

Classification par cryométrie en flux de 104 cas d'hyperlymphocytose de l'adulte

Ines Safra¹, Farah Laouiti¹, Zeineb Manai², Sami Zriba³, Houda Hmida¹, Moez Mdhaffer⁴, Jihene Bettaieb⁵, Chaker Fouzai¹, Abdeladhim Ben Abdeladhim¹, Ben Romdhane Neila²

¹Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie moléculaire et cellulaire, Tunis

²Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Hôpital La Rabta, Service d'Hématologie, Tunis, Tunisie ;

³Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Hôpital Militaire, Service d'Hématologie, Tunis, Tunisie ;

⁴Université de Sfax, Faculté de Médecine de Sfax, Hôpital Hédi Chaker, Service d'Hématologie, Sfax, Tunisie ;

⁵Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Institut Pasteur, Service d'épidémiologie, Tunis, Tunisie

I. Safra, F. Laouiti, Z. Manai, S. Zriba, H. Hmida, M. Mdhaffer, J. Bettaieb, C. Fouzai, A. Ben Abdeladhim, N. Ben Romdhane

I. Safra, F. Laouiti, Z. Manai, S. Zriba, H. Hmida, M. Mdhaffer, J. Bettaieb, C. Fouzai, A. Ben Abdeladhim, N. Ben Romdhane

Classification par cryométrie en flux de 104 cas d'hyperlymphocytose de l'adulte

Adult lymphocytosis classification by flow cytometry

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°05) : 352-356

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°05) : 352-356

R É S U M É

Prérequis : L'immunophénotypage est un outil incontournable dans le cadre du diagnostic positif et différentiel de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Celle-ci est évoquée devant toute hyperlymphocytose persistante chez l'adulte.

But : Evaluer l'apport de cytométrie en flux dans l'orientation diagnostique d'une hyperlymphocytose. Permet-elle la discrimination de la LLC des autres causes d'hyperlymphocytoses ?

Méthodes : Cent quatre échantillons sanguins de patients adultes présentant un chiffre de lymphocytes > 5000 élé/mm³ évoluant de plus de trois mois ont été analysés, selon un large panel d'anticorps monoclonaux en trois couleurs, par le logiciel Cell Quest.

Résultats : Le diagnostic de syndrome lympho-prolifératif B a été retenu chez 83 cas dont 50 cas de LLC typique avec un score de Matutes ≥ 4 et 12 cas de LLC atypique avec un score de Matutes = 3. Les diagnostics de la leucémie à tricholeucocytes et du lymphome folliculaire ont été orientés de manière spécifique par l'expression antigénique respective du CD103 et du CD10. Les LGL-T ont formé l'étiologie la plus fréquente des syndromes lymphoprolifératifs T. Des cas rares de prolifération NK et NK/T ont été retrouvés.

Conclusion : La cytométrie en flux est une technique performante dans le diagnostic étiologique des hyperlymphocytoses, permettant d'éviter dans un grand nombre de cas toute investigation invasive.

S U M M A R Y

Background: Positive and differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is based on immunophenotyping analysis. CLL is searched whenever a persistent lymphocytosis is found.

Aim: To evaluate the performance of flow cytometry in etiologic diagnosis of lymphocytosis. Could it allow us to distinguish CLL from other causes of lymphocytosis?

Methods: Blood samples from 104 adult patients having a rate of lymphocytes > 5000 élé/mm³ persisting more than three months were analyzed using a large panel of monoclonal antibodies in three colors and Cell Quest software.

Results: Lymphoproliferative B disorder was retained in 83 cases, including 50 cases of typical CLL with Matutes score ≥ 4 and 12 cases of atypical CLL with Matutes score = 3. Diagnosis of hairy cell leukemia and follicular lymphoma were guided by the respective specific antigen expression CD103 and CD10. Large granular T lymphoma (LGL-T) was the most common etiology of lymphoid T proliferation. Unusual cases of Natural Killer (NK) and NK/T proliferations were found.

Conclusion: The Flow cytometry is a powerful tool to establish lymphocytosis etiological diagnosis; it avoids invasive investigations in a large number of cases.

M o t s - c l é s

Hyperlymphocytose, leucémie lymphoïde chronique, cytométrie de flux.

Key - words

Lymphocytosis, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry.

L'accumulation dans la moelle et le sang périphérique de lymphocytes matures chez l'adulte évoque en premier lieu une leucémie lymphoïde chronique B (LLC B), la plus fréquente des hémopathies malignes. Toutefois une hyperlymphocytose > 5000 éléments/mm³ évoluant depuis plus de trois mois chez l'adulte ne correspond pas obligatoirement à une LLC, notamment devant la diversité des présentations cliniques évolutives particulières. Le clinicien se trouve à chaque fois confronté à des difficultés d'ordre diagnostique et pronostique en vue d'une prise en charge thérapeutique adéquate, d'où l'intérêt de l'immunophénotypage.

L'objectif de ce travail est de classer par cytométrie en flux les hyperlymphocytoses adressées à notre laboratoire entre 2006 et 2011.

PATIENTS ET MÉTHODES

Les échantillons prélevés sur EDTA, parvenus, sont traités instantanément. Un frottis sanguin est effectué, les cellules mononucléées sont séparées selon un gradient de densité Ficoll, lavées et reconstituées dans du PBS BSA azidé, puis réparties à raison de 500000 cellules par tube. Celles-ci sont incubées avec des anticorps monoclonaux couplés à des fluochromes en trois couleurs (FITC, PE, PE-Cy5.5), lavées puis analysées par un cytomètre en flux (CMF) FACS Diva et le logiciel CellQuest. Le panel d'anticorps utilisés permet d'analyser quantitativement l'expression antigénique normale des lymphocytes T : CD 3+, CD4+ ou CD8+, des cellules NK : CD16+ et/ou CD56+ et des lymphocytes B : CD19+, CD20+, Kappa+ ou Lambda+, ainsi que l'ensemble des antigènes B impliqués dans le score de Matutes : CD5, CD79b, CD22, CD23 et FMC7. En cas d'orientation clinico-morphologique particulière, d'autres antigènes sont analysés : CD103, CD11c, CD25 si suspicion de leucémie à tricholeucocytes, CD10 si suspicion de lymphome folliculaire.

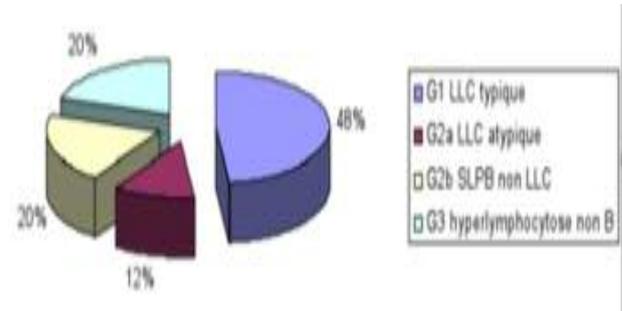
Le diagnostic par CMF repose sur les arguments suivants :

- Une prolifération lymphoïde B maligne est retenue en cas de monoclonalité B diagnostiquée par la positivité exclusive d'une chaîne légère Kappa ou Lambda, en présence ou non d'un taux de cellules B augmenté, dépassant 30% du total des lymphocytes, permettant ainsi le calcul du score de Matutes. Le diagnostic de LLC est écarté lorsque ce score est <3.
- Une prolifération lymphoïde T est évoquée lorsque le rapport CD4/CD8 est perturbé, le taux des cellules T pouvant atteindre chez les sujets normaux les 90%.
- Une prolifération des cellules NK est évoquée lorsque leur taux dépasse 30%.

RÉSULTATS

Notre étude a porté sur 104 échantillons sanguins adressés par trois centres hospitaliers (La Rabta : 82%, Hédi Chaker Sfax : 10%, Militaire : 8%) pour suspicion de LLC. L'immunophénotypage nous a permis de répartir les 104 patients selon le score Matutes en trois groupes : (Figure1)

Figure 1 : Distribution par CMF des 104 patients en intégrant le score Matutes et la morphologie



- groupe 1 (score de Matutes ≥ 4): 50 cas de LLC B typiques (48%).

- groupe 2 : (score de Matutes <4) : 33 cas de syndromes lymphoprolifératifs B (32%)

- 2a : 12 cas de LLC B atypiques (12%)

- 2b : 21 cas de syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B) non LLC (20%)

- groupe 3 : 21 cas d'hyperlymphocytose non B (20%).

Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des trois groupes sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des trois groupes

	G1 : LLC-B G2 : SLP-B G3 : SLP sans		
	Matutes ≥ 4 (n = 50)	Matutes < 4 (n = 33)	Monoclonalité B (n = 21)
Age (an) Médian	65	63	53
(min-max)	(43-83)	(32-77)	(22-63)
Sexe ratio	1,63	1,06	2
Découverte fortuite	44%	10%	20%
Syndrome tumoral	34%	54%	20%
Cytopénies :			
Anémie	30%	31%	19%
Thrombopénie	6%	16%	5%
Neutropénie	26%	29%	9%
Taux de lymphocytes			
Médian (X 103 / mm³)	41	32	8
(min-max)	(8 - 110)	(20 - 100)	(5 - 28)

La cytométrie nous permet d'établir les pourcentages des cellules lymphoïdes B, T et NK parmi le total des lymphocytes. Le pourcentage, des cellules B (CD19+) varie peu entre les groupes 1 et 2 avec respectivement des médianes de 87% vs 80%. Dans le groupe 2, les valeurs les plus faibles sont rencontrées au cours de la leucémie à tricholeucocytes. Pour le groupe 3, le pourcentage des lymphocytes B est < 30% dans tous les cas ne concordant pas avec une prolifération B.

Les pourcentages de cellules T sont très diminués dans les groupes 1 et 2 avec des médianes respectives de 12 % et 8%.

Le pourcentage médian des cellules NK dans les groupes 1 et 2 est de 1 %.

Le diagnostic immunophénotypique du groupe 2 nous a permis de retenir devant la présence d'expressions antigéniques spécifiques les diagnostics suivants :

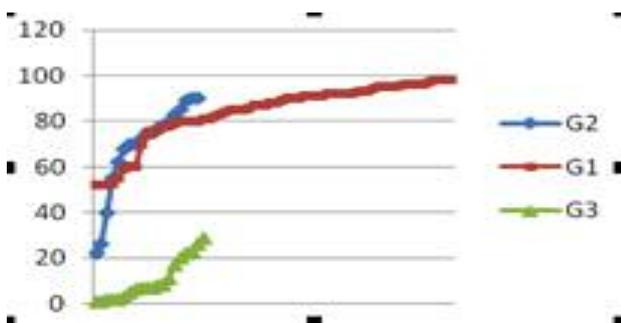
- Six cas de leucémie à tricholeucocytes exprimant les antigènes CD103, CD11c et CD25.

- Un cas de lymphome folliculaire leucémisé exprimant le CD10.

Le diagnostic immunophénotypique du groupe 2 nous a permis d'évoquer les diagnostics suivants :

- Douze cas de LLC atypique, fortement évoquée devant la présence des trois expressions aberrantes par les lymphocytes B matures: expression du CD5 (antigène T), expression du CD23 (antigène B immature) et diminution de l'intensité de l'Ig de surface (Figure 2). Ainsi, le diagnostic de LLC a été évoqué chez 62 cas : 50 cas de LLC typique du groupe 1 et 12 cas de LLC atypique du groupe 2 et retenu en confrontation avec les données morphologiques.

Figure 2 : Distribution des taux des cellules B CD19+ dans les trois groupes de patients



- Quatre cas de lymphome du manteau leucémisé exprimant comme la LLC d'une façon aberrante le CD5 alors que le CD23 est négatif.

- Deux cas de lymphomes spléniques à lymphocytes villeux exprimant le CD11c alors que le CD103 était négatif.

Faute d'expression antigénique spécifique, nous n'avons pas pu

évoquer aucun diagnostic dans huit cas de SLP B de ce groupe. (Tableau 2).

Pour le groupe 3 (Tableau 3), le diagnostic d'une hyperlymphocytose non B réactionnelle a été évoqué dans 9 cas présentant un rapport CD4/CD8 normal : 1,2 à 2.

Une prolifération d'une population lymphoïde T CD4+ a été retrouvée dans 2 cas avec un rapport CD4/CD8 respectivement = 17 et 26. Pour ces deux patients, la prolifération de cellules T de phénotype CD4+ CD3+ CD2+ CD5+ CD8- en confrontation avec la cytologie nous a permis d'évoquer le diagnostic d'un syndrome de Sézary.

Une prolifération d'une population lymphoïde T CD8+ avec un rapport CD4/CD8 < 1, a été retrouvée dans 6 cas. Le diagnostic d'une leucémie à LGL T a été évoqué sans toutefois écarter une hyper lymphocytose T CD8 réactionnelle.

Une prolifération d'une population à cellules NK a été retrouvée dans 3 cas, avec un taux de cellules CD16+ et ou CD56+ > 30% respectivement de 44, 46 et 56%. Il s'agissait d'une lymphocytose chronique bénigne dans deux cas et d'une leucémie à cellules NK associée à une hypertension portale dans le troisième cas.

Une prolifération particulière d'une population à cellules NK/T (CD56+/CD3+/CD8+) représentant 43% de l'ensemble des lymphocytes a été retrouvée dans un cas. Il s'agissait d'une lymphocytose réactionnelle conduisant à la découverte d'une maladie de Hodgkin.

DISCUSSION

Il est vrai que le terme d'hyperlymphocytose chez l'adulte est assimilé à une LLC dans un grand nombre de cas. En fait, les SLP constituent un groupe hétérogène de proliférations d'éléments lymphoïdes matures.

La cytologie constitue un moyen d'orientation diagnostique, mais ne peut pas définir avec précision le type de SLP, d'où l'intérêt de l'immunophénotypage qui ajoute aux critères morphologiques des critères d'expression antigénique plus ou moins spécifiques, permettant d'attribuer une classification des différents SLP. Au cours de ce travail nous analysons 104 cas d'hyperlymphocytoses de l'adulte. Dans notre série, 80% des hyperlymphocytoses sont le résultat d'un SLP-B. D'ailleurs, il est connu que les SLP touchant la lignée lymphoïde B sont les

Tableau 2 : Répartition par CMF des syndromes lymphoprolifératifs B de notre série en comparaison avec l'étude Sanchez ML et al (5)

Diagnostic SLP-B	LLC-B typique n (%)	LLC-B atypique n (%)	HCL n (%)	SLVL n (%)	FCL n (%)	Non classés n (%)
Notre étude n = 83 cas	50 (60)	12 (14,4)	6 (7,2)	2 (2,4)	1 (1,2)	8 (9,6)
Sánchez ML et al (5) n = 467 cas	382 (81,7)	382 (81,7)	13 (2,78)	14 (2,99)	22 (4,71)	

LLC-B : leucémie lymphoïde chronique B, HCL : Leucémie à tricholeucocytes, MCL : Lymphome de manteau, SLVL : Lymphome splénique à lymphocytes villeux, FCL : lymphome folliculaire.

Tableau 3: Répartition par CMF des hyperlymphocytoses non B (Groupe 3 de notre série)

Diagnostic	Leuc LGL T	Sd Sézary	Pro NK	Pro NK/T	L T réactionnelle
Total :					
n = 21 cas	6 cas	2 cas	3 cas	1 cas	9 cas

Leuc LGL T : leucémie de type LGLT, Sd Sézary : syndrome de Sézary, Pro NK : prolifération à cellules NK, Pro NK/T : prolifération à cellules NK/T, Lympho T réactionnelle : lymphocytose T réactionnelle.

plus fréquents, dont la leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) qui est la plus fréquente des leucémies chez l'adulte (1). L'expression du CD19 ou pourcentage de cellules lymphoïdes B par cytométrie en flux au cours des lymphocytoses est à elle seule un facteur important d'orientation diagnostique, elle passe d'une valeur de 5 % chez les sujets normaux à un taux dépassant les 50% au cours des SLP-B comme l'avait montré une étude établie par Ginaldi et al (2). Dans notre série, le taux des cellules B varie peu entre la LLC et les autres SLP-B non LLC (87% vs 80%) ne permettant pas la discrimination entre les deux groupes. Toutefois les valeurs minimales sont de 52% dans le groupe 1 et de 22% dans le groupe 2. Ainsi des taux faibles de prolifération B, parfois à la limite de la normale, sont rencontrés plutôt dans le groupe 2. Nos résultats concordent avec les données de la littérature décrivant une hyperlymphocytose B modérée surtout dans la leucémie à tricholeucocytes. La présence d'antigènes spécifiques : CD103 et le DBA44 (3, 4) permettent de retrouver cette population tumorale même lorsqu'elle est minoritaire. Le tableau 2 rapporte les fréquences des SLP-B retrouvés dans notre série et celles d'une autre étude analysant l'expression des antigènes par CMF au cours des SLP-B : l'étude Espagnole réalisée par Sánchez ML et al en 2002 (5) sur 467 cas de SLP-B. La fréquence de la LLC dans notre série est légèrement inférieure à celle retrouvée dans l'étude espagnole. L'incidence de cette maladie est estimée à 3,7 /100000 habitants (6). Sa fréquence est variable selon les régions, elle représente 22-30 % des leucémies de l'adulte (7-12). La fréquence de la leucémie à tricholeucocytes dans notre série est supérieure à celle rapportée par la littérature (13-17), Ceci peut être dû à des facteurs génétiques ou environnementaux particuliers à notre environnement, mais aussi au fait que nous incluons systématiquement dans notre panel, et indépendamment des résultats morphologiques, l'analyse du CD 103 et du CD11c marqueurs relativement spécifiques de cette prolifération.

La fréquence du lymphome de manteau leucémique dans notre série est comparable à celle de la littérature, et suggère que l'intégration du profil d'expression du CD5, CD23, l'intensité d'expression de l'immunoglobuline avec le score de Matutes permettent généralement de différencier les LLC atypiques avec un score Matutes = 3 et le lymphome du manteau. (5) Le lymphome du manteau dans sa forme leucémique représente 2-10% de l'ensemble des lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH), son incidence est de 0,5/100000 H/an (18). Au cours de notre étude, 2 cas de lymphomes spléniques à lymphocytes villeux ont été diagnostiqués parmi les 83 cas de

SLP-B. Cette fréquence se rapproche de l'étude espagnole.

Dans notre série, la fréquence des proliférations non B est de 20%. Cette fréquence varie dans les laboratoires selon la nature des services de recrutement des patients (19). Ceci nous incite à sensibiliser encore plus les dermatologues et les internistes de l'apport de la CMF dans le diagnostic du syndrome de Sézary dont l'incidence est évaluée à 0,4/100000 H/an (20).

En concordance avec les données de la littérature, le syndrome lymphoprolifératif T le plus fréquent dans notre série correspondrait à la leucémie LGL T (Tableau 3) (21). L'inclusion des antigènes T et NK dans notre panel de routine nous a permis de diagnostiquer des cas rares d'hyperlymphocytoses à NK ou NK/T. Parmi eux, deux cas de prolifération NK et un cas de prolifération T/NK sont réactionnelles. Ces hyperlymphocytoses sont rapportées sous forme de cas isolés par la littérature (22). Le caractère réactionnel a été évoqué en l'absence de preuve de monoclonalité. L'évolution réversible a confirmé ultérieurement le diagnostic.

Au cours de notre étude, la fréquence des hyperlymphocytoses réactionnelles est de 8%. Cette fréquence dépasse 80% dans les services de médecine interne. Ceci témoigne que l'orientation des patients à notre laboratoire a été faite devant une forte suspicion de SLP et non devant une hyperlymphocytose isolée.

CONCLUSION

La cytométrie de flux est un moyen de diagnostic essentiel dans l'étude des syndromes lymphoprolifératifs. En effet, en plus de la valeur diagnostique au cours des SLPB. Cet examen permet de déceler des proliférations rares telles que les proliférations T et NK.

A retenir que toute hyperlymphocytose de l'adulte n'est pas forcément une LLC.

Références

1. Sebahoun G. *Hématologie Clinique et biologique*, 2ème Edition 2005 page 273.
2. Ginaldi L, Martinitis M, Matutes E. Levels of expression of CD 19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51: 364-69.
3. Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC et al. Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood* 1993;82: 1277-87.
4. Troussard X. Leucémie à tricholeucocytes. *Encycl Méd chir, Hématologie*, 13-014-H-10, 2000 : 8.
5. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia*. 2002;16 :1460-9.
6. Ries LAG, Pollack ES, Young JL.JR. Cancer patient survival, epidemiology and result program, 1973-79. *J Nat Cancer Inst*. 1983;70: 693-707.
7. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052- 57.
8. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care* 2004;13: 279-87.
9. Shamebo M, Gebremdhin A. Chronic lymphocytic leukemia in Ethiopians. *East-Afr Med. J.* 1996; 73: 643-46.
10. Fleming AF. Leukemias in AFRICA. *Leukemia* 1993; 7: S138-141.
11. Vyas N, Hasssan A. Recent advances in chronic lymphoid leukemia. *Indian J Cancer* 2012; 49: 139-43.
12. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 1991; 78:1901-14.
13. Berman E, Heller G, Kempin S, Gee T, Tran LL, Clarkson B. Incidence of response and long-term follow up in patients with hairy cell leukemia treated with recombinant interferon alpha-2a. *Blood* 1990;75: 839-45.
14. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood* 1958;13:609-30.
15. Clavel J, Flandrin G. Epidémiologie des leucémies à tricholeucocytes. *Hématologie* 1999 ;5:295-9.
16. Haglund U, Julliusson G, Stellan R, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood* 1994;83: 2637-45.
17. Jaiyesimi I, Kantarjian H, Estey E. Advances in therapy for hairy cell leukemia. A review. *Cancer* 1993;72:5-16.
18. Semedby KE, Hjalgrin H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 293-98
19. T Lamy, M Hamidou, T Loughran Jr. Spectre des proliférations LGL et nouveaux concepts physiopathogéniques. *Hématologie* 1999 ; 5 : 300-8.
20. Diamandidou E , Cohen PR, Kurzork R. Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood* 1996; 88: 2385-409.
21. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol* 2000; 1: 3-10.
22. Garrido P, Jimenez P, Sanchez C et al. Molecular and Flow Cytometry Characterization During the Follow-up of three Simultaneous Lymphoproliferative disorders: Hairy Cell Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis, and CD4+/CD8+/-dim T-Large Granular Lymphocytosis—A Case Report. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80:195-200.