

BIOLOGIE CLINIQUE

Apport de l'immunophénotypage dans le diagnostic et le pronostic des leucémies aiguës à Abidjan, Côte d'Ivoire.

K. A. Inwoley (1, 2), D. Sawadogo (1, 3), L. Mizero (1), M. Salou (1), N. Karim (2) & A. Sangaré (4)

(1) Département d'hématologie, d'immunologie et de biologie cellulaire, Unité de formation et de recherche des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(2) Centre de diagnostic et de recherche sur le sida et les maladies opportunistes (CeDReS), Centre hospitalier universitaire de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(3) Laboratoire d'hématologie, Centre hospitalier universitaire de Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(4) Service d'hématologie clinique, Centre hospitalier universitaire de Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire.

*Correspondance : Inwoley K A, 22 BP 551 Abidjan 22, Tél : 225- 21-25-84-59, Fax : 225- 21-24-92-06, Email : ikandre@yahoo.fr

Manuscrit n° 2627. "Biologie clinique". Reçu le 30 septembre 2003. Accepté le 5 octobre 2004.

Summary: Immunophenotyping of acute leukemias: Diagnostic and pronostic utility in Abidjan, Côte d'Ivoire.

Flow cytometry is nowadays the first-line method for immunophenotypic identification of blast cells but is not so usual in limited-resources countries. We have investigated on the usefulness of this tool in Abidjan, Côte d'Ivoire.

Bone marrow sample from 13 patients with acute leukemia identified by cytology and cytochemical analysis was immunophenotyped by using monoclonal antibodies directed to: T lymphoid cells (CD3, CD5, CD7); B lymphoid cells (CD10, CD19, CD20, CD22, HLA-DR) and myeloid cells (CD13, CD33). Immunophenotyping allowed us to confirm the diagnosis of 6 de novo acute leukemias (2 acute myeloid leukaemias, 4 acute lymphoid leukemias) and 7 acute leukaemias resulting from chronic myeloid leukaemias. Immunophenotyping also characterizes the atypical/aberrant lineage essential for the prognosis: 2 biphenotypic acute leukemias (myeloid/lymphoid T) were identified. Our results suggest that flow cytometry may be a useful additional tool to identify the specific leukemic cell, to make a better classification as well as a prognosis evaluation of patients with acute leukemias.

Résumé :

La cytométrie en flux est, de nos jours, une méthode de choix pour l'étude des populations cellulaires exprimant des antigènes de surface. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic et la classification des leucémies aiguës à Abidjan.

Treize cas de leucémies aiguës (LA) ont été identifiés par la cytologie et la cytochimie, puis l'immunophénotypage a été réalisé à l'aide de marqueurs de surface des populations lymphoïdes T (CD3, CD5, CD7); populations lymphoïdes B (CD10, CD19, CD20, CD22, HLA-DR) et populations myéloïdes (CD13, CD33). L'immunophénotypage a confirmé le diagnostic des 6 LA de novo, dont 4 leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et 2 leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), et des 7 LA secondaires à des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) identifiées par la cytologie et la cytochimie. De plus, la cytométrie en flux a permis de détecter précocement la transformation aiguë des LMC et d'identifier les populations leucocytaires impliquées dans l'expansion clonale dont dépend le pronostic : 2 cas de LA biphenotypiques (myéloïde / lymphoïde T) ont été identifiés.

Au total, l'immunophénotypage des cas de LA nous a aidés à faire une meilleure distinction entre les leucémies aiguës et d'affiner le pronostic qui, en général, était très mauvais.

acute leukaemia
immunophenotyping
flow cytometry
prognosis
diagnosis
hospital
Yopougon
Abidjan
Côte d'Ivoire
Sub-Saharan Africa

leucémie aiguë
immunophénotypage
cytométrie en flux
pronostic
diagnostic
hôpital
Yopougon
Abidjan
Côte d'Ivoire
Afrique intertropicale

Introduction

Les leucémies aiguës (LA) constituent un groupe hétérogène de proliférations malignes du tissu hématopoïétique caractérisé par une expansion clonale de cellules immatures ou blastes. Leur diagnostic et leur classement reposent habituellement sur les examens morphologiques et cytochimiques de moelle osseuse et de sang périphérique. La classification FAB (French-American-British Cooperative Group) décrit huit

sous-types de leucémies aiguës myéloïdes (LAM), M₀ à M₇, caractérisées par la présence des myéloperoxydases (MPO) dans les blastes (7), et trois sous-types de leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), L₁ à L₃. Depuis quelques années, l'immunophénotypage est devenu un complément indispensable au diagnostic, qu'il permet d'affiner ou même de modifier, mais les résultats rapportés dans la littérature sont limités aux pays développés (1, 8, 9, 11, 12). De plus, c'est seulement l'immunophénotypage qui permet de préciser le type exact

des cellules qui prolifèrent et de mettre en évidence certains antigènes de surface sur les cellules blastiques dont l'expression peut influencer le pronostic (8, 9, 11, 12). Nous nous sommes proposés, dans cette étude réalisée dans un contexte où la cytométrie en flux n'est pas répandue, d'évaluer l'apport de l'immunophénotypage en caractérisant certaines populations leucocytaires chez des patients atteints de LA dont le diagnostic avait été établi par des examens morphologiques et cytochimiques.

Patients et méthode

Il s'agit d'une étude transversale qui s'est déroulée de mars à septembre 1999 chez treize patients recrutés au service d'hématologie clinique du Centre hospitalier universitaire de Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire, dont la symptomatologie clinique et l'hémogramme orientaient vers une LA. Chez chaque patient, le myélogramme a été réalisé en vue des examens biologiques complémentaires. Le diagnostic et le type de LA, selon la classification FAB, ont été établis après l'étude morphologique du suc médullaire par coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) et l'étude cytochimique par coloration à la benzidine, toutes deux réalisées au laboratoire d'hématologie du Centre hospitalier universitaire de Yopougon. L'immunophénotypage du suc médullaire a été réalisé au Centre de diagnostic et de recherche sur le sida et les maladies opportunistes (CeDReS) sise au Centre hospitalier universitaire de Treichville.

Après séparation des cellules mononuclées par gradient de ficoll, nous avons utilisé le kit CD45/CD14 et le kit Acute leukemia phenotyping® de Becton Dickinson. Ce kit est composé d'une douzaine d'anticorps monoclonaux dont chacun est lié à la phycoérythrine (PE) ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; ce sont : CD3-FITC, CD5-PE, CD7-FITC, CD10-FITC, CD13-PE, CD19-PE, CD20-FITC, CD22-PE, CD33-PE, HLA-DR-FITC et deux isotypes témoins γ 1a-PE et γ 2a-FITC. Pour chaque échantillon, nous avons utilisé une technique de double marquage direct en suivant les procédures décrites par le fabricant. La lecture a été réalisée à l'aide du cytomètre en flux Fasca et le logiciel Simulset® de Becton Dickinson.

Le couple CD45/CD14 a permis d'établir une fenêtre leucocytaire ne contenant que les cellules mononuclées. La batterie d'anticorps du kit Acute leukemia phenotyping® a permis d'identifier les lignées cellulaires, selon les recommandations de BENE *et al.*, GORIN et NAJMAN, LEMOINE (2, 6, 13). Selon ces auteurs, les cellules de la lignée T sont CD3⁺CD5⁺CD7⁺, les cellules de la lignée B sont CD19⁺CD20⁺CD22⁺HLA-DR⁺ et les cellules myéloïdes sont CD13⁺CD33⁺.

Dans les LA biphénotypiques vraies, les cellules blastiques portent des marqueurs des deux lignées et l'identification a été faite à partir d'une codification en score : la présence de la MPO, des CD3 et CD22 compte chacun pour deux points. Les marqueurs CD5, CD10, CD13, CD19 et CD33 valent un point chacun. Au

marqueur CD7 est attribué un score de 0,5 point. Les LA biphénotypiques vraies possèdent un score supérieur ou égal à 2 dans chaque lignée.

Pour reconnaître les leucémies à mégacaryocytes (M7), il faut disposer des anticorps anti-CD41 et anti-CD42. Nous avons utilisé la classification immunophénotypique EGIL pour déterminer le type de LA (8).

Résultats

Nous avons retrouvé les signes cliniques couramment décrits dans les leucémies aiguës, à savoir la splénomégalie avec 12 cas (92 %), l'altération de l'état général et l'hépatomégalie avec 9 cas (70 %). Cependant les patients présentaient plusieurs signes associés.

L'hémogramme chez les sujets porteurs de LA a mis en évidence une hyperleucocytose associée en général à une bicytopenie faite de thrombopénie et d'anémie (tableau I).

Tableau I.

Classification des patients en fonction des données de l'hémogramme.
Classification of patients according to complete blood count data.

données biologiques	n	(%)
globules blancs/mm ³		
< 4 000	2	(15)
[4 000-10 000]	3	(23)
> 10 000	8	(62)
plaquettes/mm ³		
< 150 000	9	(69)
[150 000-450 000]	4	(31)
Hb g/dl		
< 8	8	(61)
[8-10]	4	(31)
> 10	1	(8)
type d'anémie		
hypochrome microcytaire	2	(18)
normochrome normocytaire	8	(73)
macrocytaire	1	(9)

Le diagnostic morphologique, basé sur la classification FAB (French-American-British Cooperative Group) après coloration au MGG et à la benzidine, a été aisé parce que les blastes représentaient en moyenne 45 % de la population des cellules médullaires. Nous avons identifié 6 leucémies *de novo*, dont 2 leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de type L₁, 2 LAL₂, 2 leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de type M₂ et 7 LAM secondaires à des leucémies myéloïdes chroniques (LMC). Grâce à l'immunophénotypage, nous avons pu déterminer la lignée cellulaire impliquée (tableau II). En effet, dans une des LAL₁, les blastes appartenaient à la lignée B mature ; ils se caractérisaient par la présence de marqueurs généraux de la lignée B (CD10, CD19, HLA-DR) et de marqueurs de

Tableau II.

Caractéristiques des leucémies aiguës *de novo*.
Characteristics of *de novo* acute Leukemias.

sexe	age	cytologie	blastes (%)	MPO	phénotypage	classification EGIL	conclusion	pronostic
F	14	LAL ₁	85	-	CD19+/CD10+ CD5-/CD20+ CD3+/CD22+ CD33-/CD7- CD13+/HLA-DR+	B III	LAL B mature	bon
F	13	LAL ₁	25	-	CD19-/CD10- CD5+/CD20- CD3+/CD22- CD33-/CD7+ CD13-/HLA-DR-	T IV	LAL T mature	mauvais
F	10	LAL ₂	89	-	CD19+/CD10- CD5-/CD20- CD3-/CD22- CD33-/CD7- CD13-/HLA-DR+	B I	LAL B immature	bon
M	51	LAL ₂	90	-	CD19+/CD10+CD5-/CD20+CD 3+/CD22+ CD33-/CD7-CD13+/HLA-DR+	B III	LAL B mature	mauvais
F	28	LAM ₂	75	+	CD19+/CD10-CD5-/CD20-CD3- /CD22-CD33+/CD7-CD13+/HLA-DR+	LAM avec maturation	LAM ₂ avec expression du CD19	mauvais
M	16	LAM ₂	62	+	CD19-/CD10- CD5+/CD20- CD3+/CD22-CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR+	LA biphénotypique	LA myéloïde/T	mauvais

maturité que sont les molécules CD20 et CD22. Dans l'autre LAL₁, nous avons retrouvé des antigènes de surface spécifiques à la lignée T mature (CD3, CD5, CD7). Une LAL₂ était de type B mature (BIII), caractérisée par les marqueurs CD19, CD10, CD20, CD22, et l'autre une LAL B immature (BI) avec des blastes CD19⁺, HLA-DR⁺ et CD10⁻, CD20⁻, CD22⁻. Une des LAM₂ identifiée à partir des colorations par le MGG et la MPO était en fait une LA biphénotypique. Les blastes présentaient à côté des marqueurs des cellules de la lignée myéloïde (CD33, CD13), des molécules caractéristiques de la lignée lymphoïde T que sont les CD3 et CD5. Les cellules de six patients atteints de LMC acutisés en LAM ne portaient que les antigènes de surface caractéristiques de la lignée myéloïde CD33 et CD13. Dans une des LMC en transformation aiguë, il s'agissait d'une LA biphénotypique (myéloïde, lymphoïde T), car en plus des marqueurs myéloïdes, nous avons retrouvé d'autres marqueurs caractéristiques de la lignée T que sont les molécules CD3 et CD5 (tableau III).

Tableau III.

Caractéristiques des leucémies myéloïdes chroniques en transformation aiguë.
Characteristics of the chronic myeloid Leukaemias developing into acute Leukaemias.

sexe	age	blastes (%)	phénotypage	conclusion
M	16	11	CD19-/CD10- CD5-/CD20- CD3-/CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR-	LAM
F	14	57	CD19-/CD10- CD5-/CD20- CD3-/CD22- CD33+/CD7- CD13-/HLA-DR-	LAM
F	39	10	CD19-/CD10- CD5-/CD20- CD3-/CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR-	LAM
M	33	10	CD19-/CD10- CD5-/CD20- CD3-/CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR-	LAM
F	28	17	CD19-/CD10- CD5+/CD20- CD3+/CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR+	LA biphénotypique (myéloïde /T)
M	45	15	CD19-/ CD10- CD5-/CD20- CD3- / CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR-	LAM
M	60	5	CD19-/ CD10- CD5+/CD20- CD3-/ CD22- CD33+/CD7- CD13+/HLA-DR+	LAM

Discussion

En six mois, nous avons détecté treize cas de LA. D'autres auteurs, en faisant le bilan des traitements des LA sur cinq années d'expérience du service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon, avaient recensé quarante-cinq cas, soit une moyenne de neuf cas par an (10). Nos résultats mettent-ils en évidence une augmentation de l'incidence des LA ? Cette augmentation pourrait être due à divers facteurs étiologiques tels que le benzène et les radiations ionisantes auxquels la population est de plus en plus exposée. En outre, le service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon, qui concourt à la formation de nombreux spécialistes d'hématologie clinique, reçoit plusieurs cas d'hémopathies malignes de la sous-région ouest-africaine.

L'altération de l'état général, l'hépatomégalie et la splénomégalie ont constitué les manifestations cliniques les plus fréquentes liées à la prolifération tumorale et l'insuffisance médullaire. L'anémie normochrome normocytaire et la thrombopénie étaient en général associées à une hyperleucocytose. Tous ces signes cliniques et biologiques sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs (6, 7). Nos résultats confirment ceux d'autres auteurs qui ont montré que l'immunophénotypage était un outil incontournable pour l'étude des LAL (1, 2, 6, 8, 9, 11-15). En effet, la distinction entre les formes T ou B a une répercussion, non seulement sur le protocole thérapeutique utilisé, mais aussi sur le pronostic (2). Dans notre étude, les deux sujets présentant les LAL₁ étaient des enfants. Une était de type T et l'autre de type B mature. Selon certains auteurs (14, 16), les LAL de type T ont un très mauvais pronostic chez les enfants et les LAL de type B mature ont un bon pronostic.

Concernant les LAL 2, l'une était B CD10⁻ chez un enfant dont le pronostic était favorable. L'autre, B CD10⁺, chez un

adulte, était de très mauvais pronostic (3). Les LAL B CD10⁻ sont généralement de très mauvais pronostic, contrairement à ce qui a été observé chez notre patient. Les LAL B CD10⁺ sont le plus souvent de bon pronostic chez l'enfant et de très mauvais pronostic chez l'adulte, comme c'est le cas de nos deux autres patients. Ces différences d'évolution des LAL B, qu'elles soient L1 ou L2, sont en fait directement liées à la présence d'anomalies génétiques différentes.

Parmi les LA *de novo*, la morphologie et la cytochimie nous ont permis d'identifier deux LAM₂. La LAM₂ de l'enfant était en fait une LA biphénotypique avec, d'une part des cellules de type myéloïde possédant de la MPO et les molécules CD33, CD13, et d'autre part des cellules de type T porteuses des molécules CD3 et CD5, soit un score de 4 points pour la lignée myéloïde et de 3 points pour la lignée lymphoïde T. Selon la littérature, les LA biphénotypiques sont de très mauvais pronostic (2, 6, 12). La deuxième LAM₂, malgré la présence de la molécule CD19, était une vraie LAM. Il est

vrai que l'analyse cytogénétique à la recherche d'une translocation (t8-21) n'a pas été effectuée. Cependant, il n'y avait qu'un score de 1 point en faveur de la lignée lymphoïde B (CD19⁺) et de 4 points pour la lignée myéloïde (MPO⁺, CD33⁺, CD13⁺). Cette LA était de mauvais

pronostic parce que, dans les LAM, la molécule CD19 serait associée à un faible taux de rémission complète et à une mauvaise survie (14).

Nos résultats ont montré que l'immunophénotypage servait non seulement au diagnostic initial, mais aussi au suivi de la maladie, c'est à dire à l'appréciation de la maladie résiduelle, comme l'ont rapporté d'autres auteurs (6). En effet, un des enjeux en onco-hématologie est de détecter, et si possible de quantifier cette masse résiduelle leucémique, donnant la possibilité d'adapter éventuellement les stratégies thérapeutiques. Selon certains auteurs (5), l'immunophénotypage est très utile parce qu'il a une sensibilité supérieure à l'étude morphologique et à l'analyse caryotypique. Il est aussi utilisé dans les syndromes myéloprolifératifs à la recherche d'arguments en faveur d'une transformation aiguë (13). Dans les cas de LMC de notre population d'étude, malgré une altération de l'état général, les anomalies de l'hémogramme et une mauvaise réponse aux traitements, le taux de blastes ne permettait pas souvent de conclure à une LA et d'en préciser le type comme l'ont rapporté d'autres auteurs (4, 7). Ainsi grâce à l'immunophénotypage, nous avons pu analyser une quantité plus importante de cellules nous donnant des arguments pour conclure à une transformation aiguë. De plus, nous avons pu mettre en évidence une LMC qui a acutisé en LA biphénotypique avec un score de 3 en faveur de la lignée lymphoïde T (CD3⁺, CD5⁺) et un score de 4 en faveur de la lignée myéloïde (MPO⁺, CD 13⁺, 33⁺). Ces LA secondaires sont toujours de mauvais pronostic.

Conclusion

Bien que nous n'ayons pas aplani toutes les difficultés techniques, l'étude immunophénotypique des populations leucémiques nous a permis de compléter la morphologie et

la cytochimie en caractérisant mieux le clone leucémique. L'intégration des anomalies génétiques recommandée par la nouvelle classification des LA (17) étant difficile à réaliser dans notre contexte d'exercice, l'immunophénotype reste une étape essentielle dans la démarche diagnostique, tout en apportant quelques indications pronostiques.

Références bibliographiques

1. BASSO G, BULDINI B, DE ZEN L & ORFAO A - New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*, 2001, **86**, 675-692.
2. BENE MC, LEES O, FAURE G & LE GEIL - Immunophénotypage des leucémies : recommandations. *Revue Française des Laboratoires*, 1996, **267**, 47-52.
3. FIERE D & DANAILA C - Traitement des leucémies aiguës lymphoïdes de l'adulte. *Rev Prat*, 1996, **46**, 55-61.
4. FLANDRIN G - La nouvelle classification OMS des hémopathies malignes. Hémopathies myéloïdes. *Hématologie*, 2001, **7**, 136-141.
5. GABERT J - Utilité de la biologie moléculaire dans le diagnostic des leucémies aiguës et l'évaluation de la maladie résiduelle. *Rev Prat*, 1996, **46**, 42-47.
6. GORIN NC & NAJMAN A - Les leucémies aiguës. In: NAJMAN A (Eds) - *Hématologie. Précis des maladies du sang. Tome II*. Ellipses Marketing, Paris, 1994, pp 156-187.
7. IMBERT M, JOUAULT H & TULLIEZ M - Cytologie des leucémies aiguës. *Rev Prat*, 1996, **46**, 23-29.
8. JOUAULT H - Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*, 2002, **344**, 25-30.
9. KALEEM Z, CRAWFORD E, PATHAN MH, JASPER L, COVINSKY M A et al - Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, **127**, 42-48.
10. KOFFI KG, EMMOU AS, DIOP S, AKA-ADJO MA, N'DATHZ EN et al. - Résultats et complications du traitement d'induction des leucémies aiguës chez l'Africain noir. Expérience du service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon (Abidjan). *Méd Afr noire*, 1997, **44**, 642-645.
11. KRAWCZYNSKA A & ROBAK T - Monoclonal antibodies in diagnosis of acute leukemias. *Przegl Lek*, 1996, **53**, 20-25.
12. LACOMBE F, DURRIEU F, BRIAIS A, DUMAIN P, BELLOC F & al. - Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 1997, **11**, 1878-1886.
13. LEMOINE F - Phénotypage immunologique des hémopathies malignes. In: NAJMAN A (Eds) - *Hématologie. Précis des maladies du sang. Tome II*. Ellipses Marketing, Paris, 1994, pp 16-22.
14. MERLE-BERAL H & BOUCHEIX C - Contribution du typage immunologique au diagnostic et au pronostic des leucémies aiguës. *Rev Prat*, 1996, **46**, 30-36.
15. PIEDRAS J, LOPEZ-KARPOVITCH X & CARDENAS M R - Cellular immunophenotypes in 97 adults with acute leukaemia. *Rev Invest Clin*, 1997, **49**, 457-64.
16. SCHAISON G, BARUCHEL A & LEBLANC T - Traitement des leucémies aiguës lymphoïdes de l'enfant. *Rev Prat*, 1996, **46**, 48-54.
17. VALENSI F - Classification des leucémies aiguës. Nouvelles propositions de l'OMS. *Revue Française des Laboratoires*, 2002, **344**, 19-24.