

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE	4
1. Leucémie Lymphoïde Chronique	5
1.1. Epidémiologie.....	5
1.2. Facteurs de risque	5
1.3. Physiopathologie.....	5
1.3.1. Origine de la cellule B CD5+ dans la LLC	5
1.3.2. Rôle de l'apoptose.....	6
1.3.3. Rôle de la prolifération cellulaire.....	7
1.3.4. Autres facteurs.....	8
1.4. Diagnostic	9
1.4.1. Diagnostic positif	9
1.4.2. Diagnostic différentiel.....	12
1.5. Pronostic	14
2. Immunocytochimie	15
2.1. Principe de l'immunoréaction.....	15
2.2. Différents types de méthodes immunocytochimiques	17
2.2.1. Méthode directe.....	17
2.2.2. Méthodes indirectes ou à plusieurs étapes.	17
DEUXIEME PARTIE	21
1. Méthodologie	22
1.1. Type et cadre d'étude.....	22
1.2. Echantillonnage.....	22
1.3. Paramètres étudiés	22
1.4. Méthodes d'analyse	23
1.5. Analyse statistique	25
2. Résultats	26
2.1. Caractéristiques épidémiologiques des patients.....	26
2.2. Hémogramme.....	27
2.3. Pourcentage d' « ombres de Gümprrecht ».....	29
2.4. Stade de Binet	30
2.5. Immunophénotypage (Score de Matutes et expression de CD38).....	31
2.6. Immunocytochimie	31
3. Discussion	38
CONCLUSION	39
REFERENCES	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales voies de l'apoptose et structure des molécules de la famille Bcl-2.....	6
Figure 2: Aspects des différentes formes cytologiques de la LLC	10
Figure 3: Frottis sanguin des autres SLPB :.....	13
Figure 4: Méthode directe	17
Figure 5: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire	18
Figure 6: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire.....	18
Figure 7: Méthode indirecte : pontage par un polymère de dextran	19
Figure 8: Méthode indirecte : pontage par le système biotine-streptavidine.	20
Figure 9: Exemple d'un marquage immunocytochimique positif.	25
Figure 10: Répartition des patients selon la tranche d'âge	26
Figure 11: Répartition des patients selon le sexe	27
Figure 12: Image du marquage de quelques patients avec une forte positivité du Bcl-2	33
Figure 13: Images du marquage de quelques patients par le Ki67	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Score de Matutes.....	11
Tableau II: Expression des marqueurs de surface au cours des syndromes lymphoprolifératifs B.....	13
Tableau III: Classifications pronostiques de RAI et Binet	14
Tableau IV: Matériel et réactif nécessaires pour l'immunocytochimie	23
Tableau V: Etapes de la technique de marquage par immunocytochimie	24
Tableau VI: Répartition des patients en fonction des paramètres de l'hémogramme	28
Tableau VII: Récapitulatifs des statistiques des paramètres de l'hémogramme .	29
Tableau VIII: Répartition des patients en fonction du pourcentage d'OG.....	29
Tableau IX: Répartition des patients selon la Classification de Binet.....	30
Tableau X: Répartition des patients selon le score de Matutes.....	31
Tableau XI: Expression de Bcl-2 et Ki67 pour les 30 patients.....	32
Tableau XII: Récapitulatif des statistiques pour Bcl-2 et Ki67	34
Tableau XIII: Corrélations entre l'expression de Bcl-2 et certains paramètres étudiés.....	36
Tableau XIV: Corrélations entre l'expression de Ki67 et certains paramètres étudiés.....	37
Tableau XV: Répartition des patients en fonction de la coexpression Bcl-2/Ki67	37

Liste des abréviations

ACE	: Antigène Carcino-embryonnaire
AEC	: 3-amino-9-ethylcarbazole
BCR	: B-Cell Receptor
CD	: Cluster of differentiation
DAB	: Diaminobenzidine
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
FISH	: Fluorescence in situ hybridization
GIST	: Gastro-intestinal stromal tumor
HALD	: Hôpital Aristide le Dantec
HRP	: Horseradish Peroxidase
ICC	: Immunocytochimie
IHC	: Immunohistochimie
LDH	: Lactate deshydrogénase
LF	: Lymphome folliculaire
LLC	: Leucémie lymphoïde chronique
LM	: Lymphome du manteau
LPL	: Leucémie à prolymphocytes
LSLV	: Lymphome splénique à lymphocytes villeux
LT	: Leucémie à tricholeucocytes
LZM	: Lymphome de la zone marginale
NFS	: Numération formule sanguine
OG	: Ombre de Gümprrecht
PAL	: phosphatases alcalines
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
TMB	: Tétraméthylbenzidine

INTRODUCTION

La LLC est une hémopathie maligne chronique caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires de cellules lymphocytaires B exprimant le déterminant antigénique CD5 et qui sont bloquées en phase G0 du cycle cellulaire. C'est la plus commune des leucémies dans le monde occidental [1–3], caractérisée par une évolution très hétérogène. Sur le plan physiopathologique, la LLC a connu des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes intimes de la leucémogénèse. En effet, en plus d'un dysfonctionnement des mécanismes de l'apoptose reconnu depuis longtemps dans la LLC, plusieurs arguments témoignent aujourd'hui de l'existence d'une part proliférative dans la population leucémique [1].

Le défaut d'apoptose décrit dans la LLC peut être étudié indirectement par certaines protéines régulatrices de l'apoptose telles que les protéines de la famille Bcl-2. De même, la part proliférative de la population leucémique au cours de la LLC peut être établie par la mise en évidence de certains marqueurs de prolifération cellulaire comme le Ki67. L'étude de l'expression de ces protéines peut se faire par plusieurs techniques parmi lesquelles l'immunocytochimie (ICC).

L'immunocytochimie (ICC) au même titre que l'immunohistochimie (IHC) est une technique de coloration dont le but est de mettre en évidence des protéines cellulaires (cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires) spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine. Le complexe formé par la réaction antigène – anticorps est rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré [4]. La différence entre l'ICC et l'IHC est que dans le premier, l'échantillon est une préparation cellulaire alors que dans le deuxième, l'échantillon est une préparation tissulaire. Cependant, c'est l'IHC qui est la technique la plus utilisée.

Depuis son avènement, l'ICC a permis de faire des progrès considérables dans le diagnostic et dans le suivi des cancers. L'ICC est également utilisée en recherche fondamentale pour comprendre la distribution et la localisation de biomarqueurs et protéines exprimées au cours de diverses pathologies, dans le but d'une meilleure compréhension de leurs mécanismes physiopathologique.

Cependant, aussi bien l'IHC que l'ICC ne sont pas de réalisation courante dans nos pays ; et dans la majorité des cas, pour un diagnostic précis des lymphomes, les échantillons sont envoyés dans des laboratoires mieux outillés en Europe ou au Maghreb.

Ainsi, la mise en place de la technique d'ICC dans notre laboratoire, nous a permis de mener ce travail. L'objectif général de notre étude était d'étudier par ICC l'expression de deux protéines au cours de la LLC:

- d'une part, la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique ;
- d'autre part la protéine Ki67, un marqueur de prolifération cellulaire présent au niveau du noyau des cellules prolifératives en phases G1 – S – G2 et M.

De façon plus spécifique, nous proposons de rechercher une corrélation entre :

- le niveau d'expression de ces protéines et certains paramètres tels que le nombre de lymphocytes circulants, le stade de Binet, le score de Matutes, l'expression du CD38 et le pourcentage d' « ombres de Gümprrecht » ;
- le niveau d'expression de Bcl-2 et celui Ki67.

Rapport-Gratuit.com

PREMIERE PARTIE

1. Leucémie Lymphoïde Chronique

1.1. Epidémiologie

La LLC est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux (30%) alors qu'elle est rare en Afrique et en Asie (5%) [5–8]. Aux Etats Unis, environ 15000 nouveaux cas sont diagnostiqués par année [7]. En France, en 2012, on estimait à 4664 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués dont 60% survenaient chez l'homme. L'incidence standardisée sur la population mondiale est de 4,4/100000 personnes/année chez l'homme et 2,2/100000 personnes/année chez la femme, soit un sex-ratio de 2. La LLC est une pathologie du sujet âgé. En effet, l'incidence augmente avec l'âge passant chez l'homme de 1,2/100000 entre 40 et 44ans à 52,5/100000 entre 90 et 94 ans ; et chez la femme de 0,5/100000 à 22,6/100000 [7]. Cependant, 14% des patients atteints de LLC ont moins de 55 ans [8].

1.2. Facteurs de risque

L'étiologie de la LLC reste à ce jour inconnue [7,9]. Les facteurs environnementaux ne semblent pas jouer un rôle important dans la survenue de la maladie. La LLC serait la seule leucémie pour laquelle il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'exposition à des irradiations ou à des composants chimiques [10]. A l'inverse, les facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans la pathogénie de la maladie. En effet, des études épidémiologiques ont montré l'existence dans 5 à 10% des cas de LLC d'une prédisposition familiale [11,12] avec un risque relatif 8,5 fois plus élevé chez les descendants de patients porteurs de la maladie comparée à la population générale [13–15] avec une apparition précoce de la maladie et une évolution plus sévère [16,17].

1.3. Physiopathologie

En dépit des considérables avancées dans la compréhension des mécanismes intimes de développement de la cellule leucémique de la LLC, cette pathologie demeure une maladie mal cernée sur le plan physiopathologique.

1.3.1. Origine de la cellule B CD5+ dans la LLC

L'équivalent normal du lymphocyte B CD5+ de la LLC a été retrouvé au niveau du ganglion sur la bordure du centre germinatif puis dans la rate et les amygdales. Il représente 15% des cellules B du sang normal [5]. La LLC semble ainsi avoir pour origine l'expansion d'un sous

clone minoritaire de lymphocytes normaux dont certaines cellules ont subi une transformation maligne.

La cellule de la LLC a longtemps été considérée comme dérivant d'un lymphocyte B naïf au repos. Cependant, des études génétiques et phénotypiques ont permis de mettre en évidence deux sous-groupes de LLC : l'un dérivant de lymphocytes B exprimant des gènes d'immunoglobulines mutés et correspondant à la prolifération de lymphocytes B ayant été en contact avec l'antigène dans le centre germinatif ; l'autre exprimant des gènes d'immunoglobulines non mutés et correspondant à la prolifération de lymphocytes B naïfs [5,18].

1.3.2. Rôle de l'apoptose

La LLC a longtemps été considérée comme une maladie cumulative des lymphocytes B bloqués en phase G0 du cycle cellulaire. Il est bien établi que dans la LLC, il existe une dérégulation de l'apoptose en rapport avec des altérations géniques et des changements dans l'expression de nombreux régulateurs apoptotiques [19,20].

Deux principales voies d'apoptose sont connues (Figure 1A) et dans la LLC c'est essentiellement la voie de la caspase 9 (voie intrinsèque) qui est en cause. Il existe plusieurs régulateurs de l'apoptose, en particulier les protéines de la famille Bcl-2. Elles sont caractérisées par la présence de 1 à 4 séquences courtes appelées domaines BH (Bcl-2 Homology). Plus de 20 molécules de la famille Bcl-2 ont été identifiées, réparties en 3 sous-familles (Figure 1B) : le sous-groupe anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1) avec 4 domaines BH ; le sous-groupe pro-apoptotique (Bax, Bak et Bok) avec 3 domaines BH et le 3^{ème} sous-groupe, également pro-apoptotique (Bim, Bad, Bid) avec un seul domaine BH.

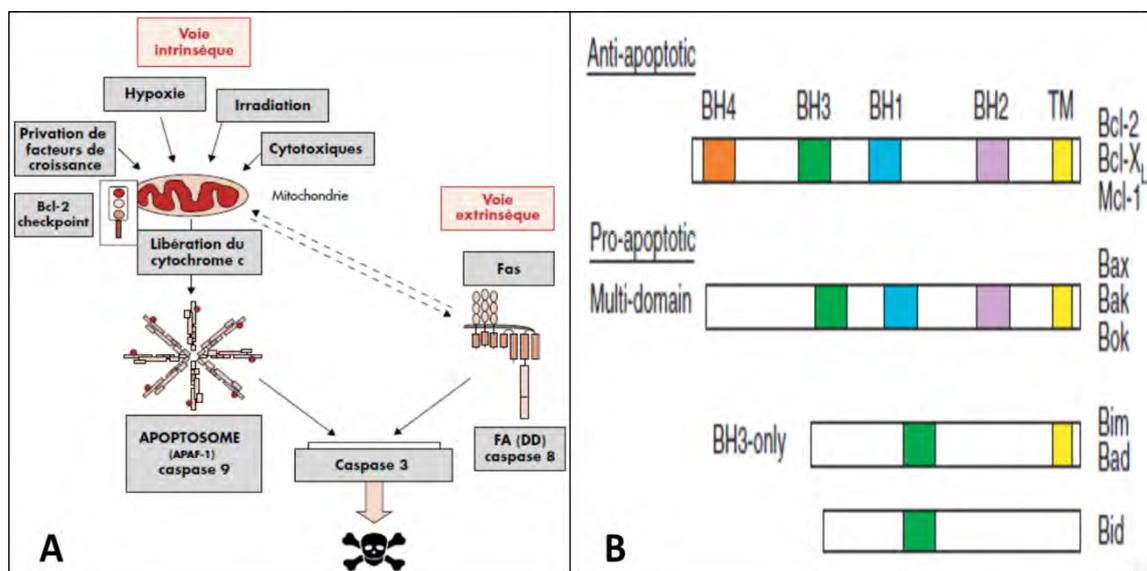


Figure 1 : A= Principales voies de l'apoptose ; B= Structure des molécules de la famille Bcl-2 [1,2]

Ainsi, une des caractéristiques de la cellule de la LLC est l'hyperexpression de la protéine Bcl-2, conférant à la cellule une résistance à l'apoptose. Cependant, les mécanismes de cette hyperexpression de Bcl-2 restent à éclaircir. Deux interrogations peuvent être émises.

D'une part, cette hyperexpression de Bcl-2 serait-elle acquise durant la leucémogénèse ou bien au contraire la LLC trouverait-elle son origine à partir de cellules hyperexprimant cette protéine ? D'autre part, cette résistance à l'apoptose serait-elle autonome (en rapport avec des altérations géniques ou épigénétiques des régulateurs de l'apoptose) ou serait-elle liée à des signaux de l'environnement reçus par la cellule leucémique ? [1,2]

Des études ont montré que dans la majorité des cas, la région du promoteur du gène Bcl-2 est hypométhylée, ce qui peut contribuer à une augmentation de la transcription de la protéine Bcl-2 [21]. Egalement, les miRNAs, nouvelle classe de gènes non codants impliqués dans la tumorigénèse humaine, apportent une réponse au moins partielle aux mécanismes de l'hyperexpression de Bcl-2. En effet, des auteurs ont montré que deux miRNA (miR-15a et miR-16-1) qui sont des régulateurs négatifs de Bcl-2 sont délétés ou hypoexprimés au cours de la LLC [22,23]. Par ailleurs, l'apoptose spontanée rapide des cellules de la LLC lorsqu'elles sont cultivées in vitro pourrait laisser croire que l'environnement joue un rôle important dans ces mécanismes de résistance à l'apoptose.

Parallèlement à Bcl-2, il a été rapporté des anomalies dans l'expression d'autres protéines de la famille Bcl-2 telles que Mcl-1 et Bax qui appartiennent respectivement aux sous-groupes anti-apoptotique et pro-apoptotique. En effet, l'hyperexpression de Mcl-1 et/ou une diminution de l'expression de Bax seraient associées à une résistance à l'apoptose et à une progression rapide de la maladie [24–27].

Les anomalies observées dans l'expression des protéines de la famille Bcl-2 jouent ainsi un rôle majeur dans la pathogénie de la LLC notamment dans la résistance à l'apoptose. Toutefois, il faut noter que d'autres régulateurs classiques de l'apoptose tels que la protéine p53 et l'ATM peuvent être altérés au cours de la LLC [28,29]. En effet, le gène de la p53, régulateur négatif de la croissance cellulaire, est muté dans 15% des cas de LLC [5].

1.3.3. Rôle de la prolifération cellulaire

En plus des anomalies de l'apoptose observées chez tous les patients atteints de LLC, il y a beaucoup d'arguments témoignant de l'existence probable d'une part proliférative dans la population leucémique. En effet, des études ont été réalisées in vivo, utilisant des techniques de marquage avec l'eau deutériée [30].

Ces études ont permis de mettre en évidence un compartiment prolifératif dans la moelle osseuse et dans les ganglions au niveau des centres de prolifération ou pseudo-follicules. En outre, ce compartiment prolifératif a été quantifié avec un taux de croissance entre 0,1 et 1% du clone par jour ; ce qui correspond à 10^9 à 10^{10} cellules leucémiques fabriquées par jour pour un patient qui possède entre 10^{12} cellules leucémiques [1]. D'autres auteurs estiment que moins de 5% des cellules B de la LLC sont en prolifération à tout instant [3]. Parallèlement, il y aurait une association entre un taux de croissance cellulaire actif et une maladie rapidement progressive.

Cette part proliférative dans la population leucémique est variable d'un patient à l'autre et se traduit par la variabilité des présentations cliniques et une hétérogénéité des marqueurs biologiques qui lui sont reliés. Certains de ces marqueurs ont une valeur pronostique : le temps de dédoublement de la lymphocytose ; l'augmentation du taux sérique de la thymidine kinase et du CD23 soluble ; la présence de marqueurs d'activation tels que le CD38 et l'expression de la protéine ZAP70.

Le phénomène de croissance cellulaire peut être mis en évidence par l'expression par les cellules leucémiques de certains marqueurs des cellules en cycle tel que le Ki67. Il s'agit d'une protéine nucléaire de 360kDa présente dans les cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M.

1.3.4. Autres facteurs

♣ Rôle du microenvironnement

La résistance à l'apoptose in vivo qui définit la maladie, et à l'inverse l'augmentation de l'apoptose spontanée lorsque les cellules sont cultivées ex-vivo impliquent que ces cellules ont perdu des facteurs nécessaires à leur survie.

♣ Rôle de la stimulation antigénique par le BCR

De nouvelles données suggèrent que la stimulation antigénique est un facteur de promotion qui entraîne la prolifération des cellules de la LLC et qui permet d'éviter l'apoptose [1]. La nature des antigènes reste encore inconnue, mais il est possible que des virus latents ou des bactéries commensales activent répétitivement des clones de cellules B particuliers par leur BCR. La LLC serait alors une conséquence directe ou indirecte d'infections spécifiques et serait entretenue par elles, d'une manière semblable à ce qui a été décrit pour les lymphomes gastriques qui évoluent en réponse à *Helicobacter pylori*.

Alternativement, des antigènes de l'environnement ou des auto-antigènes pourraient entraîner une expansion clonale des cellules B.

1.4. Diagnostic

1.4.1. Diagnostic positif

♣ Circonstances de découverte

La découverte systématique au décours d'une Numération Formule Sanguine (NFS) d'une hyperlymphocytose supérieure à 5G/L est la circonstance de découverte la plus fréquente. Assez souvent, il peut s'agir d'un syndrome tumoral qui est cependant inconstant : polyadénopathies (généralement bilatérales et symétriques), splénomégalie (rarement isolée) et/ou hépatomégalie (rare et de mauvais pronostic). Plus rarement, la maladie est révélée par des complications infectieuses (zona, pneumopathies récidivantes...) ou hématologiques (anémie hémolytique auto-immunes, thrombopénie...).

♣ Eléments du diagnostic

➤ Hémogramme + frottis sanguin

La NFS retrouve une hyperlymphocytose supérieure à 5G/L, suffisante pour évoquer le diagnostic dans la majorité des cas. Elle est le plus souvent isolée, d'importance variable (parfois très élevée), persistant sur plusieurs NFS au-delà de 6-8 semaines.

Au frottis sanguin :

- Dans la forme typique : les lymphocytes sont le plus souvent de morphologie normale et monomorphe. Les cellules lymphoïdes ont une petite taille, le noyau est entouré d'un anneau de cytoplasme peu étendu et régulier, même si de petites irrégularités nucléaires peuvent communément se voir et le cytoplasme est homogène, faiblement basophile et dépourvu de granulations. Le noyau présente des renforcements sombres nettement séparés par des espaces plus clairs, donnant l'impression de mottes chromatiniennes ; les nucléoles ne sont pas visibles. Le rapport nucléo- cytoplasmique est élevé (Figure 2A). Très souvent, il existe des cellules altérées donnant l'impression de noyaux nus appelés « ombres de Gümprecht » (Figure 2B).

- Dans la forme LLC/LPL : on note la présence de cellules de plus grande taille avec une chromatine plus fine, un nucléole bien visible, souvent excentré appelées prolymphocytes (Figure 2C), dont le pourcentage varie entre 10 et 55%. Un taux de prolymphocyte supérieur à 55% définit la Leucémie prolymphocytaire (LPL).
- Dans la forme mixte : on note la présence de petits et de grands lymphocytes associés à des prolymphocytes, dont le pourcentage reste inférieur à 10 %. Il peut y avoir des lymphocytes atypiques à type de cellules clivées (Figure 2D-E), des cellules lymphoplasmocytaires voire quelques cellules binucléées (Figure 2F).

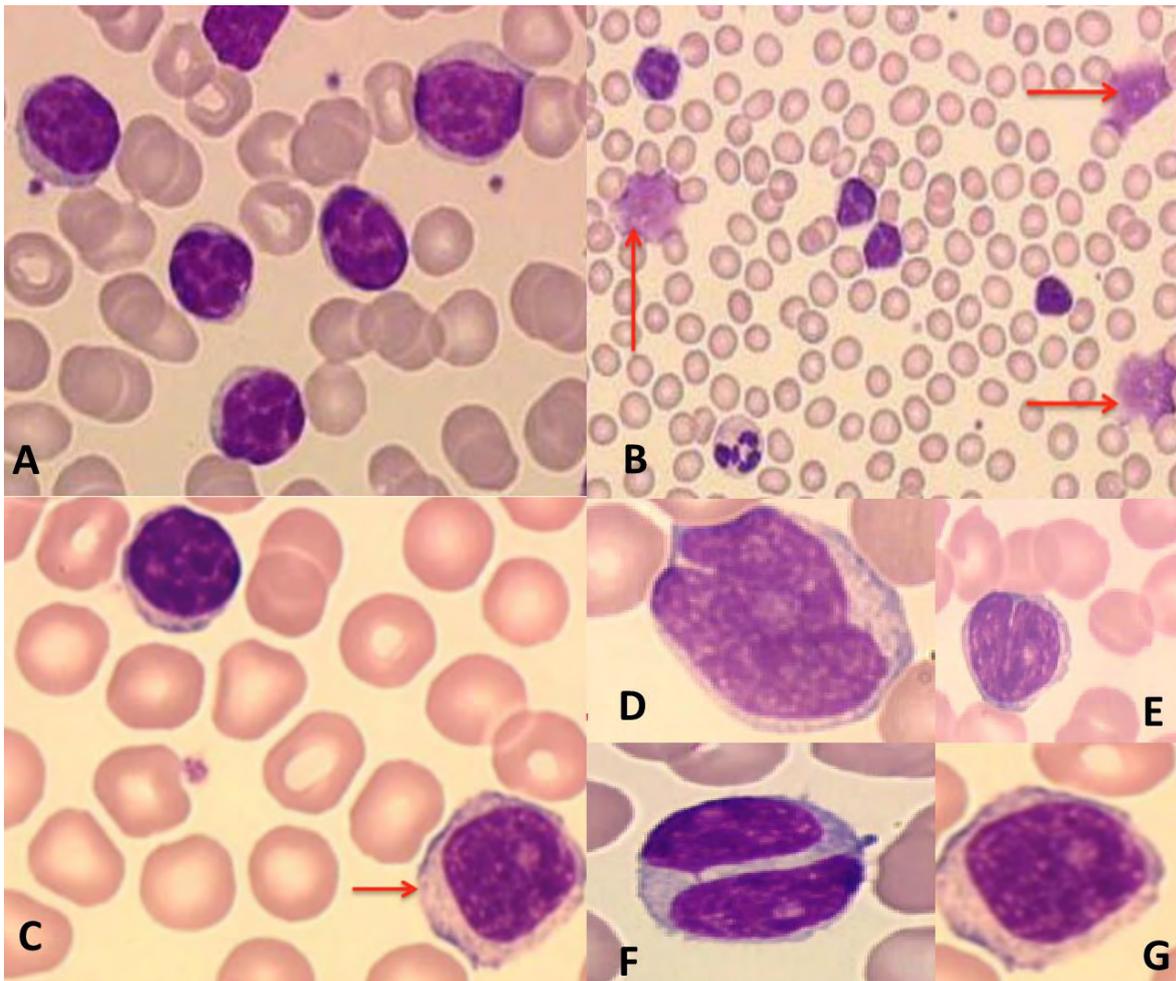


Figure 2: Aspects des différentes formes cytologiques de la LLC [32,33].

➤ Immunophénotypage des lymphocytes sanguins.

C'est l'examen essentiel pour confirmer le diagnostic. Il présente également un intérêt pronostique. Réalisée par cytométrie en flux, il affirme la nature B (CD19+ et CD20+) et la monotypie des lymphocytes (expression d'une seule chaîne légère d'immunoglobuline κ ou λ de faible intensité).

Une autre caractéristique de la LLC est la présence de l'antigène CD5 (habituellement un marqueur de lymphocytes T) qui ne s'observe que dans deux autres affections lymphocytaires B proches de la LLC (Leucémie prolymphocytaire et lymphome du manteau). Cependant, dans 7 à 20% des cas de LLC le CD5 n'est pas exprimé [31]. Les lymphocytes de la LLC expriment habituellement le CD23 ; par contre, l'expression du CD22 est rare et le FMC7 est négatif de même que le CD79b. L'immunophénotypage permet ainsi de calculer le score de Matutes (Tableau I)

Tableau I: Score de Matutes

Cotation	1point	0point
CD5	+	-
CD23		-
Monotypie κ ou λ	Faible/ Négatif	Forte
FMC7	-	+
CD22 ou CD79b	Faible/ Négatif	Forte

Un score de Matutes supérieur ou égal à 4 permet de retenir le diagnostic d'une LLC typique.

Un score égal à 3 fait discuter une LLC atypique ou un autre Syndrome lymphoprolifératif B.

Un score inférieur à 3 exclut le diagnostic de LLC.

L'immunophénotypage permet en outre la recherche de certains marqueurs pronostiques tels que le CD38.

➤ **L'immunocytochimie (ICC)**

Elle peut également permettre d'étudier l'expression par les lymphocytes sanguins des différents marqueurs de surface et possède l'avantage de ne pas nécessiter un équipement sophistiqué tel qu'un cytomètre en flux. L'ICC peut être aussi utile pour étudier l'expression d'autres protéines impliquées dans la physiopathologie de la LLC et ayant parfois un intérêt pronostic.

La technique d'ICC ayant été utilisée dans notre travail, son principe et ses différentes méthodes seront détaillés dans le deuxième chapitre de cette partie. (cf Chapitre 2).

➤ **Autres examens**

- Le myélogramme, la biopsie médullaire ou la biopsie ganglionnaire ne sont pas indispensables au diagnostic sauf dans les cas où se pose un problème de diagnostic différentiel avec les autres syndromes lymphoprolifératifs.
- Le test de Coombs direct : permet la mise en évidence d'auto-anticorps anti-érythrocytaires.
- L'électrophorèse des protéines sériques : elle peut soit être normale, soit retrouver une hypogammaglobulinémie ; ou mettre en évidence un composant monoclonal, le plus souvent de type IgM.
- Le caryotype conventionnel ou la FISH permettent de rechercher certaines anomalies chromosomiques qui ont une valeur pronostique : délétion 17p13, délétion 13q14, délétion 11q23, trisomie 12, délétion 6q21.

1.4.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel se pose d'une part avec les lymphocytoses B polyclonales et d'autre part avec les autres lymphocytoses monoclonales.

♣ Lymphocytoses B polyclonales

Elles s'observent dans certaines infections virales (Mononucléose infectieuse, infection à Cytomégalovirus...), parasitaires comme la toxoplasmose mais également bactériennes comme la coqueluche au cours de laquelle la lymphocytose peut atteindre 40 à 50G/L.

♣ Autres lymphocytoses B monoclonales

Chez l'adulte, toute lymphocytose sanguine doit être contrôlée. Persistante au-delà de 6-8 semaines, elle fait évoquer en premier lieu une LLC. L'examen morphologique des lymphocytes sur le frottis sanguin (Figure 3) et l'immunophénotypage (Tableau II) permettront d'éliminer les autres Syndromes lymphoprolifératifs qui correspondent souvent à la dissémination sanguine d'un lymphome non hodgkinien.

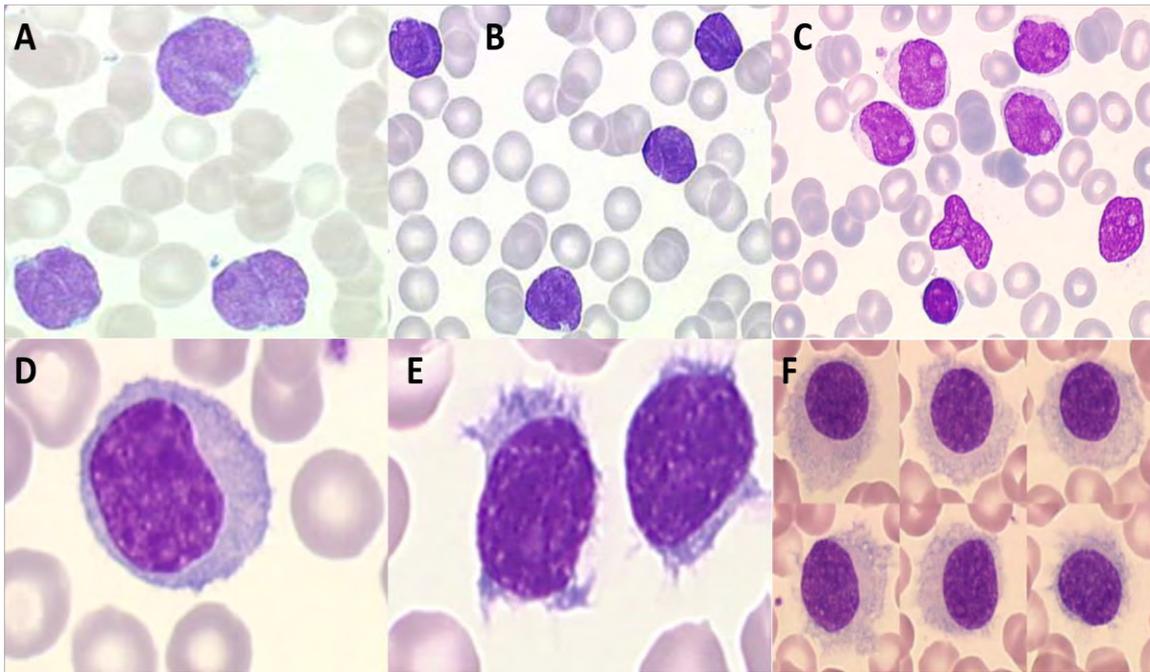


Figure 3: Frottis sanguin des autres SLPB : A= Lymphome du manteau ; B= Lymphome folliculaire ; C= Leucémie à prolymphocyte ; D= Lymphome de la zone marginale (cellules monocytoïdes) ; E= lymphome splénique à lymphocytes villex ; F= Leucémie à tricholeucocytes [31,32]

Tableau II: Expression des marqueurs de surface au cours des syndromes lymphoprolifératifs B

	LLC	LM	LF	LPL	LZM	LSLV	LT
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+	+	+	+
Ig κ ou λ	+ f	+ F	+ F	+ F	+ F	+ F	+ F
CD5	+	+	-	+/-	-	-	-
CD23	+	-	-/+	-	-	-	-
CD22 ou CD79b	-/+ f	+	+	+	+	+	+
EMC7	-/+ f	+	+	+	+	+	+
CD10	-	-	+ (40%)	-/+	-	-	-
CD43	+	-	-	-	-	-	-
CD25	-	-	-	-	-	-	+ (-V)
CD11c	-	-	-	-	-	-	+
CD103	-	-	-	-	-	+	+/-

1.5. Pronostic

Les classifications clinico-biologiques de RAI et de Binet (Tableau III) ont, pendant longtemps apporté la meilleure indication pronostique, permettant de proposer des protocoles thérapeutiques adaptés.

Tableau III: Classifications pronostiques de RAI [33] et Binet [34]

Classification de RAI		
Stades	Description	Médiane de survie (années)
0 (Risque faible)	<ul style="list-style-type: none"> Lymphocytose sanguine >5G/L seule 	20
I (risque intermédiaire)	<ul style="list-style-type: none"> Lymphocytose sanguine >5G/L Adénopathies 	8-10
II (risque intermédiaire)	<ul style="list-style-type: none"> Lymphocytose sanguine >5G/L Lymphocytose médullaire >30% Splénomégalie ou hépatomégalie 	6
III (risque élevé)	<ul style="list-style-type: none"> Lymphocytose sanguine >5G/L Lymphocytose médullaire >30% Anémie < 11g/dl 	1,5-2
IV (risque élevé)	<ul style="list-style-type: none"> Lymphocytose sanguine >5G/L Lymphocytose médullaire >30% Thrombopénie < 100 G/L 	1,5-
Classification de Binet		
Stades	Description	Médiane de survie (années)
Stade A	<ul style="list-style-type: none"> Moins de 3 aires ganglionnaires superficielles sont atteintes Hémoglobine > 10 g/dl Plaquettes > 100 G/L 	Inchangée
Stade B	<ul style="list-style-type: none"> Plus de 3 aires ganglionnaires superficielles sont atteints Hémoglobine > 10 g/dl Plaquettes > 100 G/L 	7
Stade C	<ul style="list-style-type: none"> Anémie <10g/dl et / ou Thrombopénie < 100 G/L 	2

Actuellement, on admet trois indicateurs pronostiques indépendants : le stade clinique, l'état mutationnel des gènes d'immunoglobuline VH et l'expression du marqueur de surface CD38 ; des gènes d'Ig non mutés et une expression du CD38 étant associés à un mauvais pronostic.

L'expression de la protéine ZAP70 pourrait être une alternative à l'étude du statut mutationnel des gènes d'Ig [35,36], avec un mauvais pronostic pour les formes ZAP 70+. Cependant, dans 25% des cas, on retrouve une discordance entre l'expression de ZAP70 et le statut mutationnel des gènes d'immunoglobulines [31].

D'autres facteurs pronostiques ont été proposés :

- Lymphocytose sanguine : une lymphocytose supérieure à 60G/L serait considérée comme de mauvais pronostic.
- Temps de dédoublement de la lymphocytose inférieur à 1an est un facteur de mauvais pronostic.
- Le type d'infiltration lymphocytaire de la moelle osseuse : interstitielle, nodulaire, diffuse ou mixte. De nombreuses études ont rapporté l'intérêt pronostique de cette infiltration médullaire ; une infiltration nodulaire ou interstitielle étant associée à un pronostic meilleur [37–39]
- Les délétions 17p13 et 11q23 sont associées à un pronostic plus sombre
- Les facteurs sériques tels que les taux de CD23 soluble, LDH, Thymidine kinase, β 2microglobuline... ont également un intérêt pronostique [5].

2. Immunocytochimie

2.1. Principe de l'immunoréaction

Il repose sur la détection d'une substance cellulaire par l'utilisation d'un anticorps spécifique couplé à un système révélateur (ou traceur) et dirigé contre l'antigène d'intérêt. Cet anticorps est soit directement en contact avec le traceur, soit relié à ce dernier par un ligand.

♣ Le système révélateur

Il existe différentes catégories de traceurs : fluorescents, enzymatiques, métalliques.

➤ Les traceurs fluorescents

Albert H. Coon a été le premier à introduire l'immunofluorescence en 1941 utilisant la fluorescéine, un colorant fluorescent pour localiser des substances dans les tissus [40]. La technique de marquage par un fluorochrome est utilisée dans plusieurs domaines tels que l'IHC/ICC, la cytométrie en flux... La disponibilité des fluorochromes avec différents spectres d'émission a aujourd'hui rendu possible la détection de deux ou plusieurs antigènes sur la même préparation cellulaire. Quatre fluorochromes sont communément utilisés : Fluorescéine, Rhodamine, Rouge-Texas et Phycoérythrine.

Cependant, bien que le marquage fluorescent ait l'avantage d'être très sensible avec une haute résolution, il présente quelques inconvénients, en particulier la nécessité d'avoir un matériel spécial (microscope à fluorescence, cytomètre en flux...).

➤ **Les traceurs enzymatiques**

✓ **La peroxydase**

C'est l'enzyme la plus couramment utilisée [4,40]. Elle possède une fonction oxydative qui, lorsque mise en présence d'une source d'oxygène, transfère un électron à une molécule qui devient alors oxydée. La peroxydase la plus utilisée est le HRP (Horseradish Peroxydase) [40]. La fonction oxydative de l'enzyme permet ainsi l'utilisation de chromogènes qui, lorsqu'ils sont oxydés forment un précipité coloré visible au microscope. Le substrat chromogénique le plus utilisé est le 3,3'diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB). Il s'agit d'un composé qui, en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) donne un précipité brun. Le DAB possède l'avantage d'être insoluble dans l'alcool et dans le xylène. Cependant, le principal inconvénient réside dans la ressemblance avec certains pigments endogènes tels que la mélanine, pouvant ainsi être à l'origine de faux-positifs. D'autres chromogènes sont disponibles avec des colorations différentes : 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), tétraméthylbenzidine (TMB)...

✓ **D'autres enzymes peuvent être utilisées**

Phosphatases alcalines (PAL), glucose oxydase, β-galactosidase...

➤ **Les traceurs métalliques**

Il s'agit essentiellement de la ferritine et de l'or colloïdal.

♣ **Le ligand**

Il permet de relier le système révélateur à l'anticorps spécifique. Différents types de ligands sont utilisés en IHC/ICC (cf chapitre 2.2.2.)

2.2. Différents types de méthodes immunocytochimiques

2.2.1. Méthode directe

Dans cette méthode, l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt (anticorps primaire) est directement couplé au traceur sans ligand. (Figure 4). Il s'agit d'une immunoréaction simple et rapide, permettant une localisation précise de l'antigène. Cependant, la sensibilité est réputée inférieure à celle des techniques en plusieurs étapes car la réaction antigène – anticorps est souvent faible et le bruit de fond n'est pas négligeable.

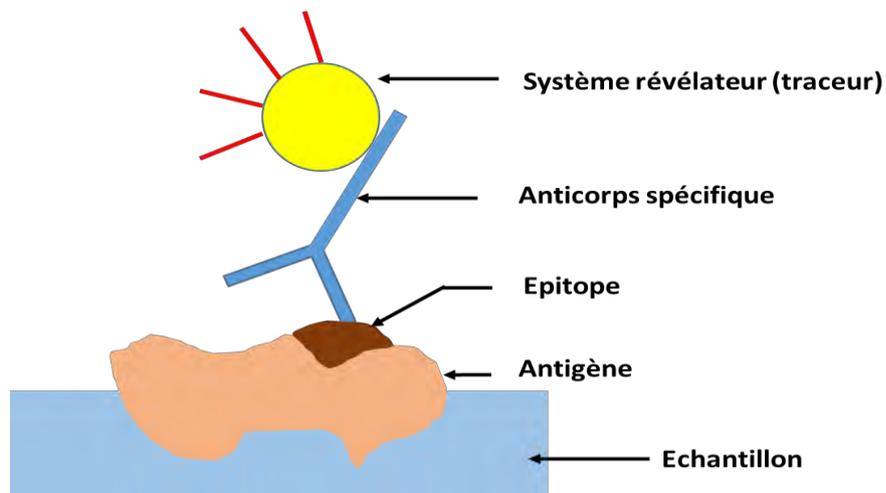


Figure 4: Méthode directe

2.2.2. Méthodes indirectes ou à plusieurs étapes.

Ces méthodes utilisent un ou plusieurs ligands qui relient le traceur à la molécule d'immunoglobuline utilisée pour détecter l'antigène. Les méthodes indirectes sont plus sensibles car il existe une légère amplification. Ces méthodes varient en fonction du ligand utilisé.

♣ Pontage par un anticorps secondaire

C'est une technique à deux étapes. Dans un premier temps, il y a une fixation de l'anticorps primaire qui reconnaît la protéine cible. Puis, dans un second temps, on ajoute l'anticorps secondaire couplé au traceur et qui reconnaît le premier anticorps (Figure 5).

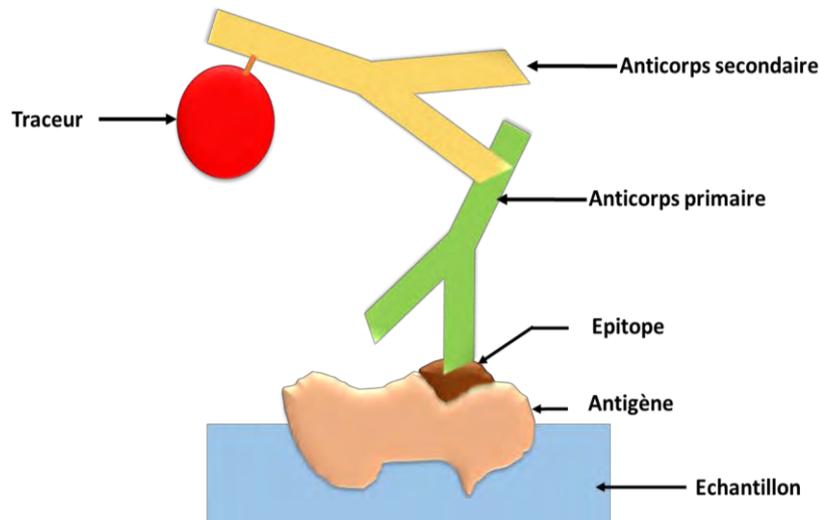


Figure 5: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire

♣ Immunoréaction « sandwich » (bridge)

Cette méthode utilise comme ligand un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire (Figure 6). Il s'agit d'une technique à trois étapes : d'abord il y a fixation de l'anticorps primaire sur l'antigène cible ; ensuite, l'anticorps secondaire se lie à l'anticorps primaire et enfin on ajoute un troisième anticorps couplé au traceur qui vient se fixer sur le deuxième anticorps.

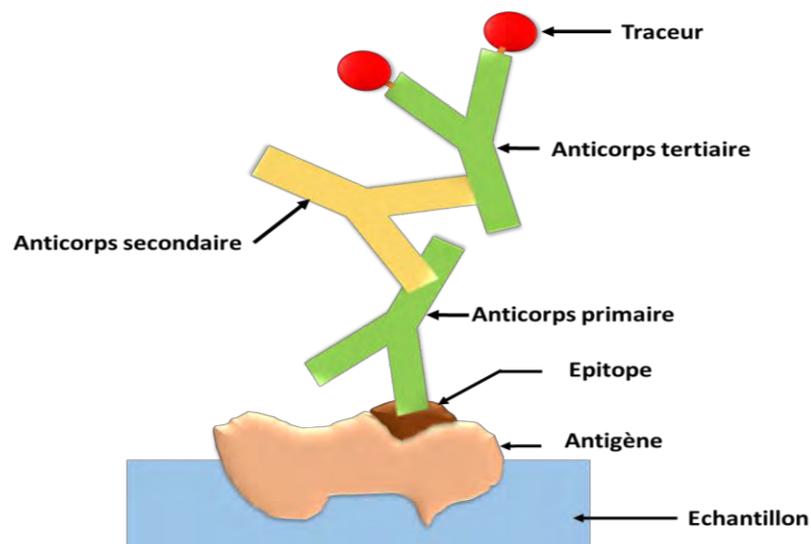


Figure 6: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire

♣ Pontage par un polymère de dextran

Les anticorps secondaires sont attachés à une large molécule de polymère de dextran marquée avec le HRP qui est la peroxydase la plus utilisée (Figure 7). Cette méthode possède l'avantage d'être rapide avec une bonne amplification et une réduction du bruit de fond.

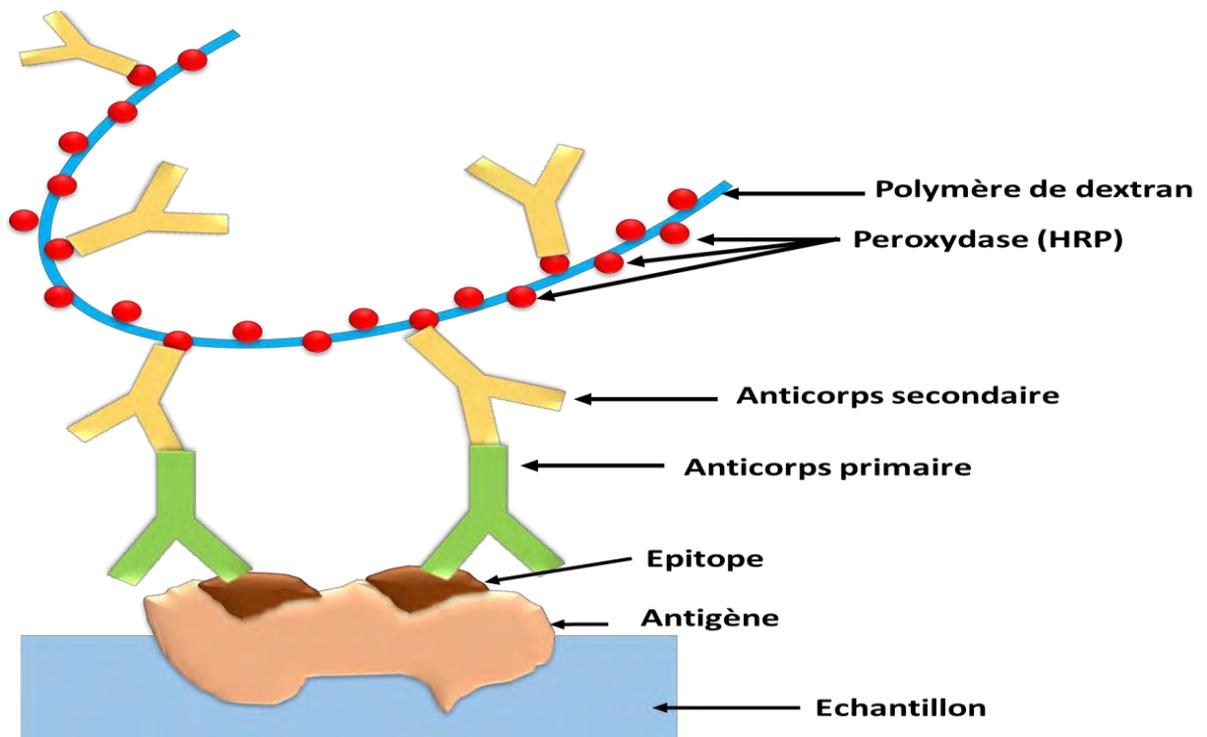


Figure 7: Méthode indirecte : pontage par un polymère de dextran

♣ Système biotine-streptavidine

Dans cette méthode, l'anticorps (primaire ou secondaire) est relié au traceur par l'intermédiaire du système biotine-streptavidine. Il existe différentes modes de liaison biotine-streptavidine (Figure 8A). Ainsi, plusieurs types de réactions sont possibles : soit c'est l'anticorps primaire qui est biotinylé, soit c'est l'anticorps secondaire qui est biotinylé ; le traceur peut être couplé soit à la biotine, soit à la streptavidine (Figure 8 B-C-D-E).

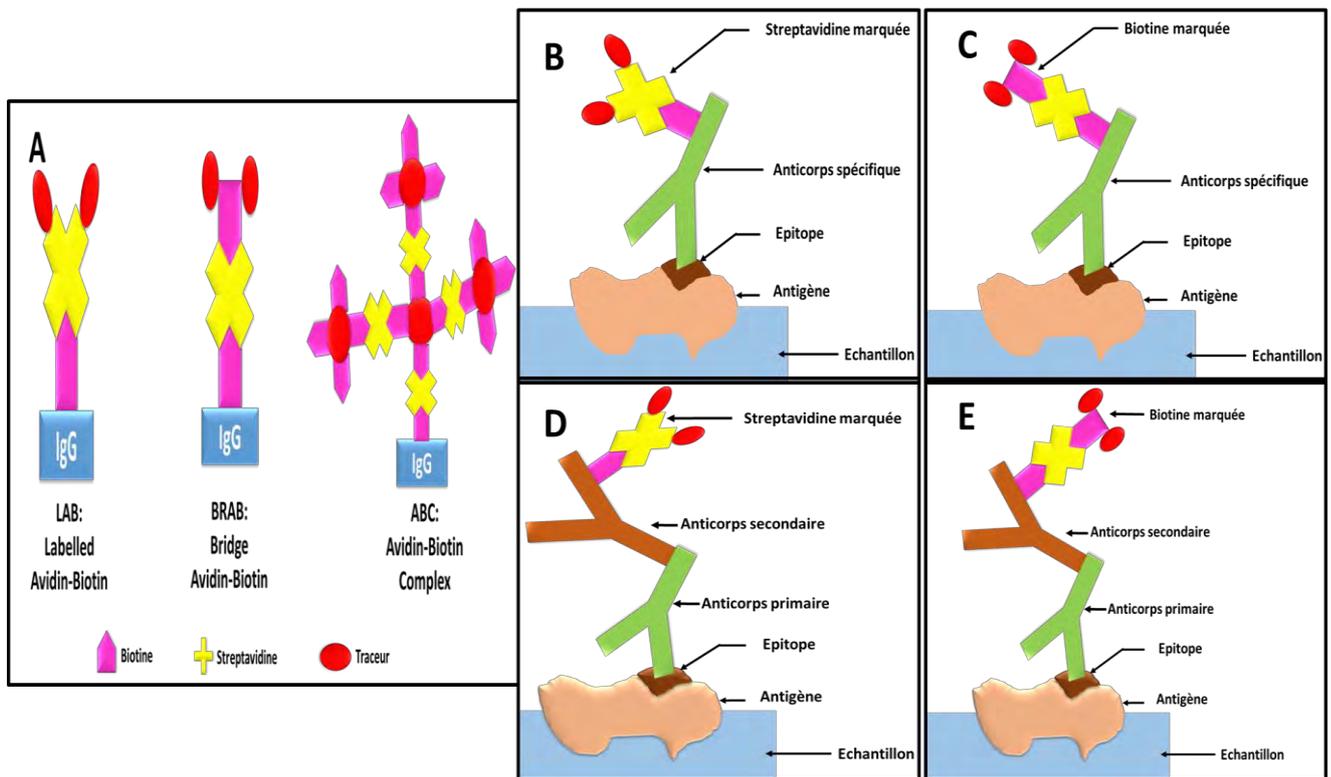


Figure 8: Méthode indirecte : pontage par le système biotine-streptavidine.

A= Modes de liaison biotine-streptavidine ; B= Anticorps primaire biotinylé et Streptavidine marquée (Labelled Avidin-Biotin) ; C= Anticorps primaire biotinylé et biotine marquée (Bridged Avidin-Biotin) ; D= Anticorps secondaire biotinylé et streptavidine marquée ; E= Anticorps secondaire biotinylé et biotine marquée.

DEUXIEME PARTIE

1. Méthodologie

1.1. Type et cadre d'étude

Nous avons mené une étude prospective, descriptive et analytique, sur une période de 16 mois (Juillet 2014 à Octobre 2015). L'étude s'est déroulée au laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec.

1.2. Echantillonnage

♣ Population d'étude

La population d'étude était constituée par tous les patients reçus dans le service durant la période de Juillet 2012 à Juillet 2015 (3ans) pour suspicion de LLC et dont le diagnostic a été confirmé par la cytologie et l'immunophénotypage. Ces patients provenaient des principales structures du Sénégal qui prenaient en charge les hémopathies malignes.

♣ Critères d'inclusion

Ont été inclus dans l'étude tous les patients dont le frottis sanguin était disponible et conservé à -20°C et/ou les patients pour lesquels les leucocytes avaient été séparés puis conservés dans du DMSO à -150°C.

♣ Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus les patients dont le frottis sanguin n'étaient pas disponibles et ceux dont le frottis était disponible mais conservé à température ambiante.

1.3. Paramètres étudiés

Pour chaque patient, les paramètres suivants ont été recueillis à partir de la base de données d'une étude antérieure réalisée dans le service:

- Les paramètres épidémiologiques : âge et sexe
- Les paramètres clinico-biologiques
 - o Le stade de Binet
 - o Les paramètres de l'hémogramme (nombre de globules blancs, nombre de lymphocytes, taux d'hémoglobine et nombre de plaquettes)
 - o Le pourcentage d' « ombres de Gümprecht » au frottis sanguin : les patients étaient répartis en deux groupes selon que le pourcentage d'OG soit inférieur ou supérieur à 30%.

- Le score de Matutes à l'immunophénotypage ainsi que la positivité ou non du CD38.

Un pourcentage de cellules CD38+ \geq 30% était considéré comme positif.

L'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 a été étudiée par immunocytochimie pour tous les patients inclus dans l'étude.

1.4. Méthodes d'analyse

Pour l'immunocytochimie, nous avons utilisé la méthode indirecte avec le système Envision de Dako (Danemark) utilisant un système de révélation par polymère de dextran.

Les frottis congelés à -20°C sont ramenés à +4°C la veille de la manipulation, puis à température ambiante au moins 30mn avant la manipulation. Les cellules congelées sont également décongelées progressivement puis lavées trois fois dans du RPMI avant d'être étalées sur une lame à l'aide du cytopspin.

Durant le marquage, il faut veiller à ce que les lames ne se dessèchent pas. Pour cela, durant les étapes d'incubation, les lames sont disposées dans une boîte porte-lames avec du sopalin imbibé d'eau.

Le tableau IV représente les matériels et réactifs nécessaires pour le marquage immunocytochimique et le tableau V résume les différentes étapes du marquage.

Tableau IV: Matériel et réactif nécessaires pour l'immunocytochimie

Immunocytochimie	
Matériel	Réactifs
○ Gants	○ Formol 4%
○ Hotte à flux laminaire	○ Acide acétique glacial
○ Papier buvard	○ TBS-Tween 20 (Wash Buffer 20X)
○ Bacs de rinçage	○ H ₂ O déminéralisée
○ Pipettes 0,5-10 μ L et 100 μ L-1000 μ L	○ Eau du robinet
○ Embouts	○ Hématoxyline de Harris
○ Tubes sec avec bouchons rouges	○ Ethanol 100°
○ Lames chargées	○ Toluène (xylène)
○ Lamelles	○ Résine (Eukitt)
○ thermomètres	○ Anticorps primaire : monoclonal Mouse anti Human BcL ₂ . Clone 124 (Dako)
○ Bain marie	○ Peroxydases Blocking Reagent SM801 (Dako)
○ Sopalin	○ Envision TM /Flex HRP SM803 (Dako)
○ Boîtes porte lames	○ Envision TM /Flex Substrate Buffer SM SM803 (Dako) :
○ Microscopes optiques	○ Envision TM /Flex Wash Buffer (Dako) DM831 : TBS Tween 20 (20x)
	○ Envision TM /Flex target Retrieval Solution DM828
	○ DAB+ chromogène DM 827 (Dako)

Tableau V: Etapes de la technique de marquage par immunocytochimie

Immunocytochimie	
Prétraitement des lames	
- Fixation : formol 4% + acide acétique (100 ml de formol + 3 ml acide acétique glacial). Recouvrir la lame de la solution de fixation	2 mn
- Rinçage : H2O déminéralisée.	5 mn
- Démasquage antigénique : Tampon PH9 (30mL) + H2O déminéralisée (1,5L), au bain marie à 96°C	20 mn
- Refroidissement des lames : sortir le bac contenant les lames du bain marie	20 mn
- Rinçage : H2O déminéralisée. Plonger les lames dans un bac contenant de l'eau déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Fixation Anticorps primaire : BcL₂ ou Ki67	
- Recouvrir les lames d'anticorps dilué au 1/400 (avec son diluent)	30 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5mn
Inhibition peroxydases endogènes	
- Recouvrir la lame de peroxydase block (250 µL)	15 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Fixation Anticorps secondaire	
- Recouvrir la lame d'anticorps secondaire couplé à une peroxydase	15mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5mn
- TBS-Tween 20- 1X	5mn
Di Amino Benzidine (DAB)	
- Recouvrir les lames de la solution contenant la DAB : 1ml de H ₂ O pour 1 goutte de DAB	8 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Contre coloration à l'hématoxyline de Harris	
- Recouvrir la lame d'hématoxyline dilué au ¼ en eau déminéralisée	8 mn
- Rincer longuement les lames avec de l'eau du robinet	5 mn
Déshydratation	
- Plonger les lames dans un bac contenant de l'éthanol 100°- Dans 3 bacs successifs	2mn x 3
- Sous hotte : plonger les lames dans un bac contenant du xylène-Dans 3 bacs successifs	1 mn x 3
Montage	
- Déposer une goutte de résine sur la lame puis recouvrir d'une lamelle	
- Attendre 15minutes avant de lire au microscope optique (x 40)	

Lorsque la réaction est positive avec la DAB, les cellules prennent une coloration brune. Lorsqu'elle est négative, les cellules sont bleues (effet de la contre coloration à l'hématoxyline de Harris) (Figure 9).

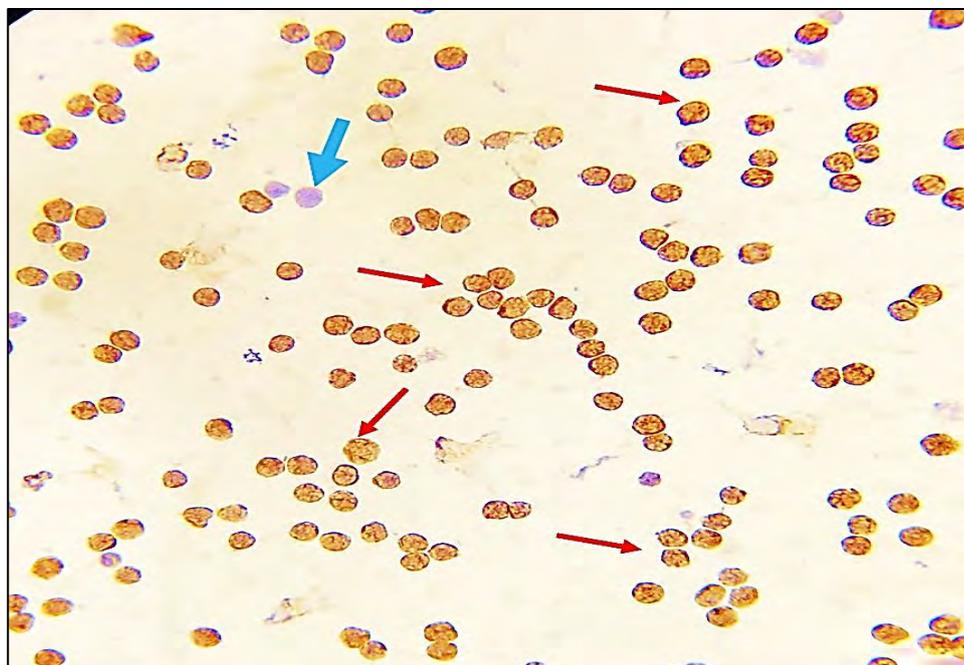


Figure 9: Exemple d'un marquage immunocytochimique positif. Flèches rouges = cellules positives; Flèche bleu = rares cellules négatives. Copyright Laboratoire Hématologie HALD

Le pourcentage de cellules positives a été déterminé chez tous les patients, avec une lecture sur au moins 200 cellules. Pour Bcl-2, un pourcentage de cellules positives d'au moins 10% était considéré comme significatif et pour Ki67, un pourcentage d'au moins 5% était considéré comme significatif.

1.5. Analyse statistique

La saisie et l'analyse des données ont été réalisées grâce au logiciel IBM SPSS Statistics version 20. Le test du Khi2 a été utilisé pour rechercher l'association entre nos différentes variables. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

2. Résultats

Au total, 46 LLC ont été diagnostiquées au laboratoire durant la période d'étude, mais seuls 20 patients possédaient un frottis sanguin conservé à -20°C et 10 patients des leucocytes séparées et congelés à -150°C . Ainsi, nos résultats concernaient uniquement ces 30 patients.

2.1. Caractéristiques épidémiologiques des patients

♣ Age

L'âge moyen de nos patients était de $61,66 \text{ ans} \pm 10 \text{ ans}$, avec des extrêmes allant de 45 à 85ans. La tranche d'âge [55-70ans[était la plus représentée (50%). 21 patients soit 70% étaient âgés de plus de 55ans (Figure 10).

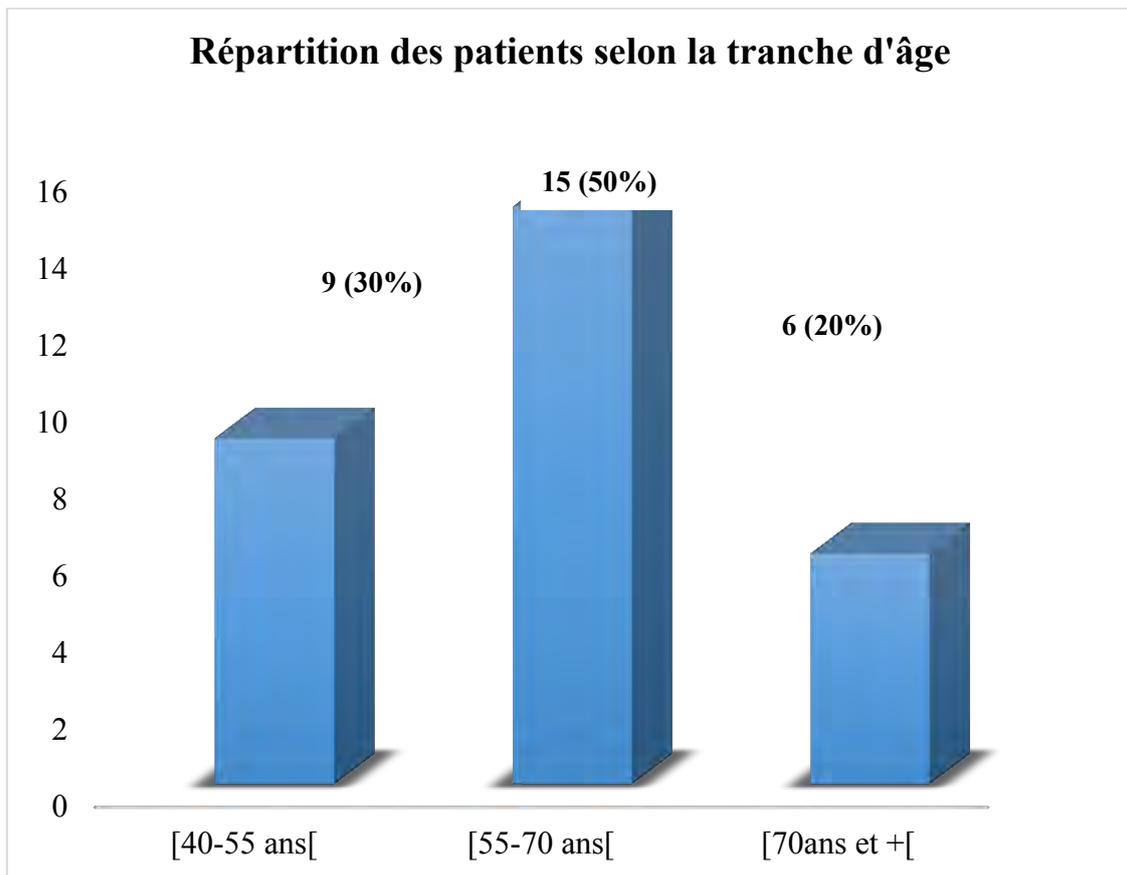


Figure 10: Répartition des patients selon la tranche d'âge

♣ Sexe

Il y avait une prédominance masculine avec 19 hommes / 11 femmes soit un sex-ratio de 1,72. (Figure 11).

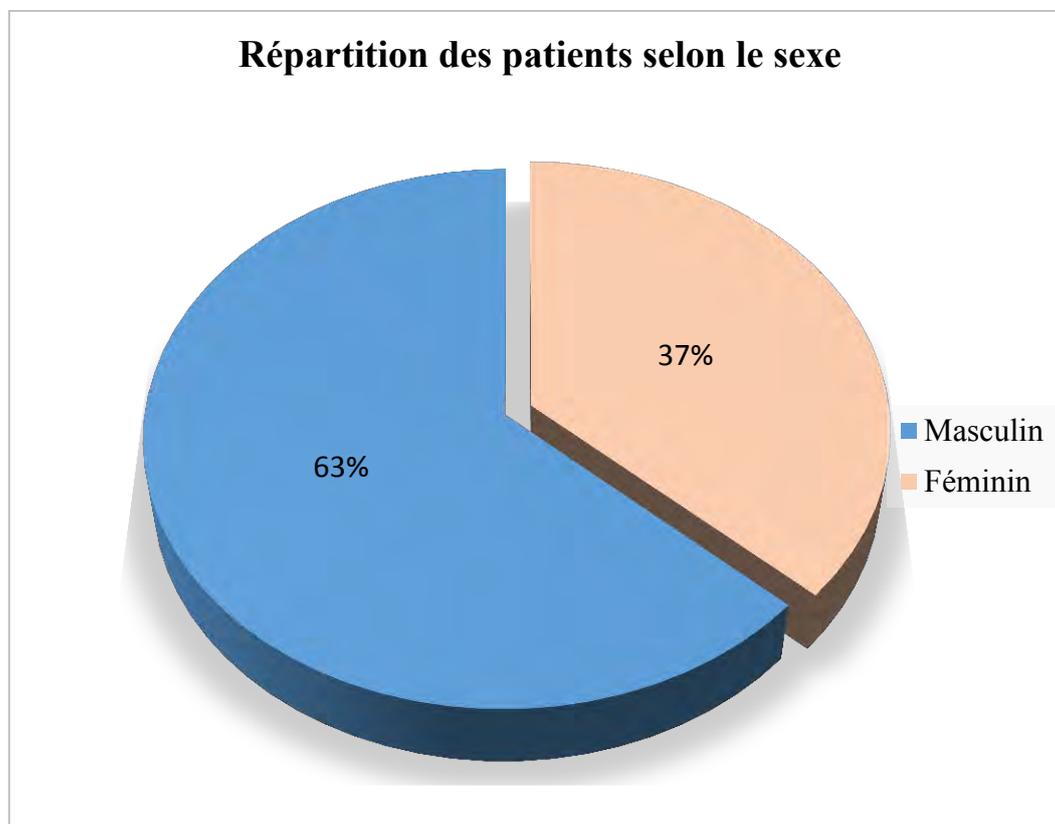


Figure 11: Répartition des patients selon le sexe

2.2. Hémogramme

♣ Leucocytes

Une hyperleucocytose a été retrouvée chez 29 de nos patients (97%) et plus de la moitié des patients (17) avaient une hyperleucocytose majeure supérieure à 100G/L. (Tableau VI). Le taux moyen de globules blancs était de 193,47G/L avec une médiane de 124,81G/L pour des extrêmes de 8,1 et 904 G/L (Tableau VII)

♣ Lymphocytes

Le taux moyen de lymphocytes était de 165,59G/L avec une médiane de 102,9G/L et des extrêmes de 5 et 789,2G/L (Tableau VII). 20 patients avaient une hyperlymphocytose majeure supérieure à 60G/L. (Tableau VI)

♣ Taux d'hémoglobine

L'anémie était retrouvée chez 21 patients (70%) des patients avec un taux d'hémoglobine moyen de 9,4g/dl et des extrêmes allant de 3,9 à 15,2 g/dl (Tableau VII). L'anémie était sévère, inférieure à 5g/dl chez 3 patients (10%) (Tableau VI).

♣ Plaquettes

Plus de la moitié de nos patients (17) n'avaient pas de thrombopénie et 9 patients ont présenté une thrombopénie inférieure à 100G/L (Tableau VI). Le taux de plaquettes moyen était de 183,1G/L (Tableau VII).

Tableau VI: Répartition des patients en fonction des paramètres de l'hémogramme

Globules blancs en G/L		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 50	8	26,6
50 – 100	5	16,7
> 100	17	56,7

Lymphocytose en G/L		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 60	10	33,3
≥ 60	20	66,7

Taux d'hémoglobine en g/dl		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 5	3	10
5 – 10	14	46,7
10 - 12	5	16,7
≥ 12	8	26,6

Taux de plaquettes en G/L		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 50	6	20
50 - 150	7	23,3
> 150	17	56,7

Tableau VII: Récapitulatifs des statistiques des paramètres de l'hémogramme

	Leucocytes (G/L)	Lymphocytes (G/L)	Taux d'hémoglobine (g/dl)	Taux de plaquettes (G/L)
Moyenne	193,47	165,59	9,4179	183,17
Médiane	124,82	102,92	9,2500	174,50
Ecart-type	223,890	193,170	3,18353	132,810
Minimum	8	5	3,90	20
Maximum	904	789	15,20	491

2.3. Pourcentage d' « ombres de Gümprecht »

Le pourcentage moyen d'OG était de 20,9% ± 14 avec des extrêmes de 6,5 et 80%. Plus de ¾ de nos patients avaient un pourcentage d'OG < 30% (Tableau VIII). Parmi les patients qui ont présenté une lymphocytose > 60G/L, 95% avaient un pourcentage d'OG < 30% contre 70% des patients qui avaient une lymphocytose < 60G/L avec une différence proche de la significativité (p=0,058).

Tableau VIII: Répartition des patients en fonction du pourcentage d'OG

Ombres de Gümprecht		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 30%	26	86,7
≥ 30%	4	13,3
Total	30	100

2.4. Stade de Binet

Plus de la moitié de nos patients (56,6%) étaient classés au Stade C de Binet. Le tableau IX représente la répartition des patients en fonction du Stade de Binet.

Tableau IX: Répartition des patients selon la Classification de Binet

Stades de Binet	Effectif	Pourcentage %
Stade A	8	26,7
Stade B	5	16,7
Stade C	17	56,6
Total	30	100

Il n'y avait pas de corrélation entre le stade de Binet et l'âge et le sexe avec des valeurs de p respectivement égales à 0,55 et 0,50. Par contre, 81% des patients classés stade B ou C avaient une lymphocytose supérieure à 60G/L contre 25% des patients stade A avec une différence statistiquement significative ($p=0,004$).

De même, il y avait une forte corrélation entre le pourcentage d'OG et le stade de Binet : tous les patients stade B ou C de Binet avaient un pourcentage d'OG $< 30\%$ contre 50% des patients stade A ($p < 0,001$).

2.5. Immunophénotypage (Score de Matutes et expression de CD38)

Le score de Matutes était égal à 5 chez 22 de nos patients soit 73,3%. Sur les 8 autres patients, 4 (13,3%) avaient un score égal à 4 : il s'agissait de 3 patients n'exprimant pas le CD23 et d'un patient qui exprimait fortement le CD22. Les 4 autres avaient un score à 3 : il y avait 3 profils CD5-/CD23- et un profil CD23-/FMC7 fortement positif (Tableau X). Il n'y avait pas de corrélation entre le score de Matutes et le taux de lymphocytes ou le stade de Binet ($p=0,704$; $p=0,195$).

Tableau X: Répartition des patients selon le score de Matutes

	Effectif	Pourcentage %
Score 5	22	73,4
Score 4	4 dont 3CD23- et 1CD22+	13,3
Score 3	4 dont 3CD23-/CD5- et 1CD23-/FMC7+	13,3
Total	30	100

Près de $\frac{3}{4}$ de nos patients (73,3%) étaient CD38+ ($\geq 30\%$ de cellules exprimant le CD38). Le pourcentage moyen de cellules CD38+ était de $51,6\% \pm 33,8$ avec une médiane de 62% [0,26 – 98%]. Il n'y avait pas de corrélation entre le CD38 et les autres facteurs : lymphocytose, Stade de Binet, Score de Matutes et pourcentage d'OG, p respectivement égal à 0,559 ; 0,08 ; 0,195 et 0,935.

2.6. Immunocytochimie

♣ Expression de Bcl-2

Tous nos patients ont eu une expression significative de la protéine Bcl-2 (% de cellules positive $\geq 10\%$) (Tableau XI). La figure 12 représente des images du marquage de quelques patients avec une forte positivité du Bcl-2. Les cellules positives apparaissent en brun. Cette positivité est variable au sein de la cellule, elle peut être homogène intéressant toute la cellule (Figure 12 A-B-C-D-E), ou hétérogène, n'intéressant qu'une partie de la cellule (Figure 12F). Le pourcentage moyen de cellules Bcl-2+ était de $86,5 \pm 17,3$; une médiane de 93,5% [20 – 99%] (Tableau XII). Seuls 8 patients (26,6%) avaient un taux $< 80\%$, dont 2 avec des valeurs $\leq 50\%$ (20% et 50%) (Tableau XI).

Tableau XI: Expression de Bcl-2 et Ki67 pour les 30 patients

Patients	Bcl-2 (% de cellules positives)	Ki67 (% de cellules positives)
Patient 1	20%	11,4%
Patient 2	50%	38%
Patient 3	66%	48%
Patient 4	76%	29%
Patient 5	80%	20%
Patient 6	70%	-
Patient 7	76%	-
Patient 8	75%	-
Patient 9	83%	-
Patient 10	84%	-
Patient 11	90%	-
Patient 12	93%	5%
Patient 13	94%	6,60%
Patient 14	94%	-
Patient 15	96%	-
Patient 16	95%	-
Patient 17	93%	-
Patient 18	96%	-
Patient 19	93%	-
Patient 20	98%	-
Patient 21	97%	5%
Patient 22	97%	-
Patient 23	98%	-
Patient 24	98%	-
Patient 25	99%	-
Patient 26	98%	-
Patient 27	96%	-
Patient 28	98%	-
Patient 29	93%	-
Patient 30	99%	-

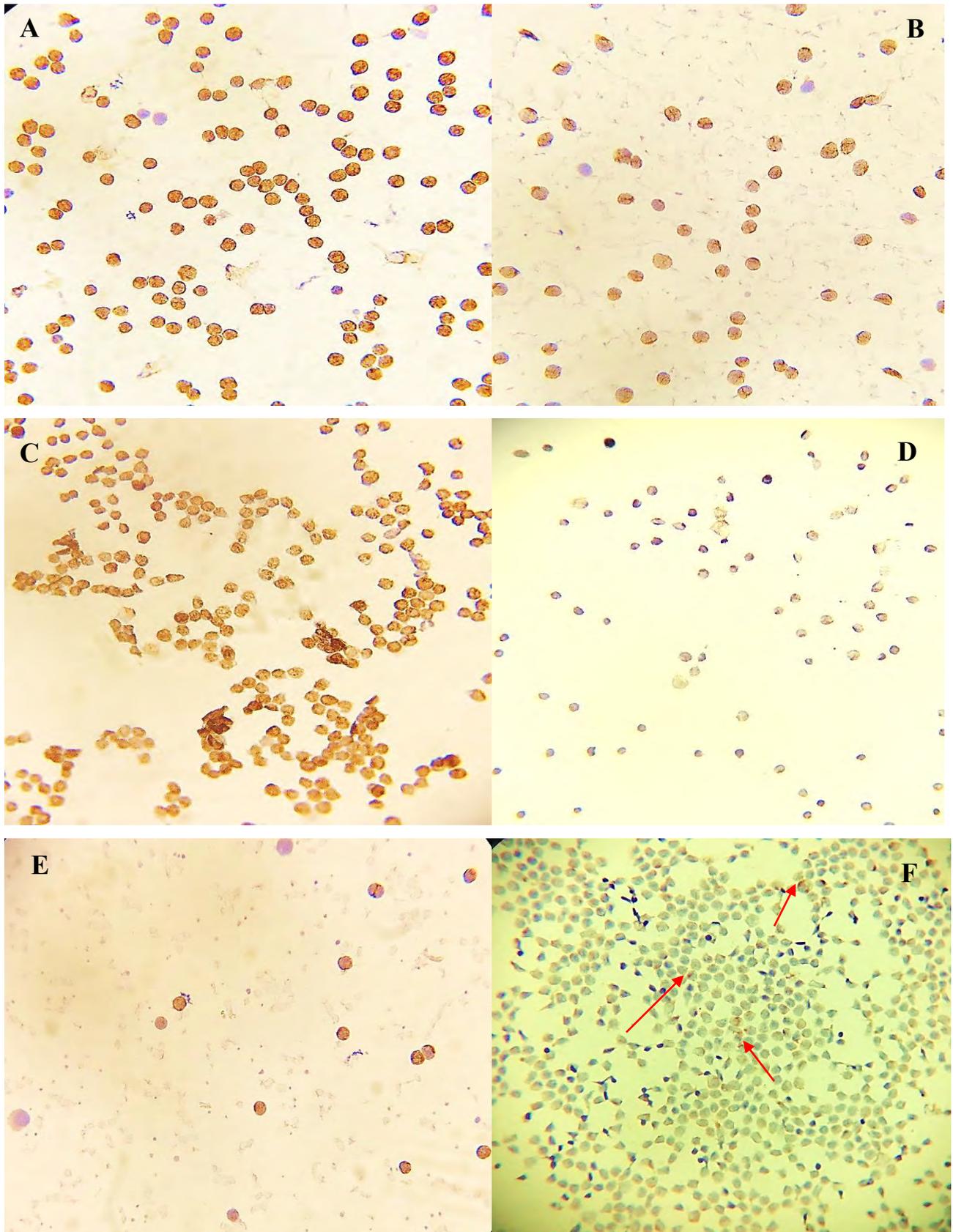


Figure 12: Image du marquage de quelques patients avec une forte positivité du Bcl-2 : la positivité est homogène pour les images A, B, C, D, E et hétérogène n'intéressant qu'une partie de la cellule pour l'image F (flèches). Copyright Laboratoire Hématologie HALD

Tableau XII: Récapitulatif des statistiques pour Bcl-2 et Ki67

	BCI-2 (%)	Ki67 (%)
Moyenne	86,5	7,23
Médiane	93,5	3,35
Ecart-type	17,3	11,46
Minimum	20	1
Maximum	99	48

♣ Expression de Ki67

Pour le Ki67, 8 patients, soient 26,6%, avaient une positivité significative $\geq 5\%$ avec chez 5 patients une valeur $\geq 10\%$ (Tableau XI). Le pourcentage moyen de cellules positives était de $7,23 \pm 11,46$, une médiane de 3,35% [1 – 48%] (Tableau XII). La figure 13 montre quelques images des lames de patients positifs pour le Ki67.

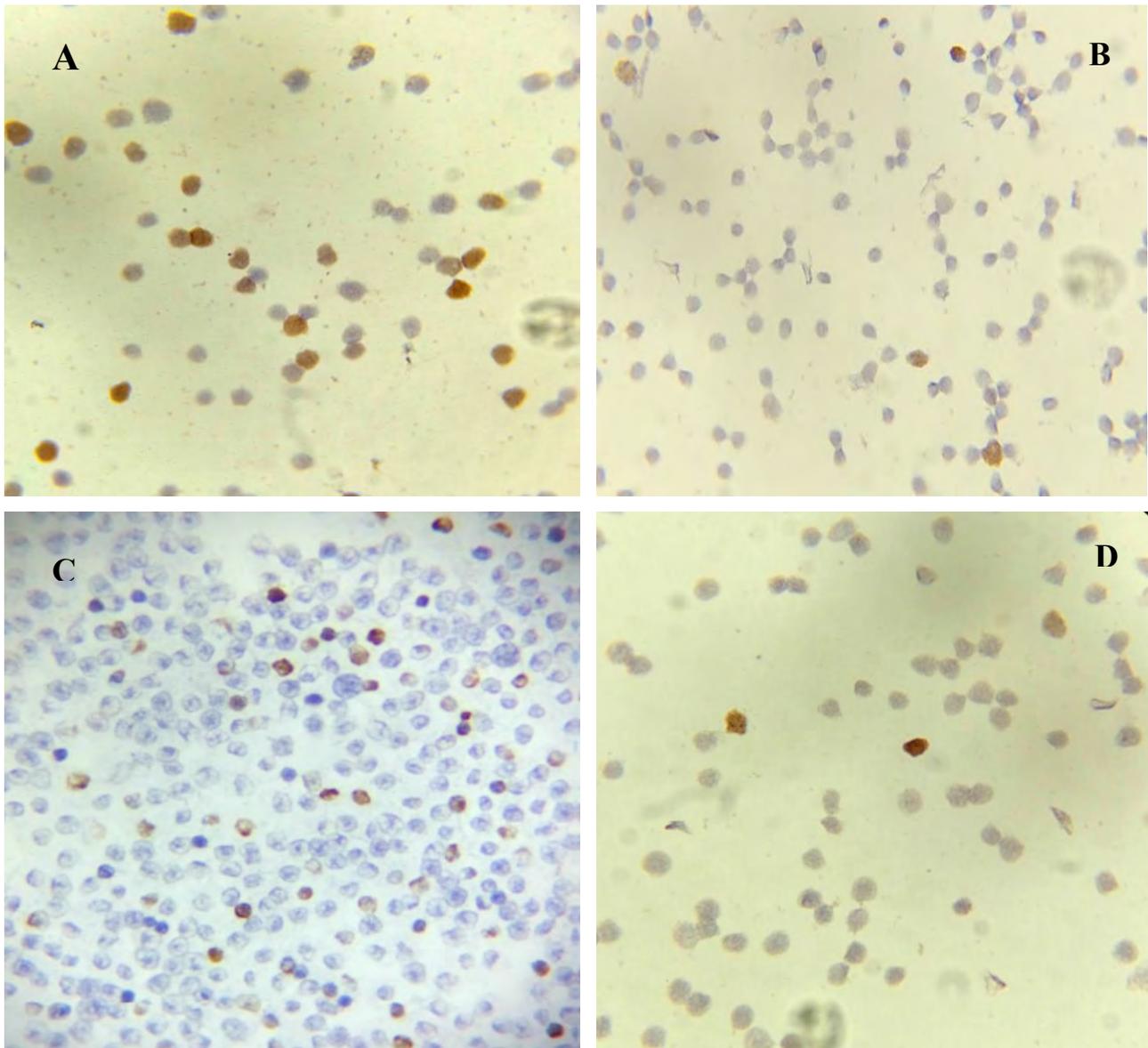


Figure 13: Images du marquage de quelques patients par le Ki67. Les images A et C montrent de nombreuses cellules positives (en marron foncé). Par contre sur les images B et D on voit de rares cellules positives (3 à 4 cellules positives par champs). Copyright Laboratoire Hématologie HALD

♣ **Corrélation entre expression de Bcl-2 / Ki67 et les autres paramètres étudiés**

Les tableaux XIII et XIV résument les corrélations obtenues entre l'expression de Bcl-2 / Ki67 et les autres paramètres étudiés tels que le stade de Binet, le score de Matutes, l'expression du CD38, le pourcentage d'OG, et taux de lymphocytes et l'expression du CD23.

Nous n'avons pas trouvé de relation entre l'expression des protéines Bcl-2 et le taux de lymphocytes, le stade de Binet, l'expression du CD38 et le pourcentage d'OG (Tableau XIII). De même, pour le Ki67, il n'y avait pas de corrélation avec le taux de lymphocytes (même si le pourcentage de cellules Ki67+ le plus élevé a été retrouvé chez le patient qui avait le nombre de globules blancs le plus élevé), le stade de Binet et le pourcentage d'OG (Tableau XIV).

Par contre l'analyse a montré que les cellules Ki67+ étaient plus retrouvées chez les patients CD38+ avec une significativité limite $p=0,046$ (Tableau XIV). Les patients qui avaient un pourcentage de cellules Ki67+ $\geq 5\%$ avaient plus tendance à avoir un pourcentage de cellules Bcl-2+ $< 80\%$ ($p=0,007$) (Tableau XIII).

Un score de Matutes < 4 était corrélé à un pourcentage de cellules Ki67+ $\geq 5\%$ et un pourcentage de cellules Bcl-2+ $< 80\%$ (p respectivement égal à 0,0001 et 0,019) (Tableaux XIII et XIV). Par ailleurs, les cellules Ki67+ étaient plus retrouvées chez les patients n'exprimant pas le CD23 avec une différence statistiquement significative ($p=0,002$) (Tableau XIV).

Tableau XIII : Corrélations entre l'expression de Bcl-2 et certains paramètres étudiés (stade de Binet, score de Matutes, CD38, ombres de Gümprrecht, taux de lymphocytes et expression de Ki67)

		Bcl-2		
		< 80% de cellules positives	$\geq 80\%$ de cellules positives	p
Stade de Binet	A	2 (25%)	6 (75%)	0,901
	B ou C	6 (27%)	16 (73%)	
Score de Matutes	4 ou 5 (LLC typique)	5 (19%)	21 (81%)	0,019
	3 (LLC atypique)	3 (75%)	1 (25%)	
CD38	Positif	7 (31%)	15 (69%)	0,29
	Négatif	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Ombres de Gümprrecht	$< 30\%$	6 (23%)	20 (77%)	0,25
	$\geq 30\%$	2 (50%)	2 (50%)	
Taux de lymphocytes	$< 60\text{G/L}$	2 (20%)	8 (80%)	0,559
	$\geq 60\text{G/L}$	6 (30%)	14 (70%)	
Ki67	Négatif ($< 5\%$)	3 (14%)	19 (86%)	0,007
	Positif ($\geq 5\%$)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	

Tableau XIV: Corrélation entre l'expression de Ki67 et certains paramètres étudiés (stade de Binet, score de Matutes, CD38, ombres de Gümprecht, taux de lymphocytes et CD23)

		Ki67		
		< 5% de cellules positives	≥ 5% de cellules positives	p
Stade de Binet	A	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,29
	B ou C	15 (68%)	7 (32%)	
Score de Matutes	4 ou 5 (LLC typique)	22 (100%)	0 (0%)	<0,0001
	3 (LLC atypique)	4 (50%)	4 (50%)	
CD38	Positif	14 (64%)	8 (36%)	0,046
	Négatif	8 (100%)	0 (0%)	
Ombres de Gümprecht	< 30%	19 (73%)	7 (27%)	0,935
	≥ 30%	3 (75%)	1 (25%)	
Taux de lymphocytes	< 60G/L	8 (80%)	2 (20%)	0,559
	≥ 60G/L	14 (70%)	6 (30%)	
CD23	Positif	20 (87%)	3 (13%)	0,002
	Négatif	2 (28,5%)	5 (71,5%)	

♣ Coexpression Bcl-2/Ki67

Chez 10 de nos patients, la somme des pourcentages de cellules positives pour BCl-2 et Ki67 était supérieure à 100 et ces patients étaient considérés comme co-exprimant les deux protéines Bcl-2 et Ki67 (Tableau XV). Parmi les patients coexprimant les deux protéines, il y avait 8 fois plus de stades C que de stade A ou B, cependant, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le stade de Binet et la coexpression BCl-2 / Ki67 (p= 0,18).

Tableau XV: Répartition des patients en fonction de la coexpression Bcl-2/Ki67

Somme Bcl-2 + Ki67	Effectif	Pourcentage %
> 100%	10	33,3
≤ 100%	20	66,7

3. Discussion

De nombreuses études se sont intéressées à l'expression des protéines Bcl-2 et /ou Ki67 au cours de la LLC ; mais rares sont celles qui utilisent l'ICC comme technique de marquage. Au Sénégal, une étude réalisée par Diop et al en 2005 avait recherché l'expression du Ki67 au cours de la LLC par ICC en utilisant comme système révélateur le complexe biotine-avidine marqué [41]. La plupart des études utilisent des techniques telles que l'IHC, la cytométrie en flux, l'immunoblot ou immunoprécipitation...[42–45]. Ces techniques peuvent paraître lourdes, soit de par leurs exigences techniques (notamment dans la préparation de l'échantillon tissulaire en IHC) ; soit de par le coût élevé de l'équipement nécessaire (Cytomètre en flux). Ainsi, l'application de l'IHC à l'échelle cellulaire (ICC) est une technique qui se révèle aussi utile en cytologie car moins coûteuse et moins invasive que l'histologie. Ceci est d'autant plus valable que dans nos pays, il n'existe pas beaucoup d'histopathologistes. D'où l'intérêt de la mise en place de l'ICC dans notre laboratoire.

Notre étude nous a permis de rechercher par ICC l'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 chez 30 patients atteints de LLC. En 3 ans, 46 cas de LLC avaient été diagnostiqués au Sénégal. Cet effectif, de même que celui observé dans d'autres séries africaines [46–48] est faible comparé aux séries européennes et américaines [49, 50]. Mais la LLC est reconnue comme étant plus fréquente en Europe et aux USA comparés à l'Afrique et à l'Asie [5, 51–54].

L'âge moyen de nos patients était de 61 ans, résultats comparables aux autres études africaines notamment au Sénégal, au Nigéria, en Côte d'Ivoire, au Zimbabwe et au Malawi [46–48, 55]. Cependant, en Europe et en Amérique, on retrouve un âge moyen au diagnostic plus élevé [56–58]. Ceci nous amène à nous interroger sur une probable apparition plus précoce de la maladie chez les africains ; suggérant ainsi l'implication telle que supposée par certains auteurs, de facteurs environnementaux ou infectieux comme le Plasmodium falciparum [31]. Par ailleurs, il est admis que la LLC est d'apparition plus précoce chez les descendants de patients porteurs de la maladie, avec une évolution plus sévère [16, 17].

La prédominance masculine retrouvée dans notre série est constante dans la majorité des séries publiées en Afrique et en Occident [48, 52, 53, 56]. Par contre, Omoti et al, de même que Salawi et al avaient retrouvé au Nigéria une prédominance féminine [46, 47].

Comparée aux séries européennes [49,59] où la majorité des patients sont au stade A de Binet au diagnostic, dans notre série, plus de la moitié de nos patients était au stade C de Binet, conformément à d'autres études africaines [46–48].

Deux hypothèses pourraient expliquer cette disparité : d'une part, le retard diagnostique lié aux réalités culturelles en Afrique mais aussi au manque de moyens ; d'autre part, l'âge de survenue précoce remarqué chez les africains serait corrélé à un pronostic plus sombre de la maladie [60].

Par ailleurs, par rapport au sexe, certains auteurs suggèrent que le sexe féminin serait corrélé à un meilleur pronostic [61]. En effet, Catovsky et al ont mis en évidence chez les femmes un stade de Binet A plus fréquent, une meilleure réponse au traitement, une moindre présence des autres facteurs de mauvais pronostic et une survie à 10 ans meilleure [61]. Néanmoins, la faible taille de notre échantillon doit faire interpréter les résultats avec prudence et des études supplémentaires seraient nécessaires pour mieux établir le rôle des facteurs âge et sexe dans l'évolution de la LLC.

Une lymphocytose supérieure à 60G/L était retrouvée chez 60% des patients dont 90% étaient au stade B ou C de Binet. Ainsi, les patients à un stade avancé de la maladie avaient un taux de lymphocytes significativement plus élevé comparés aux autres. En effet, de nombreuses études ont suggéré le taux de lymphocytes comme étant un facteur pronostic indépendant, prédictif de survie [62,63]. Mais malgré tout, la lymphocytose n'est pas intégrée dans les classifications clinico-biologiques et il n'existe pas encore de consensus sur la valeur seuil de lymphocytose au-delà de laquelle elle est considérée comme de mauvais pronostic.

Plus de la moitié des patients ont un taux d'hémoglobine inférieur à 10g/dl. Ceci était en accord avec des résultats obtenus par des études africaines [46,48,55] et explique pourquoi dans notre série, il y avait autant de patients classés stade C de Binet.

Dans notre série, le pourcentage moyen d'OG était de 20,9%, résultat comparable à ceux obtenus dans d'autres études européennes [64,65]. Quarante-huit pour cent de nos patients avaient une proportion d'OG < 30% dont 84,6% étaient classés stade B ou C. Il y avait ainsi une forte corrélation entre le pourcentage d'OG et le stade de Binet ($p < 0,0001$). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle, le pourcentage d'OG pourrait être considéré comme un facteur pronostique indépendant [64–66] ; un pourcentage faible étant corrélé à un pronostic plus sombre. Cependant, il n'y a pas encore de consensus sur la valeur seuil en deçà de laquelle le pronostic est considéré comme mauvais. Dans notre étude nous avons choisi une valeur seuil de 30%. D'autres auteurs ont utilisé un seuil plus faible de 20% [64,65]. Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le pourcentage d'OG et les autres facteurs pronostiques tels que le CD38. Par contre, Johanson et al ont montré que des pourcentages faibles d'OG étaient surtout retrouvés chez les patients CD38+, ZAP70+ ou présentant des gènes d'Ig non mutés [64]. Dans tous les cas, la détermination du pourcentage

d'OG demeure un examen simple, peu coûteux, accessible qui pourrait être adopté pour l'évaluation du pronostic chez les patients atteints de LLC, surtout dans les pays en développement où la détermination des facteurs pronostiques classiques n'est pas toujours disponible.

Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique qui joue un rôle clé dans la physiopathologie de la LLC. Selon certains auteurs, cette protéine est surexprimée chez tous les patients atteints de LLC [2,67,68]. Nos résultats semblent confirmer cette assertion. En effet, chez tous nos patients, nous avons retrouvé une positivité significative pour Bcl-2 avec un pourcentage de cellules positives supérieur à 80% dans plus de 2/3 des cas. Cependant, d'autres études ont montré qu'un niveau élevé de Bcl-2 n'était pas retrouvé chez tous les LLC [43,69]. Dans notre série, même si tous les patients avaient une positivité significative pour le Bcl-2, chez 2 patients, on retrouvait des valeurs faibles comparées à la moyenne (20% et 50%). Kitada et al avait retrouvé dans leur étude une hyperexpression de la protéine seulement chez 60% des patients [43]. Cette variabilité d'expression de la protéine Bcl-2 au cours de la LLC aurait-elle un impact sur le pronostic de la maladie ? Robertson et al avaient mis en évidence dans leur étude portant sur 33 LLC-B une association Nous avons recherché une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine et certains facteurs pronostiques tels que le stade de Binet, l'expression du CD38 et la lymphocytose. Cependant, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre l'expression de Bcl-2 et le stade de Binet comme cela a été rapporté par plusieurs études [2,42,43]. En effet, plutôt que le niveau de Bcl-2, c'est surtout l'augmentation du rapport Bcl-2/Bax qui est le plus corrélée à une progression de la maladie et à un échec thérapeutique [2,42,43]. Une corrélation n'a pas non plus été établie entre Bcl-2 et l'expression du CD38 et la lymphocytose. Par contre Kitada et al avait retrouvé une association entre un niveau élevé de Bcl-2 et une augmentation du nombre de globules blancs [43].

Concernant le Ki67, le pourcentage moyen de cellules positives était de 7,2% avec une médiane de 3,35%. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle moins de 5% des cellules de la LLC sont en prolifération [3,70]. D'autres auteurs suggèrent même un taux de cellules prolifératives plus faible, inférieur à 1%, avec un compartiment prolifératif localisé essentiellement au niveau des centres germinatifs des ganglions lymphatiques [71]. Cependant, Morabito et al en Italie avait étudié par cytométrie en flux l'expression du ki67 chez 70 patients atteints de LLC et avaient retrouvé un pourcentage médian de cellules Ki67+ de 52% avec des extrêmes allant de 2 à 99% [44].

La disparité entre nos résultats pourrait être expliquée en partie par la différence entre les techniques utilisées (Cytométrie en flux versus Immunocytochimie), mais ce facteur nous semble insuffisant pour expliquer cette grande différence.

Seuls 8 patients sur les 30 avaient un taux de cellules Ki67+ significatif $\geq 5\%$ dont 5 avaient des valeurs $\geq 10\%$. Dans l'étude de Diop et al au Sénégal, les patients étaient répartis en 3 groupes : un groupe avec un taux de prolifération $\leq 2\%$ (29,2%) qui correspondait sur le plan cytologique à une LLC typique ; un groupe avec un taux de prolifération compris entre 3 et 9% (66,6%) qui correspondait à la cytologie à une LLC mixte ou une leucémie prolymphocytaire et un groupe avec un taux de cellules prolifératives $\geq 10\%$ correspondant sur le plan cytologique à la transformation du LLC en un lymphome non hodgkinien de haut grade [41]. Ces observations peuvent faire émettre l'hypothèse selon laquelle une augmentation du nombre de cellules prolifératives au cours de la LLC pourrait être associée à une transformation de la LLC. Notre étude semble corroborer cette assertion. En effet, nous avons retrouvé une forte corrélation entre le score de Matutes et le niveau d'expression de Ki67 : les patients avec un taux de cellules Ki67+ ayant plus tendance à avoir un score < 4 et donc une LLC atypique. La question que l'on se pose alors est de savoir si la transformation de la LLC s'accompagne ou pas de l'acquisition de marqueurs de surface aberrants ou de la perte de marqueurs caractéristiques avec comme conséquence une diminution du score de Matutes ? Dans le même sens, nous remarquons que dans notre étude, 5 patients parmi les 7 qui n'exprimaient pas le CD23 avaient un taux de prolifération $\geq 5\%$. Cette absence (ou perte) d'expression du CD23 était positivement corrélée avec des taux élevés de Ki67 ($p=0,002$). Ceci n'était pas en phase avec l'étude de Bennet et al qui avait trouvé une forte expression de Ki67 essentiellement dans les cellules CD23+ [71]. En effet, beaucoup d'études immunohistochimiques avaient déjà admis le CD23 comme étant plus fortement exprimé par les cellules prolifératives [72]. Pourtant, le CD23 n'est pas exprimé dans les lymphocytes B normaux, mais une forte expression est retrouvée au cours de l'activation de ces cellules. Une question mériterait alors d'avoir une réponse, notamment pourquoi le CD23 s'exprime de façon caractéristique au cours de la LLC alors que le pourcentage de cellules prolifératives au cours de cette pathologie est supposé être faible. Ainsi, des études supplémentaires seraient nécessaires pour mieux étayer les hypothèses formulées et apporter des réponses aux questions formulées.

Même si le patient qui avait le taux de prolifération le plus élevé correspondait à celui qui avait le nombre de globules blancs le plus élevé, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'expression du Ki67 et la lymphocytose sanguine ($p=0,0559$). En effet, certains auteurs suggèrent que l'évaluation du taux de croissance des cellules leucémiques est plus significative cliniquement (taille des ganglions et rate) que par la numération des lymphocytes [1].

Par ailleurs, notre étude a retrouvé une corrélation entre l'expression de Ki67 et celle du CD38, l'expression du Ki67 étant plus élevée chez les patients CD38+. Des résultats similaires ont été obtenus par Morabito et al qui en dosant le Ki67 plasmatique circulant avaient retrouvé des valeurs plus élevées chez les patients CD38+, suggérant ainsi que les cellules CD38+ reflétaient le compartiment prolifératif du clone [44]. Cependant, l'étude d'une éventuelle relation entre l'expression du CD38 et celle de Ki67 montre des résultats disparates. Bennet et al dans leur étude avaient retrouvé une variabilité interindividuelle en ce qui concernait la relation entre CD38 et Ki67 : dans un groupe de patients, les cellules Ki67+ montraient une forte expression du CD38 et dans un autre groupe l'expression du Ki67 était seulement détectable dans les cellules CD38- [71]. Ainsi d'autres études seraient nécessaires pour mieux établir la relation entre l'expression du CD38 et celle de Ki67. Néanmoins, malgré l'absence de corrélation manifeste entre l'expression du Ki67 et les autres facteurs pronostiques tels que le stade de Binet, l'expression du CD38 et la lymphocytose, le Ki67 serait un puissant considéré comme un puissant prédicteur de l'évolution clinique au cours de la LLC [3,44]. En effet, Morabito et al ont rapporté dans leur étude que les patients avec un taux de prolifération inférieur à la médiane avaient une meilleure survie comparée aux autres. De même, parmi les patients CD38-, ceux qui exprimaient des taux élevés de Ki67 avaient une survie moindre [37]. Ainsi, certains auteurs considèrent que la fraction de cellules prolifératives augmentait avec la progression de la maladie [4].

Par ailleurs, nous avons trouvé que les patients qui avaient un pourcentage de cellules Bcl-2+ < 80% avaient un score de Matutes plus faible ($p=0,019$) et un pourcentage de cellules Ki67+ plus élevé ($p < 0,001$). Cela pourrait suggérer qu'au cours de la LLC, les cellules leucémiques ont tendance à perdre l'expression de Bcl-2 lorsqu'elles entrent en cycle cellulaire. Peu d'études se sont intéressées aux relations entre Bcl-2 et Ki67 au cours des lymphomes non hodgkiniens en général et de la LLC en particulier. Masir et al ont individualisé dans leur étude deux groupes de LLC.

Dans le premier groupe, les cellules leucémiques perdaient l'expression de Bcl-2 durant le cycle cellulaire, cette caractéristique étant maintenue même lorsqu'il y a une transformation en lymphome de haut grade ; dans le second groupe, les cellules en cycle cellulaire avaient tendance à coexprimer les deux marqueurs [45]. Dans notre série, la somme des pourcentages de cellules exprimant Bcl-2 et Ki67 était supérieure à 100 chez 33,3% de nos patients, laissant ainsi suggérer chez ces patients la présence de cellules coexprimant les deux protéines. Cependant, un double marquage simultané des deux protéines sur la même préparation cellulaire nous aurait permis de mieux apprécier la coexpression Bcl-2/Ki67. En effet, une somme de pourcentage de cellules exprimant Bcl-2 et Ki67 < 100 n'exclut pas formellement la présence de cellules coexprimant les deux protéines ; et donc l'interprétation des résultats en ce qui concerne la coexpression Bcl-2/Ki67 doit se faire avec prudence.

Dans la littérature, il existe des informations limitées à propos de la relation entre Bcl-2 et Ki67 dans les lymphocytes B normaux. Pezella et al soutiennent que les deux protéines n'y sont pas normalement co-exprimées ; Bcl-2 étant exprimé seulement par les cellules non prolifératives [73]. Les mêmes observations ont été rapportées par Puthier et al dans plasmocytes normales [74]. Dans le même sens, Schena et al ont trouvé que les cellules normales n'expriment pas Bcl-2 de façon constante et ont la capacité d'inhiber l'expression de Bcl-2 avant d'entrer en cycle cellulaire, c'est-à-dire avant d'exprimer Ki67 [75].

Parmi les patients supposés coexprimer les deux protéines, 80% étaient classés stade C de Binet même si, il n'y avait pas de corrélation significative retrouvée ($p=0,18$). Masir et al avaient retrouvé une coexpression Bcl-2/Ki67 chez les lymphomes agressifs [45]. De même, Schena et al ont suggéré que les tumeurs conservant l'expression de Bcl-2 malgré l'entrée en cycle cellulaire pourraient être plus agressives cliniquement [75]. Ainsi, il serait intéressant dans des études ultérieures, de mieux investiguer l'implication de la coexpression Bcl-2/Ki67 sur le pronostic de la LLC.

CONCLUSION

L'immunocytochimie au même titre que l'immunohistochimie est d'un grand intérêt dans le diagnostic, le suivi et l'évaluation du pronostic des tumeurs en général et des hémopathies malignes en particulier. Il s'agit d'une technique certes longue (au minimum 3h de manipulation) mais particulièrement utile en oncohématologie, surtout dans nos pays où il n'existe pas beaucoup d'hémathologistes et où l'immunohistochimie n'est pas de pratique courante. En effet, pour un diagnostic précis des lymphomes, les pièces de biopsie ganglionnaire sont systématiquement envoyées dans des laboratoires d'Europe, avec un coût qui n'est pas à la portée de tous les patients. C'est ainsi que beaucoup de lymphomes souffrent dans nos régions d'un diagnostic imprécis et donc très probablement d'un traitement inadapté, d'où l'importance de la mise en place de ces techniques dans nos structures sanitaires.

Ainsi, à travers l'étude de l'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 au cours de la LLC, ce travail nous a permis de mettre en place et de maîtriser la technique de marquage immunocytochimique au laboratoire d'Hématologie de L'Hôpital Aristide le Dantec. Les principaux résultats obtenus ont montré une forte expression de Bcl-2 chez la quasi-totalité des patients avec un pourcentage de cellules exprimant le Bcl-2 > 80% chez près de $\frac{3}{4}$ des patients. Par contre, pour le Ki67, seuls 26,6% des patients avaient une expression significative de la protéine ($\geq 5\%$ de cellules positives). Par ailleurs, une corrélation significative a été retrouvée entre une forte expression de Ki67, une perte d'expression de Bcl-2 et un score de Matutes faible. Cependant, des études supplémentaires, avec un échantillonnage plus grand seront nécessaires pour mieux établir les relations entre Bcl-2 et Ki67 au cours de la LLC, et leur implication dans le pronostic de la maladie. Et dans cette perspective, il serait pertinent de remplacer la présente méthode par la méthode de double marquage antigénique afin de mieux apprécier la coexpression Bcl-2 et Ki67.

Nous envisageons de pérenniser cette activité dans notre service, et de l'étendre au diagnostic des autres hémopathies malignes, surtout des lymphomes (par exemple : expression de CD15 et CD30 au cours du lymphome de Hodgkin ; expression de la cycline D1 dans le lymphome du manteau ; expression de Bcl-2 dans le lymphome folliculaire), en utilisant comme échantillon des frottis de suc ganglionnaire.

Nos recommandations vont essentiellement à l'endroit de la Direction de l'HALD. Nous sollicitons un soutien de la part de l'hôpital afin de nous faciliter l'obtention du matériel et des réactifs nécessaires à la réalisation de l'ICC en pratique courante. Ce qui contribuera d'une part à une meilleure prise en charge des patients, et d'autre part à mieux développer le recherche.

REFERENCES

1. Merle-Beral H. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique : absence de mort ou prolifération ? *Hématologie*. 2006;12 (Spécial 6):4–10.
2. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005 Apr;114(4):441–9.
3. Bruey J-M, Kantarjian H, Ma W, Estrov Z, Yeh C, Donahue A, et al. Circulating Ki-67 index in plasma as a biomarker and prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010 Oct;34(10):1320–4.
4. Genton CY. L'immunohistochimie : son principe, ses applications et ses limites. *Clin Mother Child Health*. 2006 Apr;3(1):477–81.
5. Merle-Beral H. Leucémie lymphoïde chronique. In: *Hématologie Clinique et Biologique*. Rueil-Malmaison: Arnette; 2005. p. 285–91.
6. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):265–76.
7. Monnereau A, Remontet L, Maynadie M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012: Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim Partie 2 – Hémopathies malignes. 2013.
8. Eichhorst B, Hallek M, Dreyling M, On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May 1;21(Supplement 5):v162–4.
9. Xavier BROCHET. Conception et intégration d'un système d'information dédié à l'analyse et à la gestion des séquences réarrangées des récepteurs d'antigènes au sein d'IGMT® : application a la leucemie lymphoïde chronique [PhD]. [Montpellier]: Montpellier 1; 2008.
10. Vyas N, Hassan A. Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. *Indian J Cancer*. 2012;49(1):137.

11. Linet MS, Van Natta ML, Brookmeyer R, Khoury MJ, McCaffrey LD, Humphrey RL, et al. Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. A case-control study. *Am J Epidemiol.* 1989 Oct;130(4):655–64.
12. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109(4):794–9.
13. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol.* 2000 Aug; 65(2):114–7.
14. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2009 May;94(5):647–53.
15. Rebora P, Lee M, Czene K, Valsecchi MG, Reilly M. High risks of familial chronic lymphatic leukemia for specific relatives: signposts for genetic discovery? *Leukemia.* 2012 Nov;26(11):2419–21.
16. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001 May;113(2):407–14.
17. Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet.* 1996 Nov; 59 (5):990–8.
18. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* 2007 Jan 1;109 (1):259–70.
19. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004 Jul 30; 305(5684):626–9.
20. Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1;1644 (2-3):229–49.

21. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993 Sep 15;82(6):1820–8.
22. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944–9.
23. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793–801.
24. Ghia P, Boussiotis VA, Schultze JL, Cardoso AA, Dorfman DM, Gribben JG, et al. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):244–51.
25. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett*. 2002 Dec 10;187(1-2):199–205.
26. Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, Mouzakiti A, Habens F, Brimmell M, et al. Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*. 2004 Jun 17;23(28):4818–27.
27. Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):444–54.
28. Bouley J, Deriano L, Delic J, Merle-Béral H. New molecular markers in resistant B-CLL. *Leuk Lymphoma*. 2006 May;47(5):791–801.
29. Trbusek M, Malcikova J, Smardova J, Kuhrova V, Mentzlova D, Francova H, et al. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*. 2006 Jun;20(6):1159–61.

30. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):755–64.
31. Sall Abibatou. Caractéristion des syndromes lymphoprolifératifs au Sénégal - Implication des micro-RNAs [PhD]. [Dakar - Sénégal]: Université Cheikh Anta Diop; 2015.
32. Troussard X. Nouveautés sur les hémopathies lymphoïdes chroniques B matures. *Immuno-Anal Biol Spéc.* 28:174–82.
33. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975 Aug;46(2):219–34.
34. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981 Jul 1;48(1):198–206.
35. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003 May 1;348(18):1764–75.
36. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Aug 26;351(9):893–901.
37. Gray JL, Jacobs A, Block M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1974 Apr;33(4):1169–78.
38. Rywlin AM. Letter: Bone marrow biopsy and aspiration. *Am J Clin Pathol.* 1976 Sep;66(3):617–8.
39. Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Brugues R. Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1981 Apr;47(4):529–37.
40. Clifton N. Immucytochemical Methods and Protocols. *Methods Mol Biol.* 2010 Jan;115.

41. Diop S, Letestu R, Orsolani D, Leboeuf Y, Le Tutour P, Thiam D, et al. Expression of proliferation marker Ki 67 in chronic lymphocytic leukemia. *Dakar Méd.* 2005;50(2):65–8.
42. Molica Stefano, Dattilo Angela, Giulino Crispina, Levato Domenico, Levato Luciano. Increased bcl-2/bax ratio in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with a progressive pattern of disease. *Haematologica.* 1998;83:1122–30.
43. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3379–89.
44. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, Loiacono F, Matis S, Recchia AG, et al. More on the determination of Ki-67 as a novel potential prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2010 Dec;34(12):e326–8.
45. Masir N, Jones M, Lee AM, Goff LK, Clear AJ, Lister A, et al. The expression of Bcl-2 by proliferating cells varies in different categories of B-cell lymphoma. *Histopathology.* 2010 Apr;56(5):617–26.
46. Salawu L, Bolarinwa RA, Durosinmi MA. Chronic lymphocytic leukaemia: a twenty-years experience and problems in Ile-Ife, South-Western Nigeria. *Afr Health Sci.* 2010 Jun;10(2):187–92.
47. Omoti CE, Awodu OA, Bazuaye GN. Chronic lymphoid leukaemia: clinico-haematological correlation and outcome in a single institution in Niger Delta region of Nigeria. *Int J Lab Hematol.* 2007 Dec;29(6):426–32.
48. Mukiiibi JM, Paul B, Nyirenda CM, Adewuyi JO, Gwanzura C, Mzulu E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in Central Africans. *Cent Afr J Med.* 2004 Dec;50(11-12):111–5.
49. Tjønnfjord GE, Ly BE, Johannesen TB, Tierens A, Beiske K, Heim S, et al. Chronic lymphocytic leukaemia in Norway--incidence and prognostic markers at diagnosis. *Tidsskr Den Nor Lægeforen Tidsskr Prakt Med Ny Række.* 2012 Oct 2;132(18):2056–9.

50. Van den Broek EC, Kater AP, van de Schans SAM, Karim-Kos HE, Janssen-Heijnen MLG, Peters WG, et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia in the Netherlands: Trends in incidence, treatment and survival, 1989–2008. *Eur J Cancer*. 2012 Apr;48(6):889–95.
51. Chihara D, Ito H, Matsuo K. [Comparison of the incidence and trends of hematologic malignancies between Japan and the United States]. *Rinshō Ketsueki Jpn J Clin Hematol*. 2015 Apr;56(4):366–74.
52. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3724–34.
53. Healey R, Patel JL, de Koning L, Naugler C. Incidence of chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B-cell lymphocytosis in Calgary, Alberta, Canada. *Leuk Res*. 2015 Apr;39(4):429–34.
54. Lee SJ, Tien H-F, Park HJ, Kim J-A, Lee DS. Gradual increase of chronic lymphocytic leukemia incidence in Korea, 1999-2010: comparison to plasma cell myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 2;1–5.
55. Koffi KG, Nanho DC, Tolo A, N'Dathz E, Kouakou B, Meite N, et al. Chronic lymphocytic leukemia in Subsaharian Africa: clinical outcome experience of Côte d'Ivoire]. *Bull Cancer (Paris)*. 2009 Sep;96(9):901–6.
56. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):446–60.
57. Pfeil AM, Imfeld P, Pettengell R, Jick SS, Szucs TD, Meier CR, et al. Trends in incidence and medical resource utilisation in patients with chronic lymphocytic leukaemia: insights from the UK Clinical Practice Research Datalink (CPRD). *Ann Hematol*. 2015 Mar;94(3):421–9.
58. Bergmann M, Wendtner C-M. [Chronic lymphatic leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 2015 Apr;140(7):479–82.
59. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*. 2009 Jan;23(1):25–47.

60. Parikh SA, Rabe KG, Kay NE, Call TG, Ding W, Schwager SM, et al. Chronic lymphocytic leukemia in young (≤ 55 years) patients: a comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):140–7.
61. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1088–94.
62. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*. 1987 Mar;69(3):929–36.
63. Letestu R, Lévy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4588–90.
64. Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J, et al. Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010 Jul;34(7):892–8.
65. Szerafin L, Jakó J, Riskó F, Hevessy Z. [The prognostic value of smudge cells (Gumprecht shadows) in chronic lymphocytic leukaemia]. *Orv Hetil*. 2012 Nov 4;153(44):1732–7.
66. Paydas S. Smudge cells: very old history and new conclusions. *Leuk Res*. 2010 Dec;34(12):1680.
67. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2615–20.
68. 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 Oct 15;78(8):1901–14.
69. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*. 1996 Mar;10(3):456–9.

70. Sanhes L, Tang R, Delmer A, DeCaprio JA, Ajchenbaum-Cymbalista F. Fludarabine-induced apoptosis of B chronic lymphocytic leukemia cells includes early cleavage of p27kip1 by caspases. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1104–11.
71. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, Tute R de, Moreton P, Jack A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007 Nov;139(4):600–4.
72. Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol*. 2006 Feb;37(2):152–9.
73. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol*. 1990 Aug;137(2):225–32.
74. Puthier D, Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Robillard N, Rapp MJ, Juge-Morineau N, et al. Differential expression of Bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia*. 1999 Feb;13(2):289–94.
75. Schena M, Larsson LG, Gottardi D, Gaidano G, Carlsson M, Nilsson K, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2981–9.

RESUME

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne chronique caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires de cellules lymphocytaires B bloquées en phase G0 du cycle cellulaire. Sa physiopathologie reste encore mal élucidée. Cependant, en plus d'un dysfonctionnement des mécanismes de l'apoptose reconnu depuis longtemps dans la LLC, plusieurs arguments témoignent aujourd'hui de l'existence d'une part proliférative dans la population leucémique. C'est dans ce contexte que nous avons mené ce travail avec comme objectif général d'étudier par immunocytochimie l'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 au cours de la LLC.

Méthodologie

Nous avons mené une étude prospective, descriptive et analytique sur une période de 16 mois (Juillet 2014 à Octobre 2015), au laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier Universitaire de l'Hôpital Aristide le Dantec. On été inclus dans l'étude toutes les LLC diagnostiquées dans le service de Juillet 2012 à Juillet 2015 et dont le frottis sanguin était disponible et conservé à -20°C. Les patients dont les leucocytes avaient été séparées et conservées dans du DMSO à -150°C ont également été inclus. Pour chaque patient nous avons étudié les paramètres épidémiologiques (âge et sexe), les paramètres clinico-biologiques (stade de binet, hémogramme, ombres de Gümprecht, score de Matutes, expression du CD38). L'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 a été étudiée par immunocytochimie. Un pourcentage de cellules positives supérieur à 10% et supérieur à 5% a été considéré comme significatif respectivement pour Bcl-2 et Ki67.

La saisie et l'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel IBM SPSS Statistics version 20. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Trente patients avaient rempli les critères d'inclusion. L'âge moyen était de 61,66 ans (+/- 10). Il y avait une prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,72. Tous les patients ont présenté une expression significative de Bcl-2. Le pourcentage moyen de cellules Bcl-2+ était de 86,5%. Huit patients (26,6%) avaient un pourcentage de cellules positives inférieur à 80%. Pour le Ki67, le pourcentage moyen de cellules positives était de 7,23%. Seuls 8 patients (26,6%) avaient une expression significative de la protéine Ki67. Chez 10 patients (33,33%) il y avait une coexpression des deux protéines. Une corrélation significative a été retrouvée entre un pourcentage de cellules Bcl-2+ inférieur à 80% et un pourcentage de cellules Ki67+ supérieur à 5% ($p=0,007$). De même, une faible expression de Bcl-2 et une forte expression de Ki67 étaient significativement corrélée à un score de Matutes < 4 ($p=0,019$ et $p<0,0001$). Une forte expression de Ki67 était aussi corrélée avec une forte expression du CD38 et une perte d'expression du CD23 ($p=0,046$ et $p=0,002$).

Conclusion :

L'hyperexpression de la protéine Bcl-2 est constante au cours la LLC. Par contre, l'expression de Ki67 semble plus importante chez les patients qui expriment faiblement Bcl-2. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour mieux établir les relations entre Bcl-2 et Ki67 au cours de la LLC, et leur implication dans le pronostic de la maladie. Ce travail nous aura par ailleurs permis de mettre en place et de maîtriser la technique d'immunocytochimie