Caractéristiques épidémiologiques des patients

1.1. Type et cadre d'étude

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

1.2. Echantillonnage

♣ Population d'étude

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

♣ Critères d'inclusion

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

♣ Critères de non inclusion

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

1.3. Paramètres étudiés

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

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

- Le score de Matutes à l'immunophénotypage ainsi que la positivité ou non du CD38. Un pourcentage de cellules CD38+ ≥ 30% était considéré comme positif.

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

1.4. Méthodes d'analyse

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

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

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

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

Tableau IV: Matériel et réactif nécessaires pour l'immunocytochimie

Immunocytochimie	
Matériel	**Réactifs**
o Gants o Hotte à flux laminaire o Papier buvard o Bacs de rinçage o Pipettes 0,5-10 µL et 100 µL-1000 µL o Embouts o Tubes sec avec bouchons rouges o Lames chargées o Lamelles o thermomètres o Bain marie o Sopalin o Boîtes porte lames o Microscopes optiques	o Formol 4% o Acide acétique glacial o TBS-Tween 20 (Wash Buffer 20X) o H_2O déminéralisée o Eau du robinet o Hématoxyline de Harris o Ethanol 100° o Toluène (xylène) o Résine (Eukitt) o Anticorps primaire : monoclonal Mouse anti Human BcL_2. Clone 124 (Dako) o Peroxydases Blocking Reagent SM801 (Dako) o Envision ^{TM}/Flex HRP SM803 (Dako) o Envision ^{TM}/Flex Substrate Buffer SM SM803 (Dako) : o Envision ^{TM}/Flex Wash Buffer (Dako) DM831 : TBS Tween 20 (20x) o Envision ^{TM}/Flex target Retrieval Solution DM828 o DAB+ chromogène DM 827 (Dako)

Tableau V: Etapes de la technique de marquage par immunocytochimie

Immunocytochimie	
Prétraitement des lames	
- Fixation : formol 4% + acide acétique (100 ml de formol + 3 ml acide acétique glacial). Recouvrir la lame de la solution de fixation	2 mn
- Rinçage : H2O déminéralisée.	5 mn
- Démasquage antigénique : Tampon PH9 (30mL) + H2O déminéralisée (1,5L), au bain marie à 96°C	20 mn
- Refroidissement des lames : sortir le bac contenant les lames du bain marie	20 mn
- Rinçage : H2O déminéralisée. Plonger les lames dans un bac contenant de l'eau déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Fixation Anticorps primaire : BcL_2 ou Ki67	
- Recouvrir les lames d'anticorps dilué au 1/400 (avec son diluent)	30 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5mn
Inhibition peroxydases endogènes	
- Recouvrir la lame de peroxydase block (250 µL)	15 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Fixation Anticorps secondaire	
- Recouvrir la lame d'anticorps secondaire couplé à une peroxydase	15mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5mn
- TBS-Tween 20- 1X	5mn
Di Amino Benzidine (DAB)	
- Recouvrir les lames de la solution contenant la DAB : 1ml de H_2O pour 1 goutte de DAB	8 mn
Rinçage	
- H2O déminéralisée	5 mn
- TBS-Tween 20-1X	5 mn
Contre coloration à l'hématoxyline de Harris	
- Recouvrir la lame d'hématoxyline dilué au ¼ en eau déminéralisée	8 mn
- Rincer longuement les lames avec de l'eau du robinet	5 mn
Déshydratation	
- Plonger les lames dans un bac contenant de l'éthanol 100°- Dans 3 bacs successifs	2mn x 3
- **Sous hotte :** plonger les lames dans un bac contenant du xylène-Dans 3 bacs successifs	1 mn x 3
Montage	
- Déposer une goutte de résine sur la lame puis recouvrir d'une lamelle	
- Attendre 15minutes avant de lire au microscope optique (x 40)	

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

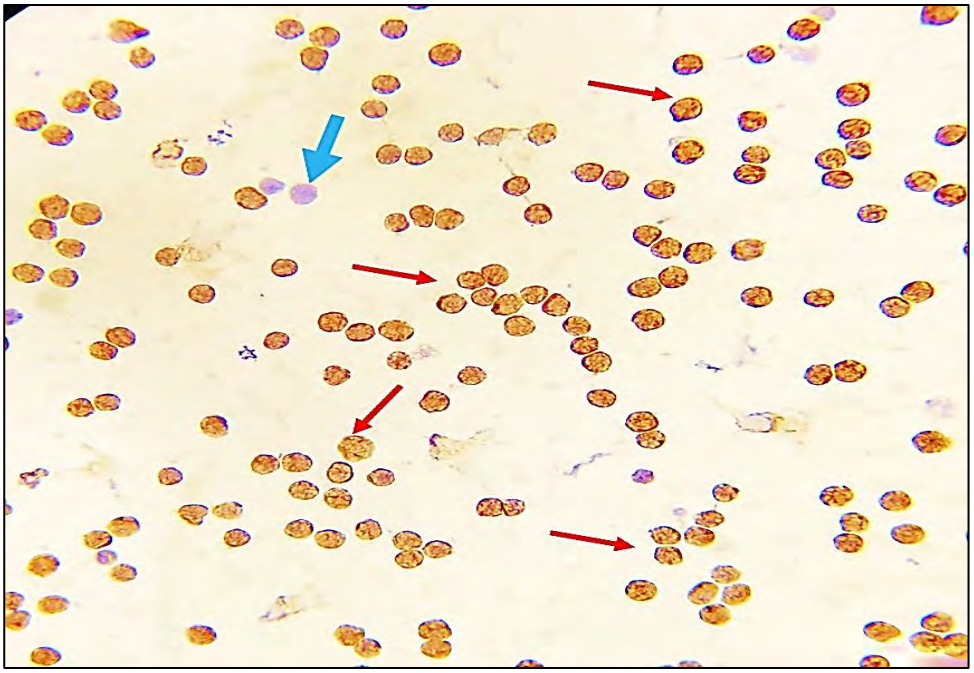

Figure 9: Exemple d'un marquage immunocytochimique positif. Flèches rouges = cellules positives; Flèche bleu = rares cellules négatives. Copyright Laboratoire Hématologie HALD

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

1.5. Analyse statistique

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

2. Résultats

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

♣ Age

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

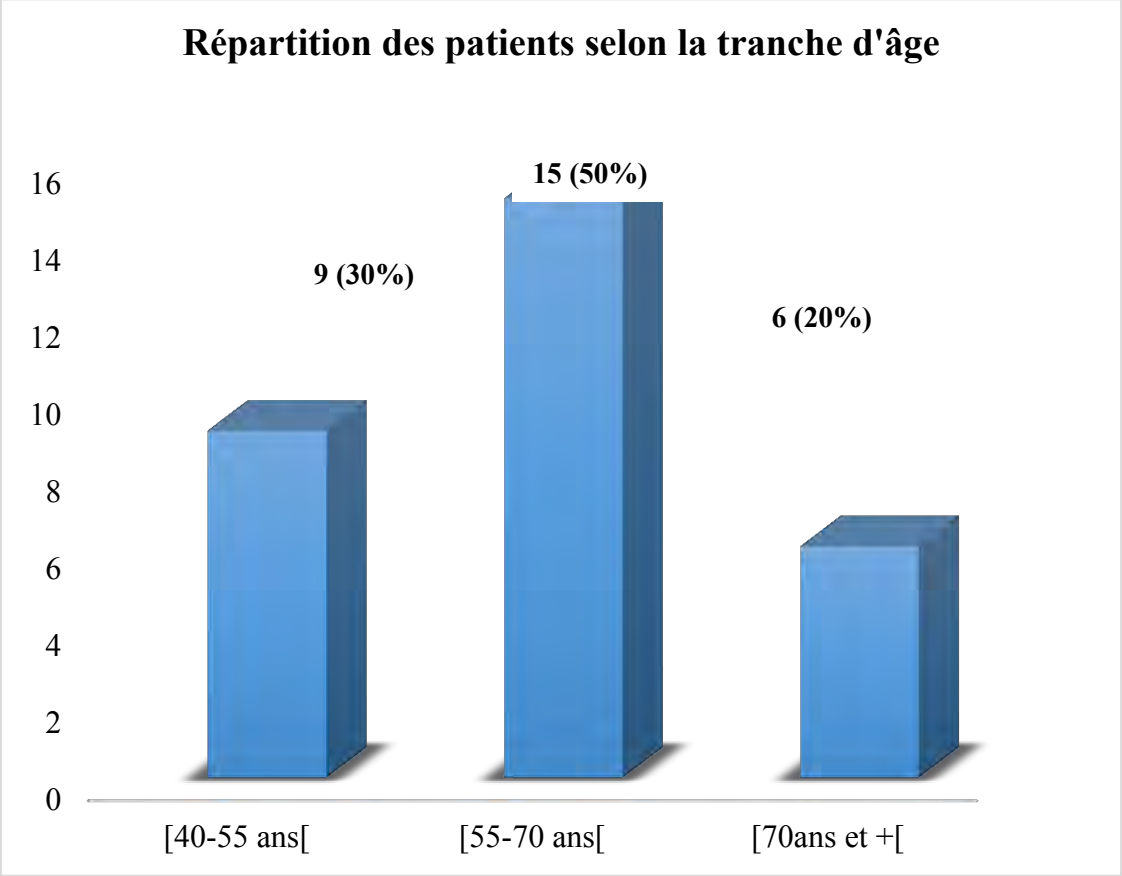

Figure 10: Répartition des patients selon la tranche d'âge

♣ Sexe

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

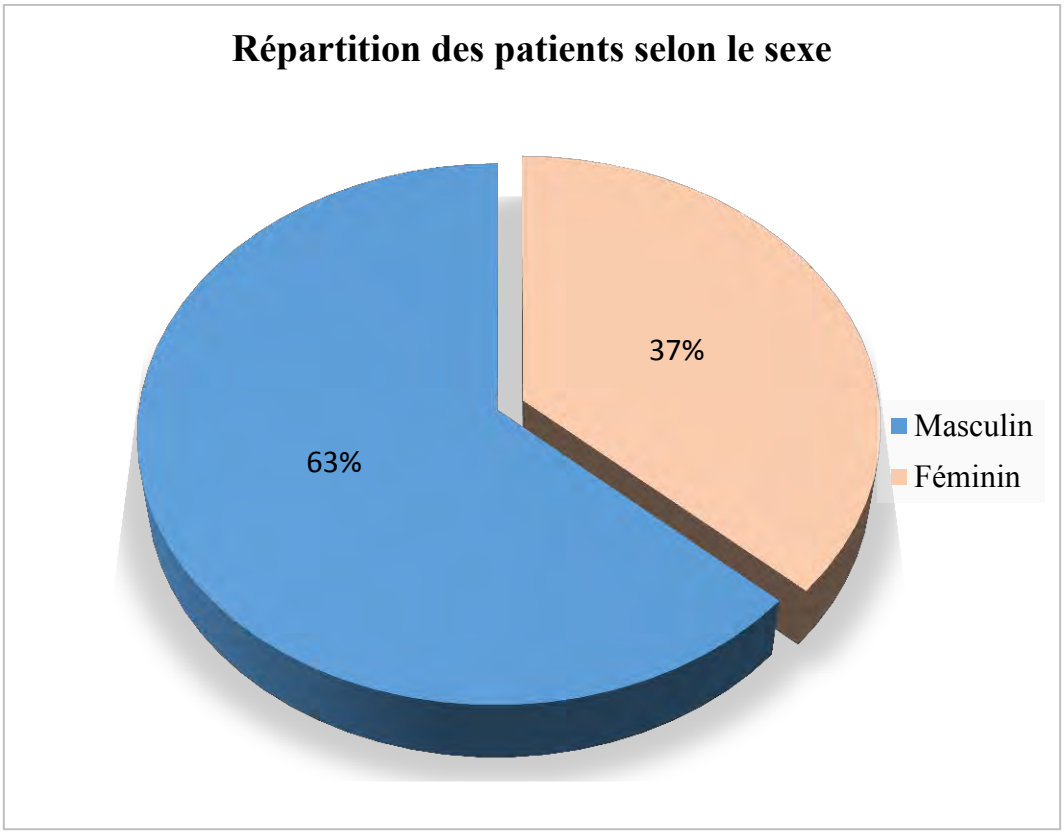

Figure 11: Répartition des patients selon le sexe

2.2. Hémogramme

♣ Leucocytes

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

♣ Lymphocytes

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

♣ Taux d'hémoglobine

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

♣ Plaquettes

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

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

Globules blancs en G/L		
Intervalles	**Nombre de patients (n=30)**	**Pourcentage %**
< 50	8	26,6
50 – 100	5	16,7
> 100	17	56,7
Lymphocytose en G/L		
Intervalles	Nombre de patients (n=30)	Pourcentage %
< 60	10	33,3
≥ 60	20	66,7
Taux d'hémoglobine en g/dl		
Intervalles	**Nombre de patients (n=30)**	**Pourcentage %**
< 5	3	10
5 – 10	14	46,7
10 - 12	5	16,7
≥ 12	8	26,6
Taux de plaquettes en G/L		
Intervalles	**Nombre de patients (n=30)**	**Pourcentage %**
< 50	6	20
50 - 150	7	23,3
> 150	17	56,7

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

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

2.3. Pourcentage d' « ombres de Gümprecht »

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

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

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

2.4. Stade de Binet

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

Tableau IX: Répartition des patients selon la Classification de Binet

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

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

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

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

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

Tableau X: Répartition des patients selon le score de Matutes

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

Près de ¾ de nos patients (73,3%) étaient CD38+ (≥ 30% de cellules exprimant le CD38). Le pourcentage moyen de cellules CD38+ était de 51,6% ± 33,8 avec une médiane de 62% [0,26 – 98%]. Il n'y avait pas de corrélation entre le CD38 et les autres facteurs : lymphocytose, Stade de Binet, Score de Matutes et pourcentage d'OG, p respectivement égal à 0,559 ; 0,08 ; 0,195 et 0,935.

2.6. Immunocytochimie

♣ Expression de Bcl-2

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

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

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

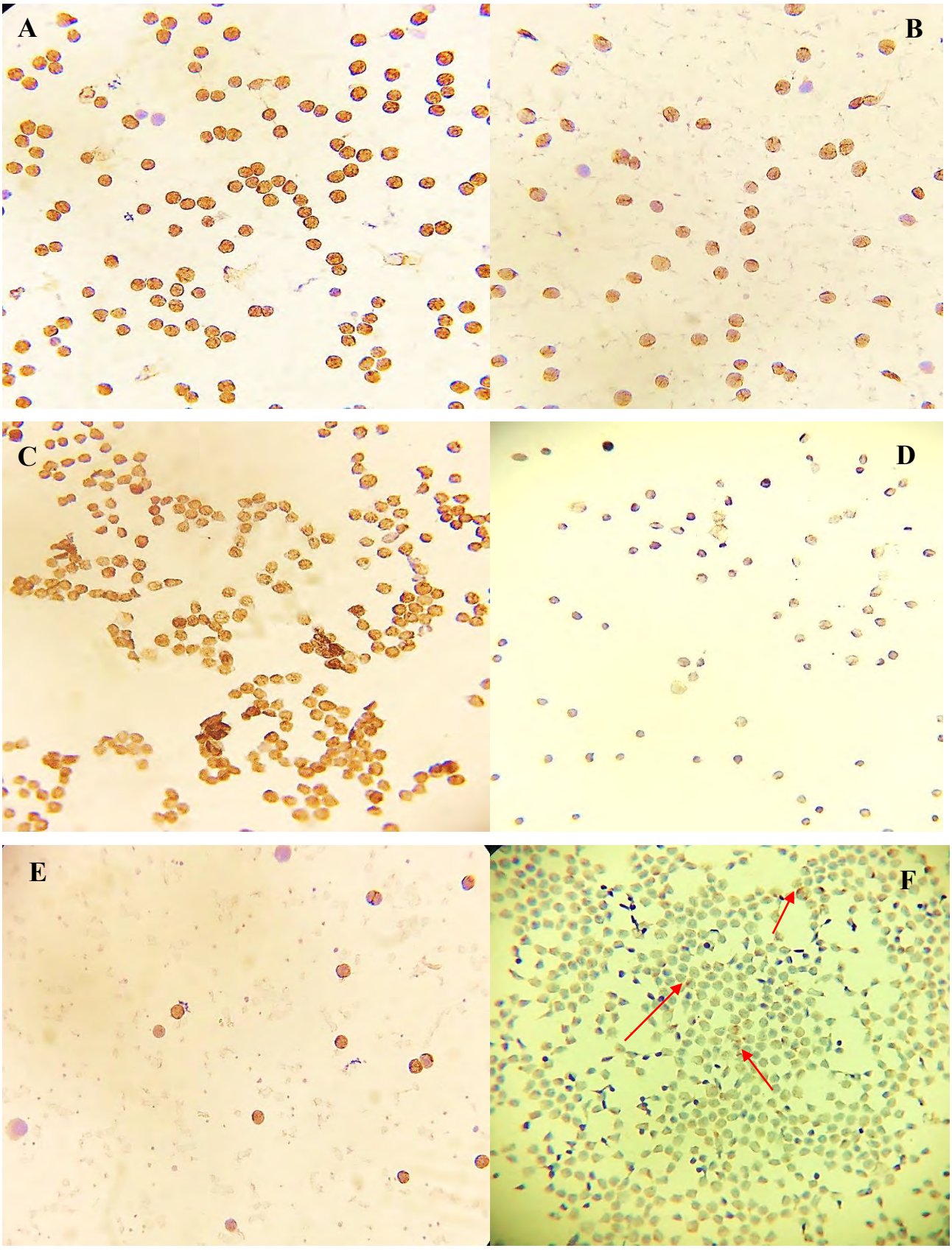

Figure 12: Image du marquage de quelques patients avec une forte positivité du Bcl-2 : la positivité est homogène pour les images A, B, C, D, E et hétérogène n'intéressant qu'une partie de la cellule pour l'image F (flèches). Copyright Laboratoire Hématologie HALD

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

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

♣ Expression de Ki67

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

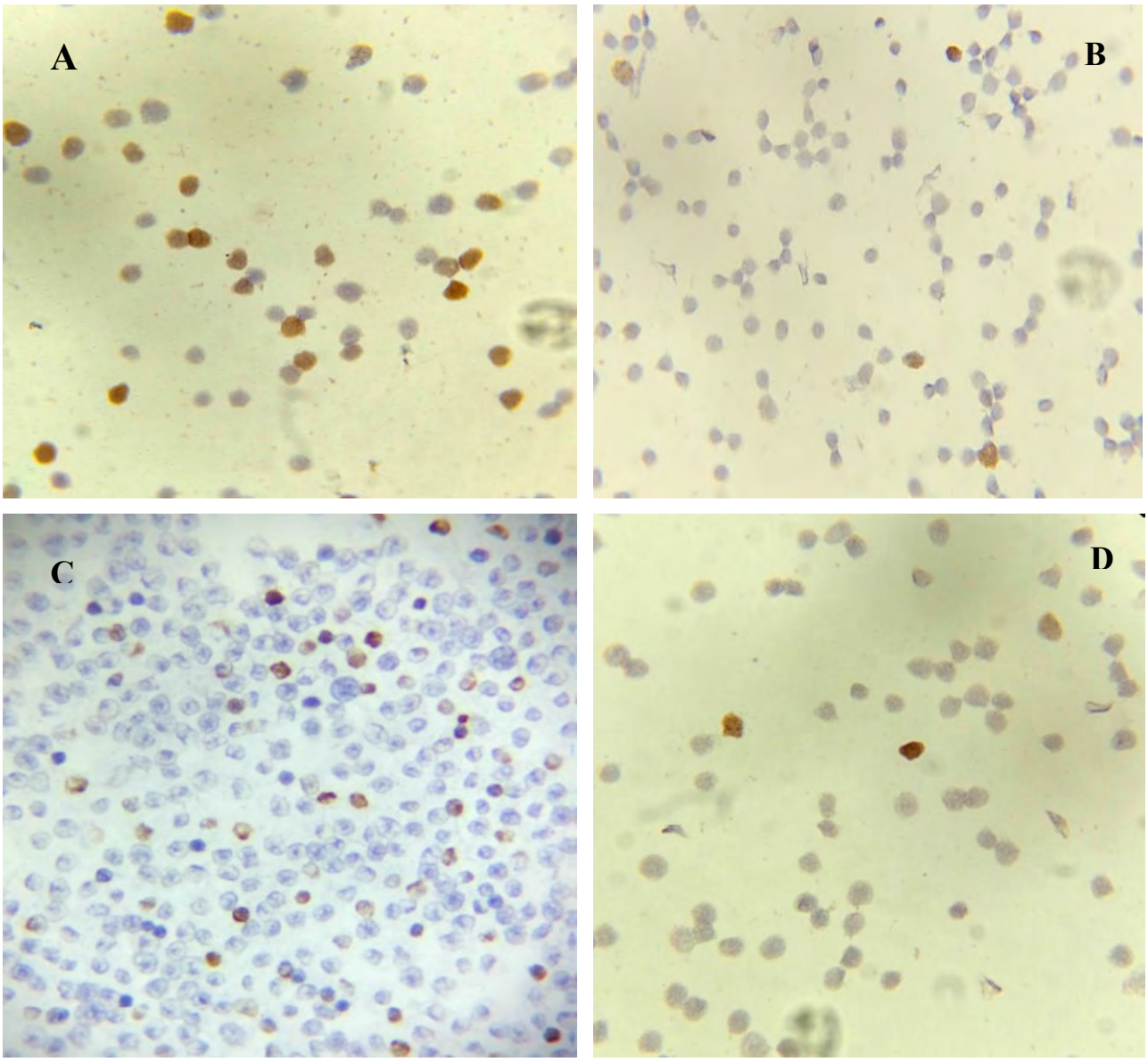

Figure 13: Images du marquage de quelques patients par le Ki67. Les images A et C montrent de nombreuses cellules positives (en marron foncé). Par contre sur les images B et D on voit de rares cellules positives (3 à 4 cellules positives par champs). Copyright Laboratoire Hématologie HALD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

♣ Coexpression Bcl-2/Ki67

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

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

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

3. Discussion

De nombreuses études se sont intéressées à l'expression des protéines Bcl-2 et /ou Ki67 au cours de la LLC ; mais rares sont celles qui utilisent l'ICC comme technique de marquage. Au Sénégal, une étude réalisée par Diop et al en 2005 avait recherché l'expression du Ki67 au cours de la LLC par ICC en utilisant comme système révélateur le complexe biotine-avidine marqué **[41].** La plupart des études utilisent des techniques telles que l'IHC, la cytométrie en flux, l'immunoblot ou immunoprécipitation…**[42–45]**. Ces techniques peuvent paraître lourdes, soit de par leurs exigences techniques (notamment dans la préparation de l'échantillon tissulaire en IHC) ; soit de par le coût élevé de l'équipement nécessaire (Cytomètre en flux). Ainsi, l'application de l'IHC à l'échelle cellulaire (ICC) est une technique qui se révèle aussi utile en cytologie car moins coûteuse et moins invasive que l'histologie. Ceci est d'autant plus valable que dans nos pays, il n'existe pas beaucoup d'histopathologistes. D'où l'intérêt de la mise en place de l'ICC dans notre laboratoire.
Notre étude nous a permis de rechercher par ICC l'expression des protéines Bcl-2 et Ki67 chez 30 patients atteints de LLC. En 3 ans, 46 cas de LLC avaient été diagnostiqués au Sénégal. Cet effectif, de même que celui observé dans d'autres séries africaines **[46–48]** est faible comparé aux séries européennes et américaines **[49, 50]**. Mais la LLC est reconnue comme étant plus fréquente en Europe et aux USA comparés à l'Afrique et à l'Asie **[5, 51–54]**.

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

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

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