec le diagnostic cytologique et cytochimique (FAB).

2. L'intensité de la positivité varie avec le marqueur : très importante pour HLA-DR et faible pour CD13 et CD14.

→ CAS N°7

Le dernier cas, LAM1, est étudié sur frottis de sang, avec 69 000 globules blancs à la numération :

2-0-0-5-0

et la formule suivante : 92 blastes

1 érythroblaste acidophile

Tous les Ac sont dilués au 1/10^e en TBS sauf l'Ac antiCD14 au 1/20^e.

Paramètres Ac anti	Fixateur	Nombre d'amplification	Blastes positifs (%)	FACS %
CD 11b	BFA	2	1	-
CD 13	BFA	2	16	39
CD 14	BFA	2	65	17
CD 15	BFA	2	11	8
HLA-DR	BFA	2	2	26
CD 33	-	-	-	55

Tableau XV : Cas n°7

Commentaires :

1. Le CD14 est positif dans notre technique et négatif au FACS.
2. La faible positivité du CD13 est corrélée avec les résultats en IFI (FACS).

II.2.4 - BILAN

Afin d'avoir une vue globale de nos résultats et de ceux donnés par le FACS en IFI, nous avons rassemblé les résultats des treize LAM étudiées dans le tableau XVI et la figure 9.

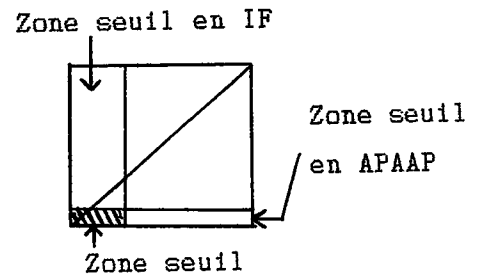
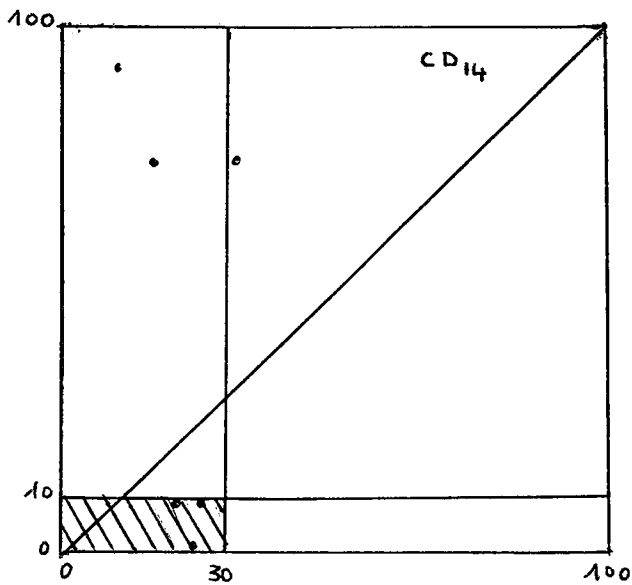
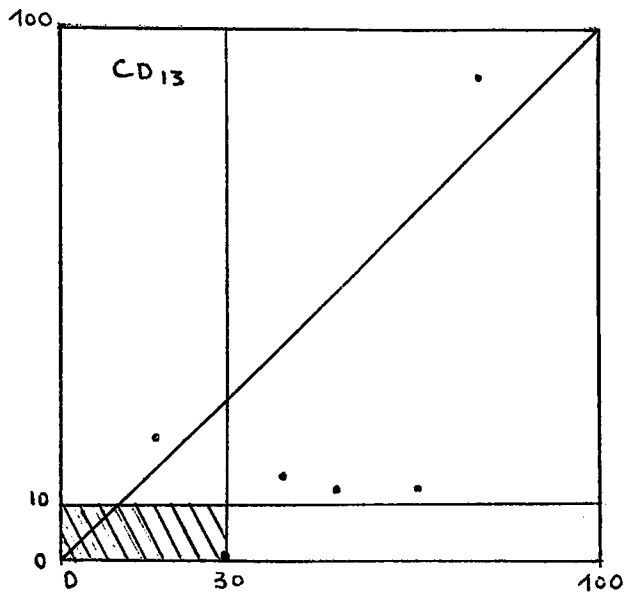
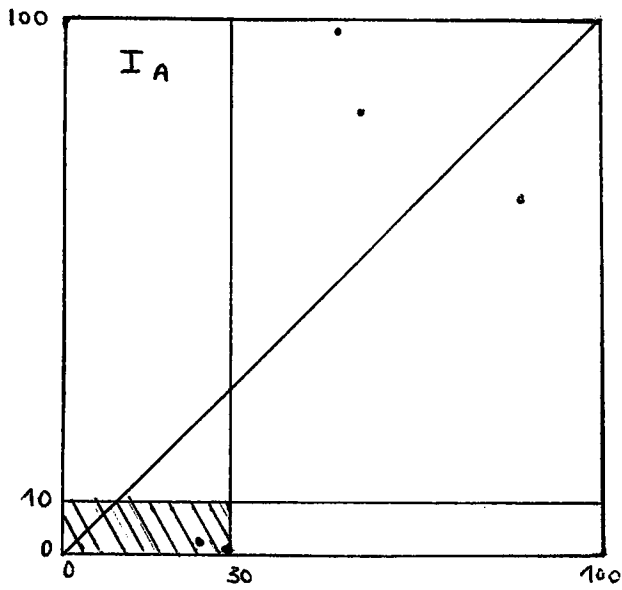
1. La figure 10 présente pour trois marqueurs HLA-DR, CD13 et CD14, les corrélations existant entre l'immunophénotypage en APAAP et en IFI.
2. On observe une bonne corrélation entre HLA-DR où seul un cas sur six était ininterprétable en APAAP.
3. Pour le CD13, on observe une discordance dans un cas (une LAM2) sur six.
4. Pour le CD14, deux cas discordent (2 LAM1) sur six. La corrélation n'a pu être étendue à tous les cas étudiés en APAAP, à cause de l'absence de l'immunophénotype en IF au moment du diagnostic.

	APAAP FACS	HLA-DR	CD33	CD11	CD13	CD14	CD15	CD20	CD22	CD7	CD19	CD2
I M M U N O T E C H	M1	100 / 49	- / 64	31 / -	96 / 76	93 / 9	10 / -	76 / -	-	88 / 5	-	-
	M4	93	-	35	13	90	0	-	-	60	-	-
	M5	15	-	0	5	15	0	-	-	0 (1)	-	-
	M2	85 / 54	- / 58	0 / -	23 / 18	75 / 32	0 / -	- / 14	- / -	4 / -	-	- / 18
	M4	41	-	0	0	100	0	0	0	17	-	-
	M4	35	-	32	61	52	40	0	0	-	-	-
	M5	93	-	86	93	98	62	-	-	-	-	-
D A Y O P A T T S	M1/2	0	-	72	84	75	23	-	*	0	-	-
	M2/4	* / 51	19 / 20	* / -	16 / 52	9 / 27	45 / -	-	* / -	* / -	- / 12	- / 16
	M1	0 / 29	8 / 84	7 / -	0 / 30	9 / 23	2 / -	-	0 / -	2 / -	-	- / 11
	M1	67 / 85	0 / 64	1 / -	13 / 66	1 / 25	0 / -	-	6 / -	5 / 26	-	-
	M5	67	0	76	19	42	28	-	-	-	-	-
	M1	2 / 26	- / 55	1 / -	16 / 39	65 / 17	11 / 8	- / -	- / -	- / -	- / 4	- / 6

Tableau XVI : Bilan

Légende : 1/2 : 1 : résultats APAAP
 2 : résultats FACS
 * : ininterprétable
 - : non testé
 (1) : Lymphocytes négatifs

% cellules positives
(technique APAAP)



Immunomarquage au FACS (% cellules positives)

Figure 9 : Représentation schématique de l'immunophénotypage des LAM étudiées en APAAP et IF

Conclusion :

1. La discussion abordera les différents aspects de nos résultats.

2. Par ailleurs, étant donné les résultats peu encourageants en APAAP pour les Ag lymphoïdes, nous avons décidé d'utiliser une autre technique pour tester ces marqueurs sur des LAL.

Quelques essais ont été réalisés avec la méthode Avidin - Biotin Peroxydase Complex (ABC).

Nous présentons la technique ABC des laboratoires Vector avec laquelle nous avons réalisé les premiers essais concluants sur le marquage de LAL.

II.3 - IMMUNOCYTOCHIMIE EN ABC

=====

II.3.1 - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ABC

=====

(HSU 1981, FUESDON 1979)

Le principe de la méthode ABC est fondé sur la très haute affinité d'une glycoprotéine, l'avidine, pour de petites molécules comme la biotine, une vitamine.

La présence de quatre sites de liaison de l'avidine pour la biotine permet la réalisation d'un complexe immuno-enzymatique dont le rapport peroxydase/ anticorps primaire est plus grand que celui des autres méthodes indirectes (cf figure 10).

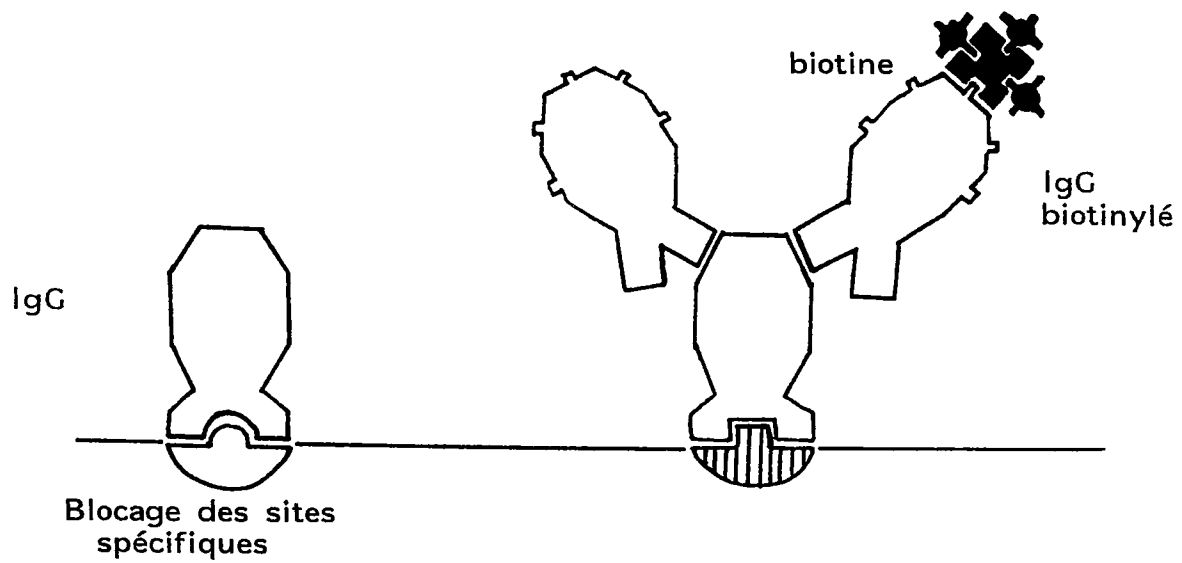
Les principaux avantages de cette technique sont :

1. Une sensibilité supérieure à celle des autres méthodes indirectes ce qui permet une moindre consommation d'anticorps spécifiques et la mise en évidence de faibles quantités d'antigène.
2. Un bruit de fond pratiquement nul en particulier dans les zones nécrotiques ou hémorragiques.
3. Une excellente reproductibilité des résultats.
4. L'utilisation du complexe avidine-biotine-peroxydase quelque soit l'espèce animale produisant l'anticorps monoclonal (Ac primaire).
5. Un prix de revient inférieur à celui des autres méthodes.

B - MATERIEL

=====

- 1 - Echantillons (cf II.2.2.1)
- 2 - Anticorps monoclonaux (cf II.2.2.2)
- 3 - Fixateurs (cf II.2.2.3)



Blocage des sites non spécifiques






-  Peroxydase biotinylée
-  Avidine spécifique
-  Site non 
-  Site non spécifique

Figure10 : Représentation schématique de la technique ABC



[REDACTED]

[REDACTED]

II.3.2.4 - Réactifs ABC.

Nous avons utilisé le kit Vectastain, Vektor (réf. PK 4002), pour localiser divers antigènes dans les tissus.

Ce kit fournit les solutions concentrées (petits flacons) servant à faire les dilutions de travail en PBS (grands flacons fournis).

Sont fournis :

1. Sérum normal de cheval :

- . concentré 3 gouttes
- . PBS 10 ml

2. Anticorps biotinylé :

- . concentré 1 goutte
- . PBS 10 ml

3. Réactif ABC :

- . concentré A 1 goutte
à mélanger avec 5 ml de PBS. Agiter
- . puis, ajouter 1 goutte de réactif B. Agiter fortement.
- Nb1 : respecter rigoureusement cet ordre
- . Laisser reposer 30 mn avant emploi.
- . Nb2 : - les solutions de travail sont utilisables pendant 48 heures
- les supprimer ensuite et rincer les flacons à l'eau distillée
- ces réactifs vectastains doivent être conservés impérativement à + 4°C dans leur emballage d'origine;

. PBS (ph 7,4) A préparer

- | | | | |
|----------------|--|-------------|--------|
| . Solution A : | Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O | 23,4 g/l... | 90 ml |
| . Solution B : | Na ₂ HPO ₄ | 21,3 g/l > | |
| | ou | > | 410 ml |
| | Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O | > | |
| . Solution C : | NaCl | 9 g/l... | 500 ml |

5. Substrat (3-3' Diaminobenzidine tétrahydrochloride)
(Sigma Chemical Company)

a) Solution Stock (5mg/ml)

3'3' Diaminobenzidine tétrahydrochloride 50 mg
Tris 0,1 M 10 ml
Ajuster à pH 7,6
Congeler à - 20°C par fraction de 2 ml

b) Solution de travail de DAB à 1 mg/ml

Décongeler un aliquot de 2 ml
Ajouter 8 ml de Tris 0,1 M
Ajuster à pH 7,6
Important : la solution doit être à température du
laboratoire

c) Solution extemporanée d'eau oxygénée (0,02%)

H₂O₂ à 110 vol (perhydrol) 20 µl
Eau distillée 100 ml

d) Solution de coloration

Mélanger juste avant emploi :
- solution b : 10 ml
- solution c : 10 ml

II.3.3 - METHODE

=====

II.3.3.1 - Schéma général de la technique

1. Fixer les frottis.
2. Identifier les lames. Tracer un spot au graveur, au dos des lames (pour ne pas fragiliser le frottis), au niveau des franges.
3. Réhydrater en tampon PBS 15 mn
4. Déposer sur le spot une goutte de sérum normal dilué : 20 mn
5. Jeter l'excédent sans rincer.
6. Ajouter une goutte de l'anticorps monoclonal : 60 mn.
7. Laver 10 mn en PBS
8. Déposer une goutte d'anticorps biotinylé : 30 mn

9. Rincer en PBS : 10 mn.
10. Inhibition de la peroxydase endogène (selon l'échantillon étudié).
11. Déposer une goutte de réactif ABC : 1 heure
12. Rincer 10 mn en PBS
13. Déposer le substrat 5 à 10 mn.
14. Rincer à l'eau courante 5 mn.
15. Sécher.
16. Contre-colorer au Giemsa (dilué au 10è en eau ph 7) pendant 20 mn
17. Rincer à l'eau courante. Sécher
18. Monter en Eukitt (ne pas utiliser de glycérine-gélatine).

II.3.3.2 - Fixation (cf II.2.3.2)

Les marqueurs lymphoïdes sont utilisés sur frottis fixé à l'acétone tamponée.

II.3.4 - RESULTATS

Ces quatre essais ont été réalisés avec les Ac primaires dilués au 1/10è en PBS.

Les résultats sont consignés dans le tableau XVII. Hélas, une difficulté technique (résolue depuis) a retardé nos essais ; pour cette raison, nous n'avons pu étendre nos résultats à d'autres LAL, ni éventuellement aux LAM (malgré le problème déjà évoqué de la peroxydase endogène).

La positivité est évaluée sur 200 blastes. une cellule est positive si la zone cytoplasmique périphérique est colorée en brun (cf photo 4).

% Blastés positifs LAL (FAB)	IA	CD 10	CD 19	CD 20	CD 22	CD 2	CD 5	CD 7	CD 13	CD 14	CD 41		
												CD 10	CD 19
N°1 LAL 1 MO : 98% Blastés	46 + -	94 +	0	0	93	-	0	0	1	8	0		
N°2 LAL 2 GB : 27 000/mm ³ Sang : 1-0-0-14-0 84 blastés plasmocyte	81 64	91 POS.	14 62	0 59	54 -	0 -	21 -	- -	0 7	24 5	- -		PREB
N°3 LAL 1 Sang : GB : 210 000/mm ³ 91 blastés	14 NEG	5 NEG	4 -	- -	87 -	0 92	35 79	93 92	13 NEG	41 NEG	- -		LALT
N°4 LAL 2 Sang : GB : 10500/mm ³ Formule : 5-0-0-7-0 88 blastés	91 71	83 85	10 37	- 31	14 -	- 24	3 -	7 -	2 32	4 25	- -		

Tableau XVII : LAL en ABC et IF (FACS)

- III -

DISCUSSION / CONCLUSION

Si la classification FAB reste à l'heure actuelle le principal outil diagnostique des leucémies aiguës, celle-ci est néanmoins tenue en échec dans 20% des cas.

Parmi les moyens diagnostiques plus sophistiqués dont on dispose, la détermination du phénotype immunologique est maintenant couramment pratiquée dans les laboratoires d'hématologie spécialisés grâce à l'immunofluorescence en cytométrie en flux. Cette technique, de loin la plus utilisée, permet de donner le profil immunologique de la majorité des LA.

Cependant, les rares cas de fibrose médullaire, ou de faible blastose, nécessitent l'application d'une autre méthode.

Pour cette raison, nous avons choisi de mettre au point une technique immuno-enzymatique sur frottis (sang et moelle), afin d'apporter une solution simple rapide et fiable, susceptible d'aider les cliniciens dans le choix d'une thérapie adaptée.

Les techniques d'immunocytochimie réservées presque exclusivement au domaine de la recherche sont variées et on n'a pas encore assez de recul sur les premières études à grande échelle pour avoir une idée claire sur leur efficacité.

Afin de phénotyper les LAM, nous avons choisi la technique APAAP pour sa sensibilité et l'absence de peroxydase dans la révélation, de façon à éviter l'interaction de la peroxydase endogène, problème déjà évoqué plus haut.

Cette technique présente l'avantage de donner un marquage facile à repérer grâce aux grains rouges beaucoup plus aisés à visualiser que la coloration brune obtenue en ABC. Sur le plan de la sensibilité, le principe même du complexe APAAP en fait une des techniques indirectes la plus sensible.

Cependant, il ne nous a pas été possible d'éliminer totalement le bruit de fond sur les frottis alors qu'il est totalement absent en ABC. Néanmoins cet inconvénient ne pose pas vraiment de gros problème d'interprétation : en effet, l'intensité du bruit de fond est souvent proportionnelle à l'intensité de la positivité des blastes ; or, lorsque

les cellules sont très positives, il n'est pas difficile de trancher pour un oeil expert.

Il faut souligner que la spécificité et la sensibilité de la méthode dépendent aussi en grande partie de la qualité de l'Ac monoclonal : une méthode quelles que soient ses performances, ne peut compenser la faible affinité d'un Ac, risquant même d'intensifier le manque de spécificité de l'Ac (ce que nous avons observé avec le CD20). Le rôle des amplifications, s'il renforce l'intensité de la positivité, ne saurait non plus compenser une mauvaise sensibilité de l'Ac primaire. On a pu observer par ailleurs que les Ac monoclonaux utilisables en IF (FACS) ne conviennent pas toujours aux techniques sur lame : le frottis affectant peut être la conformation de l'Ag et par conséquent la fixation de l'Ac. Cela pourrait aussi expliquer certaines différences entre les résultats du FACS et nos résultats, bien qu'il soit difficile de comparer deux principes méthodologiques différents.

Si notre travail porte principalement sur la technique APAAP, nous nous sommes heurtés au problème de la révélation d'Ag lymphoïdes par cette technique. La technique ABC, qui donne de meilleurs résultats, peut-être grâce à une plus grande sensibilité, soulève deux problèmes :

1. Comment envisager l'utilisation de deux méthodes si l'on considère qu'elles auront de rares indications et que les dates de péremption des réactifs sont souvent courtes ?

2. Peut-on se satisfaire de la positivité d'une lignée cellulaire sans être sûr que les autres sont négatives ?

Et/ou doit-on tester à chaque fois les deux techniques, ce qui serait assez lourd pour l'intégration dans la routine d'un laboratoire ?

Il sera souhaitable d'une part d'essayer d'utiliser l'ABC pour le marquage des Ag myéloïdes malgré le problème de la peroxydase endogène, puisque les premiers résultats sur des LAL indiquent une bonne réactivité des Ag lymphoïdes et un CD13 négatif ou très légèrement positif (13% dans 1 cas/4) ; d'autre part, d'étendre les résultats en ABC à d'autres LAL.

Cependant, certains paramètres inhérents aux techniques immunocytochimiques interviennent sur les deux méthodes.

Un des paramètres, difficile à maîtriser, est la qualité des frottis. En effet, un marquage peut être tenu en échec par des frottis de mauvaise qualité, liée à sa nature même ou à des difficultés de prélèvement ou d'étalement ; on peut imputer aussi la conservation des frottis (température de congélation instable, date de conservation). Nos résultats indiquent que certains Ag peuvent souffrir d'une trop longue exposition au froid (cf cas n°4, paragraphe II.2.4.3.2). Il paraît donc souhaitable de ne pas conserver plus d'un an les frottis non marqués.

Autre paramètre sur lequel on peut par contre intervenir : la fixation des frottis. Les fixateurs sont nombreux et ont des propriétés différentes.

Ainsi, on peut à tort considérer une réaction négative alors qu'elle s'explique par la destruction de l'Ag par le fixateur ou inversement par le marquage de l'Ag à l'intérieur de la cellule, l'Ac ayant pu pénétrer dans la cellule.

Une remarque à ce propos : les techniques d'immunocytochimie grâce à la fixation permettent de mettre en évidence des Ag cytoplasmiques parfois plus spécifiques que les Ag membranaires (CHEN et coll. 1986 - VAN DONGEN et coll. 1988).

Si l'immunocytochimie présente l'avantage d'une observation simultanée de la morphologie cellulaire, il faut néanmoins respecter le compromis entre le maintien de l'aspect morphologique des cellules marquées et la révélation des Ag qui somme toute reste le principal but de la technique. Il n'est pas sûr qu'un tel compromis soit bien réalisé en mélangeant à différents volumes plusieurs types de fixateurs, ce qui est réalisé dans l'AMF.

Néanmoins, nous avons obtenu un certain nombre de résultats encourageants. Les points de référence choisis pour notre étude sont la classification FAB et les données de la littérature concernant les profils immunologiques des LA d'une part, les résultats en cytométrie de flux pour quelques LAM (6 cas / 13) et LAL (4 cas/4) d'autre part.

Nous commenterons surtout les résultats des LAM étudiées en APAAP, puisque notre étude des LAL reste encore limitée à ce jour.

Que constate-t-on ? Tout d'abord des convergences avec la classification FAB, avec 10/13 LAM CD13+, ce qui oriente vers la lignée myéloïde puisqu'on admet désormais le CD13 comme un marqueur spécifique de la lignée myélomonocytaire. Certains auteurs néanmoins trouvent 10 à 20% des LAL, CD13+ (DREXLER 1987). Les 3/13 LAM CD13- sont aussi myéloperoxydase (MPO) positifs : la MPO étant un critère essentiel dans le diagnostic des LA. DREXLER (1988) recommande d'ailleurs l'association du CD13 et de la MPO dans un panel de dépistage comportant des marqueurs lymphoïdes B (CD19, CD22) et T (CD3, CD7).

Un second marqueur, discriminatif quant à lui d'une participation monocytaire, le CD14 se trouve positif dans 6/6 cas de M4 et M5 bien définies.

Troisième marqueur reproductible HLA-DR est positif dans 9/13 cas et négatif dans 3/13 cas (3 LAM peu différenciées).

Cependant, il n'en est pas moins vrai qu'apparaissent à travers cette étude un certain nombre de divergences. Divergence avec les profils immunologiques associés aux différents types de LA de la classification FAB: on observe une positivité inattendue du CD14 dans 4/7 cas (M1 et M2). Il faut préciser que l'Ac utilisé, My4 de COULTER, marque les monocytes, mais aussi les granuleux pour 20% (selon COULTER). Il serait sans doute bon d'essayer un marqueur plus spécifique même si ces mêmes LAM étudiées en immunofluorescence avec l'Ac My4 sont CD14-.

L'Ac MO2, anti CD14 de COULTER, plus spécifique des monocytes est hélas une IgM, ce qui pose des problèmes de liaison avec l'anticorps secondaire, qui est une anti-IgG. Cette même explication peut être également évoquée devant la faible réactivité du CDW41 pour lequel nous avons un nombre d'amplification supérieur à celui des autres marqueurs pour un résultat moins satisfaisant.

Autres positivités inattendues, celles obtenues avec les marqueurs lymphoïdes, 2 cas/8, dont une LAM1 avec CD7 (88%), CD20 (76%) et une LAM4, CD7 (60%). Il n'y a pas hélas de résultat en IFI. Or si l'on se réfère à la littérature, le CD7 apparaît positif dans 10% cas de LAM (NORTON J.D. et coll. 1988 ; VODINELICH L. et coll. 1983) et dans 5/15 cas LAM pour LY B. (1988). Ces derniers auteurs montrent une bonne corrélation entre les pourcentages obtenus en APAAP et IFI.

Pour notre part, sur deux cas testés dans les deux techniques, un cas est CD7-, dans les deux techniques, l'autre est CD7+ en APAAP (88%) et négatif en IFI. Pour les trois cas testés avec le CD20 dans notre étude (APAAP), un cas sur trois est CD20+, une LAM1 avec 76% de blastes positifs. Il n'y a pas de résultat en IFI. LY (1988) montre le rôle de la congélation dans l'augmentation de la positivité du B1 (CD20) le marqueur de COULTER que nous utilisons aussi. Nous n'avons pas exploité cette hypothèse alors que l'auteur précédemment cité trouve 5/5 LAM, positives en CD20 en immunocytochimie (APAAP) et négatives en IF (FACS).

Ces comparaisons immunocytochimie / IFI indispensables à notre étude et qui ne demeurent qu'un outil d'analyse nous montrent les difficultés de l'interprétation des résultats d'un immunophénotypage. Il faut en effet connaître les limites de chaque technique avant de chercher à établir une comparaison des résultats. Les techniques ne sont pas interchangeables et les paramètres capables de modifier les sites antigéniques (froid, fixation) sont essentiels.

D'autre part, le seuil limite au delà duquel on considère une cellule positive doit être déterminé avec rigueur, ceci pouvant expliquer pourquoi d'une équipe à une autre, les résultats divergent parfois. Ainsi, certains auteurs trouvent des LAM Calla+ (J5) dans 10/15 cas en immunocytochimie (LY B. et coll. L 1988), tandis que d'autres ne trouvent aucun cas positif sur 41 LAM étudiées en immunocytochimie (HANSON C.A. et coll. 1987).

Quoiqu'il en soit, il faut rappeler qu'un marqueur n'est jamais à lui seul assez spécifique pour être discriminant, et que le profil immunologique d'une LA est seul interprétable. Notre étude confirme l'utilité de conserver la myéloperoxydase en association avec un marqueur panmyélomonocytaire tel que le CD13 afin de pallier les cas où l'un des deux serait en défaut. Ceci aboutit chez certains auteurs à l'utilisation d'un panel de dépistage (DREXLER H.G. et coll. 1988).

Pour conclure, voyons quelles sont les perspectives ouvertes par ce travail.

Le principal problème posé par notre étude est l'utilisation rationnelle d'une méthode pour le phénotypage des LAM. L'impossibilité de révéler ces Ag lymphoïdes par la technique APAAP et à l'inverse les bons résultats obtenus en ABC sur des LAL, conduit à envisager l'utilisation

d'une seule technique, l'ABC, pour autant que l'ABC puisse révéler tous les Ag myéloïdes nécessaires à l'immunophénotypage des LAM.

La prochaine étape, qui sort du cadre de ce travail, est la mise au point du phénotypage des LAM en ABC avec extension des premiers résultats de LAL à de nombreux autres cas, toujours en parallèle avec l'IFI (FACS).

Parallèlement à cette étude, il sera nécessaire de trouver un Ac anti-^{anti-}précoce CD33 pour les LA peu différenciées, puisque celui qui est utilisé efficacement en IFI ne donne pas de résultat en immunocytochimie.

De même, l'utilisation d'un autre anti-CD13 serait sans doute souhaitable, compte tenu des pourcentages relativement faibles obtenus dans nos différents cas.

Ceci, afin d'aboutir comme d'autres auteurs déjà cités à l'établissement d'un panel de dépistage.

Alors que l'on s'aperçoit de plus en plus de la nécessité de disposer de différents moyens pour le diagnostic des leucémies aiguës l'immunocytochimie offre une alternative de mise en oeuvre simple et rapide (< 24h) qui peut aisément s'appliquer aux cas de faible blastose.

La multiplicité des techniques de sensibilité et spécificité différentes ouvre des perspectives optimistes quant à la caractérisation de toutes les leucémies aiguës.

ANNEXE 1

TECHNIQUE APAAP AVEC REACTIFS DAKOPATTS

A - PREPARATION DES FROTTIS

=====

a) Frottis de sang ou de moëlle

Bien étalés séchés au moins 24h jusqu'à 7 jours, ou congelés emballés dans du papier aluminium à - 80°C (- 20°C).

b) Décongélation

Laisser les lames décongeler dans du papier aluminium pendant 1 heure à température ambiante.

Déballer, marquer l'Ac monoclonal testé sur chaque lame, entourer la partie la plus fine du frottis par un cercle d'environ 12 à 15 mm de diamètre sur l'envers du frottis.

B - ETAPE 1 : FIXATION

=====

BFA : pour les marqueurs myéloïdes. Le jour du marquage, 20 à 40 sec.
Rincer à l'eau distillée rapidement. Puis étape 2.

AMF : Pour le CDW41, la veille du marquage, 1mn30
Rincer à l'eau distillée rapidement.
Laisser sécher à l'air. Puis étape 2 le lendemain.

C - ETAPE 2

=====

Réhydrater 15 mn en TBS ph 7,6

D - ETAPES 3 A 8 : MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE

=====

Toutes les étapes se déroulent en chambre humide (boîte de Pétri carrée avec coton imbibé de TBS et tiges de verre pour supporter les lames). Les frottis ne doivent sécher à aucun moment.

→ *Etape 3 : Ac monoclonal*

Diluer en TBS pH 7,6 : adapter la dilution à l'Ac utilisé.

Sécher les bords du cercle, déposer 30 à 50 µl de l'Ac dilué.

La goutte s'étale mieux si on la laisse tomber d'assez haut (10 cm).

Incuber 30 mn.

→ *Etape 4 : Rinçage*

Rincer d'abord par un jet de pissette (TBS) en amont du cercle.

Puis laisser tremper 10 mn en TBS.

→ *Etape 5 : Ac de liaison*

Diluer l'Ac au 25è en TBS à 5% de sérum AB neutre humain.

Sécher les bords du cercle. Déposer 30 à 50 µl d'Ac dilué.

Incuber 30 mn

→ *Etape 6 : Rinçage (cf étape 4)*

→ *Etape 7 : APAAP*

Diluer l'APAAP au 50è en TBS.

Sécher les bords du cercle;

Déposer 30 à 50 µl d'APAAP dilué.

Incuber 60 mn.

→ **Etape 8 : Rinçage (cf étape 4)**

→ **Etape 9 : Amplification**

Amplifier en répétant les étapes 5, 6, 7, 8.

Le nombre d'amplifications varie de 1 à 2 : au delà, cela allonge excessivement la technique.

→ **Etape 10 : Révélation**

On prépare extemporanément le substrat.

Recouvrir le spot avec le substrat filtré.

Incuber 30 mn à l'obscurité.

→ **Etape 11 : Rinçage (cf étape 4)**

→ **Etape 12 : Contre-coloration**

Avant la contre-coloration, sécher les frottis à l'air.

Recouvrir les spots avec l'Hématoxyline de Mayer.

Incuber 5 mn.

Rincer à l'eau courante.

Laisser tremper dans l'eau du robinet : 5 mn.

Sécher à l'air.

→ **Etape 13 : Montage**

Monter les lames en glycérine - gélatine (56°C).

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.
Proposals for the classification of the acute leukemias.
Br. J. Haematol., 1976, 33, 451-458.

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.
A variant form of hypergranular promyelocytic leukemia (M3).
Br. J. Haematol., 1980, 44, 169-170.

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.,
The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia :
concordance among observers and clinical correlations.
Br. J. Haematol., 1981, 47, 553-561.

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.
Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.
Br. J. Haematol., 1982, 51, 189-199.

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.
Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid
leukemia.
Ann. Intern. Med., 1985a, 103, 620-625.

- * BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G.,
GRALNICK H.R., SULTAN C.
Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage
(M7). A report of the Franco-American British Cooperative Group.
Ann. Intern. Med., 1985b, 103, 460-462.

- * BRETON-GORIUS J., GOURDIN M.F., REYES F.
Ultrastructure of the leukemic cell.
In CATOVSKY D. Ed. "The leukemic cell". Churchill Livingstone -
Edinburg 1981, 87.

- * BRETON-GORIUS J., VAINCHENKER W.,
 Apport des anticorps monoclonaux à la classification des leucémies
 aiguës.
 Le Biologiste, 1987, XXI (167), 63-70.

- * CAMPANA D., COUSTAN-SMITH E., JANOSSY G.
 The reliability of membrane and cytoplasmic markers of immature B and T
 lymphoid cells in acute leukemia diagnosis.
 Leukemia (in press).

- * CHEN Z., SIGAUX F., MIGLIERINA R., VALENSI F., DANIEL M.T.,
 OCHOA-NOGUERA M.H., FLANDRIN G.
 Immunological typing of acute lymphoblastic leukemia : concurrent
 analysis by flow cytofluorometry and immunocytology.
 Leuk. Res., 1986, 10, 1411-1417.

- * CIMINO M.C., ROTH D.G., COLOMB H.M., ROWLET J.D.
 A chromosome marker for B cell cancer.
 N. Engl. J. Med. 1978, 298, 1422.

- * COLOMB H.M., ROWLEY J.D., VARDINIAN J.W., BARON J., LOCKER G.,
 KRASNOW S.
 Partial deletion of long arm of chromosome 17, specific abnormality in
 acute promyelocytic leukemia.
 Arch. Intern. Med., 1976, 136 : 825-828.

- * CORDELL J.L., FALINI B., ERBER W.N., GHOSH A.K., ABDULAZIZ Z.,
 MACDONALD S., PULFORD K.A.F., STEIN H., MASON D.Y.
 Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes
 of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase
 (APAAP complexes).
 J. Histochem. Cytochem., 1984, 32 (2), 219-229.

- * DONGEN J.J.M. Van, KRISSENSSEN G.W., WOLVERS-TETTERO I.L.M.,
 COMANS-BITTER W.M., ADRIAANSEN H.J., HOOIJKAAS H., WERING E.R. Van,
 TERHORST C.
 Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for
 immature T-cell malignancies.
 Blood, 1988, 71, 603-612.

- * DONGEN J.J.M. Van, QUERTERMOUS T., BARTRAM C.R., GOLD D.P.,
WOLVERS-TETTERO I.L.M., COMANS-BITTER W.M., HOOIJKAAS H.,
ADRIAANSEN H.J., KLEIN A. de, RAGHAVACHAR A., GANSER A., DUBY A.D.,
SEIDMAN J.G., ELSEN P. Van den, TERHORST C.
T-cell receptor-CD3 complex during early T-cell differentiation.
Analysis of immature cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) at DNA,
RNA and cell membrane level.
J. Immunol., 1987, 138, 1260-1269.

- * DREXLER H.G.
Classification of acute myeloid leukemias. A comparison of FAB and
immunophenotyping.
Leukemia, 1987, 1, 697-705.

- * DREXLER H.G., GIGNAC S.M., MINOWADA J.
Routine immunophenotyping of acute leukaemias.
Blut, 1988, 57, 327-339.

- * First MIC Cooperative Study Group
Morphologic, immunologic and cytogenetique (MIC) classification of
acute lymphoblastic leukemias.
Cancer genet. cytogenet. 1986, 23, 189-197.

- * GRIFFIN J.D., DAVIS R., NELSON D.A., DAVEY F.R., MAYER R.J.,
SCHIFFER C., MC INTYRE O.R., BLOOMFIELD C.D.
Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute
myeloblastic leukaemia.
Blood, 1983, 68, 1232-1241.

- * GRIFFIN J.D., MAYER R.J., WEINSTEIN H.J., ROSENTHAL D.S., CORAL F.S.,
BEVERIDGE R.P., SCHLOSSMAN S.F.
Surface marker analysis of acute myeloblastic leukaemia : identification
of differentiation - associated phenotypes.
Blood, 1986, 62, 557-563.

- * HANSON C.A., CAJL-PECZALSKA K.J., PARKIN J.L., BRUNNING R.D.
Immunophenotyping of acute myeloid leukemia using monoclonal antibodies
and the alkaline phosphatase -antialkaline phosphatase technique.
Blood, 1987, 70, 83-89.

* HSU S.M., RAINE L., FANGER H.

A comparative study of peroxidase - antiperoxidase method and Avidin-Biotin complex method for studying polypeptide hormones with radio-immunology-assay antibodies.

Am. J. Clin. Pathol., 1981a, 75, 734-738.

* HSU S.M., RAINE L., FANGER H.

Use of Avidin-Biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures.

J. Histochem. Cytochem., 1981b, 29, 577-580.

* LY B., BEISKE K., LARSEN N.

Immunological typing of acute leukemias : immunoenzymatic staining of fixed cells compared with immunofluorescence staining of unfixed cells in suspension.

Eur. J. Haematol., 1988, 41, 147-155.

* MARIE J.P., RIEFFERS B., BRUN B., REYES F., BRETON-GORIUS J., DREYFUS B.

Chronic granulocytic aplasia with partial blastic bone marrow involvement. Demonstration of myeloid origin of the blasts by ultrastructural detection of myeloperoxidase. A study of three cases.

Leuk. Res., 1980, 4, 399-407.

* MASON D.Y., LABAUME S., PREUD'HOMME J.L.

The detection of membrane and cytoplasmic immunoglobulins in human leukocytes by immunoperoxidase staining.

Clin. Exp. Immunol. 1977, 29, 413-421.

* MOIR D.J., GHOSH A.K., ABOULAZIZ Z., KNIGHT P.M., MASON D.Y.

Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies.

Br. J. Haematol., 1983, 55, 395-410.

* NADLER L.M., KORSMEYER S.J., ANDERSON K.C., BOYD A.W., SLAUGHENHOUP B., PARK E., JENSEN J., CORAL F., MAYER R.J., SALLAN S.E., RITZ J., SCHLOSSMAN S.F.

B-cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia.

J. Clin. Invest., 1984, 74, 332-340.

- * NEAME P.B., SOAMBOONSRUP P., BROWMAN G.P., MEYER R.M., BENGER A.,
WILSON W.E.C., WALKER I.R., SAEED N., MC BRIDE J.A.
Classifying acute leukemia by immunophenotyping : a combined FAB-
immunologic classification of AML.
Blood, 1986, 68, 1355-1362.

- * NORTON J.D., CAMPANA D., HOFFBRAND A.V., JANOSSY G., COUSTAN-SMITH E.,
JANI H., YAXLEY J.C., PRENTICE H.G.
Rearrangement of immunoglobulin and T cell antigen receptor genes in
acute myeloid leukemia with lymphoid-associated markers.
Leukemia, 1988, 1, 757-761.

- * REIFFERS J., BERNARD P., LARRUE J., DACHARY D., DAVID B., BOISSEAU M.,
BROUSTET A.
Acute erythroblastic leukemia presenting as acute indifferenciated
leukemia : a report of two cases with ultrastructural features.
Leuk. Res., 1985, 413-420.

- * REIFFERS J., DARMENDRAIL V., LARRUE J., VILLENAVE S.J., BERNARD P.,
BOISSEAU M., BROUSTET A.
Ultrastruture cytochemical prospective study of adult acute lympho-
blastic leukemia : detection of peroxidase activity in patients with
failing to respond to treatment.
Cancer, 1980, 48, 927-931.

- * REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEVEY R.H., SCHLOSSMAN S.F.
Discret stages of human intrathymic differenciation : analysis of
normal thymocytes and leukemic lymphoblastes of T lineage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 1588-1592.

- * ROTH J.
The colloidal gold marker system for light microscopy and electron
microscopic cytochemistry.
In : BULLOCK G.R., PETRUSZ P. (Eds) "Techniques in immunocytochemistry"
London : Academic Press. Vol 2, 1983, 217-284.

- * Second MIC Cooperative Study Group
Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification
of the acute myeloid leukemias.
Report of the worshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986.
Cancer genet. cytogenet., 1988, 30, 1-15.

* VODINELICH L., TAX W., BAI Y., PEGRAM S., CAPEL P., GREAVES M.F.
A monoclonal antibody (WT-1) for detecting leukemias of T-cell
precursors (T-ALL).
Blood, 1983, 62, 1108-1113.