



Leucémie lymphoïde chronique : apport de la cytométrie en flux

Chronic lymphocytic leukemia : flow cytometry contribution

سرطان الدم الليمفاوي المزمن : أهمية التعداد الخلوي المتعاقب

S. Benkirane, M. Aghrouh, A. Masrar, N. Benkirane Agoumi.

المخلص : مقدمة : يمثل سرطان الدم الليمفاوي المزمن جزء من الأمراض الليمفاوية التكاثرية B. وهو مرض بطيء النمو لكن تطوره متغير. والهدف من دراستنا هو تسليط الضوء على أهمية التعداد الخلوي المتعاقب في تشخيص سرطان الدم الليمفاوي المزمن. **المواد والطرق :** هذه دراسة استطلاعية امتدت على مدى سنتين (2005/2006) وشملت 13 حالة من حالات سرطان الدم الليمفاوي المزمن منتقاه من 42 حالة من متلازمة الأمراض الليمفاوية التكاثرية. البيانات السريرية تم الحصول عليها من الطلبات المرسلة من الأطباء. وطرق التشخيص تضمنت : صيغة الدم الكلي مع دراسة مورفولوجية للخلايا اللمفية، سفلت نقي العظم، خزع النخاع العظمي و التعداد الخلوي المتعاقب.

النتائج : ضمت الدراسة 13 حالة، 9 رجال و 4 نساء متوسط العمر 68.5 سنة. العلامات الطبية التي صادفناها في مرضانا عبارة عن تضخم الطحال، تضخم الغدد الليمفاوية والنقص في تعداد خلايا الدم. وكانت تقضي في الخلايا الليمفاوية تراوح ما بين 5.6 و 136 دراسة نخاع العظمي، أبانت عن احتشاد الخلايا اللمفاوية المتسرطنة الصغيرة الحجم. Matutes اعتمد التعداد الخلوي المتعاقب على مجموع نقاط .

مناقشة : يسهل تشخيص سرطان الدم الليمفاوي المزمن عن طريق : تعداد الدم الكلي والتعداد الخلوي المتعاقب. حاليا علاج هذا المرض يعتمد على تصنيف راي أو بنيت ولكن هناك حاجة ملحة تطور للحصول على معالم أكثر دقة نظرا للتطور المرضي المتخير لهذا المرض.

الاستنتاج : يعتبر التعداد الخلوي المتعاقب من الوسائل الأساسية في تشخيص ورصد الأمراض المتبقية في سرطان الدم الليمفاوي المزمن.

الكلمات الأساسية : سرطان الدم الليمفاوي المزمن، تزايد في الخلايا الليمفاوية، التعداد الخلوي المتعاقب.

Résumé : Introduction : la leucémie lymphoïde chronique fait partie des syndromes lympho-prolifératifs B. Il s'agit d'une maladie cliniquement indolente sur de nombreuses années, avec cependant une grande variabilité d'évolution.

Le but de notre étude est de souligner l'importance de l'analyse cytométrique dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique.

Matériel et méthodes : il s'agit d'une enquête prospective étalée sur deux ans (2005/2006) et qui a intéressé 13 cas de leucémie lymphoïde chronique isolés à partir de 42 syndromes lympho-prolifératifs B. Les données cliniques sont rapportées sur les demandes d'examen dûment remplies par le praticien. Les moyens ayant permis le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique sont : l'hémogramme avec une étude morphologique des lymphocytes périphériques, le myélogramme +/-, la biopsie ostéo-médullaire et l'immunophénotypage sur le cytomètre FC500™ (Beckman Coulter).

Résultats : Sur les 13 cas, il y avait 9 hommes et 4 femmes avec une moyenne d'âge de 68.5 ans et des extrêmes allant de 45 à 80 ans. Les circonstances de découverte les plus fréquemment retrouvées sont : la splénomégalie, les polyadénopathies et les cytopénies. Chez nos patients, la lymphocytose variait de 5,6 à 136 g/l. L'étude de la moelle osseuse pratiquée chez certains cas a montré un envahissement lymphocytaire fait de petits lymphocytes d'aspect mature. L'analyse cytométrique s'est basée sur le score de Matutes.

Discussion : dans la majorité des cas, le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique est facilement posé grâce à l'hémogramme et à l'immunophénotypage. A l'heure actuelle, les décisions thérapeutiques sont basées sur les classifications de Rai ou de Binet ; mais il est important de posséder d'autres marqueurs prédictifs plus pertinents vu l'hétérogénéité évolutive.

Conclusion : La cytométrie en flux est d'un apport certain dans le diagnostic et le monitoring de la maladie résiduelle de la leucémie lymphoïde chronique.

Mots clés : Leucémie lymphoïde chronique.

Abstract : Introduction: chronic lymphocytic leukemia is a part of B lympho-proliferative diseases. Clinically, it is an indolent disease though it has a variable evolution.

Our aim is to focus on the importance of flow cytometry in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia.

Material and methods : this is a prospective survey conducted in 2005/2006, concerned 13 cases of chronic lymphocytic leukaemia from 42 B- cell chronic lymphoproliferative syndromes. The clinical features were summarized in the data file filled by the praticiens. Chronic lymphocytic leukemia is studied in our laboratory by different means such as: hemogram with a morphological aspects of peripheral lymphocytes, osteomedullary biopsy myelogram, and immunophenotyping by FC500™ cytometer (Beckman Coulter).

Results : within the 13 cases of chronic lymphocytic leukemia, there were 9 male and 4 female having a mean age of 68.5 years old with extremes from 45 to 80 years old. The most important signs found were: polyadenopathy, splenomegaly or cytopenia. In our patients, lymphocytosis was ranged from 5,6 to 136 g/l. The marrow was infiltrated by small lymphocytes in some cases. The cytometric analysis was based on Matutes score.

Discussion : in most cases, the chronic lymphocytic leukemia diagnosis seems to be easy based on the hemogram and immunophenotyping. Actually, treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia depends on Rai or Binet classifications ; still, it is important to have more accurate markers due to its variable evolution.

Conclusion : flow cytometry is of real help in the diagnosis and the monitoring of residual disease in chronic lymphocytic leukemia.

Key Words : Chronic lymphocytic leukemia.

Tiré à part : S. Benkirane : Service de laboratoire d'hématologie, hôpital Ibn Sina CHU de Rabat - Salé - Maroc.

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie maligne chronique caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions et la rate de cellules lymphocytaires B. La moelle osseuse constitue le point de départ de la maladie contrastant avec les lymphomes non hodgkiniens qui peuvent entrer en une phase leucémique dans leur évolution et poser parfois un problème de diagnostic différentiel [1,2].

Décrite depuis plus d'un siècle, elle est l'objet ces dernières années d'un regain d'intérêt du fait de son individualisation nette des autres syndromes lymphoprolifératifs B chroniques, d'une meilleure connaissance de sa physiopathologie cellulaire, de la démonstration de l'utilité de nouveaux marqueurs pronostiques et d'un renouveau thérapeutique.

L'objectif de notre travail est de souligner, à travers une étude prospective, l'intérêt de l'analyse cytométrique dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique.

Matériel et méthodes

Cette enquête prospective est réalisée au sein de notre service durant la période janvier à 2005 – décembre 2006. L'immunophénotypage est effectué sur le cytomètre FC500 de Beckman Coulter. Treize cas de leucémie lymphoïde chronique sont répertoriés sur les 42 cas de syndromes lymphoprolifératifs B étudiés durant les deux ans. Les données épidémiologiques et cliniques sont rapportées dans les demandes d'examen dûment remplies par le praticien. Nos méthodes d'analyse comportent l'hémogramme avec étude morphologique des lymphocytes périphériques, le myélogramme +/-, éventuellement la biopsie ostéo-médullaire et l'analyse cytométrique. Notre protocole d'immunophénotypage est adopté pour tous les syndromes lymphoprolifératifs B avec un gating lymphocytaire SSC/CD45 (tableau I). Des déviations de ce profil cytométrique typique ont amené à l'adoption du score de Matutes qui comprend 5 paramètres (tableau II).

Tableau I : Protocole cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B [20]

Marqueurs	Intérêt	CLL	MCL	FL	HCL
CD3/CD19	différencier proliférations B des T	-/+	-/+	-/+	-/+
CD5/CD23	spécifique pour la majorité des LLC	+/+	+/-	-/-	-/-
SIg/CD20	concomitants dans l'ontogénie du LB,	Dim/ Dim	+/+	+/+	+/+
FMC7	parmi les SLP-B seule CLL est FMC7 –	-	+	+	+
CD79b	parmi les SLP-B seule CLL est CD79b -/Dim	-/Dim	+	+	+
CD10	diagnostic différentiel LLC/FL	-	-	+	-
CD25	diagnostic différentiel CLL/HCL	-	-	-	+
CD11c	expression aberrante dans CLL	+/-	-	+/-	+

MCL : Mantle Cell Lymphoma, **FL** : Follicular Lymphoma, **HCL** : Hairy Cell Lymphoma

Tableau II : Score de Matutes [20]

Marqueur	Score
Intensité SIg faible	1
CD5+	1
CD23+	1
FMC7 –	1
CD79b ou CD22 faible ou -	1

Le diagnostic de LLC est retenu pour un score >3.

Résultats

Les 13 cas de leucémie lymphoïde chronique constituent 30.9% de notre échantillon de syndromes lymphoprolifératifs B étudiés. Ils proviennent de différents services de médecine ou de la consultation d'hématologie externe.

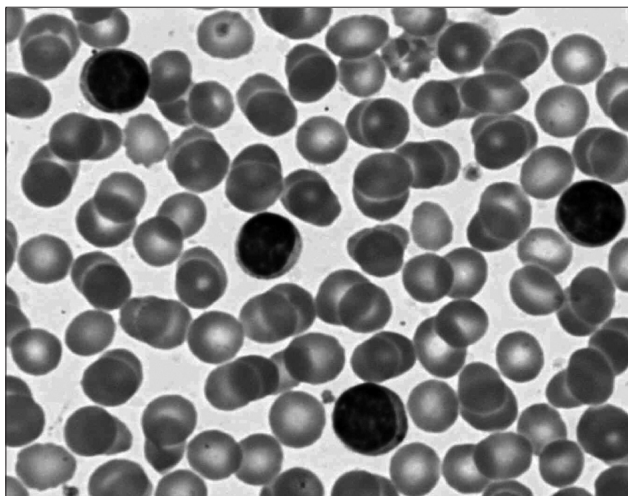
Notre série comprend 9 hommes et 4 femmes avec une moyenne d'âge à 68.5 ans (limites 45 à 80 ans). Les circonstances de découverte diffèrent selon les cas (tableau III).

Tableau III : Circonstances de découverte de la leucémie

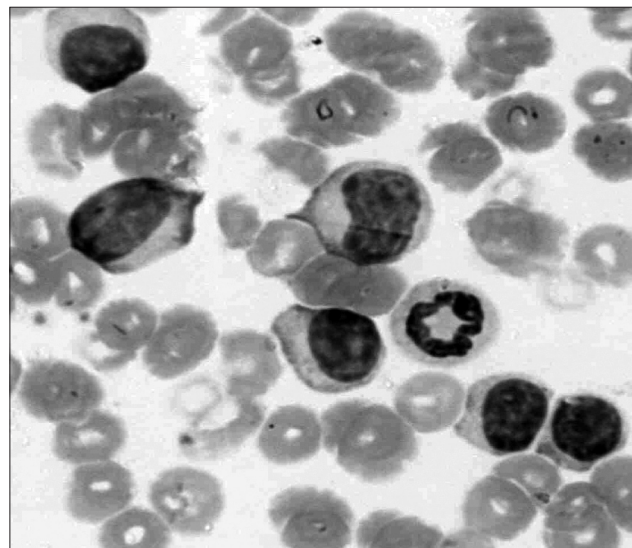
CIRCONSTANCES	NOMBRE	POURCENTAGE
Patients asymptomatiques	4	30.7%
Syndrome tumoral		
SMG	4	30.7%
HMG	0	0%
PADP	5	38%
Cytopénies		
Anémie	10	76.9%
Neutropénie/ Sd fébrile	0 / 6	0 / 46%
Thrombopénie/ Sd hémorragique	9 / 1	69.2 / 7.6%
Thrombophlébite/ Sd hémorragique		
Thrombopénie	1	7.6

SMG : Splénomégalie, **HMG** : Hépatomégalie, **PADP** : Polyadénopathies, **Sd** : Syndrome

Les données de l'hémogramme varient d'un patient à l'autre et l'étude morphologique du frottis a révélé un envahissement lymphocytaire variable (taux lymphocytaire >61% des leucocytes sanguins), l'aspect typique est celui d'un petit lymphocyte à chromatine mottée et un cytoplasme clair basophile (figure1), des écarts à ce profil morphologique sont parfois observés (figure 2). Des taux de prolymphocytes variants de 2 à 26% (tableau IV).

Figure 1 : Etude morphologique du frottis sanguin

Aspect cytologique sanguin montrant des lymphocytes d'aspect mature (MGG, x1000)

Figure 2 : Aspect cytologique sanguin montrant

des prolymphocytes Sang (MGG, x1000)

Tableau IV : Résultats de l'hémogramme des patients de notre série

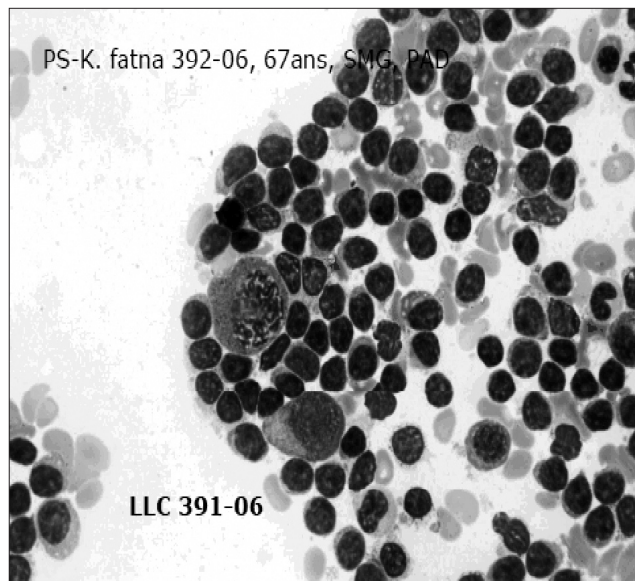
Patient	Hgb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	PNN (G/L)	L (G/L)	ProL (G/L)	PLT (G/L)
1	15	91.4	31.1	6.6	22.7	<2	179
2	7.9	86.5	27.4	4.2	41.6	10	132
3	10	89.7	30.8	3.4	5.6	<2	93
4	11.3	89.2	30.7	13.6	24.4	>2	14
5	10.4	93.6	32.4	2.7	17.4	<2	102
6	12.9	89	30.7	2.8	46.7	<2	104
7	11.3	91.1	31.1	8	59.8	5	237
8	10.6	94.8	31.2	8.9	91.5	12	179
9	11.8	78.6	27.4	37.5	107.6	<2	289
10	12.7	83.8	28	3.2	13.1	<2	81
11	5.7	100	32.2	10.7	136	<2	31
12	6.6	87	28.2	17.1	102.7	10 à 20	140
13	9.7	106.4	35.8	21.5	29.2	<2	54

Hgb : Hémoglobine, **MCV** : volume globulaire moyen, **MCH** : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, **PNN** : polynucléaire neutrophile, **L** : lymphocyte, **ProL** : prolymphocyte, **PLT** : plaquettes .

Le myélogramme réalisé par les praticiens chez neuf patients a montré un envahissement lymphocytaire fait

de petits lymphocytes d'aspect mature avec un taux de prolymphocytes allant de 2% à 12% (figure 3).

Figure 3 : Aspect cytologique médullaire



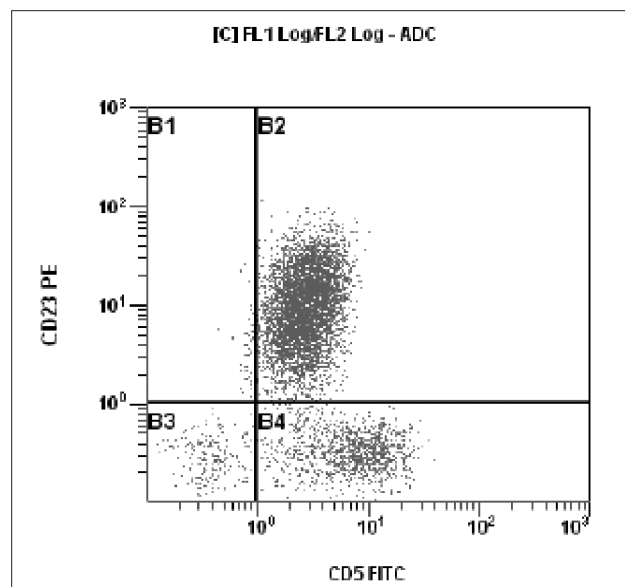
Il s'agit d'un patient de notre série myélogramme (MGG, x400)

Nos patients ont bénéficié d'une analyse cytométrique basée sur le score de Matutes (tableau V). La coexpression CD5/CD23 a été retrouvée chez 9 de nos patients (figure 4).

Tableau V : Score de Matutes des patients de notre série

Cas	Intensité S-Ig	CD5	CD23	CD79b	FMC7	Score
1	faible	+	+	-	-	5
2	faible	-	+		-	3
3	faible	+	-		-	3
4		+	+	+	-	3
5	faible	+	+	+	-	4
6		+	+	-	-	4
7	faible	+	+	+	-	4
8	faible	+	+	+	-	4
9	faible	+	+	-	-	5
10	faible	+	+	-		4
11	faible	-	+	-		3
12	faible	+	3	3		3
13	faible	-	+	+		4

Figure 4 : Aspect immunophénotypique d'un patient



de notre série sur cytomètre FC500

Discussion

La leucémie lymphoïde chronique représente les deux tiers des syndromes lymphoprolifératifs B [1, 3,5-16]. Le pourcentage de 30.9% de tous les syndromes lymphoprolifératifs B signe sa représentativité au sein de notre série et nous pousse à envisager d'autres études de plus grande importance pour mieux évaluer la prévalence de la LLC dans la population marocaine.

Elle est plus fréquente chez l'homme et le plus souvent chez le patient de plus de 50 ans avec une médiane d'âge à 65 ans [1, 3,7-14]. Dans notre série, les données rejoignent celles de la littérature avec une prédominance masculine (sexe ratio de 2,25 :1) et une moyenne d'âge à 68.5 ans avec des extrêmes allant de 45 à 80 ans.

La découverte de la maladie se fait le plus souvent lors d'un hémogramme systématique révélant une lymphocytose sanguine chez un sujet apparemment en bonne santé [1,3,5, 8-10, 14,15], ce fut le cas pour quatre de nos patients. Parfois, on note la présence d'adénopathies superficielles [1, 3, 5,8-10, 14,15] comme chez 38.4% de nos cas. 30.7% des sujets avaient une splénomégalie alors que d'autres présentaient une cytopénie (anémie, thrombopénie).

Le diagnostic repose sur une lymphocytose périphérique

> 5 g/l qui doit exister depuis plusieurs mois et qui est variable en moyenne autour de 30 g/l mais peut atteindre des chiffres beaucoup plus élevés [1, 3, 7, 8, 10,14-15]; dans notre série, le taux de lymphocytes variait de 5.6 g/l à 136 g/l avec une moyenne de 53.7 g/l. Cette lymphocytose est confirmée par l'étude morphologique du sang et de la moelle osseuse (le myélogramme est non indispensable au diagnostic) qui peut en plus révéler la présence de formes atypiques ou encore de prolymphocytes allant de 2% à 20% sans dépasser 55% qui est le taux requis pour le diagnostic de LPL [1, 3, 5, 7, 10, 14-16]. La neutropénie est souvent décrite comme étant à l'origine des différentes complications infectieuses [1, 3, 7, 8, 10,14-16]. Dans notre série, 6 de nos patients avaient au contraire une neutrophilie variant de 8.9 à 37.5 G/L.

L'immunophénotypage est un outil diagnostique essentiel permettant de démontrer la clonalité de la population néoplasique par l'homogénéité λ ou κ , de mettre en évidence la coexpression caractéristique du CD5 et du CD23, de définir le score de Matutes, d'établir le pronostic de la leucémie lymphoïde chronique (CD38, ZAP70), de localiser les cibles thérapeutiques (CD20, CD52 ou encore plus récemment le Preferentially expRessed Antigen in Melanoma ou PRAME et la fibromodulline) et enfin d'évaluer la maladie résiduelle après traitement [1,3,5,7,8-10,14-16,19-21].

La coexpression CD5/CD23 a été retrouvée chez 9 patients, 3 sujets avaient un CD5 négatif et un cas avait un CD 23 négatif. Certains auteurs rapportent que l'absence du CD5 est exceptionnelle et qu'elle signe alors une forme agressive de la maladie [12]. Le score de Matutes variait de 3 à 5 points.

Certains de nos patients ont bénéficié d'un dosage de marqueurs sériques : deux patients ont eu un dosage de la β 2-microglobuline avec des taux très élevés, pour l'un qui a en plus bénéficié d'un dosage de la LDH (taux > 14 fois la normale), La détermination du LDH faite chez 11 cas, a montré des chiffres augmentés (taux > 1.5-3 fois la normale) chez quatre patients.

Une fois le diagnostic posé, il faut déterminer la pertinence d'un traitement. Deux classifications clinico-biologiques sont actuellement utilisées permettant de codifier les indications thérapeutiques : celle de Rai établie en 1975 puis révisée en 1981 pour donner celle de Binet. Mais le pronostic des patients de stade clinico-biologique précoce est encore difficile à déterminer d'où l'intérêt des nouveaux marqueurs prédictifs tels que le statut mutationnel de IgVH, l'expression du CD38 ou ZAP70 et la cytogénétique par hybridation in situ fluorescente (FISH) [1-3, 8-13, 16].

Conclusion

Si l'analyse cytologique reste la base du diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique et des autres syndromes lymphoprolifératifs B, l'immunophénotypage par cytométrie en flux est un outil diagnostique essentiel visant à établir le profil phénotypique caractéristique soit la co-expression du CD5 et du CD23 et le score de Matutes. De plus, l'analyse cytométrique a un intérêt croissant dans l'évaluation pronostique, la mise en évidence de certaines cibles thérapeutiques et le suivi de la maladie résiduelle.

Références

1. Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Harris NL. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In : Pathology & Genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (World Health Organization classification of tumors) ; IARC Press Lyon, 2001.
2. Benkirane Agoumi A. La cytométrie en flux dans la LLC-B, protocole SLP. 1ères Journées de l'UFR d'Hématologie et XIèmes Journées de la SMHT, 16-17 Novembre 2006, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat (Abstract).
3. Kipps TJ. Chronic Lymphocytic Leukemia and Related diseases. In : Williams Hematology ; Mc Graw Hill Professional, 2000.
4. Ellis DW, Eaton M, Fox RM, Juneja S, Leong ASY, Miliuskas J et al. Diagnostic pathology of lymphoproliferative disorders. Pathology, 2005 ; 37 : 434-456.
5. Felman P, Merle-Béral H. Aspects cytologiques et immunophénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. Revue Française des Laboratoires, 1999; 313: 31-37.
6. Chiorazzi N, Rai K R, Ferrarini M. Mechanisms of disease: Chronic Lymphocytic Leukemia. N Eng J Med, 2005 ; 352: 804-815.
7. Merle-Béral H. Leucémie lymphoïde chronique : Biologie et Pronostic. Revue Française des Laboratoires, 2006; 379: 37-43.
- 8- Travade P, Tournillac O, Dighiero G. Leucémie lymphoïde chronique. Encycl Méd Chir, 2000 ; Hématologie : 13-013-B-20, 12p.
9. Abbott B L. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent advances in diagnosis and treatment. The Oncologist, 2006; 11: 21-30.
10. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. British Journal of Haematology, 2004; 125 : 294-317.
11. Dighiero G. CLL Biology and Prognosis. Hematology, 2005 : 278-284.
12. Cazin B. Classification pronostique de la LLC. Hématologie, 2003 ; 9 : 403-411.
13. Evrard S, Gaussem P, Helley D, Darnige L. Facteurs pronostiques de la leucémie lymphoïde chronique : apport des marqueurs biologiques récents. Ann Biol Clin, 2005; 63 : 589-597.
14. Binet J L, Maloum K, Leblond V, Sutton L, Gabarre J, Gonzalez H, Merle-Béral H. Leucémie lymphoïde chronique. In : Cancers : évaluation, traitement et surveillance. JM Andrieu & P Colonna Ed. ESTEM, Paris 1997.
15. Sotto J J, Sotto M F. Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. Revue Française des Laboratoires, 1999 ; 313 : 21-25.
16. Dighiero G. Recommandations pour le diagnostic, l'évaluation pronostique et le traitement de la leucémie lymphoïde chronique. Hématologie, 2003 ; 9 : 79-88.
17. Epstein FH. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. N Eng J Med, 1999 ; 341 : 1520-2159.
18. Byrd J C, Stilgenbauer S, Flinn I W. Chronic Lymphocytic Leukemia. Hematology, 2004 : 163-183.
19. Gudgin E J, Erber W N. Immunophenotyping of lymphoproliferative disorders: state of the art. Pathology, 2005; 37 : 457-478.
20. Matutes E. New additions to antibody panels in the characterization of chronic lymphocytic leukemia. J Clin Pathol, 2002; 55 : 180-183.
21. Leporrier M. Leucémie lymphoïde chronique. Hématologie, 2003, 9 : 13-20.