

Mémoire de Maîtrise en médecine No 1819

Syndromes lymphoprolifératifs CD19/CD5 positifs: expression différentielle de CD200

Etudiant

Loris Canton

Tuteur

Prof. Olivier Spertini
Service d'hématologie
Département d'Oncologie et des Laboratoires
1011 Lausanne CHUV

Expert

Prof. Jacqueline Schoumans Pouw
Unité de cytogénétique du cancer, CHUV
1011 Lausanne CHUV

Lausanne, Mai 2015

Résumé

Contexte. Le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs est souvent difficile et nécessite l'intégration de données immunophénotypiques, morphologiques, génétiques et cytogénétiques. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome du manteau (LM) sont tous deux des lymphoproliférations CD19 et CD5 positives qu'il est nécessaire de distinguer car le pronostic et le traitement diffèrent. Les analyses génétiques jouent un rôle majeur notamment par la présence de la translocation t(11 ;14) (q13 ;q32) et le réarrangement IgH/CCND1 permettant d'identifier la plupart des lymphomes du manteau. Malgré cela, certains cas atypiques restent difficilement classifiables. CD200 (OX-2), une glycoprotéine transmembranaire jouant un rôle dans l'immunité anti-tumorale pourrait être un marqueur immunophénotypique permettant de distinguer la LLC dans laquelle elle serait surexprimée, du lymphome du manteau dans lequel elle semble déficiente. D'autres syndromes lymphoprolifératifs (SLP) pourraient également bénéficier de ce marqueur.

Objectifs. Le but de ce travail est de déterminer si l'analyse de l'expression du CD200 permet de distinguer le lymphome du manteau de la LLC mais également sa corrélation avec d'autres SLP.

Méthodes. Analyse de données immunophénotypiques par cytométrie de flux à partir d'une base de données de 68 patients comprenant 44 LLC, 4 lymphomes du manteau, 10 lymphomes folliculaires, 7 lymphomes de la zone marginale, 2 lymphomes lymphoplasmocytaires et une leucémie à tricholeucocytes sur une période allant de novembre 2012 à septembre 2013. L'étude de rapports morphologiques en pathologie, génétique et cytogénétique ainsi qu'une recherche de littérature principalement dans Medline (Pubmed) complète ce travail.

Résultats. Ce travail démontre que la coexpression des marqueurs CD19 et CD5 (généralement observée dans la LLC, d'un peu plus faible intensité dans le lymphome du manteau et de très faible intensité dans d'autres lymphomes) n'est pas suffisante pour les distinguer les uns des autres. La coexpression CD200/CD19 forte dans la LLC la distingue du lymphome du manteau avec l'exception de certains cas atypiques de lymphome du manteau. Le ratio CD19/CD200 / CD19/CD5 distingue tous les LLC des lymphomes du manteau mais pas dans tous les cas d'autres SLP, d'autres marqueurs de surface permettant la distinction (CD19/CD10 dans le cas des lymphomes folliculaires et CD19/IgM de surface exprimée avec une forte intensité pour les lymphomes lymphoplasmocytaires). Enfin, la coexpression CD19/CD23 ne permet pas de distinguer tous les cas de LLC de ceux du lymphome du manteau en raison de cas atypiques de LLC.

Conclusion. Les observations décrites dans ce travail indiquent que l'addition du marqueur CD200 au panel classique des syndromes lymphoprolifératifs comprenant les marqueurs CD19, CD20, CD23, CD43, CD10, CD5, CD103, CD38 et l'IgM de surface, est utile au diagnostic des lymphomes/leucémies de faible degré de malignité. Toutefois cette analyse doit tenir compte également des divers ratios décrits dans ce travail pour en distinguer avec plus d'efficacité les différents sous-types et permettre d'apporter, avec les résultats de la morphologie, de la cytogénétique, des analyses moléculaires, du séquençage et du profil d'expression génique, les éléments essentiels à une approche diagnostique intégrative. Les résultats sont à considérer avec prudence vu le faible échantillon de patients (n=68).

Mots-clés. CD200 – SLP CD19/CD5 positifs - LLC– lymphome du manteau – cytométrie de flux.

Introduction

Parmi les tumeurs des tissus hématopoïétiques, les néoplasies lymphoïdes représentent un large spectre d'entités très variables tant au niveau de la clinique, des caractéristiques génétiques, morphologiques, de l'immunophénotype que du traitement et du pronostic. La classification OMS 2008 a établi des critères de référence pour les différencier en se basant en grande partie sur ces caractéristiques. Ce travail se focalise principalement sur la leucémie lymphocytaire chronique (LLC) et le lymphome du manteau (LM), deux syndromes lymphoprolifératifs (SLP) qui font partie des néoplasies lymphoïdes à lymphocytes B matures (1). Le diagnostic différentiel de ces deux lymphoproliférations CD19 et CD5 positives peut être difficile, notamment lorsque le lymphome du manteau présente une phase leucémique (13-77%) et il est nécessaire de les distinguer car le pronostic et le traitement diffèrent (2,3).

Le lymphome du manteau représente environ 7% à 9% des lymphomes non-Hodgkiniens à lymphocytes B matures en Europe et se présente généralement entre la 5^{ème} et la 6^{ème} décennie. Les cellules tumorales du lymphome du manteau ressemblent aux lymphocytes B de la zone du manteau qui entourent les centres germinaux. Ces derniers peuvent être entourés ou même effacés par la tumeur qui revêt alors une apparence nodulaire. Typiquement, on retrouve une prolifération homogène de petits lymphocytes avec un noyau aux contours irréguliers et occasionnellement clivés. De grandes cellules ressemblant à des centroblastes et des centres de proliférations sont absents permettant la distinction avec respectivement le lymphome folliculaire et la LLC. Dans la plupart des cas, la chromatine est condensée, le nucléole peu visible et le cytoplasme rare. Il existe une variante agressive blastoïde (cellules ressemblant à des lymphoblastes et pouvant faire suspecter un lymphome lymphoblastique) ainsi qu'une variante pléomorphe (4). La plupart des patients (70%) présente un stade avancé lors du diagnostic et débute initialement par une lymphadénopathie dans 75% des cas alors qu'une présentation extra-ganglionnaire se retrouve dans 25% des cas (5) Des symptômes B typiques (fièvre, sudation, perte de poids) sont présents dans plus de 30% des cas et de nombreuses autres localisations sont fréquemment touchées: splénomégalie (45-60%), infiltration de la moelle osseuse (>60%), anneau de Waldeyer, phase leucémique dans le sang périphérique (13-77%), système digestif dans environ 20% souvent sous forme de «polypose lymphomateuse», SNC (<5%, associé à la phase leucémique) (2,6,7).

Les cellules tumorales du lymphome du manteau sont généralement CD19, CD5, CD20, FMC7, CD43 positives et expriment fortement les IgM et IgD de surface (sIgM +/- IgD) et principalement les chaînes légères lambda. Elles sont en revanche CD10, BLC6 et CD23 négatives (4). Certains cas atypiques peuvent être CD23 partiellement positifs (8) ou encore CD5 négatifs (9) pouvant ainsi compliquer le diagnostic différentiel. Un moyen diagnostique important du lymphome du manteau repose sur la détection de la cycline D1. Une translocation spécifique t(11;14)(q13;q32) juxtapose l'oncogène de la cycline D1 (appelée aussi BCL-1, CCND1 ou PRAD-1) sur le chromosome 11 au gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (locus IgH) menant à une surexpression de cycline D1. Cela a pour conséquence une transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S contribuant au développement tumoral (10). Outre la t(11;14), une cycline D1 surexprimée peut aussi être liée à une mutation ponctuelle ou une délétion menant à un ARNm tronqué associé avec une prolifération cellulaire augmentée et à un taux de survie diminué (11). Le lymphome du manteau présente généralement un mauvais pronostic dont la classification dépend principalement du score FLIPI (12) et le traitement varie d'une abstention à une polychimiothérapie.

La leucémie lymphocytaire chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux et est considérée comme une maladie touchant plutôt la personne âgée avec un âge médian de 60 ans lors du diagnostic. Les cellules tumorales de la LLC sont de manière prédominante de petits lymphocytes avec un noyau rond ou légèrement irrégulier, avec une chromatine condensée et peu de cytoplasme qui effacent diffusément les ganglions lymphatiques. Il peut y avoir également de plus grands lymphocytes qui se rassemblent souvent en agrégats appelés « centres de proliférations » qui parlent fortement en faveur d'une LLC. Le sang contient de nombreux petits lymphocytes ronds avec peu de cytoplasme. La moelle osseuse est presque toujours impliquée avec des infiltrats interstitiels ou des agrégats de cellules tumorales. Les patients sont souvent asymptomatiques au diagnostic. Les patients symptomatiques ont souvent une présentation aspécifique. Une lymphadénopathie généralisée et une hépatosplénomégalie sont présentes dans 50-60% des patients symptomatiques (13). Le diagnostic de LLC requiert la présence d'une lymphocytose de >5 G/L de lymphocytes B monoclonaux dans le sang périphérique pour une durée d'au moins 3 mois (14).

Les cellules tumorales de la LLC sont généralement CD19, CD5, CD23 positives, CD20 et CD79b positives mais à un niveau plus faible que les lymphocytes B normaux. Elles expriment la Smlg (surface membrane immunoglobulin) à très faible expression, le plus souvent IgM ou IgM/IgD avec une seule chaîne légère (kappa ou lambda) (13,14).

CD23 est un autre marqueur immunophénotypique identifié comme le récepteur à basse affinité de l'IgE (FCεRII), c'est une glycoprotéine principalement exprimée sur la surface des lymphocytes B. Son rôle dans la biologie de la LLC n'est pas bien défini mais cette dernière l'exprime fortement. C'est également un facteur diagnostique important pour cette maladie. L'absence d'expression de CD23 dans la LLC est rare et évoque plutôt le diagnostic de lymphome du manteau dans lequel il est généralement absent (15,16).

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire présente dans un pourcentage significatif de LLC et qui est corrélée à un mauvais pronostic et une résistance au traitement. Elle est considérée comme un facteur prédictif et pronostic et pourrait devenir un examen de routine dans la LLC (17).

La LLC est caractérisée par diverses anomalies génétiques et cytogénétiques. La délétion del(13q14.3) est la plus fréquente (55%) et est souvent associée à l'inactivation du gène RB. Elle est associée à un pronostic plutôt favorable (18,19). La délétion del(11q) est la seconde mutation la plus fréquente (18%) et contient dans certains cas le gène ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) donnant lieu à une protéine mutée. Del(11q) est associée avec des adénopathies multiples, une maladie progressive et une survie plus courte (18). La mutation del(17p) (7-10%) est associée à un très mauvais pronostic et est corrélée dans la majorité des cas à la mutation de TP53 en raison de la présence de ce dernier sur le chromosome 17. Cette mutation expliquerait en outre jusqu'à 40-50% des LLC réfractaires à la chimiothérapie (20). La trisomie 12 a des conséquences peu claires et controversées, mais est fréquemment présente (18). Le *staging* de la LLC est basé sur deux systèmes, selon Rai et selon Binet. Classification de Rai: composé de IV stades lors du diagnostic: Stade 0 (lymphocytose, 25%), Stade I à II (lymphadénopathie, organomégalie, 50%), stades III à IV (anémie, thrombopénie) et classés en trois groupes: bas risque (stade 0), risque intermédiaire (stade I et II), haut risque (stade III et IV).

Stades selon Binet: Prend en compte 5 sites potentiels (cervical, axillaire, ganglions lymphatiques inguinaux, rate, foie) en fonction du nombre de sites impliqués et de la présence d'anémie (Hb <10g/dl) et/ou thrombopénie (plaquettes <100 G/L): Stade A (<3 sites lymphoïdes touchés), stade B (3 ou plus), stade C (anémie +/- thrombopénie). Le traitement de la LLC est l'abstention le plus longtemps possible si asymptomatique. Le cas contraire de nombreux schémas de chimiothérapie peuvent être utilisés (21).

CD200

Ce travail s'intéresse à l'identification récente d'un marqueur immunophénotypique, le CD200, qui pourrait avoir une utilité diagnostique pour exclure le lymphome du manteau (dans lequel il ne serait que peu ou pas exprimé) par rapport à la LLC (dans laquelle il serait exprimé avec une intensité de fluorescence modérée à élevée). La littérature actuelle semble aller dans le sens de cette hypothèse (3,22–24). CD200 (OX-2) est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines et encodée par le gène CD200 sur le chromosome 3q13.2 (22). Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires incluant les lymphocytes B, certains sous-groupes de lymphocytes T, les thymocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et le système nerveux central et périphérique. Son récepteur, CD200R est quant à lui exprimé sur la lignée cellulaire myéloïde/monocytaire et certains lymphocytes T (22,24,25).

Rôle de CD200. Son interaction avec son récepteur semble jouer un rôle dans la régulation de l'activité anti-tumorale en générant un signal immunosuppresseur de la réponse immune médiée par les lymphocytes T (22,24,26). De plus, il mène à une inhibition des macrophages, l'induction de lymphocytes T régulateurs, avec un switch du profil de cytokines de Th1 à Th2. Sa surexpression est associée avec un mauvais pronostic dans le myélome multiple (MM) et la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et est observée dans de nombreux autres cancers de manière significative (27). Bien que cela reste à confirmer par le biais d'autres études, CD200 pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour de nombreuses néoplasies (25,27,28). ADAM (une disintégrine et métalloprotéase de la famille des protéases transmembranaires) est impliquée dans l'adhésion, la signalisation cellulaire, la migration, la dégradation de matrice extracellulaire et l'excrétion d'ectodomaine protéolytique. ADAM28 (particulièrement sa forme membranaire ADAM28-m comparée à sa forme soluble ADAM28-s) pourrait augmenter la production de sCD200 (la forme soluble de CD200 qui est corrélée à un mauvais pronostic dans la LLC). sCD200 peut être mesuré dans la LLC et pourrait également être une cible thérapeutique (29).

Expression de CD200 dans les néoplasies lymphoïdes B. La cytométrie de flux (CF) a un rôle important dans le diagnostic différentiel des néoplasies lymphoïdes à lymphocytes B notamment en comparant l'intensité de CD200 entre ces différents syndromes lymphoprolifératifs (22,23,30). Plusieurs études montrent que l'expression de CD200 dans la LLC est modérément à fortement intense dans les cas typiques et peu ou pas présente dans les cas de lymphome du manteau typiques (3,22,23). Il existe cependant des variantes atypiques de LLC dans la littérature avec une expression faiblement positive de CD200, notamment en cas de Trisomie 12 concomitantes (22), d'expression de CD23 faiblement ou non-positive (23). Des cas atypiques de lymphome du manteau avec une expression modérée à forte de CD200 ont été décrits, notamment les cas de lymphomes du manteau présentant une expression inhabituellement positive de CD23 (22). Une étude immunohistochimique de l'expression de CD200 n'a révélé que des LLC CD200 positives et des lymphomes du manteau uniquement négatifs (24). Certaines de ces études ont également déterminé l'expression de CD200 dans d'autres syndromes lymphoprolifératifs. Il en ressort entre autres une expression fortement positive dans la leucémie à tricholeucocytes (« hairy cell leukemia ») (31), négativement à modérément positive dans le lymphome folliculaire (LF), variable dans le lymphome de la zone marginale (LZM) mais avec une différence significative par rapport à la LLC et plutôt faible à modérée dans le lymphome lymphoplasmocytaire (LLP) (22–24). L'expression différente de CD200 entre la LLC et le lymphome du manteau pourrait être en partie expliquée par des différences d'activation des voies d'AKT et de MEK/ERK, l'expression de l'ARNm de CD200 corrélant avec l'activation d'ERK dans la LLC (32,33).

Méthodologie

Littérature. Une recherche systématique de la littérature dans les bases de données scientifiques, principalement Medline (Pubmed), UpToDate et dans le Robbins and Cotran « Pathologic Basis of Disease » a été effectuée dans un premier temps.

Patients. Nous avons analysé les données de 68 patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs de faible degré de malignité, principalement des leucémies lymphoïdes chroniques (44), des lymphomes du manteau (4), des lymphomes folliculaires (10), des lymphomes de la zone marginale (7), des lymphomes lymphoplasmocytaires (2) et une leucémie à tricholeucocytes. Ces patients font parties d'une base de données du laboratoire central d'hématologie du CHUV obtenue par cytométrie de flux. La récolte de donnée s'est effectuée sur une période allant de novembre 2012 à septembre 2013. Cela compose le seul critère d'inclusion de ce travail. Il n'y a pas de critères d'exclusion particuliers. L'échantillon de patients comprend 40 hommes pour 28 femmes et l'âge varie de 32 à 93 ans.

Analyses immunophénotypiques. La récolte des données immunophénotypiques a été effectuée par cytométrie de flux multiparamétrique, une technique permettant de mesurer des marqueurs immunophénotypiques à partir d'échantillons de sang, moelle osseuse, LCR, LBA, ascite ou fragment de rate ou de ganglions. Après un isolement cellulaire par la technique de Ficoll ou par lyse cellulaire à l' NH_4Cl , le marquage direct par une réaction anticorps-antigène à partir de divers anticorps de contrôle (fluorochromes) avec des anticorps reconnaissant CD19, CD5, CD23 et CD200 entre autres et d'autres marqueurs de surfaces a été effectué. Les lymphocytes ont été ensuite ciblés par un *gating* en fonction de la taille et de la granularité. L'analyse d'histogrammes principalement biparamétriques a permis de définir la coexpression et l'expression à partir de la MFI (*Mean Fluorescence intensity*) des divers marqueurs immunophénotypiques nécessaires à ce travail dont CD200.

Analyses cytogénétiques. L'analyse des données cytogénétiques provient d'analyses cytogénétiques par techniques de caryotypes, FISH et puces à ADN dont la récolte provient de la base de données du laboratoire de cytogénétique du cancer du CHUV à Lausanne.

Analyses pathologiques . Les données pathologiques des patients se fondent sur l'analyse d'archives de rapports de pathologie via les logiciels Soarian et Archimède utilisés au CHUV, Lausanne pour les patients dont les rapports ont été demandés à l'institut universitaire de pathologie du CHUV. Pour les cas externes dont les analyses ont été demandées à d'autres instituts de pathologie en Suisse, les rapports nous ont été fournis par l'institut universitaire de pathologie (IUP) du CHUV.

Statistique. Le logiciel «GraphPad Prism6» a été utilisé pour l'analyse statistique et un $p \leq 0.05$ a été considéré comme significatif pour toutes les analyses statistiques suivantes.

L'analyse non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisée pour comparer les 6 groupes de lymphomes/leucémies au niveau statistique et rejeter l'idée que la différence soit due à un échantillonnage aléatoire. «Le Dunn's multiple comparisons test» a été utilisé comme analyse post-test pour comparer tous les types de lymphomes et leucémies. L'analyse de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer le ratio CD19/CD200 / CD19/CD5 entre la leucémie lymphocytaire chronique et le lymphome du manteau.

Résultats

Coexpression de CD19 et CD5 par les cellules lymphomateuses CD19+

Les lymphomes et leucémies de faible degré de malignité étudiés dans ce travail sont caractérisés par une forte coexpression des marqueurs CD19 et CD5 observée constamment dans la LLC, généralement d'intensité un peu plus faible dans le lymphome du manteau, généralement de très faible intensité dans d'autres lymphomes de faible degré de malignité et dans le cas unique de HCL (figure 1). Cependant, comme indiqué par la figure 1, la coexpression des marqueurs CD19 et CD5 n'est pas suffisante pour distinguer tous les lymphomes de faible degré de malignité les uns des autres. Pour mieux les distinguer, nous avons étudié dans ce travail la coexpression du marqueur CD200 par ces différents SLP. L'expression de ce marqueur étant supposée être négative dans le lymphome du manteau.

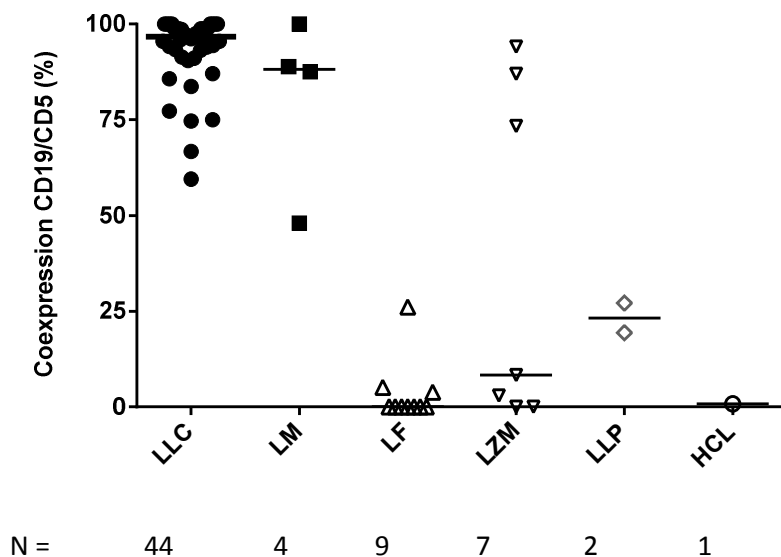
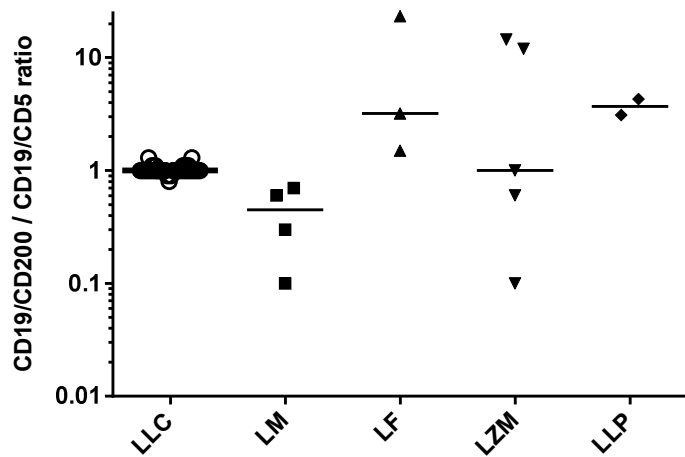


Figure 1. Analyse statistique: test de Kruskal-Wallis $P < 0.0001$; Dunn 's multiple comparisons test $P < 0.0001$ pour la comparaison LLC vs LF : LLC vs LZM , $P < 0.01$; LLC vs LM : NS ; LM vs LF, $P < 0.001$; LM vs. LZM or LLP: $P < 0.001$

Coexpression de CD19 et CD200 par les cellules lymphomateuses CD19+.

Le lymphome du manteau se distingue de la LLC par une coexpression faible des marqueurs CD19 et CD200. Il existe cependant un *overlap* entre le LM et les autres lymphomes qui coexpriment faiblement CD19 et CD200 et ne se distinguent pas de certains cas de LM (figure 2).

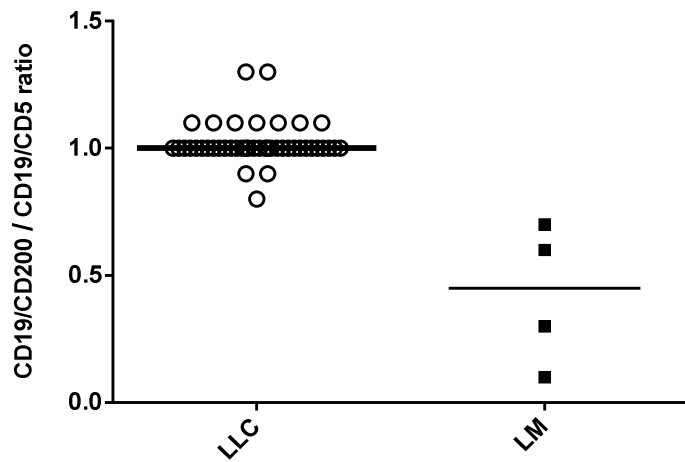
A)



N = 44 4 9 7 2

Figure 3 A. Analyse statistique: test de Kruskal-Wallis $P < 0.0001$; Dunn's multiple comparisons test $P < 0.01$ pour la comparaison LLC vs.LF, $P < 0.05$; LLC vs LZM, NS ; LLC vs LLP: NS.

B)



N = 44

N = 4

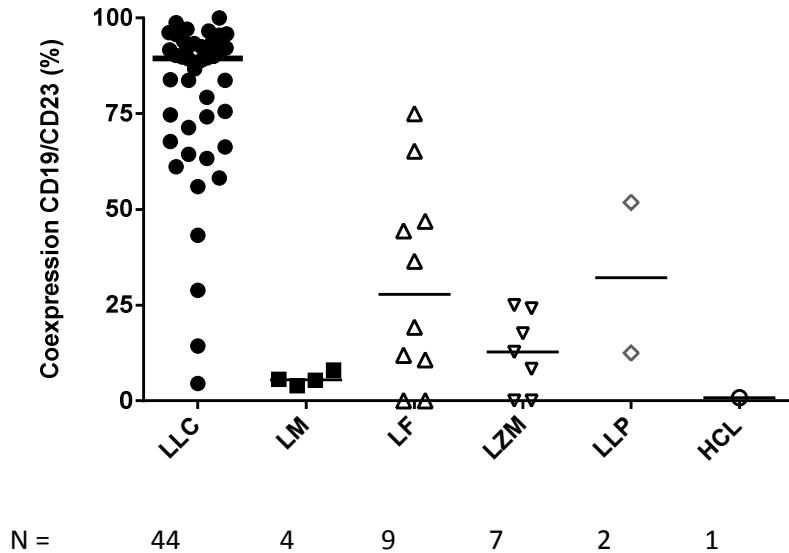
Figure 3 B. Le ratio CD19/CD200 / CD19/CD5 distingue clairement les LLC des lymphomes du manteau. Analyse statistique: test de Mann-Whitney, $P < 0.0001$ pour la comparaison LLC vs.LM,

La coexpression des marqueurs CD19 et CD23 ne permet pas de distinguer tous les cas de LLC de ceux du lymphome du manteau.

En effet, l'absence de coexpression du marqueur CD23 avec le CD19 est souvent utilisée pour distinguer le lymphome du manteau de la LLC généralement positive pour ces 2 marqueurs. Toutefois certains cas de LLC sont atypiques et n'expriment pas le CD23. Cette molécule peut également être

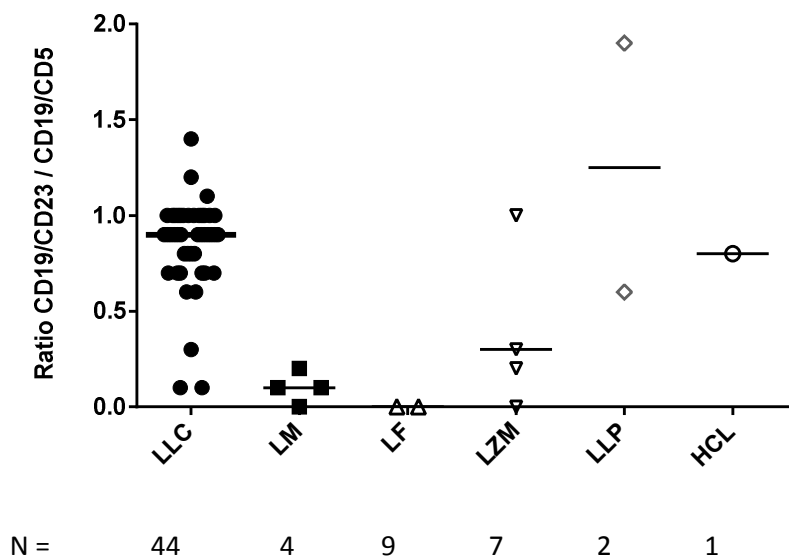
clivée de la surface cellulaire si l'analyse est effectuée tardivement après le prélèvement, résultant en une analyse faussement négative.

A)



La **figure 4A**, ci-dessus, montre une expression très variable du marqueur CD23 par les divers lymphomes et leucémies examinés, avec cependant une coexpression forte CD19/CD23 par la majorité des LLC analysées. A noter cependant une expression faible, voire négative, du CD23 dans 2 cas de LLC atypique. Tous les lymphomes du manteau sont négatifs pour la coexpression CD19/CD23. La coexpression de ces 2 marqueurs dans les autres lymphomes de faible degré de malignité et la HCL est variable, en moyenne inférieure à celle observée dans la LLC.

L'étude de la distribution du ratio CD19/CD23 / CD19/CD5 (figure 4B) permet clairement de distinguer la majorité des cas de LLC des lymphomes folliculaires. Cependant 3 cas de LLC ont un rapport du même ordre de grandeur que celui observé dans les 4 cas de lymphome du manteau, suggérant que le ratio CD19/CD200 / CD19/CD5 peut être plus performant pour distinguer ces 2 pathologies.



Les lymphomes folliculaires se distinguent clairement des autres lymphomes de faible degré de malignité s'ils coexpriment les marqueurs CD19 et CD10.

Les lymphomes folliculaires analysés dans ce travail sont tous caractérisés par une coexpression des marqueurs CD19 et CD10. Cette coexpression n'est pas observée de manière significative par les autres lymphomes et leucémies étudiés ici.

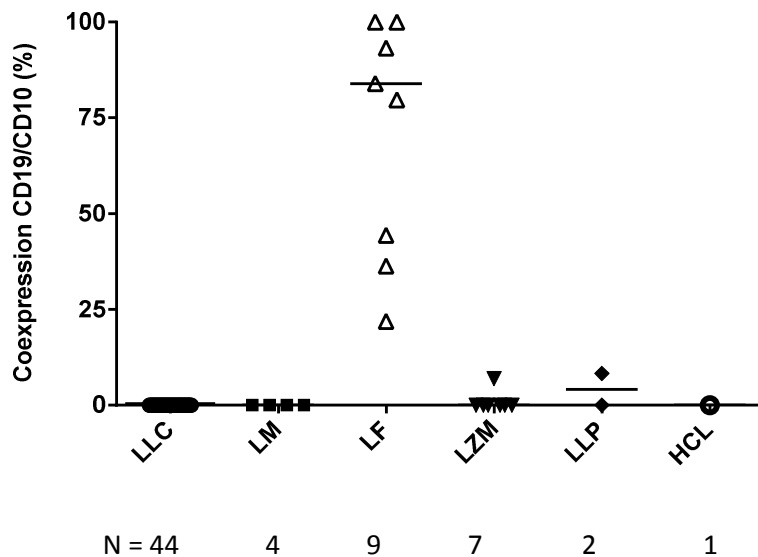


Figure 4. Coexpression des marqueurs CD19 et CD10 par les lymphomes folliculaires

Statistique: Kruskal-Wallis test $P < 0.0001$; Dunn's multiple comparison test, $P < 0.0001$ pour la comparaison LF vs.LLC, LM, LZM

Les lymphomes lymphoplasmocytaires se distinguent des autres lymphomes de faible degré de malignité par la coexpression du CD19 et de l'IgM de surface qui est exprimée avec une forte intensité de fluorescence.

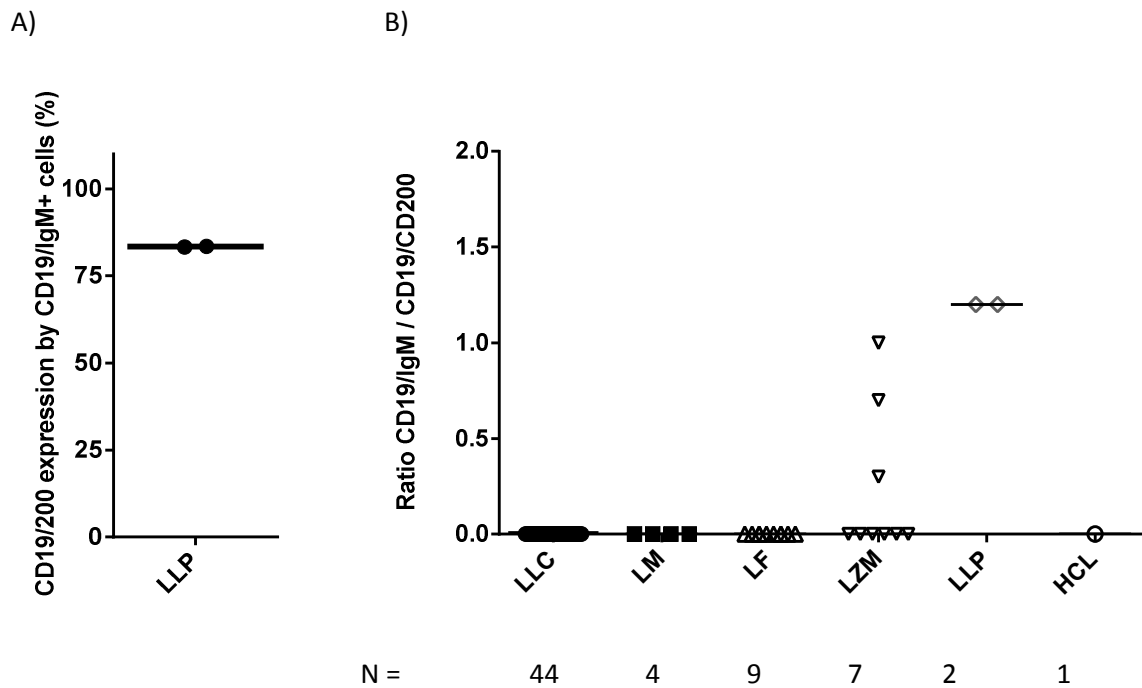


Figure 5. Les lymphomes lymphoplasmocytaires expriment fortement à leur surface de l'IgM. Cette caractéristique permet de les distinguer de la plupart des autres lymphomes de faible degré de malignité, mis à part quelques cas de lymphome de la zone marginale qui expriment également de l'IgM, mais avec une beaucoup plus faible intensité de fluorescence.

Figure 5B. Analyse statistique: test de Kruskal-Wallis $P < 0.0001$; Dunn's multiple comparison test, $P < 0.001$ pour la comparaison LLP vs. LLC, LM, LF et $P < 0.05$ pour LLP vs. LZM.

Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié l'expression du marqueur CD200 dans divers lymphomes et leucémies de faible degré de malignité. Nos résultats sur 68 cas analysés par cytométrie de flux permettent de mieux définir l'utilité de ce marqueur dans le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs par cytométrie de flux multiparamétrique.

Nous avons observé une expression de très faible intensité du marqueur CD200 dans les lymphomes du manteau comme l'avaient rapporté des observations publiées précédemment. Toutefois, il est parfois difficile de distinguer certains cas de lymphome du manteau atypiques, exprimant partiellement CD200, de LLC atypiques exprimant faiblement ce marqueur. L'analyse multiple paramétrique, en tenant compte des coexpression des marqueurs CD19, CD5, CD23 et CD200 et l'analyse du ratio de ces différents marqueurs, permet d'améliorer la distinction entre les différents sous-groupes de syndrome lymphoprolifératif coexprimant CD19 et CD5, comme l'indiquent les analyses illustrées par les figures 3 à 5. Les analyses complémentaires génétiques avec l'identification de la translocation t(11 ; 14) et du réarrangement IgH-CCND1 permettent de clarifier le diagnostic dans les cas atypiques. Ces analyses sont nécessaires à la distinction d'une LLC atypiques avec un lymphome de la zone marginale ou un lymphome du manteau atypique. À noter cependant que les analyses génétiques n'ont pas non plus une spécificité et une sensibilité de 100 %. Comme les marqueurs de cytométrie de flux, les analyses moléculaires et cytogénétiques sont des compléments indispensables à l'examen morphologique pour identifier les divers syndromes lymphoprolifératifs et peut-être dans le futur définir de nouveaux sous-types de lymphomes.

Parmi les lymphomes dont l'identification est parfois difficile, les lymphomes de la zone marginale ont une expression variable du CD200. Les ratios CD19/CD200 / CD19/CD5 et CD19/CD23 / CD19/CD5, de même que l'intensité de l'expression de l'IgM de surface permettent la plupart du temps de les distinguer de la LLC, du lymphome du manteau et des lymphomes lymphoplasmocytaires.

La coexpression du marqueur CD10 et du CD19 ainsi que le ratio de l'expression de ces 2 marqueurs avec celle du CD19 et du CD5 permettent généralement de distinguer les lymphomes folliculaires de la LLC ou des autres lymphomes de faible degré de malignité. Cependant, en cas de négativité du CD10, les analyses génétiques et moléculaires sont nécessaires pour clarifier le diagnostic.

En conclusion, les observations décrites dans ce travail indiquent que l'addition du marqueur CD200 au panel classique des syndromes lymphoprolifératifs comprenant les marqueurs CD19, CD20, CD23, CD43, CD10, CD5, CD103, CD38 et l'IgM de surface, est utile au diagnostic des lymphomes et des leucémies de faible degré de malignité. Toutefois cette analyse doit tenir compte également des divers ratios décrits dans ce travail pour distinguer avec plus d'efficacité les différents sous-types de lymphomes et permettre d'apporter, avec les résultats de la morphologie, de la cytogénétique, des analyses moléculaires, du séquençage et du profil d'expression génique, les éléments essentiels à une approche diagnostique intégrative.

Bibliographie

1. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Eds), IARC Press, Lyon 2008.
2. Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Beà S, et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 15 juin 2007;109(12):2473-80.
3. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. sept 2009;33(9):1212-6.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, International Edition, Saunders Elsevier, 8th ed. 2009:612-613.
5. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 80 Cases. *Blood*. 15 mars 1997;89(6):2067-78.
6. Chim CS, Hu WHC, Loong F, Ooi GC, Liang R. GI manifestations of mantle cell lymphoma. *Gastrointest Endosc*. déc 2003;58(6):931-3.
7. Cheah CY, George A, Giné E, Chiappella A, Kluijn-Nelemans HC, Jurczak W, et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol*. 8 janv 2013;24(8):2119-23.
8. Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 Expression in Mantle Cell Lymphoma: Clinicopathologic Features of 18 Cases. *Am J Clin Pathol*. 11 janv 2003;120(5):760-6.
9. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, Tsang P, Cohen P, Stephenson CF, et al. CD5- Mantle Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 8 janv 2002;118(2):216-24.
10. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Dignonnet I, Rouault JP, Tigaud JD, et al. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*. 1 avr 1994;83(7):1871-5.
11. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 1 juin 2007;109(11):4599-606.
12. Møller M.B. and coll. : Mantle Cell lymphoma : prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Br J Haematol* 2006; 133 : 43-49.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, International Edition, Saunders Elsevier, 8th ed, 2009: 603-605.
14. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 15 juin 2008;111(12):5446-56.
15. DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer*. 15 mars 2002;94(6):1721-30.
16. Fournier S, Delespesse G, Rubio M, Biron G, Sarfati M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. avr 1992;89(4):1312-21.

17. Ibrahim S, Keating M, Do K-A, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 juill 2001;98(1):181-6.
18. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910.
19. Corcoran MM, Rasool O, Liu Y, Iyengar A, Grander D, Ibbotson RE, et al. Detailed Molecular Delineation of 13q14.3 Loss in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 15 févr 1998;91(4):1382-90.
20. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 10 oct 2010;28(29):4473-9.
21. Samuel Blaser, Jérôme Stirnemann, Monika Nagy. Leucémie lymphoïde chronique : quand débiter le traitement ? *Rev Med Suisse* 2013;1870-1874
22. Challagundla P, Medeiros LJ, Kanagal-Shamanna R, Miranda RN, Jorgensen JL. Differential Expression of CD200 in B-Cell Neoplasms by Flow Cytometry Can Assist in Diagnosis, Subclassification, and Bone Marrow Staging. *Am J Clin Pathol*. 12 janv 2014;142(6):837-44.
23. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 1 mars 2014;86(2):98-105.
24. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 Membrane Glycoprotein) Expression in B Cell-Derived Neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 11 janv 2010;134(5):726-33.
25. Wong KK, Khatri I, Shaha S, Spaner DE, Gorczynski RM. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J Leukoc Biol*. 8 janv 2010;88(2):361-72.
26. Liao K-L, Bai X-F, Friedman A. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J Theor Biol*. 7 juill 2013;328:65-76.
27. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 févr 2008;366(1):117-22.
28. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, et al. CD200 Expression on Tumor Cells Suppresses Antitumor Immunity: New Approaches to Cancer Immunotherapy. *J Immunol*. 5 janv 2007;178(9):5595-605.
29. Twito T, Chen Z, Khatri I, Wong K, Spaner D, Gorczynski R. Ectodomain shedding of CD200 from the B-CLL cell surface is regulated by ADAM28 expression. *Leuk Res*. juill 2013;37(7):816-21.
30. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 15 avr 2008;111(8):3941-67.
31. Brunetti L, Di Noto R, Abate G, Gorrese M, Gravetti A, Raia M, et al. CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells. *Br J Haematol*. 1 juin 2009;145(5):665-7.
32. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 15 janv 2008;111(2):846-55.
33. Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, Wendtner C-M. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk Res*. mars 2009;33(3):460-4.

Annexes

Table 1. Lymphome du manteau

Patient	Diagnostic sur demande d'analyse	19/23 %	19/10%	19/38%	19/5 %	CD19	19/200 %	CD200 %	Cytométrie de flux	Pathologie	Cytogénétique
1)	LM (système digestif)	2	0	24	12	25	4	5	LM B lamda	LM Cycline D1 nég	Réarrangement IgH-CCND1 (2,0 %) t(11;14)(q13.3;q32.3)
2)	LM	1		16	16	18	2	6	LM B kappa	LM Cycline D1 +	Réarrangement IgH-CCND1 (2,0 %) t(11;14)(q13.3;q32.3)
3)	LM	3		6	49	56	36	41	LM B Lambda	LM	Réarrangement IgH-CCND1 t(11;14)(q13.3;q32.3)
4)	LM	3		1	77	77	49	49	LM B lambda	-	Réarrangement IgH-CCND1 (54,0 %) + del(13)(q14.3), del(17)(p13.1) (54,4 %)/del(17)(p13.1) (11,5 %)

Table 2. LF

Patient	Diagnostic sur demande d'analyse	19/23 %	19/10%	19/38%	19/5 %	CD19	19/200 %	CD200 %	Cytométrie de flux	Pathologie	Cytogénétique
1)	Lymphome folliculaire	14	68	73	0	73	43	30	LF	-	-
2)	Lymphome folliculaire	8	8	18	0	18	12	11	LF	LF	-
3)	Lymphome folliculaire	7	47	54	0	59	30	37	LF	LF	-
4)	Lymphome folliculaire	30	14	39	0	64	38	53	LF	LF	-
5)	Lymphome folliculaire	6	8	5	0	8	4	54	LF	LF	-
6)	lymphome folliculaire	4	4	9	0	11	9	18	LF	LF	-
7)	lymphome folliculaire	6	47	52	0	56	41	61	LF	LF	-
8)	lymphome folliculaire	15		8	6	23	19	25	LF	LF	Bcl2-JH; t(14;18) positif
9)	lymphome folliculaire	0	78	85	4	78	6	9	LF	-	-
10)	lymphome folliculaire	0	84	84	3	79	70	70	SLP B Lambda	-	Trisomie 12

Table 3. LLC

Patient	Diagnostic sur demande d'analyse	19/23 %	19/10%	19/38%	19/5 %	CD19	19/200 %	CD200 %	Cytométrie de flux	Pathologie	Cytogénétique
1	LLC	64	0	4	64	67	65	66	LLC	LLC (lambda)	del(13q) (gènes MIR15A, MIR16, DLEU1/DLEU2, RB1 (délétion de type II).
2	LLC	83	0	90	92	92	92	93	LLC (CD38+)	LLC	del(17p) (TP53-) + complexité génomique
3	LLC	56	0	12	86	87	85	86	LLC	LLC	t(11;14) négatif + monosomie 11q23.3
4	LLC (récidive)	73	0	12	89	92	91	91	LLC bas grade (CD38 12%)	-	Trisomie 12 + del(13q)
5	LLC	41	0	2	41	49	41	38	LLC	-	-
6	LLC	63	0	54	93	93	93	94	LLC (CD38+)	-	-
7	LLC	37	0	31	40	40	39	39	LLC (CD38+)	LLC	Trisomie 12 (4,0%); der(18)t(5;18)(p15.3;p11.3) (100,0%); trisomie 5p15.2 (93,0%); monosomie 18p11.3 (100,0%)
8	LLC?	73	0	11	73	73	73	73	LLC (lambda 1/-, CD23, 43+)	-	-
9	LLC	78	0	60	83	83	83	83	LLC kappa CD38+	-	-
10	LLC	71	0	39	74	77	75	76	LLC kappa CD38+	-	-
11	LLC?	75	0	0	82	84	84	83	LLC kappa bas grade	-	-
12	LLC?	72	0	0	80	78	76	76	LLC lambda bas grade	-	-
13	LLC	46	0	77	76	79	70	70	LLC kappa (CD23 partiel, CD38+)	LLC vs LZM	Trisomie 12
14	LLC	84	0	27	86	87	84	85	LLC lambda partiel (évolution?) (CD38 partiel)	-	-
15	LLC	12	0	2	83	84	84	84	LLC (CD23 très faible, CD200 2e log)	LLC (cycline D1 -)	absence de réarrangement IgH-CCND1
16	LLC	66	0	0	64	68	64	67	LLC lambda CD38-	-	-
17	LLC	57	0	54	85	86	86	88	LLC kappa faible intensité (CD23 partiel)	LLC (CD23 partiel)	del(11q22.3 comprenant gène ATM) + complexité génomique
18	LLC	74	0	3	78	79	78	79	LLC lambda haute intensité	-	-
19	LLC	66	0	2	67	69	69	70	LLC kappa bas grade	-	-
20	LLC	50	0	10	72	79	64	78	LLA kappa faible intensité (CD23+/-, CD19 2e log, CD200 2e log, CD79b -)	LLC (CD23+)	Réarrangement IgH-CCND1 (83,0%) = 15-20% néoplasies plasmocytaires surajoutée diag en 2012, LLC diag en 2013
21	LLC (+ gammopathie monoclonale?)	14	0	25	25	25	25	25	LLC (CD23 partiel, CD38-, CD200 3e log, kappa 3e log fort)	LLC	absence de réarrangement IgH-CCND1
22	LLC	75	0	13	78	78	78	81	LLC lambda faible intensité	-	-
23	LLC	74	0	2	74	99	61	85	Infiltration massive LLC connue (CD200 2e log, CD19 faible 2e log)	LLC	del(13q14) comprenant gènes: MIR-16 et MIR-15a (délétion de type I)
24	LLC	71	0	0	76	77	76	76	LLC lambda	-	del(13q14) gènes MIR15A, MIR16, DLEU1 et DLEU2 (délétion de type I)
25	LLC (rémission)	5	0	6	6	7	6	7	LLC B Lambda	-	absence de trisomie 12, del(11)(q22.3), del(13)(q14.3) et del(17)(p13.1)
26	LLC	64	0	15	61	70	70	70	LLC kappa	-	Caryotype féminin normal
27	LLC	21	0	63	72	73	73	75	LLC (CD23+/-, CD43-) ou LM atypique	-	trisomie du chromosome X (Xpter-Xqter) + - trisomie du chromosome 12 (12pter-12qter) et absence de réarrangement IgH-CCND1
28	SL/LLC	60	0	61	63	67	62	62	LLC lambda intensité moy (CD43-) vs autre SLP	SL à petites cellules B	trisomie 18q21.3 (sondes IgH/BCL2) (8.5%) et (sondes 3'/5'BCL2) (6.0%) LF?
29	LLC	58	0	40	86	95	95	98	LLC lambda bas grade (CD38+, CD23 faible, CD200 2e-3e log)	-	-
30	LLC kappa	52	0	3	58	60	60	62	LLC kappa bas grade	-	-
31	LLC?	11	0	0	9	12	12	14	LLC (4.5% cellules)	-	Caryotype normal
32	LLC	72	0	0	80	80	78	82	LLC kappa	-	délétion 13q14.3 (type I) + trisomie du chromosome 12 (12pter-12qter) + de bras court du chromosome 17 entre pter et p112 et bras court du chromosome 8 entre les bandes 18pter et 8p11.2
33	LLC connue	73	0	15	81	87	87	89	LLC connu	LLC connue	-
34	LLC	16	0	2	22	37	25	29	LLC lambda	-	Caryotype anormal (47,X,-Y,+3,+12[3]/46,XY[37])
35	LLC	2	0	8	34	44	39	42	(LM kappa vs) LLC atypique (CD23-, CD43-, CD200 2e log, CD38-, CD79b +)	SL/LLC (LM exclu) + SMD	Monosomie 5q31.2/5q33.1 (62,5%) + monosomie 17p13.1 (50,3%) + absence de réarrangement IgH-CCND1 / de d'aneuploïdie 7, 7q31.2 et 8
36	LLC	72	0	0	84	86	86	87	LLC kappa	SL/LLC kappa	Aucune abberation
37	LLC	62	0	15	81	82	82	83	LLC lambda	Pas d'arguments	Aucune abberation spécifique à la LLC (réarrangement IgH@ et 46,XX,inv(14)(q11.2q32)[19]/46,XX[1])
38	LLC	82	0	0	79	81	79	83	LLC kappa	LLC	-
39	LLC atypique CD43-	23	0	0	16	24	21	80	LLC kappa "atypique" (CD23+, CD43-, CD79b +, kappa fort int 3e log, 19/5 +/-, CD200 2e log)	-	Absence de réarrangement IgH-CCND1 et aucune aberration commune à la LLC
40	LLC	88	0	0	94	98	94	98	LLC kappa	-	-
41	LLC	56	0	0	56	60	60	64	LLC lambda (intensité moyenne)	-	-
42	LLC	48	0	14	51	54	49	49	LLC kappa (intensité moyenne)	-	-
43	LLC	49	0	0	63	66	64	66	LLC lambda (intensité moyenne)	-	-
44	LLC	80	0	0	74	81	81	82	LLC kappa	-	del(13q14) comprenant les gènes MIR15A, MIR16, DLEU1 et DLEU2 (type I) + del(2q12.3-q13)

Table 4. LZM

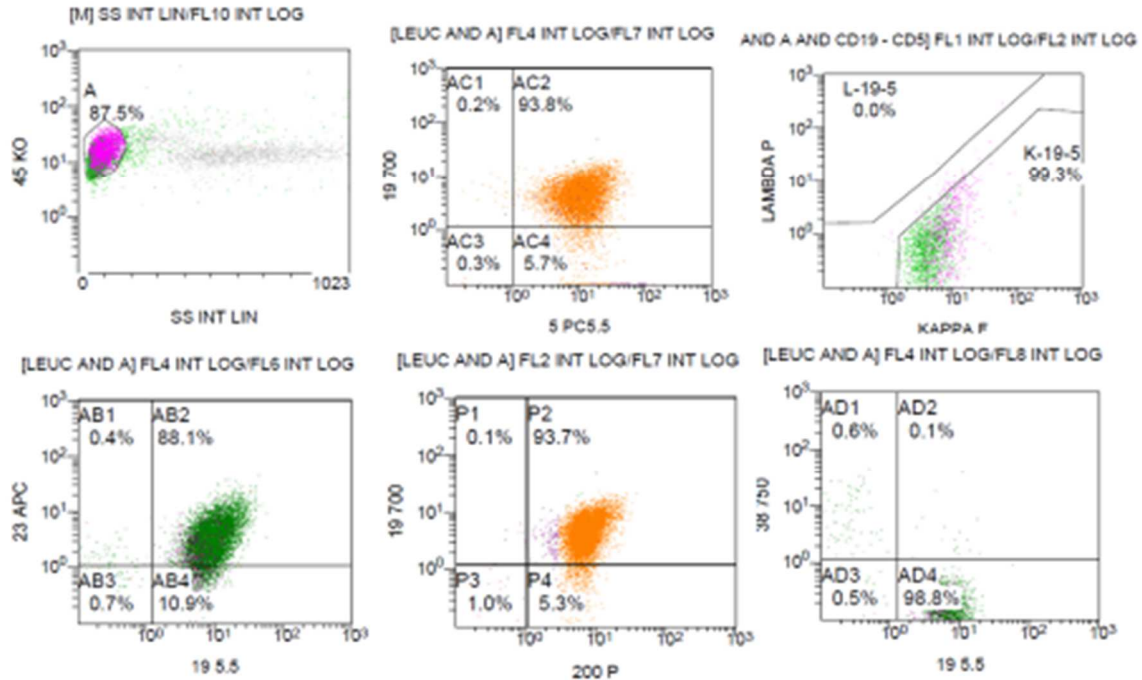
Patient	Diagnostic sur demande d'analyse	19/23 %	19/10%	19/38%	19/5 %	19/IgM	CD19	19/200 %	CD200 %	Cytométrie de flux	Pathologie	Cytogénétique
1)	Lymphome marginal	2	0	2	2	24	24	24	25	LZM	Kappa, 19/5 très faible int partiel ess. Neg (24%- , 2%+), 23-, 43-, 19/200 + 2e log, 38-	-
2)	Lymphome marginal?	3	0	14	16	6	17	9	18	LZM	LM exclu	Aucune abberation (réarrangement IgH-CCND1
3)	Lymphome de la zone marginale VS lymphome lymphoplasmocytaire?	17	7	3	2		68	29	34	LZM vs LLP	-	
4)	Lymphome ZM > LLC atypique > LM	0	0	1	47		54	49	50	Lymphome ZM > LLC atypique > LM	-	
5)	Lymphome de la zone marginale	19	0	0	58	37	79	3	9	LZM		Caryotype normal
6)	Lymphome B de la zone marginale	0	0	0			22	15	15	SLP low grade	LZM avec colonisation folliculaire	
7)	LZM	10	0	7	0	23	79	69	73	LZM vs autre SLP low grade	Myélome à plasmocytes	Absence de réarrangement IgH et d'aneuploïdie 1q21.3, 13q14.3 et 17p13

Table 5. LLP

Patient	Diagnostic sur demande d'analyse	19/23 %	19/10%	19/38%	19/5 %	19/sIgM	CD19	19/200 %	CD200 %	Cytométrie de flux	Pathologie	Cytogénétique
1)	LLP	9	6	23	14	72	72	60	66	LLP	LL CD5-	
2)	LLP	44	0	0	23	85	85	71	70	LLP	LLP	Absence d'aneuploïdie 1q21.3. 13q14.3 et 17p13.1 ni réarrangement IgH avec probable réarrangement VDJ télomérique

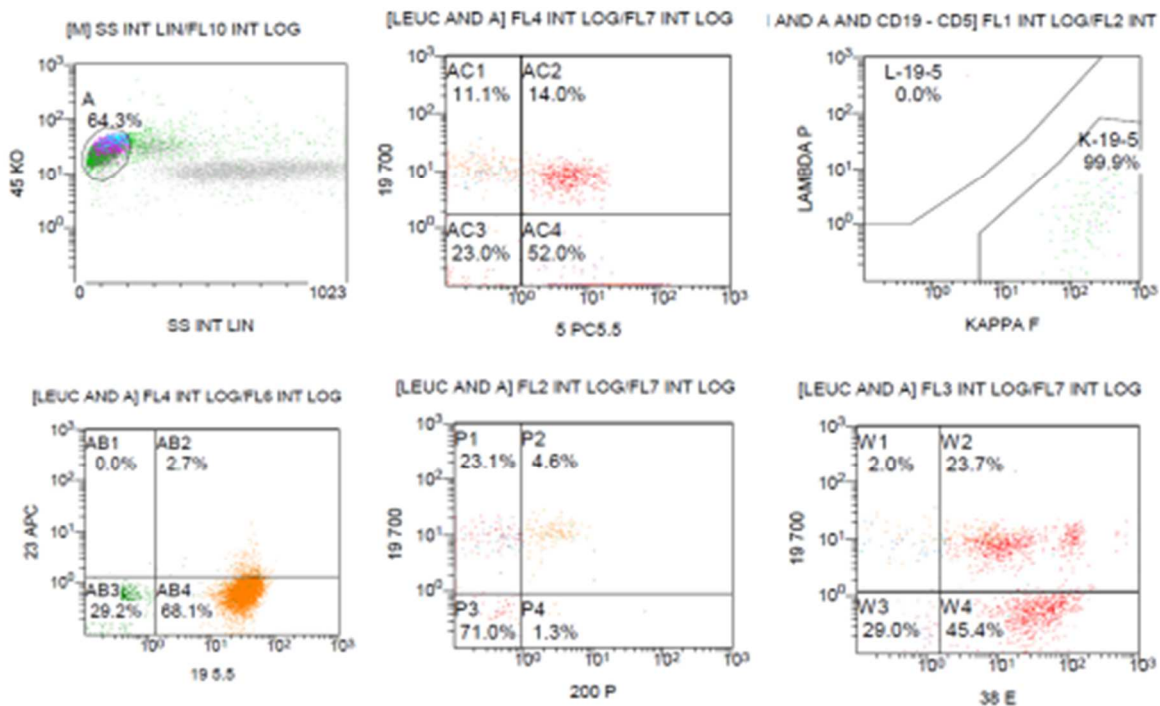
Analyse cytométrie de flux. Quelques exemples

LLC



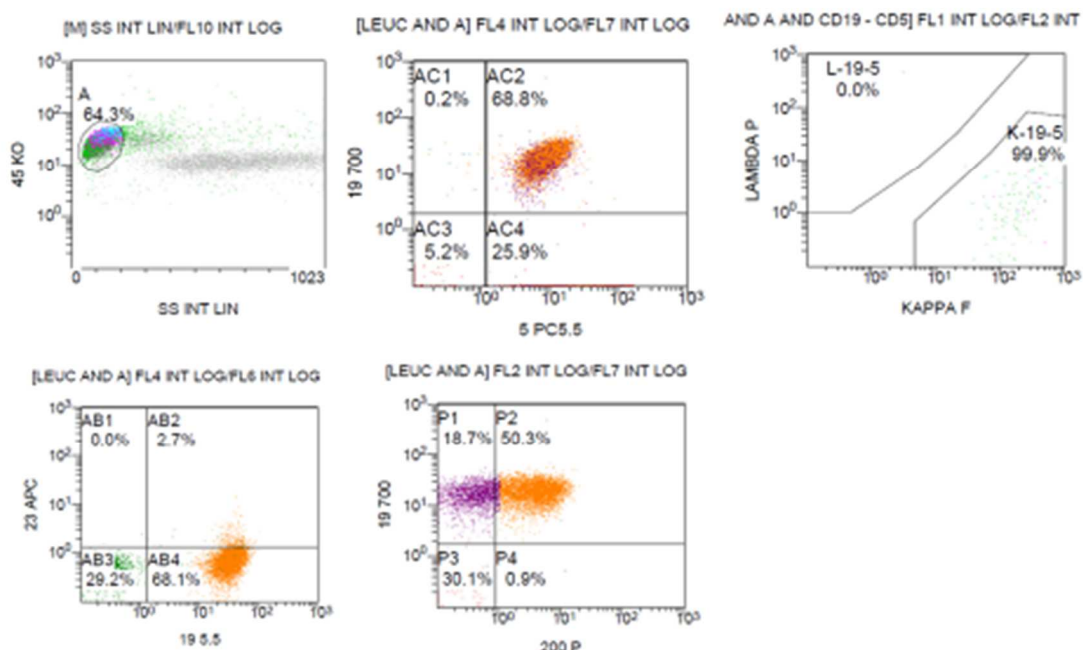
Cas #40, table LLC

LM



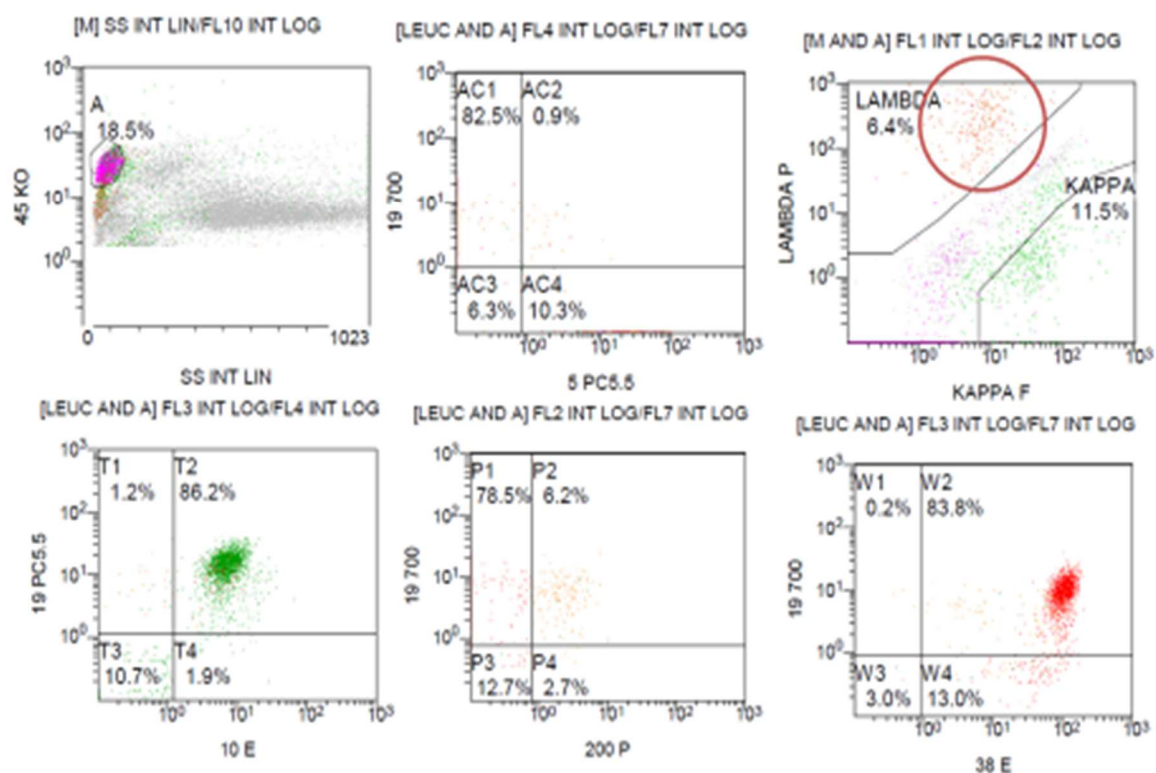
Cas #1, table LM

LM



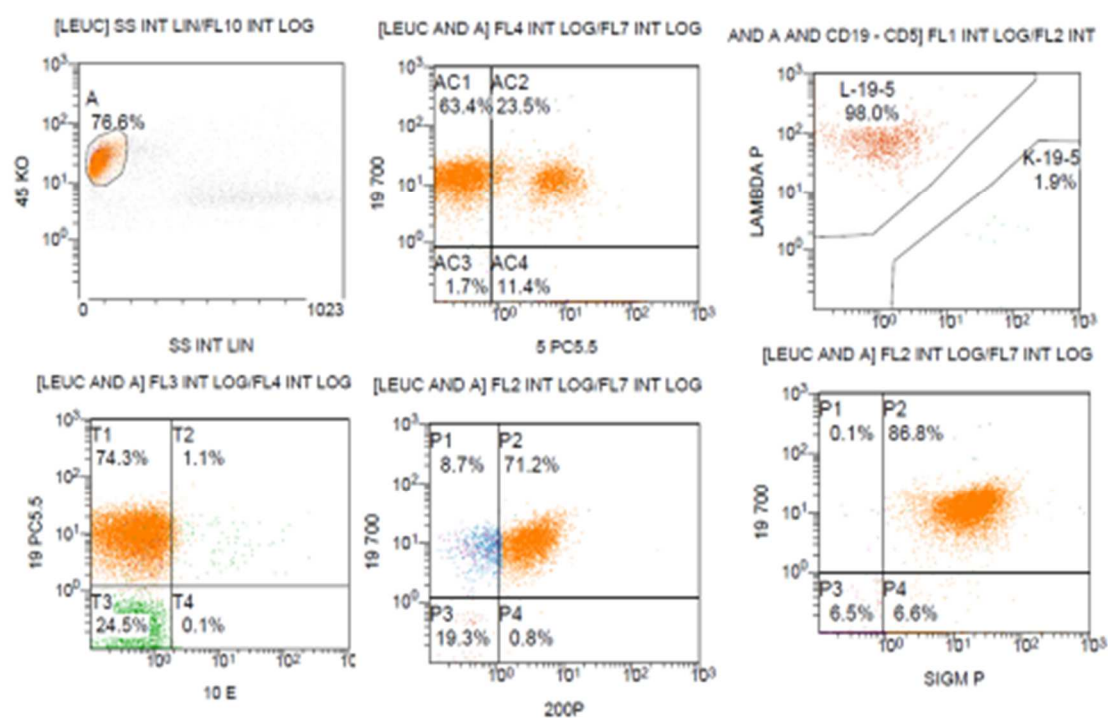
Cas #4, table LM

LF



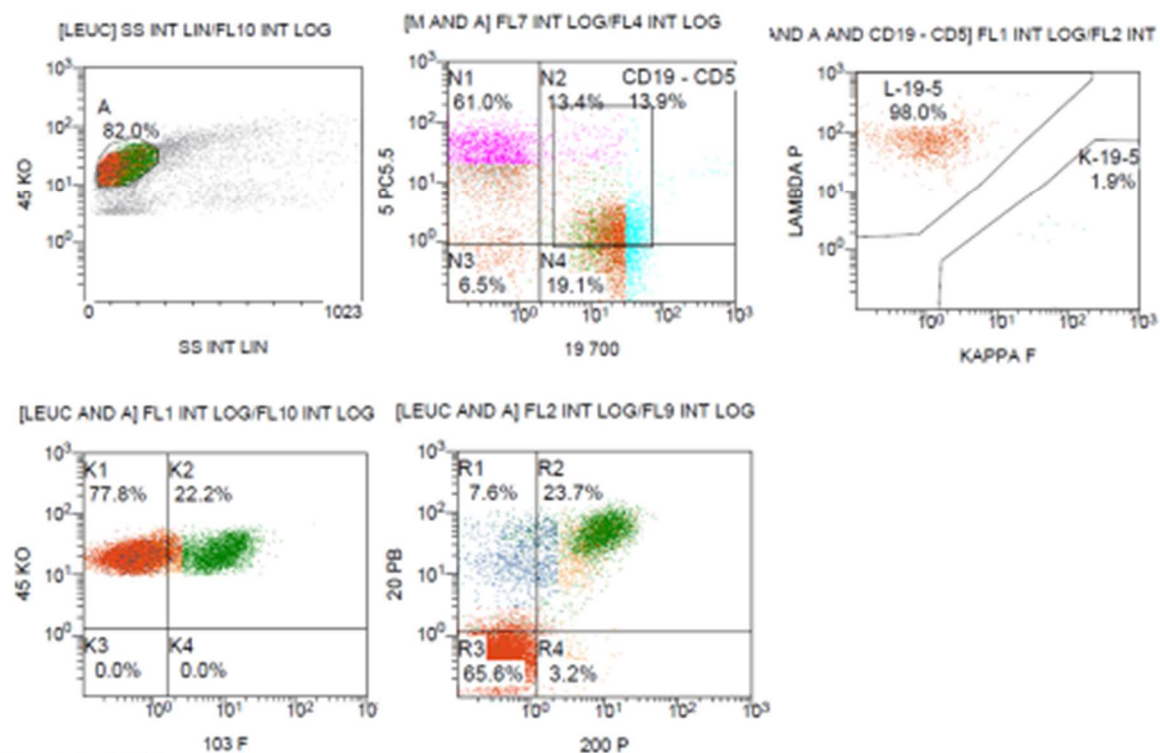
Cas #9, table LF

LLP



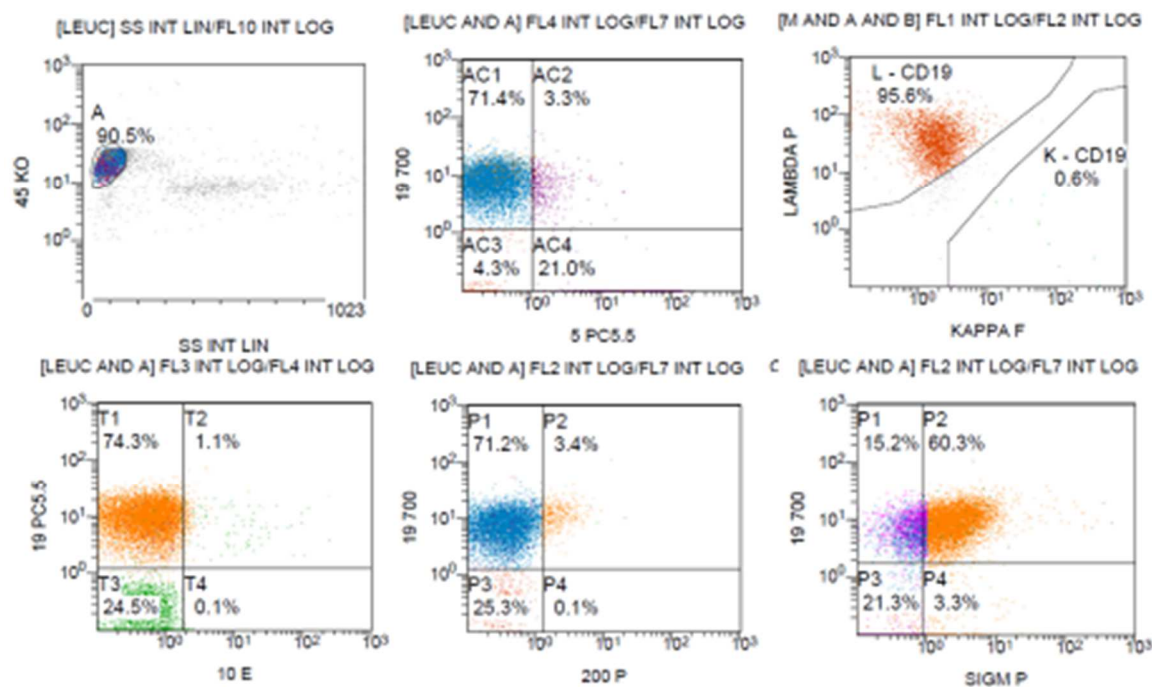
Cas #2, table LLP

HCL



Cas #1, HCL

LZM



Cas #9, table LF

Remerciements

Dans le cadre de ce travail je remercie tout particulièrement mon tuteur, le Prof. Olivier Spertini pour sa patience, sa disponibilité et son aide dans les moments difficiles de ce travail.

Remerciements à M. Stéphane Quarroz, technicien en analyses biomédicales (TAB), responsable moelle/marqueurs du laboratoire central d'hématologie du CHUV pour son temps, ses explications et sa récolte minutieuse de données nécessaires à ce travail.

Remerciements à Mme DeLeval et ses collaborateurs pour m'avoir fourni les données de pathologie (notamment pour les patients externes non-présents sur Soarian/Archimede) nécessaires à ce travail.

Pour finir, remerciements au laboratoire de cytogénétique du cancer et tout particulièrement au Dr. Dominique Muehlmatter pour m'avoir donné accès aux données cytogénétiques (caryotypes, FISH et puces à ADN) nécessaires à ce travail.