
MERCREDI 3 FÉVRIER 2016
HÔTEL PARIS EST - PARIS 10^e

2^e Journée Thématique d'Hématologie



Programme - Résumés - Liste des participants



www.alphavisa.com/jtafc/2016/02/



2^e Journée Thématique d'Hématologie



Mercredi 3 février 2016 - Hôtel Paris Est - Paris 10^e

PROGRAMME

10:00-10:05 Introduction

Lydia Campos (Saint-Étienne) et Xavier Troussard (Caen)

Modératrices : *Lydia Campos (Saint-Étienne) et Valérie Bardet (Paris)*

10:05-10:50 Mastocytoses

- **Cytologie** - *Chantal Brouzes (Paris)*
- **CMF** - *Ludovic Lhermitte (Paris)*

10:50-11:30 Pause café - Visite de l'exposition

11:30-12:15 Diagnostic des LMMC

- **Cytologie** - *Françoise Schillinger (Besançon)*
- **CMF** - *Orianne Wagner-Ballon (Créteil)*

**12:15-13:00 La Leucémie dérivée des cellules dendritiques
plasmacytoïdes (LpDC)**

- **Cytologie** - *Bernard Chatelain (Yvoir, Belgique)*
- **CMF** - *Francine Garnache-Ottou (Besançon)*

13:00-14:30 Déjeuner - Visite de l'exposition

14:30-15:15 Proliférations à cellules "chevelues"

- **Cytologie** - *Xavier Troussard (Caen)*
- **CMF** - *Lucile Baseggio (Pierre-Bénite)*

15:15-15:45 Pause café - Visite de l'exposition

15:45-16:30 Aspects cytologiques et immunophénotypiques des LGL

- **Cytologie** - **CMF** - *Mikaël Roussel (Rennes)*

Mastocytoses

Cytologie

Chantal Brouzes

CMF

Ludovic Lhermitte

Laboratoire d'onco-hématologie - Hôpital Necker Enfants Malades - Paris

Les mastocytoses représentent un groupe hétérogène d'affections caractérisées par la prolifération de mastocytes (MC) anormaux qui s'accumulent dans un ou plusieurs organes. Il s'agit d'une affection rare (400 nouveaux cas par an) pouvant toucher l'enfant comme l'adulte. Les formes pédiatriques sont très largement cutanées et sont habituellement spontanément résolutive à la puberté. L'absence d'atteinte médullo-sanguine ou ganglionnaire et le pronostic généralement favorable font que le biologiste hématologiste est rarement impliqué dans la prise en charge diagnostique de ces formes pédiatriques. Au contraire, les formes adultes sont volontiers chroniques, non-résolutive et systémiques. On distingue les formes indolentes avec au premier plan des signes généraux (asthénie), des troubles fonctionnels (flush, malaise) et un préjudice esthétique (signes cutanés), et les formes agressives volontiers plus tumorales, avec dysfonction viscérale, et pouvant engager le pronostic vital à plus ou moins long terme. Les mastocytoses systémiques sont considérées dans la classification WHO2008 comme un syndrome myéloprolifératif (SMP). Elles se distinguent cependant des autres SMP : d'une part leur diagnostic repose avant tout sur l'aspect histologique plutôt que la démonstration de la clonalité moléculaire, et d'autre part la cytologie et l'immunophénotypage sont des éléments importants du diagnostic. Cette session présentera les signes cytologiques et immunophénotypiques retrouvés dans les mastocytoses en fonction des différentes formes, et soulignera les difficultés auxquelles le biologiste hématologue pourra être confronté.

La cytologie d'un tissu infiltré, généralement la moelle mais aussi parfois d'autres tissus comme le ganglion ou des liquides biologiques (ascite, liquide pleural, sang), recherchera une expansion des mastocytes et permettra d'exclure la leucémie à mastocytes (>20% de mastocytes médullaires, ou >10% de mastocytes circulants). Elle recherchera également des signes de dysmorphie essentiels au diagnostic des mastocytoses (>25% des mastocytes sont atypiques ou immatures pour compter comme un critère mineur selon l'OMS). Les différentes atypies cellulaires seront présentées. Celles-ci sont dominées par les mastocytes en aiguille, dits « spindle-shaped mast cells » dans la terminologie anglo-saxonne, présents dans plus de 90% des mastocytoses systémiques. Il peut cependant exister plus rarement d'autres signes, tels des plages hypo-/a-granulaires focales (aires cytoplasmiques lacunaires), des compactions granulaires, des granules coalescentes polaires, un (ou plusieurs) nucléole(s) proéminent(s), une chromatine dédifférenciée lâche voire pseudo-blastique, ou encore un noyau bi/multilobé. Dans tous les cas, il est essentiel de rechercher des anomalies sur les autres lignées, quantitatives (excès d'éosinophiles, de blastes, augmentation de la richesse médullaire, hémopathie lymphoïde associée), ou qualitatives (signes de dysplasie myéloïde) pouvant orienter notamment vers une hémopathie non mastocytaire associée à la mastocytose, qui conditionne généralement le pronostic.

.../...

.../...

L'immunophénotypage mastocytaire recherche des atypies simples que sont l'expression du CD2 et/ou du CD25 à la surface des mastocytes (critère mineur selon l'OMS). Le gating des mastocytes est relativement simple mais doit impérativement inclure selon les recommandations internationales un gating positif (CD45, CD117, FcεRI ET CD9 ou CD33), et un gating négatif (CD34, CD38) pour analyser l'expression du CD2 et du CD25. Le mastocyte est un élément médullaire rare et son analyse impose les mêmes contraintes que celles de l'analyse en situation de maladie résiduelle, en termes de nombre d'évènements acquis, interprétation des signaux spécifiques et non spécifiques. D'autre part, le mastocyte étant une cellule très auto-fluorescente, des difficultés d'interprétation sont très fréquentes et requièrent une certaine habitude pour conclure.

Le biologiste hématologue peut être confronté au diagnostic des mastocytoses de l'adulte. Compte-tenu de la complexité de la prise en charge diagnostique et thérapeutique (multi-disciplinaire), il est hautement souhaitable de diriger les patients vers le réseau national CEREMAST qui prend en charge l'expertise diagnostique des mastocytoses (phenoMAST, séquençage intégral de KIT) et permet la valorisation de la cohorte des mastocytoses pour des études translationnelles.

Diagnostic des LMMC

Cytologie

Françoise Schillinger¹

CMF

Orianne Wagner-Ballon²

¹ *Laboratoire de biologie médicale de la greffe - EFS Bourgogne Franche-Comté - Besançon*

² *Laboratoire d'hématologie immunologie biologique - Hôpitaux Universitaires
Henri Mondor - Créteil*

Introduction

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie myéloïde clonale du sujet âgé, dont le diagnostic repose sur un ensemble de critères définis par l'OMS 2008¹. Parmi ces critères, seule la monocytose sanguine persistante $\geq 1\text{G/L}$ est formelle. Les autres sont soit des critères d'exclusion d'autres hémopathies myéloïdes clonales, soit des critères incertains, qu'il est toutefois nécessaire de rechercher afin d'exclure les monocytoses d'autre étiologie. Le diagnostic différentiel des LMMC avec les monocytoses réactionnelles reste en effet un problème récurrent pour le laboratoire.

Aspects cytologiques

Nous présentons les aspects cytologiques des LMMC. Nous rappelons les critères morphologiques établis par la classification OMS et décrivons les différents aspects normaux et pathologiques de la lignée monocytaire⁴. Nous rappelons les principaux diagnostics différentiels de la LMMC, avec les différents aspects morphologiques s'y rapportant. Il n'est pas facile de distinguer formellement une LMMC d'une monocytose réactionnelle, et les recommandations du GFHC établissant le seuil de revue de la formule sanguine à 1.5 G/L de monocytes n'est pas entièrement satisfaisant. Nous avons donc analysé les paramètres issus des automates SysmexTM XN pour améliorer la gestion des examens microscopiques devant une monocytose sanguine. Nous avons analysé les résultats de la numération formule sanguine (NFS) et des paramètres de position et de dispersion des PN et des Mo chez 35 patients présentant une LMMC et 67 témoins présentant une monocytose réactionnelle. Trois paramètres ont été retenus, avec lesquels nous avons établi une équation dont le seuil optimal conditionnait l'examen microscopique avec une sensibilité de 0.94 [0.81-0.99] et une spécificité de 0.96 [0.87-0.99].

Aspects cytométriques

Les monocytes sanguins normaux se répartissent en 3 sous-populations définies par l'expression membranaire de CD14 et CD16 : les monocytes « classiques » CD14+/CD16- (MO1), largement majoritaires, les monocytes « intermédiaires » CD14+/CD16+ (MO2), et les monocytes « non classiques » CD14-/CD16+ (MO3)². Une étude récente réalisée par l'équipe du Pr Eric Solary (INSERM U1009, Institut Gustave Roussy, Villejuif) a permis de mettre en évidence une accumulation de la population monocytaire MO1 dans le sang périphérique des patients atteints de LMMC³.

.../...

.../...

Dans un premier temps, l'étude d'une cohorte d'apprentissage (n=175, composée de 53 patients présentant une LMMC, 26 donneurs de sang, 39 témoins ≥ 65 ans, 33 patients présentant une monocytose réactionnelle et 24 patients présentant une hémopathie autre que la LMMC) a révélé une signature phénotypique de la LMMC avec une augmentation de la population MO1 ($96,6 \pm 1,7\%$ des monocytes), les MO1 représentant $84,0 \pm 7\%$ des monocytes chez les témoins ≥ 65 ans et n'augmentant pas dans les monocytoses réactionnelles ($79,1 \pm 10,5\%$) ni dans les autres hémopathies ($84,4 \pm 10,6\%$). L'établissement d'une courbe ROC a déterminé un seuil critique ($94,0\%$ de MO1) au-delà duquel le phénotype est très en faveur de la LMMC (spécificité : $95,1\%$), permettant d'écarter l'hypothèse d'une monocytose réactionnelle ou d'une autre hémopathie (sensibilité : $90,6\%$). La cohorte de validation (n=307, composée de 86 patients présentant une LMMC, 68 témoins ≥ 65 ans, 74 patients présentant une monocytose réactionnelle et 79 patients présentant une hémopathie autre que la LMMC) a confirmé la validité de ce test diagnostique (spécificité : $94,1\%$ et sensibilité : $91,9\%$). Cette signature phénotypique est indépendante de la monocytose, des mutations et/ou anomalies cytogénétiques, de la forme de LMMC (proliférative vs dysplasique) et du type de LMMC (Type 1 vs 2). De plus, les agents déméthylants, lorsqu'ils sont efficaces, corrigent cette anomalie phénotypique.

Conclusion

Le diagnostic de LMMC reste délicat sur le plan cytologique. Nous proposons une nouvelle approche morphologique et phénotypique, afin d'améliorer la prise en charge des patients suspects de LMMC tout en discriminant au mieux les patients présentant une monocytose réactionnelle.

Références :

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951.
2. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011; 118: e16-31.
3. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, Morabito M, Met E, Debord C, Benayoun E, Nloga AM, Fenaux P, Braun T, Willekens C, Quesnel B, Adès L, Fontenay M, Rameau P, Droin N, Koscielny S, Solary E, on behalf of the Groupe Francophone des myélodysplasies (GFM). Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 2015 Jun 4;125(23):3618-26.
4. Jean E Goasguen, John M Bennett for the International Working Group on Morphology of Myélodysplastic Syndrome. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*. 2009 Jul;94(7) : 994-997.

La Leucémie dérivée des cellules dendritiques plasmacytoïdes (LpDC)

Cytologie

Bernard Chatelain¹

CMF

Francine Garnache-Ottou²

¹ Laboratoire d'hématologie - Centre Hospitalier Universitaire UCL Mont-Godinne
Yvoir - Belgique

² Laboratoire de biologie médicale et de greffe - EFS Bourgogne Franche-Comté - Besançon

La Leucémie dérivée des cellules dendritiques plasmacytoïdes (LpDC) ou *Blastic dendritic cell neoplasms* selon la classification OMS 2008 est une leucémie aiguë (LA) rare et agressive. Sa découverte, plus récente que celle des LA myéloïdes et lymphoïdes (au début des années 2000) (Feuillard *et al.* 2002, Chaperot *et al.* 2001, Petrella *et al.* 1999), sa rareté (< 1% des diagnostics de LA des laboratoires) et le fait qu'elle dérive de cellules rares de l'organisme, moins bien connues que les cellules lymphoïdes ou myéloïdes, rendent sa caractérisation plus difficile.

Il est important que les biologistes des laboratoires connaissent les situations où l'on peut évoquer ce diagnostic. Cette présentation fera le point sur les aspects morphologiques et immunophénotypiques de cette leucémie et les critères diagnostiques actuels qui permettent de retenir ce diagnostic ainsi que les difficultés qui persistent. Ce travail se base pour une grande partie sur les cas que beaucoup de biologistes du GFHC, de l'AFC et du GEIL ont envoyés dans le cadre du réseau Français LpDC pendant la période 2004-2013 (n=109).

L'hémogramme de la plupart des patients révèle des cytopénies en relation avec l'infiltration médullaire (87,1%) : anémie (64%), thrombopénie (75%), leucopénie (24%), neutropénie (38%). L'hyperleucocytose est observée dans 30,7% des cas avec une blastose variable (taux moyen de 36%) et les cas les plus hyperleucocytaires sont clairement liés à une blastose très importante. La monocytose est observée chez 12% des patients sans antécédent de LMMC. Il faut souligner la difficulté à distinguer morphologiquement certaines cellules leucémiques de monocytes ou de précurseurs monocytaires. La myélémie est fréquente (42%) mais le plus souvent faible ou modérée : inférieure à 8,7% et inférieure à 2 G/L à l'exception d'un patient pancytopénique avec myélémie à 21% mais leucopénie à 1,05 G/L. L'atteinte médullaire est objectivée dans 96% des cas avec rarement (6%) des blastoses inférieures à 20%. Dans 32% des cas, des anomalies morphologiques sont retrouvées dans au moins une lignée : 85% dans la ligne granulocytaire, 43% dans la lignée mégacaryocytaire et 32% dans la lignée érythroblastique.

La morphologie des blastes est variable mais on y retrouve souvent des éléments qui évoquent en première approche la lignée monocyttaire : cytoplasme faiblement basophile, gris bleuté ; présence fréquente de vacuoles et de prolongements cytoplasmiques. La taille des blastes est très variable selon les cas et, pour un même cas, on peut retrouver des cellules de taille moyenne et des cellules de petite taille. Le cytoplasme moyennement abondant est de basophilie variable avec souvent des vacuoles bien délimitées et parfois en bordure de la membrane cytoplasmique (image de microvacuoles en « collier de perles ») ou de vacuoles plus grandes coalescentes ou allongées (aspect en « grains de riz »).

.../...

.../...

La présence de vacuoles est très fréquente, dans un contingent seulement des blastes et parfois dans moins de 10% des blastes. La présence de pseudopodes, larges le plus souvent (image en « miroir à manche »), est fréquente même si elle n'est présente que dans un nombre limité de blastes. Dans de rares cas, des granulations azurophiles sont visibles. Elles sont généralement en nombre restreint et d'une taille supérieure à celles qu'il est possible d'observer dans les monocytes normaux. Le noyau est souvent de forme très irrégulière et même dans les cellules blastiques de petite taille au rapport nucléo-cytoplasmique élevé, on observe souvent un aspect très irrégulier, convoluté ou cérébriforme. Les nucléoles sont souvent visibles mais peu nombreux et de couleur pale. Parfois le nucléole est isolé, très apparent et volumineux tel que celui d'un prolymphocyte. La cytochimie montre l'absence d'activité peroxydasique et pour les estérases non spécifiques (Alpha Naphtyl Acétate ou Butyrate Estérases). Cet élément est important car il permet d'orienter vers un diagnostic d'hémopathie à composante monocyttaire ou plus rarement érythroblastique voire mégacaryoblastique si une et/ou l'autre des deux réactions cytoenzymatiques présentent une positivité.

L'immunophénotypage des blastes dans le sang ou la moelle osseuse (ou plus rarement d'autres sites envahis) est indispensable pour confirmer l'origine pDC des blastes. Le biologiste doit y penser devant une leucémie qui n'exprime pas de marqueurs d'appartenance forte aux lignées myéloïdes (cMPO-, CD11c-, CD14-) et lymphoïdes (cCD3-, cCD79a-, CD19-) et qui par contre exprime fortement HLA-DR, CD4 (qui peut parfois être faible) et le plus souvent CD56 (qui peut parfois être faible). CD123 est toujours exprimé par les LpDC à un niveau d'expression fort. A noter que ce marqueur n'est pas spécifique en soi puisqu'il est fréquemment exprimé par les LAM mais le plus souvent à un niveau plus faible. BDCA2 (*Blood dendritic cell antigen* ou CD303) est un marqueur spécifique des pDC normales et ainsi des LpDC. Il s'agit d'un marqueur de maturation acquis lors de la différenciation pDC et son niveau d'expression est souvent faible sur les LpDC voire parfois négatif (30% des cas environ). Ainsi son expression permet de confirmer l'origine pDC mais son absence ne permet pas de l'exclure. BDCA4 (CD304) est très fréquemment exprimé (96%) mais n'est pas spécifique à lui seul car environ 10% des LA (surtout lymphoïde B mais aussi myéloïde immature) peuvent l'exprimer. Le proto-oncogène TCL1 (*T cell leukemia 1*) est toujours exprimé fortement dans les LpDC. Bien que ce ne soit pas un marqueur spécifique de la lignée pDC puisqu'il est exprimé dans des cellules B normales par exemple et dans différentes pathologies B ou T comme les leucémies prolymphocytaires T (en relation avec une t(14;14)), son niveau d'expression très fort dans les LpDC en fait un très bon marqueur quel que soit sa méthode de détection (CMF ou immunohistochimie). L'expression isolée de marqueurs des lignées myéloïde ou lymphoïde T est fréquemment retrouvée (respectivement 50 et 65 % des cas), CD33 le plus souvent en ce qui concerne la lignée myéloïde et CD7 pour la lignée lymphoïde T. L'expression d'un marqueur B est plus rare (15 % des cas), et dans ce cas nous retrouvons majoritairement l'expression de CD22. Dans notre cohorte de 109 cas, l'association de marqueurs myéloïdes et T est retrouvée dans 28 cas, lymphoïde T et B dans 4 cas et lymphoïde B et myéloïde dans 4 cas. A noter que 4 cas supplémentaires sur 109 expriment à la fois un marqueur myéloïde, 1 marqueur T et 1 marqueur B. Dans tous ces cas, il n'est jamais observé de marqueurs forts d'appartenance aux lignées myéloïde ou lymphoïde et l'anatomopathologie a confirmé le diagnostic de LpDC. Les autres marqueurs les plus exprimés dans les LpDC sont CD36 (93,8%), CD38 (82,1%) et CD45RA (88,9%). Les marqueurs d'immaturité sont rares : CD34 (1%), CD117 (22%) et Tdt (16%).

Proliférations à cellules « chevelues »

Cytologie

Xavier Troussard¹

CMF

Lucile Baseggio²

¹ Laboratoire d'hématologie - Centre Hospitalier Universitaire - Caen

² Laboratoire hématologie cellulaire - Groupement Hospitalier Lyon-Sud
Hospices Civils Lyon - Pierre-Bénite

Parmi les syndromes lymphoprolifératifs à cellules « chevelues », la dernière classification WHO 2008 des tumeurs hématopoïétiques et des tissus lymphoïdes rapporte deux entités déjà reconnues : la leucémie à tricholeucocytes (HCL) et le lymphome splénique de la zone marginale (LZMS) avec cellules villeuses (rapportés sous le terme de SLVL) et deux entités provisoires ; la forme variante de la HCL (HCL-V) et le lymphome splénique diffus de la pulpe rouge de la rate (SDRPL) (1-3). Ces différentes entités présentent leurs propres caractéristiques cliniques, biologiques, histologiques, cytogénétiques ou moléculaires mais aussi des prises en charge thérapeutiques différentes, allant d'une simple surveillance à des traitements par immunochimiothérapie ou à des traitements ciblés.

Nous aborderons les différents aspects clinico-biologiques de ces entités et discuterons enfin le rapprochement du SDRPL d'avec la forme variante de la HCL-V.

Clinique

Le SDRPL et la HCL sont des entités rares qui représentent respectivement 1 et 2% des lymphomes non-hodgkinien, mais si le SDRPL est observé chez l'homme âgé (âge médian de 77 ans), la HCL est plutôt décrite chez l'homme plus jeune (âge médian 55 ans). Le LZMS est lui plus fréquent (25%) avec une prédominance féminine de 60 à 70 ans. Leur présentation clinico-biologique avec une constante splénomégalie est proche, avec néanmoins une pancytopenie uniquement observée dans la HCL.

Morphologie

Au niveau de l'étalement du sang périphérique, la population lymphomateuse apparaît homogène avec un net contingent de vrais lymphocytes villeux (LV) dans le SDRPL et de tricholeucocytes dans la HCL, alors qu'elle est plus hétérogène dans le LZMS associant des éléments d'aspect polymorphe avec parfois un faible contingent de LV (moins de 20% des cellules lymphomateuses)(Figure).

Au niveau de la moelle osseuse, dans le SDRPL comme dans le LZMS, l'infiltration lymphomateuse est interstitielle et/ou nodulaire, dans la HCL elle est plus souvent diffuse ou nodulaire. Si dans le LZMS et SDRPL l'hématopoïèse est généralement conservée et le plus souvent sans fibrose médullaire, dans la HCL, il existe une diminution de l'hématopoïèse associée à une importante fibrose médullaire.

Au niveau de la rate, dans le SDRPL l'infiltration splénique est diffuse au niveau de la pulpe rouge avec disparition de la pulpe blanche, et se rapproche de celle de la HCL qui est caractérisée par une infiltration diffuse de la pulpe rouge avec effacement de la pulpe blanche et formation de pseudo-sinus spléniques avec élargissement des cordons pulpaire. Par contre dans le SDRPL, le marquage à l'annexine A1 est négatif contrairement à la HCL. Dans le LZMS, l'atteinte nodulaire de la pulpe blanche montre un épaississement de la zone marginale qui dans sa forme classique présente un aspect bi-phasique.

.../...

.../...

Immunophénotype

Les cellules lymphomateuses du SDRPL sont habituellement CD5, CD23 et CD43 négatives comme celle du LZMS mais s'en distinguent par une expression plus forte des CD11c, CD22 et CD20, ainsi que par une forte expression du CD76. Le CD103 est positif dans 20 à 30% des cas de la série lyonnaise (4). Les CD123, CD25, CD38, CD24 et CD27 sont habituellement négatifs. Ce profil immunologique, nous a permis d'établir un score basé sur 5 paramètres (cinq points de valeur 1 ou 0) facilitant sa distinction immunologique d'avec le LZMS : 1 point est attribué en cas de forte positivité des CD22, CD11c et CD76 (ce dernier réalisé en immunocytochimie), de la négativité des CD38 et CD27 (4). Un score supérieur à 3 est en faveur d'un SDRPL. L'expression du CD180 apparaît également discriminante entre LZMS et SDRPL, cette expression étant statistiquement plus importante dans le SDRPL que dans le LZMS (5). Un score immunologique a également été développé pour le diagnostic de la HCL. Basé sur l'expression de quatre marqueurs (CD103, CD11c, CD25 et CD123), un point est attribué pour une expression positive et 0 point pour une expression négative. 98 % des cas de HCL ont un score à 3 ou 4, contrairement au LZMS où le score est habituellement de 0 ou 1 (6).

Génétique

Le caryotype ne met que rarement en évidence des anomalies chromosomiques (32% des cas de SDRPL), ce qui est un autre élément qui le distingue du LZMS qui présente lui des anomalies clonales dans la très grande majorité des cas (plus de 80% des cas de LZMS). Par contre les anomalies retrouvées sont celles observées dans les LZMS avec en particulier des délétions en 7q, des trisomies 18 et trisomies en 3q. Chez les patients avec une HCL, les anomalies chromosomiques sont également rares. Les chromosomes les plus impliqués sont les chromosomes 1,2,5,6,11,19 et 20, et en particulier les atteintes du chromosome 5 (40% des cas de HCL) qui correspondent à des trisomies, inversions péricentriques ou des délétions interstitielles en 5q13.3.

Profil des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV)

Le profil des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV) est muté dans 80% des cas de SDRPL et de HCL, et dans plus de 85% des cas de LZMS (49% de cas très muté avec moins de 97% d'homologie, 38% peu muté avec 97-99.9% d'homologie). Dans le SDRPL, il existe un biais d'utilisation des segments VH3-23 et VH4-34. Dans le LZMS, 3 réarrangements IGVH1-2 (25%), IGHV4-34 (13%) et IGHV3-23 (8%) représentent un peu moins de la moitié (46%) des réarrangements identifiés dans notre série avec une utilisation préférentielle de l'allèle *04 (92%) contre l'allèle *02 (8%) (13). Dans la HCL, le répertoire le plus fréquemment utilisé est VH3-23 (21% des cas), VH4-34 (10% des cas) et VH3-30 (8%) L'utilisation du VH4-34 est associée à un profil non muté, une leucocytose élevée (> 5 10⁹/L) et une absence de réponse de courte durée après traitement par les analogues des purines (PNA) et une survie globale réduite (8.63 ans vs 26.22 ans). Dans la pathologie lymphoïde, la mutation V600E du gène BRAF a été décrite comme spécifique de la HCL, et exceptionnellement rapportée dans LZMS et jamais à ce jour dans le SDRPL.

.../...

.../...

Relation entre le SDRPL et la forme variante de la HCL (HCL-V)

La HCL-V distingue de la HCL par la présentation clinico-biologique (absence de monocytopenie et neutropénie), l'aspect cytologique des cellules lymphomateuses circulantes (cellules proches des LV typiques mis à part un net nucléole unique), le profil immunologique (habituellement absence d'expression des CD103/CD123/CD25, et de l'annexine A1 sur coupe) et la résistance au traitement conventionnel de la HCL (absence de réponse à la cladribine). Par contre la HCL-V présente des similitudes avec le SDRPL. En effet il s'agit d'une entité rare (0,4% des SLP-B avec dissémination sanguine), qui touche l'homme âgé (âge médian de 71 ans) avec généralement une lymphocytose modérée sans pancytopenie, une infiltration médullaire avec une hématopoïèse conservée. L'aspect cytologique du frottis sanguin bien différent de la HCL, est proche de celui du SDRPL si ce n'est la présence d'éléments lymphomateux avec un proéminent nucléole alors que dans notre série de SDRPL les éléments nucléolés sont rares. L'infiltration splénique tout comme dans le SDRPL est diffuse au niveau de la pulpe rouge avec atrophie de la pulpe blanche. Les données de cytogénétique et de biologie moléculaires sont limitées compte-tenu du faible nombre de séries publiées. Comme le SDRPL, les gènes des IGHV sont peu mutés avec un biais d'utilisation de VH3-23 et VH4-34. Il n'a pas été décrit d'anomalies chromosomiques récurrentes, des atteintes chromosomiques en 14q32, 8q24, del17p et des trisomies 12 ont été rapportées. Enfin il n'y a pas de mutation de la protéine BRAFV600E. Si la HCL-V apparaît donc bien différente de la HCL classique tant dans sa présentation clinique que biologique et sa réponse au traitement, il existe par contre un important chevauchement les 2 entités SDRPL et HCL-V sur le plan cytologique, histologique, phénotypique, et moléculaire ce qui nous amène à proposer que ces cas avec LV comportant un nucléole proéminent classés par certains en HCL-V puissent correspondre à des SDRPL en progression tumorale. Enfin le terme SDRPL nous semblerait alors plus adapté que HCL-V pour définir cette « entité » puisqu'elle apparaît nettement différente de la HCL (absence en particulier du marqueur moléculaire BRAF), de plus le terme HCL-V peut prêter à confusion avec le terme HCL pour certains biologistes et cliniciens, or la prise en charge thérapeutique est totalement différente.

Conclusion

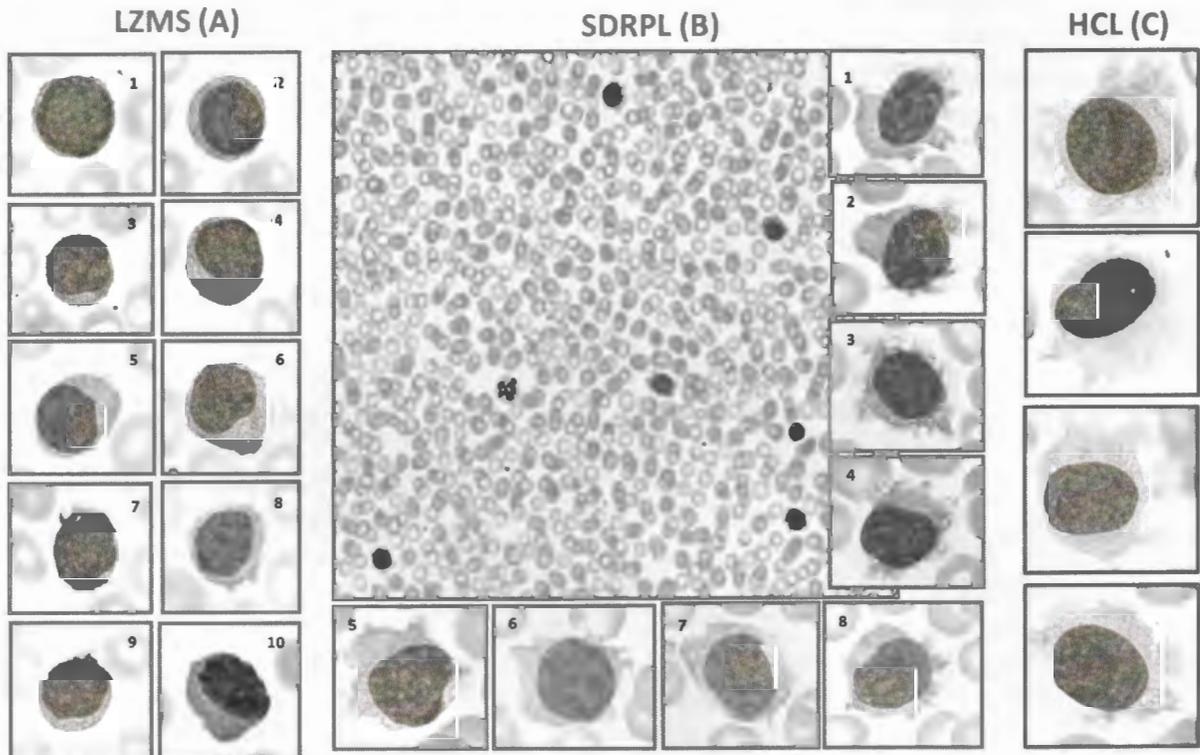
Malgré des caractéristiques clinico-biologiques bien distinctes du LZMS et HCL, le diagnostic différentiel, mais surtout l'individualisation du SDRPL d'avec la HCL-V, peut parfois s'avérer difficile compte-tenu d'un certain chevauchement entre ces deux entités. Une meilleure compréhension de leur pathogénèse et les futures études de séquençage haut débit devrait néanmoins permettre d'en préciser les contours et de clarifier les controverses actuelles entre le SDRPL et la HCL-V.

Mots clés : lymphome B splénique, lymphocytes villeux, tricholeucocytes, morphologie, cytométrie en flux.

.../...

.../...

Figure : cytologie du frottis sanguin



A - LZMS (x100, MGG) : Hétérogénéité des cellules lymphomateuses circulantes avec une majorité de petites cellules lymphoïdes (lymphocyte-like)(1-3), fréquemment des cellules lymphoplasmocytoïdes (4-6), des cellules avec de fines villosités (7-9), et de rares cellules plasmocytaire (10).

B - SDRPL : Homogénéité de la population lymphomateuses circulantes (x10 ; MGG) avec une majorité de lymphocytes villeux vrais (x100, MGG) : noyau rond à chromatine mottée, sans nucléole visible ou de petite taille, cytoplasme basophile d'abondance variable le plus souvent moyenne, et présentant des villosités franches réparties en un ou plusieurs pôles (1-5), exceptionnels éléments villeux nucléolés et/ou plus atypiques (6-8).

C - Tricholeucocytes typiques (x100, MGG) : Cellule moyenne, noyau ovale ou réniforme à chromatine finement dispersé sans ou avec un nucléole unique et de petite taille, cytoplasme abondant, faiblement et irrégulièrement basophile présentant de fines projections cytoplasmiques sur tout le pourtour de la cellule.

.../...

.../...

Références :

1. OMS 2008 : Ed Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, World Health Organisation classification of Tumours of Haematoloietice and Lymphoid Tissues, 4th edn. IARC press: Lyon, 2008.
2. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008 Feb;111(4): 2253-2260.
3. Troussard X., Valensi F., Duchayne E., Garand R., Felman P., Tulliez M. Splenic lymphoma with villous lymphocytes : clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. Groupe francais d'hématologie cellulaire (GFHC). *Br J Haematol*. 1996;93:731-736
4. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Callet-Bauchu E, Morel D, Magaud JP, Berger F, Salles G, Felman P. Relevance of a scoring system including CD11c expression in the identification of splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SRPL). *Hematol Oncol*. 2010 Mar;29(1): 47-51.
5. Miguet L, Lennon S, Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Perrusson N, Chenard MP, Galois AC, Eischen A, Mayeur-Rousse C, Maar A, Fornecker L, Herbrecht R, Felman P, Van Dorsselaer A, Carapito C, Cianférani S, Mauvieux L. Cell-surface expression of the TLR homolog CD180 in circulating cells from splenic and nodal marginal zone lymphomas. *Leukemia*. 2013 , 10 (oneline).
6. Del Giudice I, Matutes E, Morilla R, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Rafiq F, A'Hern R, Delgado J, Bazerbashi MB, Catovsky D. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica*. 2004 , 89 (3) : 303-8.
7. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Jun;364 (24) : 2305-15.

Aspects cytologiques et immunophénotypiques des LGL

Cytologie - CMF

Mikaël Roussel

Laboratoire Hématologie - CHU de Rennes - Rennes

Les leucémies à grands lymphocytes granuleux (LGL : Large Granular Lymphocyte) sont caractérisées par des expansions clonales de lymphocytes T CD3^{pos} ou de lymphocytes NK CD3^{neg}. La présentation clinique est dominée par des infections récurrentes et une fréquente neutropénie. Une anémie, une splénomégalie et des pathologies auto-immunes sont fréquemment associées et peuvent constituer un mode de révélation. Les lymphocytes à grains sont présents physiologiquement et sont donc observés fréquemment sur un frottis de sang.

C'est l'observation répétée d'un nombre important de cellules avec grains cytoplasmiques azurophiles et ceci en l'absence de cause réactionnelle qui déclenche l'exploration complémentaire. L'analyse en cytométrie de flux doit permettre de définir le lignage T ou NK de la prolifération mais aussi de documenter la clonalité par analyse du répertoire Vbeta et ceci notamment pour les petits clones. Cette clonalité doit parfois être objectivée par une recherche d'un réarrangement du TCR en biologie moléculaire.

Ces hémopathies peuvent être complexes à objectiver, d'une part du fait de l'hétérogénéité de leur présentation mais aussi de la difficulté parfois à documenter une clonalité. Enfin la détection d'un clone T n'est pas toujours synonyme de malignité et ces derniers peuvent se voir dans des pathologies inflammatoires ou infectieuses. En définitive, si le diagnostic de ces hémopathies est parfois évident du fait d'une expansion importante de cellules, fréquemment il repose sur un "Recueil de Concertation Pluridisciplinaire" entre la clinique, la cytologie, l'immunophénotype et la biologie moléculaire.