

Neutropenia associated with LGL proliferative disease: current aspects

T.LAMY

CHU de RENNES

AVIGNON 10/09/2005

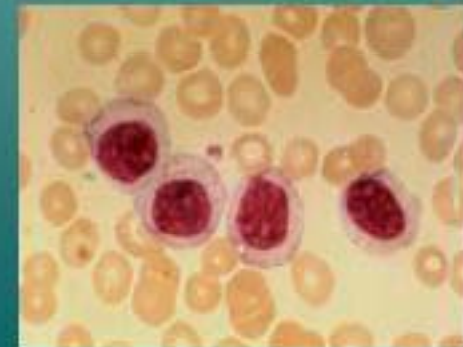
A stylized silhouette of a mountain range in shades of teal, located at the bottom right of the slide.

- ◆ DEFINITION OF LGL PROLIFERATION
- ◆ CLINICO-BIOLOGICAL FEATURES OF LGL LEUKEMIA
- ◆ PATHOPHYSIOLOGY OF CLONAL LEUKEMIC EXPANSION
- ◆ FELTY'SD AND LGL LEUKEMIA
- ◆ PATHOPHYSIOLOGY OF NEUTROPENIA
- ◆ RELATIONSHIP WITH ADULT AI NEUTROPENIA
- ◆ THERAPEUTIC APPROACHES

Nosologic Spectrum of LGL Proliferations: Problem of definition

**Large granular lymphocyte
NK (or T) cell lineage**

Normal value: 250 +/- 40/ μ l



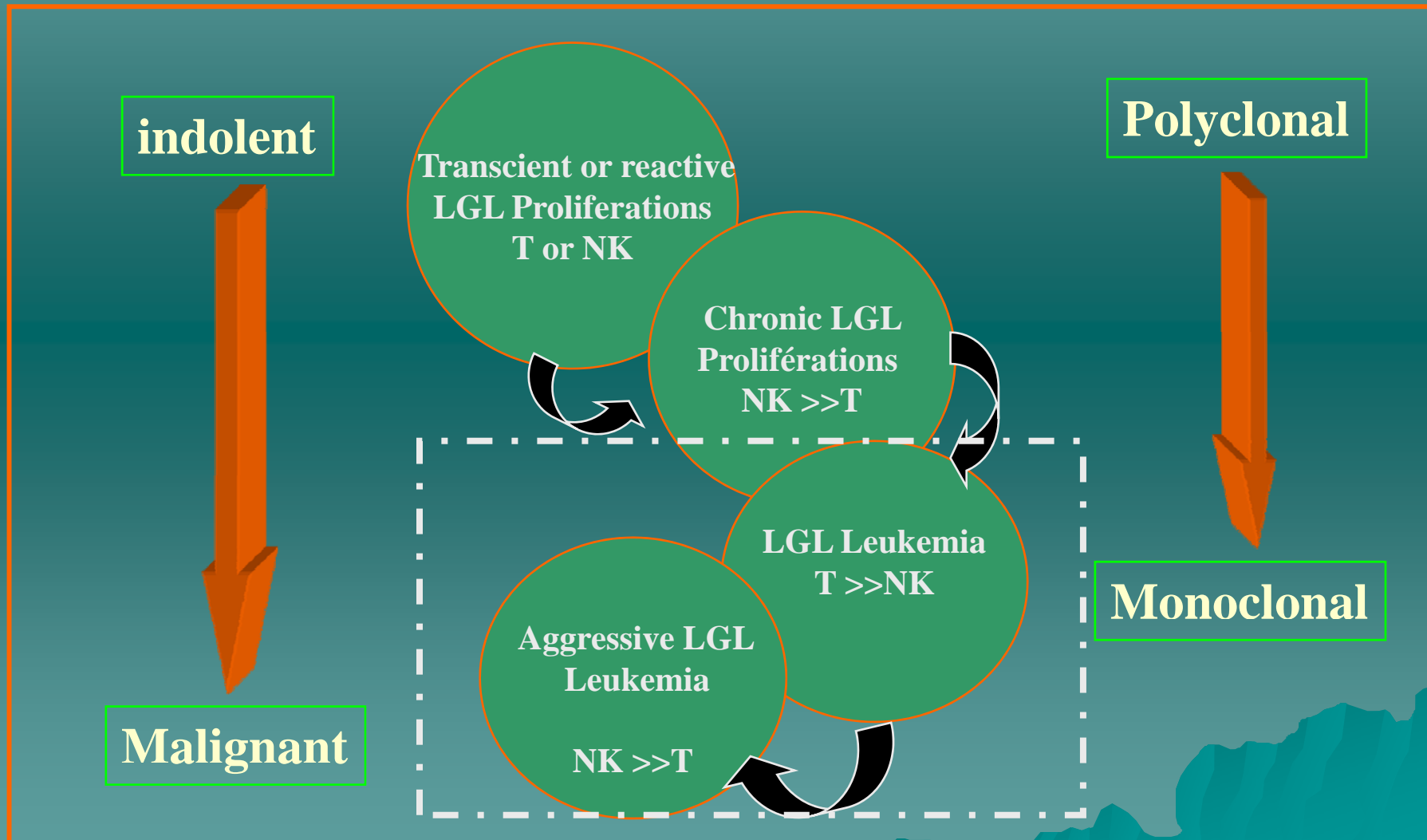
Difficulties in the classification of LGL expansion

- morphology? LGL may lack granules
- phenotype? nl lymphocyte express CD8/CD57/CD56
- LGL count? excess is not mandatory
- clonality? does not imply leukemia

How distinguish LGL leukemia from other forms of LGL prolifer?

By using conjunction of clinical/ morphological / phenotypical / molecular and histological criteria

Nosologic Spectrum of LGL Proliférations: LDGL



Reactive LGL Proliferations

◆ Definition:

- Moderate Lymphocytosis ($< 4 \times 10^9/l$)
- Transient (< 6 months)
- T polyclonal or NK

◆ Causes:

- Infections: VIH, CMV, EBV...
- Connectivitis, ITP, Hemop Sd, MGUS
- NHL, Hodgkin's disease,
- Post-transplantation (HSC / ORGAN)

Chronic T/NK Lymphocytosis

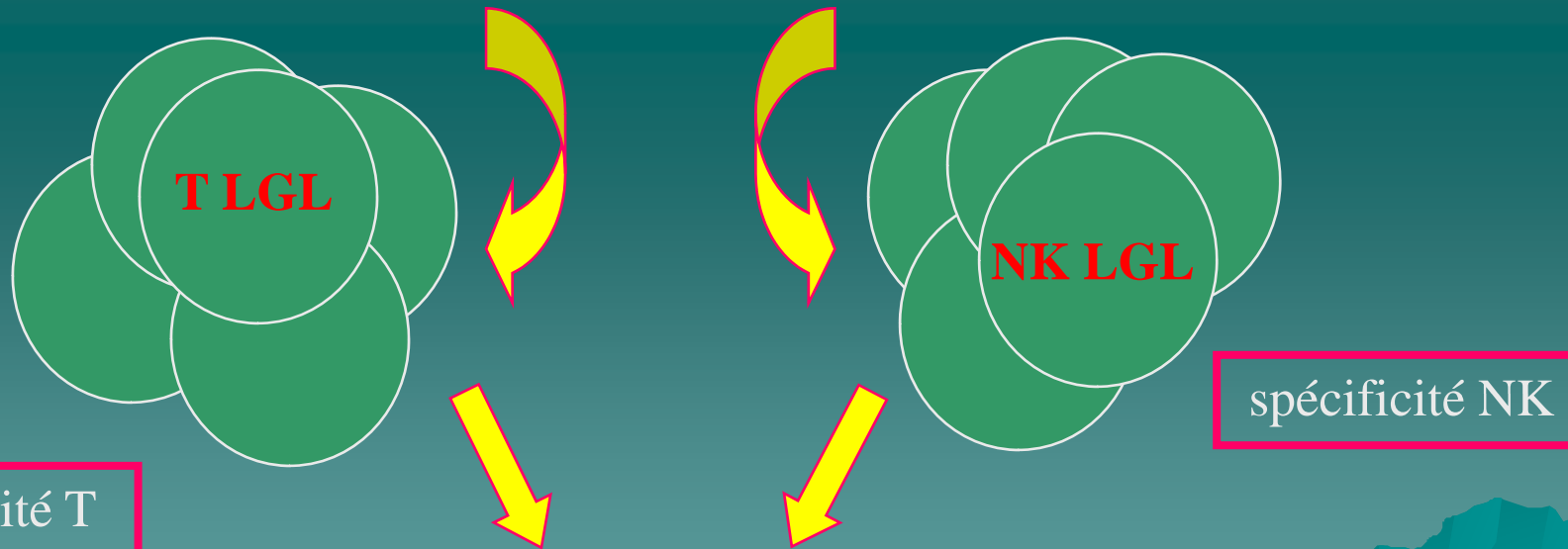
- ◆ **Definition:**
 - **Chronic LGL Proliferations**
 - **Poly or monoclonal**
 - **Lasting from months to several yrs**
- ◆ **Clinical Presentation:**
 - **silent or splenomegaly**
- ◆ **Biological presentation:**
 - **LGL < 10 x 10⁹/l T ou NK**
 - **isolated or associated with cytopenia)**
- ◆ **Associated diseases:**
 - **Same as reactive LGL proliferations**

Post-organ transplantation Chronic T Lymphocytosis

- ◆ 9 cases: LGL (lasting 2-36 months)
- ◆ Kidney: 6 heart: 2
kidney/pancreas: 1
- ◆ CMV Primo.infection: 8/9 cases
- ◆ Indolent disease (except neutropenia = 2)
- ◆ 2 graft rejections
- ◆ 8 T Oligoclonal

Pathogénie des leucémies T/NK LGL

Infection rétrovirale, cytokine (IL2/IL12/IL15/IL18)
dysrégulation voies d'apoptose (Fas/Fas, Trail,...), récepteur KIR



Spécificité T

spécificité NK

Parenté clinico-biologique

LGL Leukemia

- ◆ **First description in 1978**
- ◆ **WHO (Mature T cell and NK cell neoplasms)**
 - **Leukemic:**
 - T . PRL
 - **T-LGL Leukemia**
 - **NK LGL leukemia**
 - ATL
 - **Extra-nodal:**
 - **Cutaneous**
 - **Nodal**
 - **Peripheral T-Cell NHL**
 - **Anaplastic NHL**
 - **AIL**

T LGL Leukemia

- ◆ **Clonal LGL expansion** ($> 2 \times 10^9/l$)
(SB/PCR, RT-PCR, CDR3 seq) or Vbeta/KIR or Karyotype
- ◆ **> 6 months**
- ◆ **LGL organ Infiltration** : Liver, spleen, bone marrow ...
- ◆ **Incidence:?** ($> \text{HCL, SLVL, PRL.T}$)

T LGL Leukemia

◆ *Median age: 60 yr (10 to > 80)*

◆ *Clinical Manifestations Frequency*

Recurrent Infections	30-50%
B Symptoms	20-30%
Splenomegaly	20-50%
Hépatomegaly	10%
Polyadenopathy	< 5%

T LGL Leukemia

◆ *Biological Manifestations* *frequency*

Neutropenia: ANC < 1.5 x 10.⁹/l **80%**

Severe Neutropenia: ANC < 0.5 x 10.⁹/l **45%**

Circulating LGL:

◆ **< 1 x 10.⁹/l** **8%**

◆ **1 - 4 x 10.⁹/l** **40%**

◆ **> 4 x 10.⁹/l** **52%**

Lymphocytosis: > 5 x 10.⁹/l **50%**

Anemia: Hb < 11 g/dl **48%**

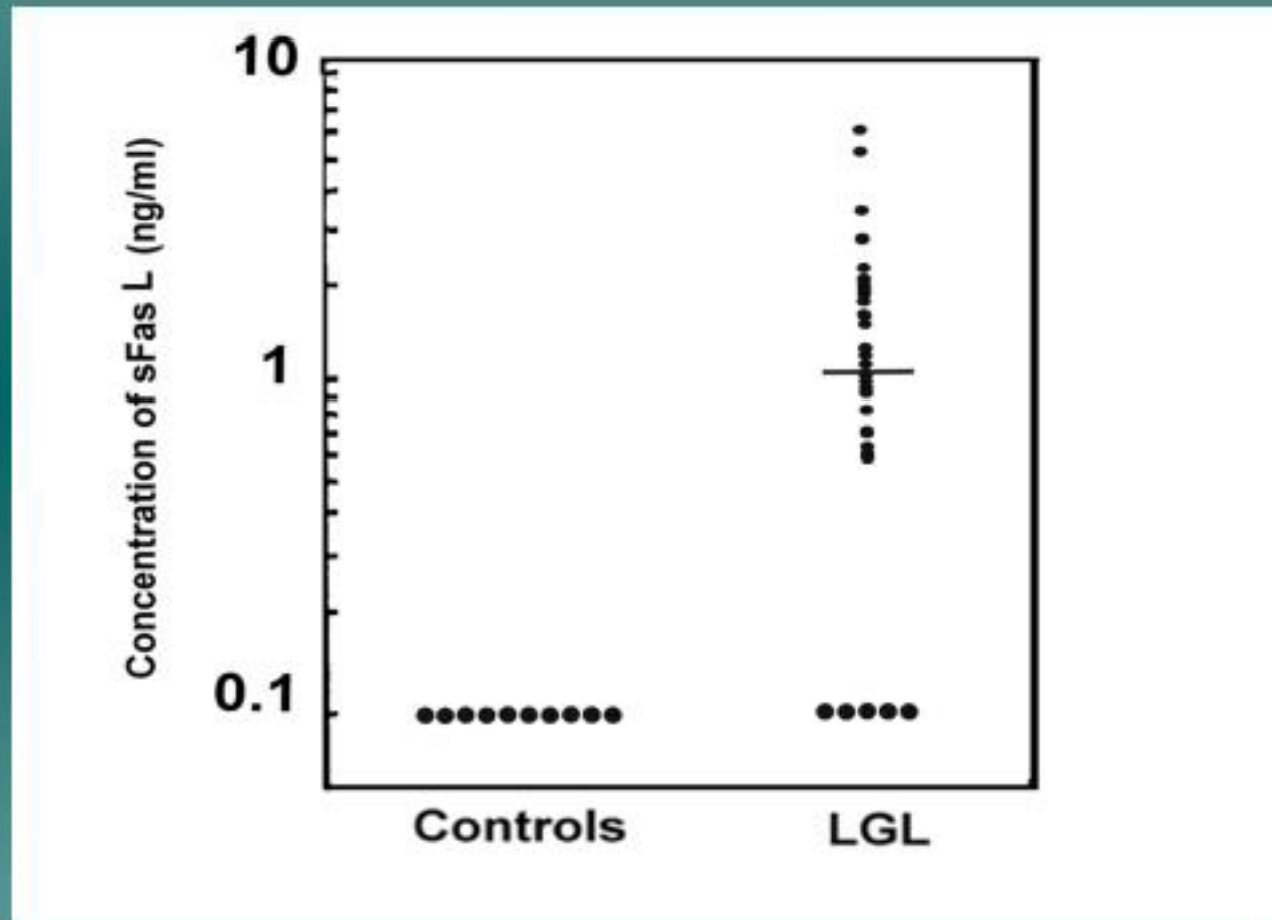
Hb < 8 g/dl **20%**

Thrombocytopenia: < 150 x 10.⁹/l **10%**

T LGL Leukemia

- ◆ **Anti nuclear AB : 20%**
- ◆ **Anti Neutrophil AB? CIC**
- ◆ **Coombs test +**
- ◆ **Polyclonal Hypergamma-globulinemia**
- ◆ **MGUS**
- ◆ **↗ β 2 μ globuline : 65%**
- ◆ **↗ Sol Fas-L : 90%**

Elevated Fas Ligand Levels



NK LGL Leukemia

- ◆ ***Clinical Manifestations*** *frequency:*
 - marrow Infiltration 100%
 - splenomegaly 90%
 - hepatomegaly 60%
 - Polyadénopathy 28%

- ◆ ***Rare Manifestations :***
 - GI Infiltration - NCS infiltration
 - Ascitis/ ITP/divc

- ◆ ***Biological Manifestations***
 - benign or severe Neutropenia 18% / 50%
 - Anemia 100%
 - Thrombocytopenia 75%
 - Hyperlymphocytosis < 10 x 10⁹/l 70%

Etude de la Clonalité

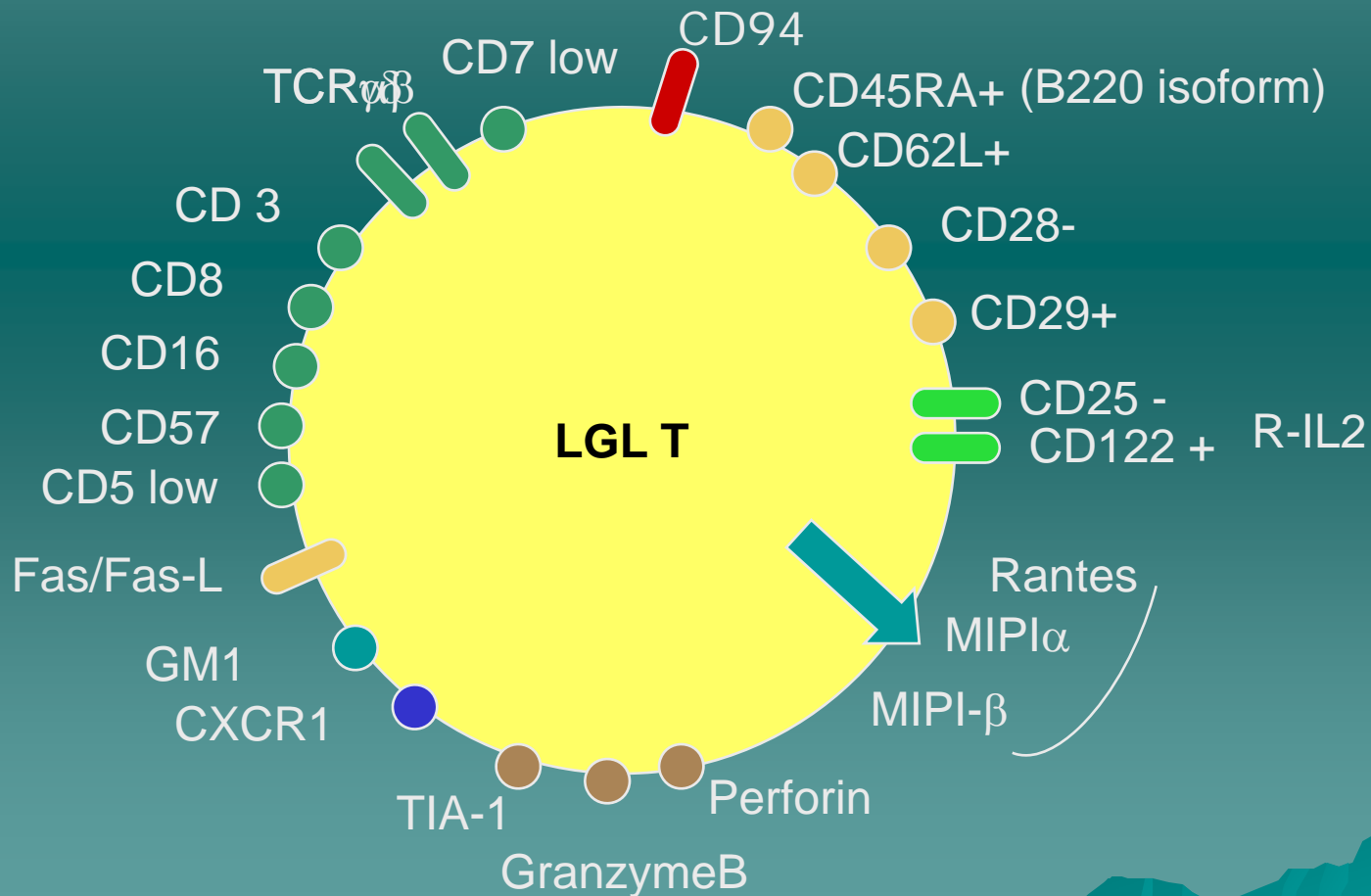
- ◆ Caractéristiques phénotypiques
- ◆ Etude du TCR: phénotypique et moléculaire
- ◆ Régulation des récepteurs NK
- ◆ Caractéristiques cytogénétiques

Etude de la Clonalité (I)

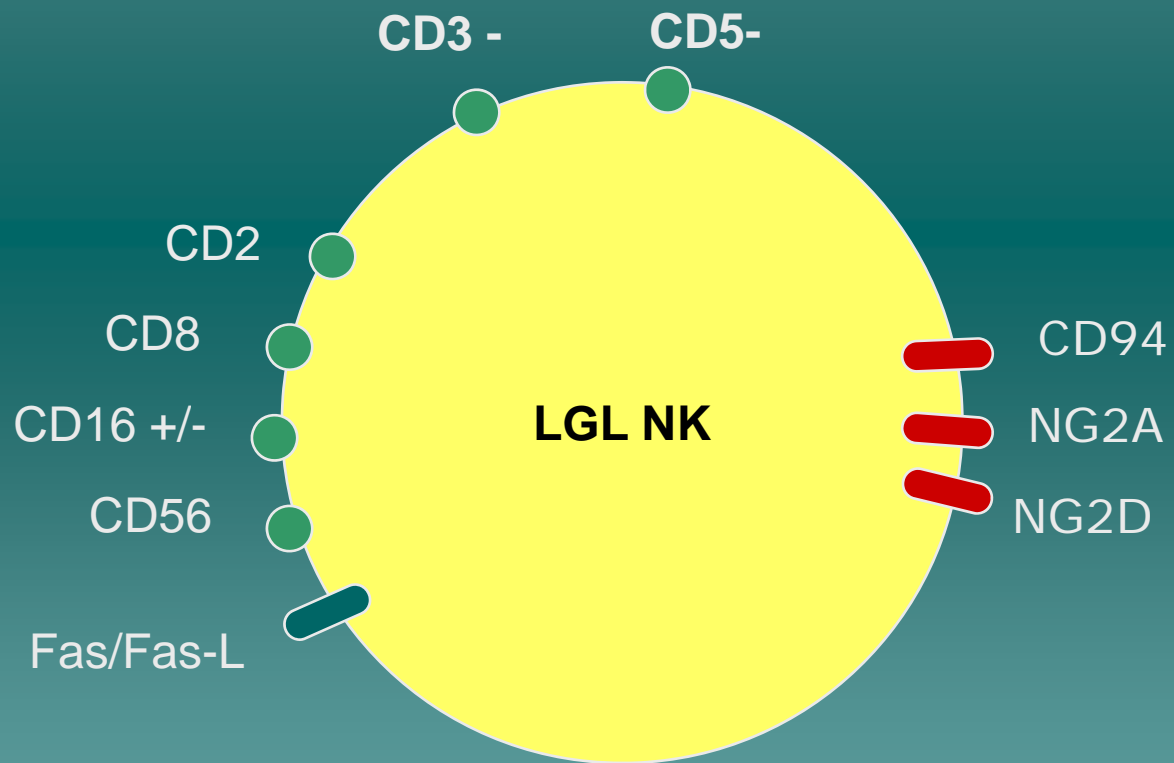
- ◆ **Caractéristiques phénotypiques**
- ◆ Etude du TCR: phénotypique et moléculaire
- ◆ Régulation des récepteurs NK
- ◆ Caractéristiques cytogénétiques

T CD3 + LGL : Immunological features

PECULIAR CYTOTOXIC PHENOTYPE

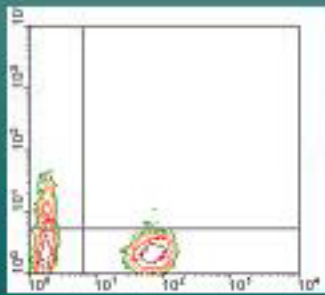


NK CD3 - LGL : Immunological features



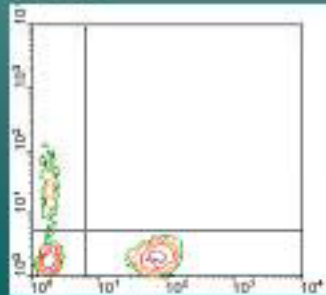
Non informative

CD94



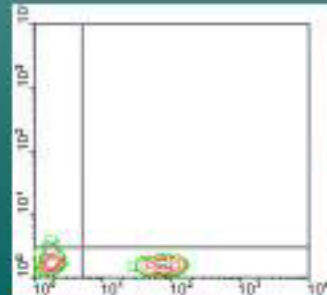
CD3

CD159
NKG2a



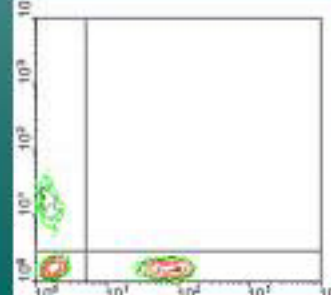
CD3

CD158a



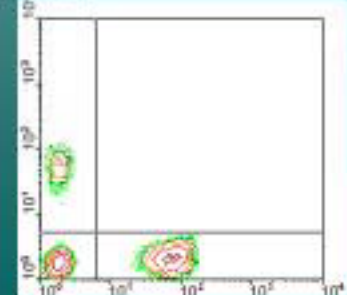
CD3

CD158b



CD3

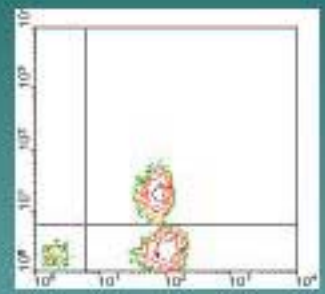
P70
NKB1



CD3

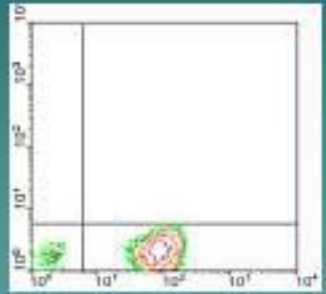
KIR monoclonal

CD94



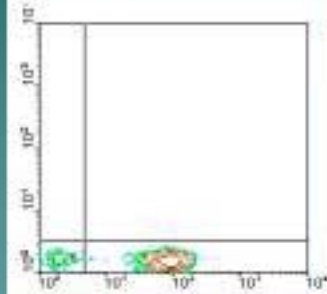
CD3

CD159
NKG2a



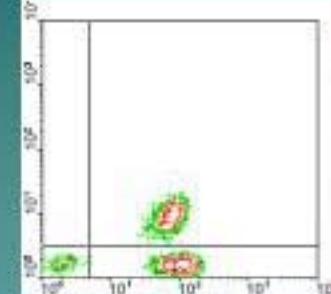
CD3

CD158a



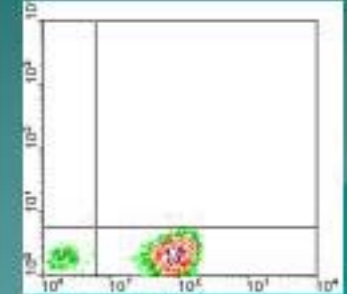
CD3

CD158b



CD3

P70
NKB1



CD3

Etude de la Clonalité (II)

- ◆ Caractéristiques phénotypiques
- ◆ **Etude du TCR: phénotypique et moléculaire**
- ◆ Régulation des récepteurs NK
- ◆ Caractéristiques cytogénétiques

Clonalité et TCR: Leucémie LGL T

◆ Répertoire V Béta par CMF

◆ Réarrangement gènes TCR

– Southern Blot: long, laborieux, faible sensibilité, grande Q d'ADN

– PCR:

◆ ADN génomique: Rapide, faible qualité ADN, MRD

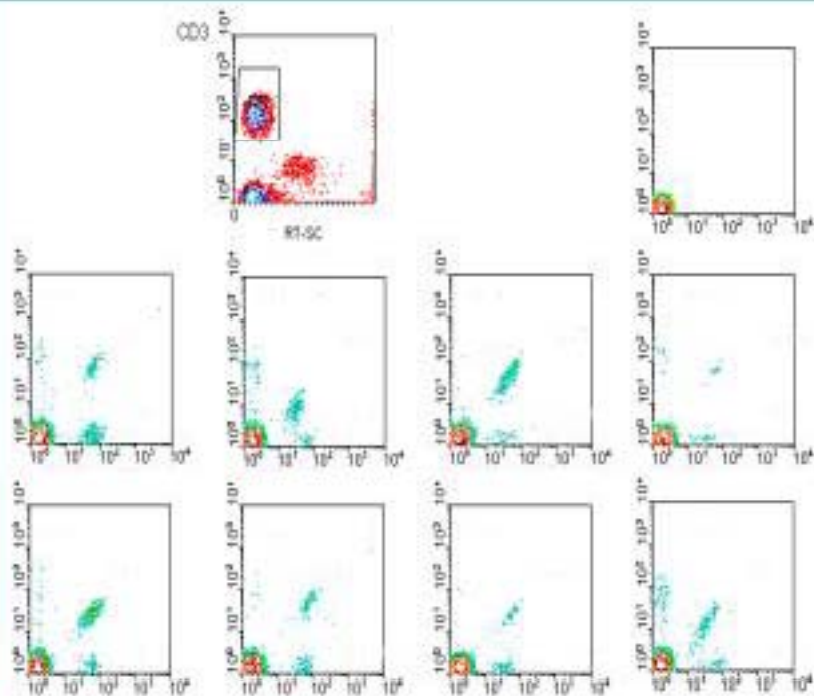
◆ RT-PCR: amplification transcript $V\beta/C\beta$, CDR3 séquençage

Clonalité et TCR (VBéta)

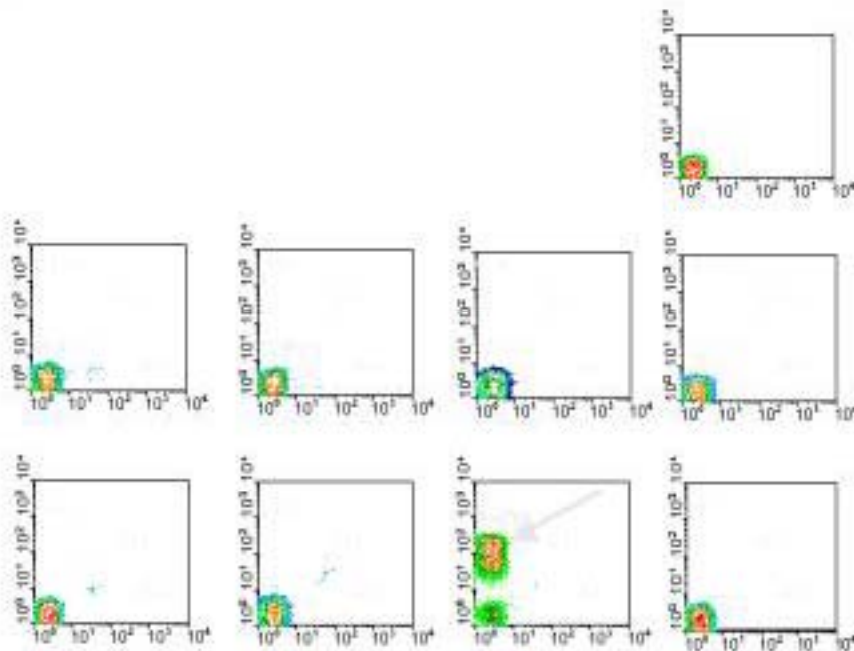
Table 1. V β antibodies and their reactivity in healthy controls

V β antibody specificity	mAb clone	Manufacturer	% V β expression per CD3/TCR $\alpha\beta$ cells*	
			Median (p10-p90)	Upper limit (3 SD)
V β 1	BL37.2	Immunotech	4.1 (3.4-5.9)	8.9
V β 2	MPB2/D5	Immunotech	8.6 (6.2-11.2)	14.0
V β 3	CH92	Immunotech	4.5 (1.5-8.5)	12.5
V β 5.1	IMMU157	Immunotech	6.5 (4.0-8.7)	12.3
V β 5.2/5.3	4H11	T-cell Sciences	3.2 (2.1-3.8)	5.1
V β 6.1	CRI304.3	Immunotech	1.3 (0.5-2.8)	4.1
V β 6.7	OT145	T-cell Diagnostics	3.0 (0.5-5.5)	8.2
V β 7.1	Zoé	Immunotech	2.8 (1.6-4.6)	6.4
V β 8.1/8.2	56C5.2	Immunotech	5.0 (3.5-6.5)	8.6
V β 9.1	FIN9	Immunotech	3.2 (2.1-4.7)	7.2
V β 11.1	C21	Immunotech	0.8 (0.5-1.4)	2.2
V β 12.2	VER2.32	Immunotech	2.4 (1.3-3.6)	6.5
V β 13.1/13.3	BAM13	T-cell Sciences	5.9 (4.3-10.8)	20.5
V β 13.6	JU74.3	Immunotech	2.1 (1.5-3.0)	5.7
V β 14	CAS1.1.3	Immunotech	3.7 (2.1-8.6)	16.9
V β 16	TAMAYA1.2	Immunotech	1.3 (1.0-1.7)	2.2
V β 17	E17.5F3	Immunotech	5.2 (3.8-6.5)	8.9
V β 18	BA62.6	Immunotech	0.5 (0.5-1.5)	2.1
V β 20	ELL1.4	Immunotech	2.4 (1.1-4.1)	5.9
V β 21.3	IG125	Immunotech	2.8 (1.8-4.2)	6.9
V β 22	IMMU546	Immunotech	4.0 (0.6-5.3)	11.1
V β 23	HUT78.7/AF23	Immunotech	1.3 (0.5-2.5)	3.8

Non inform



VB11, clonal



Clonalité et TCR (Vbeta)

T cell expansion :

si > 2 DS (nl) ou

$< 85\%$ de l'ensemble du panel
(défectif)

Clonalité et TCR (VBéta)

<i>Nb</i>	<i>Vbeta</i>			<i>SB</i> +	<i>PCR</i> +	<i>ref</i>
	<i>def</i>	<i>Mono</i>	<i>≥2 clones</i>			
23	6	16	1	100%	100%	<i>langerak</i>
58	-	53	4	100%	100%	<i>Lima</i>
33	4	25	4	nd	100%	<i>O'Keefe</i>
72*	21	37	11	nd	100%	<i>Drénou</i>

* 4 profil nl

Clonalité et TCR (VBéta)

- ◆ Lima: si Vbeta expansion > 60%

VPP 100%

VPN 78%

Sensitivité 81%

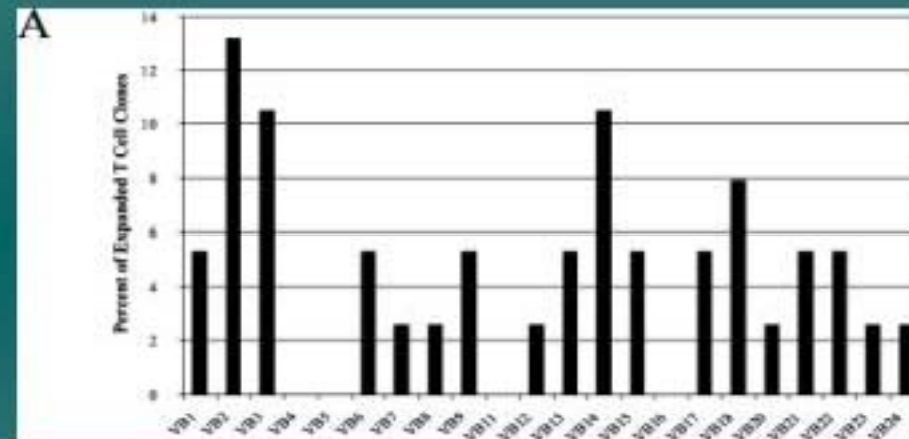
Spécificité 100%

- ◆ Langerak: facile, peu chère, fiable, MRD

Clonalité et TCR (mol)

- ◆ **TCR γ : le plus communément utilisé** (*Sigaux F, Blood 1988*)
 - Diversité restreinte
 - Fort background d'amplification de réarrangements nx T cell
- ◆ **TCR δ :**
 - Indiqué dans les LAL immatures et les proliférations G/D
- ◆ **TCR α :**
 - Forte complexité
 - TCRA réarrangé implique TCR B/G réarrangés
- ◆ **TCR β :**
 - Réarrangé dans toutes les SD lympho T matures

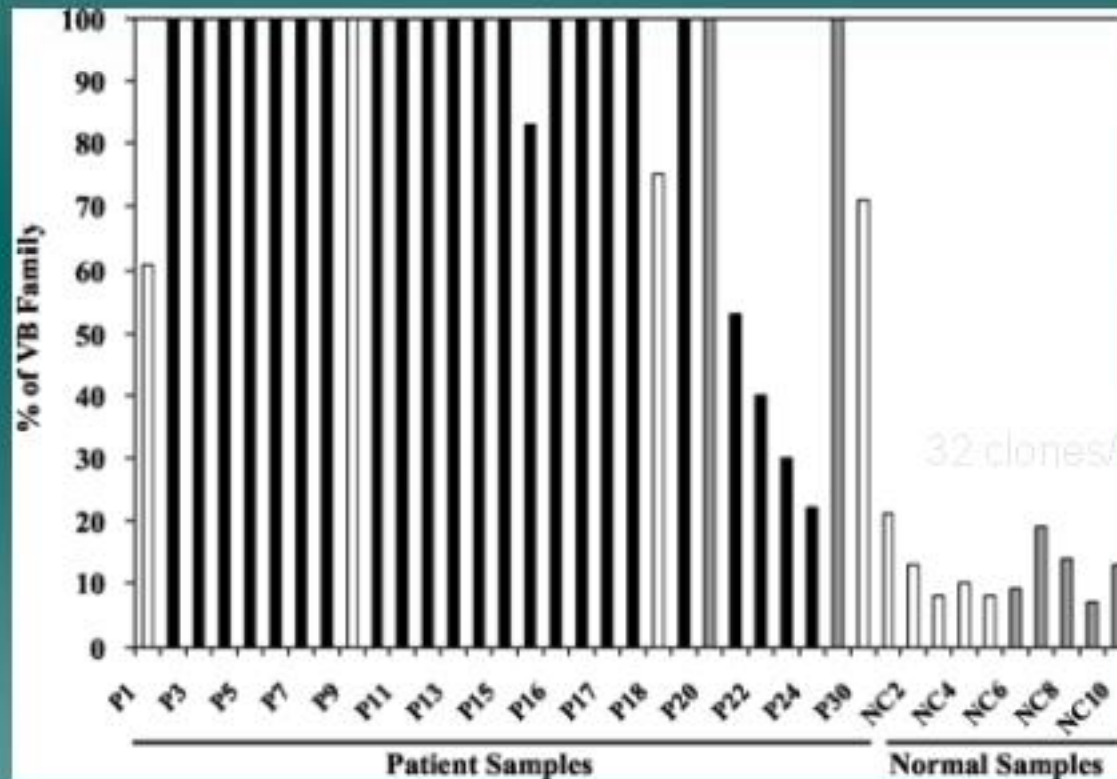
Clonalité et TCR



Pas d'expansion Vb préférentielle

Clonalité et TCR

% récurrence: N clones avec seq id/ N clones seq



Vb13 et Vb3

32 clones/vb fam

Utilisation du TCR: fréquence des clones dominants

Table II. Clonotypes of LGL leukemia expanded T cell clones^a

Pt	Cell	CDR3			VB	JB	%
		VB	NIN	J			
1	CD8	CAS	GQRGG	A	3	2.4	61
2	CD8	CAS	RQPSY	E	22	2.7	100
3	CD8	CAS	IEAVRLASTD	T	17	2.3	100
4	CD8	CASS	LPGTPT	E	9	1.1	100
5	CD8	CASS	LGDPQH	F	8	1.5	100
6	CD8	CASS	LASISYN	E	6	2.1	100
7	CD8	CASS	LEYRVG	E	14	1.4	100
8	CD8	CASS	AGQDT	E	1	1.1	100
9	CD8	CASS	PHGVTVELENT	E	3	1.1	100
10	CD8	CAS	ARSHGLLRA	V	7	2.7	100
11	CD8	CANS	EPPLLDVSGSYN	E	20	1.1	100
12	CD8	CASS	LLTKTGSYBQ	E	14	2.5	100
13	CD8	CAS	GTGILP	G	12	2.6	100
14	CD8	CSA	SGLLAGGPEY	E	2	2.7	100
15	CD8	CATS	RDMCEQ	E	24	2.5	100
	CD8	CASS	HGGLD	E	6	2.1	83
16	CD8	CSA	QTGRYEQ	E	2	2.7	100
17	CD8	CSA	SPLWTGNT	E	2	2.1	100
	CD8	CASS	FRQNN	E	21	2.1	100
18	CD8	CASS	IDRGRRET	Q	17	2.1	100
	CD8	CASS	PLGAVGYN	E	3	2.1	75
19	CD8	CASS	LFVQPPLDIPYN	S	14	2.1	100
20	CD8	CASS	SGPTQGVLDISKT	E	13	1.1	100
21	CD8	CASS	PTLRDRGRTD	T	1	2.3	53
22	CD8	CASS	PFVGDREY	E	18	2.7	40
24	CD8	CASS	AGLN	G	14	1.2	86
25	CD8	CASS	YLLTTGGAVR	S	13	1.6	100
30	CD8	CAS	TWGGNGY	E	3	2.7	71

^a CDR3 sequences are given in amino acid code. The first invariant amino acid of the J region is indicated. Percentage of identical sequences within a given VB family.

analyse clonotypique du TCR

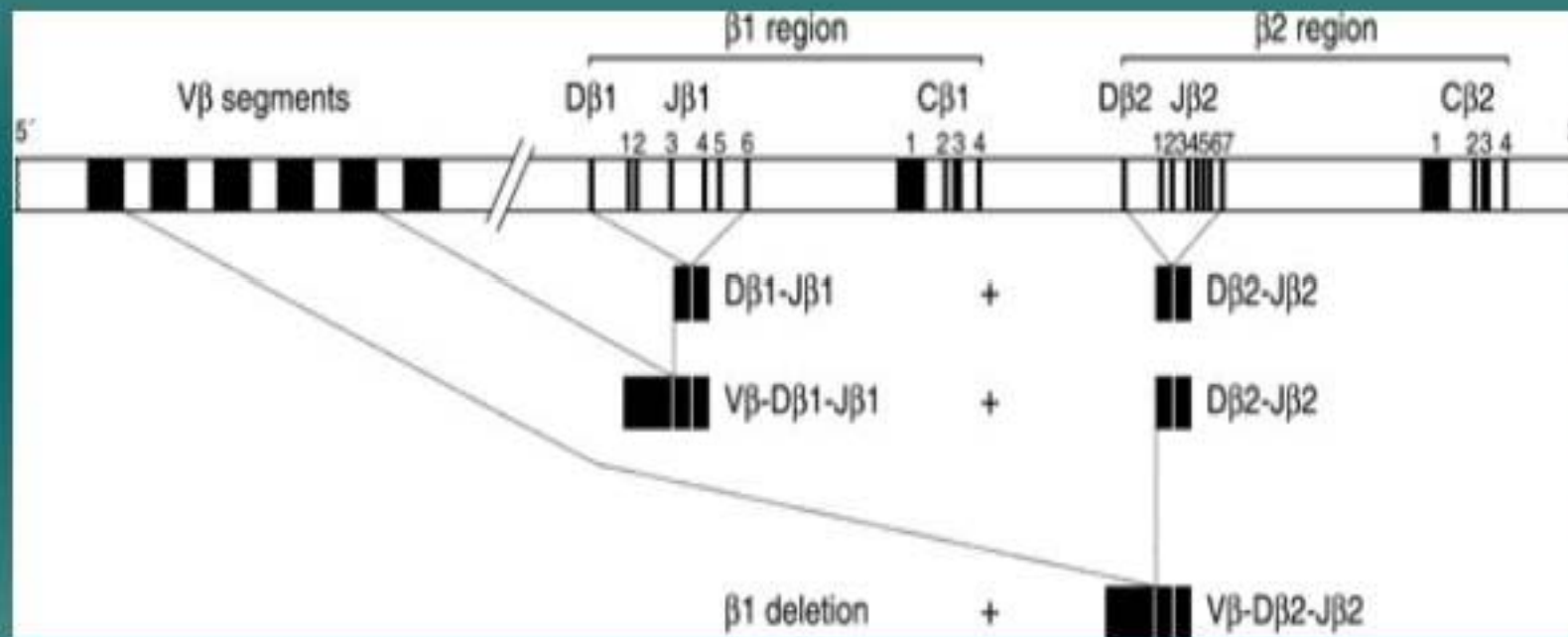
Hétérogénéité d'utilisation TCR

plus une réponse immune qu'à une expansion au hasard d'un clone muté

Possibilité de marqueurs spécifiques

Classification des proliférations LGL

Clonalité et TCR (Biomed)



2 réarrangements indépendants possibles sur un allèle

Clonalité et TCR (Biomed: PCR multiplex)

- ◆ Tube A: 23 V β primers and 9 J β primers: (J 1.1-1.6, J 2.2, J 2.6 and J 2.7).
- ◆ Tube B: 23 V β primers and 4 J β primers: (J 2.1, J 2.3, J 2.4 and J 2.5).
- ◆ Tube C: 2 D β primers (D 1 + D 2) and 13 J β primers (J 1.1-1.6 and J 2.1-2.7).

Clonalité et TCR (Biomed)

Table 1 Number of *TCRB* gene rearrangements detected by PCR relative to the number of SB-detected results

<i>Theoretical number of TCRB rearrangements per disease category^a</i>	<i>Complete Vβ – Jβ (PCR/SB)^b</i>	<i>incomplete Dβ – Jβ (PCR/SB)^b</i>	<i>No PCR product/ G,D,other^c</i>
Mature TCR $\alpha\beta^+$ T-cell malignancies (<i>n</i> = 148)	86% (38/44)	88% (29/33)	92% (65/71)
CD3 negative T-ALL (<i>n</i> = 124)	83% (40/48)	92% (12/13)	97% (61/63)
TCR $\gamma\delta^+$ T-ALL (<i>n</i> = 60)	83% (10/12)	85% (11/13)	100% (35/35)
TCR $\alpha\beta^+$ T-ALL (<i>n</i> = 80)	93% (28/30)	100% (11/11)	92% (36/39)
	87% (116/134)	90% (63/70)	
Total (<i>n</i> = 412) ^a		88% (179/204)	95% (197/208)

^aThe total number of rearrangements is based on the assumption that theoretically four *TCRB* gene rearrangements can occur in one sample, because both *TCRB* alleles contain a D β -J β -C β 1 and a D β -J β -C β 2 region. Consequently, the number of samples is multiplied by four to obtain the number of theoretical rearrangements.

^bProportion of samples with PCR-detectable *TCRB* rearrangements per SB-detected *TCRB* rearrangements.

^cSamples in which no *TCRB* PCR product was detected, whereas in SB analysis a germline configuration, deletion of (part of) the *TCRB* locus or a non-PCR-detectable rearrangement (other) was seen.

Clonalité et TCR (Biomed)

- PCR et SB, concordant dans 91% des cas
- SB+ /PCR-: 6%
- SB-/PCR+: 3%
- T cell mature Malignancies: (20 LGL/36)

100% au – un réarrangement complet

64% un réarrangement incomplet

Clonalité et TCR (Biomed)

SB+ /PCR-: 6%

- réarrang. atypique/ réarrang segment Vb non fonct/perte de sensib pour des Vb/Cb particulier/perte de 1 des 2 réarrang par amplification d'un réarrang

• SB-/PCR+: 3%

- non détection par SB (comigration)/ petit clone.

Etude de la Clonalité

- ◆ Caractéristiques phénotypiques
- ◆ Etude du TCR: phénotypique et moléculaire
- ◆ **Régulation des récepteurs NK**
- ◆ Caractéristiques cytogénétiques

Phénotype KIR

- ◆ *NK expriment 3 types de récepteurs:*

- Récepteurs de type lectin C (KLR), NKG2
- Récepteurs de type Ig Like (KIR)

Activateur ou inhibiteur dépendant de la présence de ITAM ou ITIM

- Récepteurs de type naturel cytotoxiques (NCR)

- ◆ *Activant ou inhibant la cytolyse NK:*

Phénotype KIR

KIR (Killer-Ig-like R)

CD158a	KIR 2D 1	HLA C	EB6
CD158k	KIR3DL2	HLA-A	Q66

KLR (lectin-R)

CD94	KP43	HLA-E	
	NKG2A/B		
	NKG2C/D/E		

LIR (leucocyte Ig-Like R)

CD85j/d	LIR/ILT2	HLA-G/F	F278
---------	----------	---------	------

NCR

NKp

Cellules normales: Phénotype KIR

- KIR et NKGD2: reconnaissance des ag soi



Normal NK: 2 à 8 KIRs

- NCR forment un complexe avec DAP et induisent

la lyse via perforine et granzyme

LGL et Phénotype KIR (I)

Leucémies LGL NK (Burnette PK, Blood 2004)

- 13 patients: 7/13 expression unique d'un KIR

	moy pt	moy ct
CD 94	59 +/-23	11 +/- 4
NKG2A	45 +/-33	6 +/-3
NKG2D	62 +/-28	1.6

- ratio activateur/inhibiteur élevé

LGL et Phénotype KIR (II)

Leucémies LGL NK (Zambello R, Blood 2003)

- **18 patients: 8/18 expression unique KIR**

6/18 expression inhomogène

4/18 KIR-

CD94: 100%

NKG2A: 16/18

- **Expression diminuée des NCR**

LGL et Phénotype KIR (II)

Leucémies LGL T (Zambello R, semin Hematol 2003)

- **GL183 et EB6 : 4/44 cas**
- **Expression élevée de ILT2**
- **CD94: 8/12**

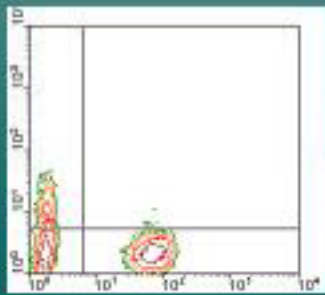
LGL et Phénotype KIR (II)

Leucémies LGL T (Drénou et al, 2003)

	<i>Vbeta clonal</i>	<i>Vbeta défective</i>	<i>Vbeta nl</i>
<i>NKR clonal</i>	4	5	0
<i>NKR polyclonal</i>	1	1	7

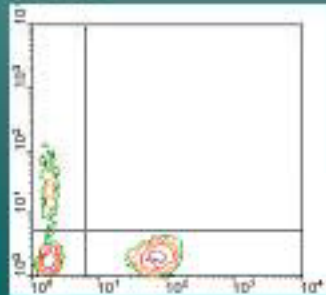
Non informative

CD94



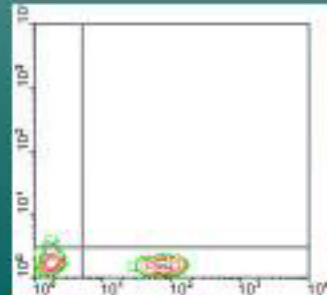
CD3

CD159
NKG2a



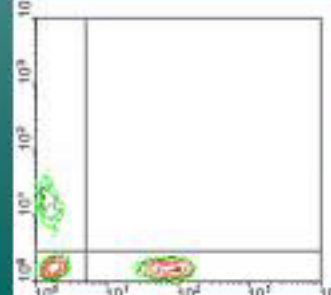
CD3

CD158a



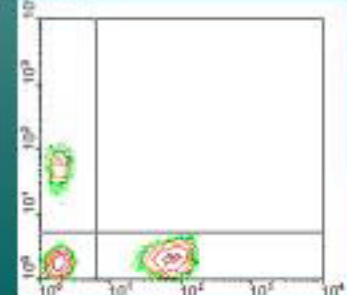
CD3

CD158b



CD3

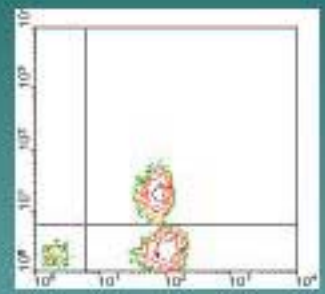
P70
NKB1



CD3

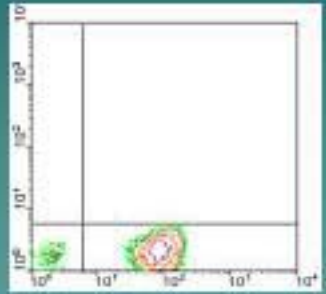
KIR monoclonal

CD94



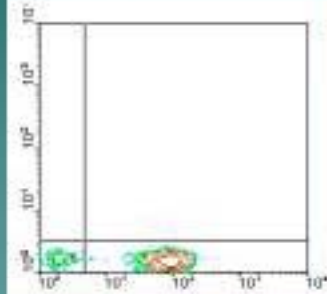
CD3

CD159
NKG2a



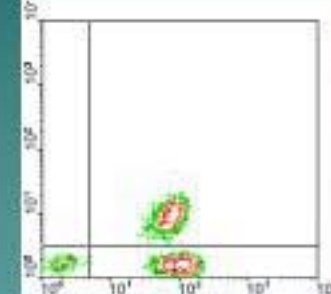
CD3

CD158a



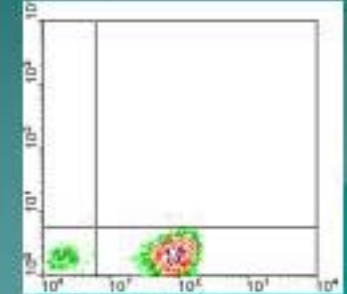
CD3

CD158b



CD3

P70
NKB1



CD3

Etude de la Clonalité

- ◆ Caractéristiques phénotypiques
- ◆ Etude du TCR: phénotypique et moléculaire
- ◆ Régulation des récepteurs NK
- ◆ Caractéristiques cytogénétiques

Clonalite - Caryotype

- ◆ Anomalies clonales mais non récurrentes et rares:

Tr1 8 Tri14

del 6

t(11:12)

inv (7), inv (14)

- ◆ Plus fréquentes Leucémies LGL NK que T

T LGL Leukemia and associated diseases

◆ *Autoimmune diseases:*

- ◆ Rheumatoid arthritis (25%)
- ◆ SLE
- ◆ Gougerot-Sjögren Syndrome . Recurrent uveitis

◆ *Autoimmune Cytopenia :*

- ◆ **Pure red cell aplasia**
- ◆ Hemolytic anemia, ITP, Amegacaryocytic purpura
- ◆ **Cyclic neutropenia:**

◆ *Endocrinopathy :*

- ◆ Type I autoimmune Polyendocrinopathy
- ◆ Hashimoto's disease
- ◆ Grave diseases, Cushing Syndrome

◆ *Malignant disease :*

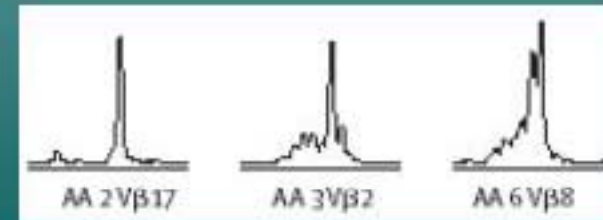
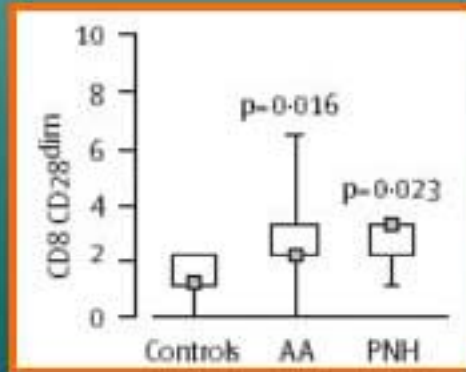
Unusual clinical features of T LGL Leukemia

- ◆ Pulmonary hypertension
- ◆ Vascular necrotic purpura
- ◆ Post-transplantation
- ◆ PNH/AA/MDS

*Lamy et al, BJH 1999, Mohti et al Leukemia 2002,
Risitano et al, Leukemia 2005*

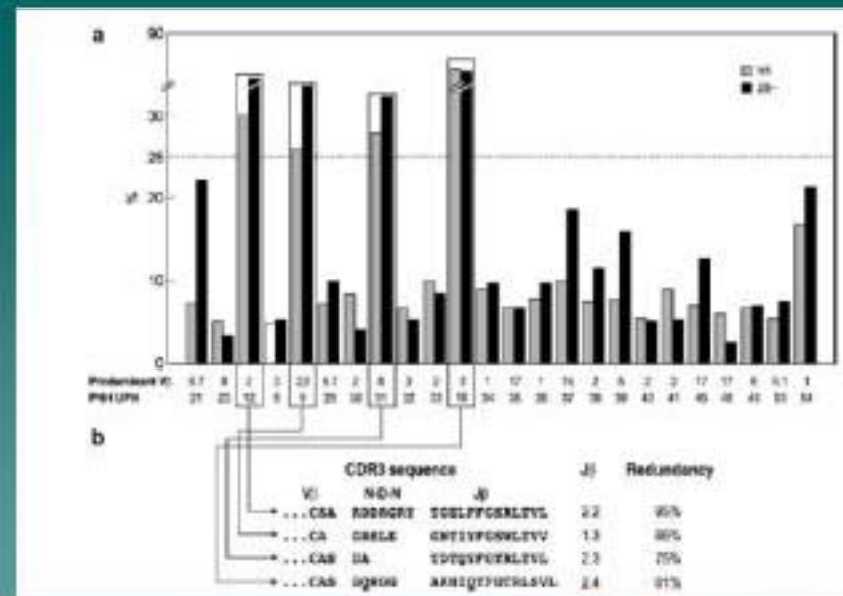
AA and PNH

Risitano et al, Lancet 2004



4/24 PNH patients:

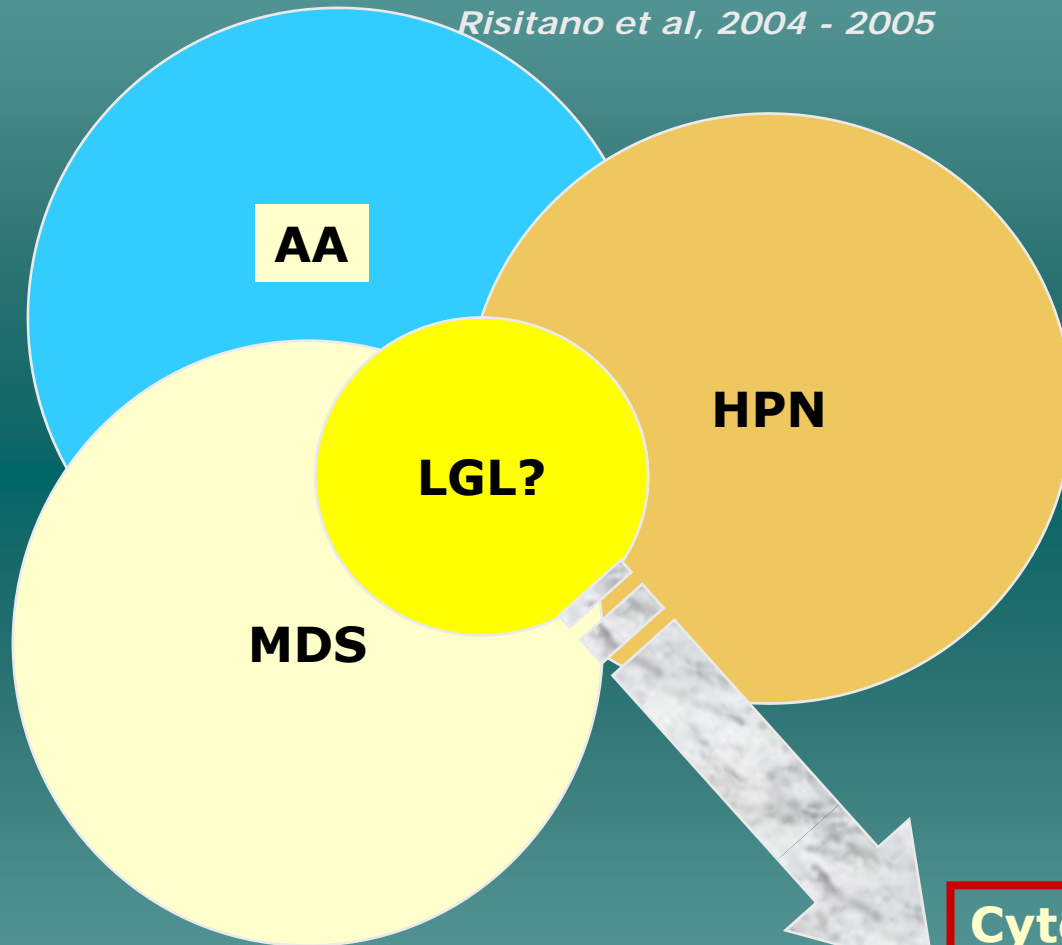
- expansion of one V β Subset of CD8/CD56+ Effector cell



Risitano et al, Leukemia 2005

OVERLAPPING DISEASES?

Risitano et al, 2004 - 2005



Saunthararajah et al, 2001

Cytology
Immunophenotyping
IHC and TCR

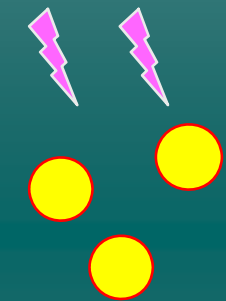
PATHOPHYSIOLOGY
OF CLONAL LEUKEMIC
EXPANSION

The background is a solid teal color. At the bottom right, there is a silhouette of a mountain range in a darker shade of teal.

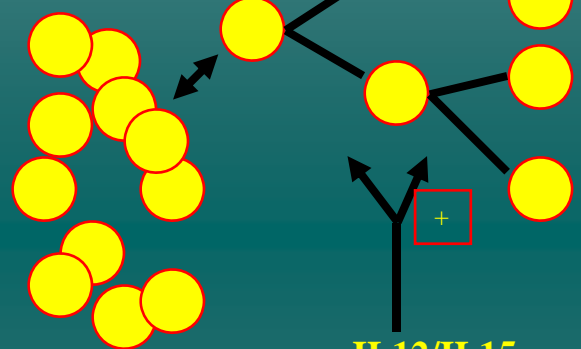
3rd step: tumor clone survival

2nd step: clonal expansion

First step: rétro/virus, or public/private ag.

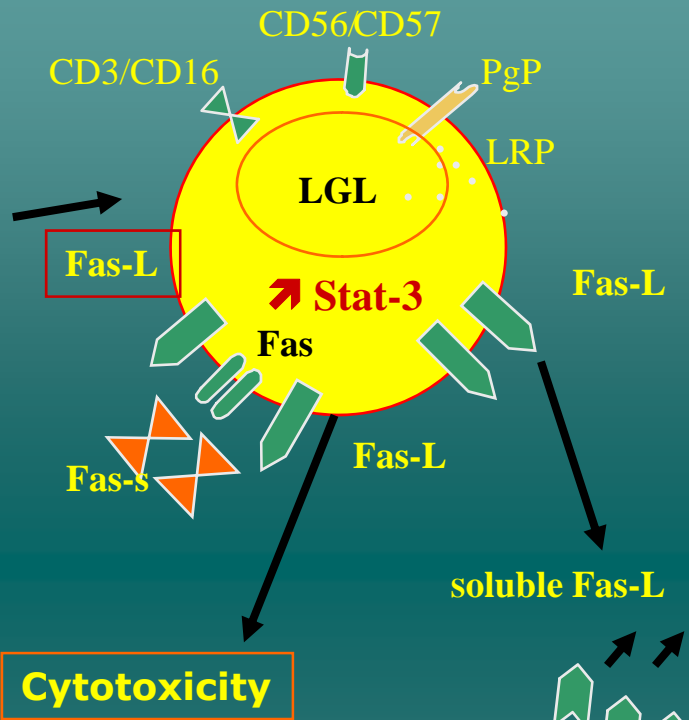


T/NK Lymphocytes



T/NK activated Lymphocytes
Polyclonal expansion

IL12/IL15



Cytotoxicity

soluble Fas-L

4th step: tissue/cell agresion

Tissue Aggression

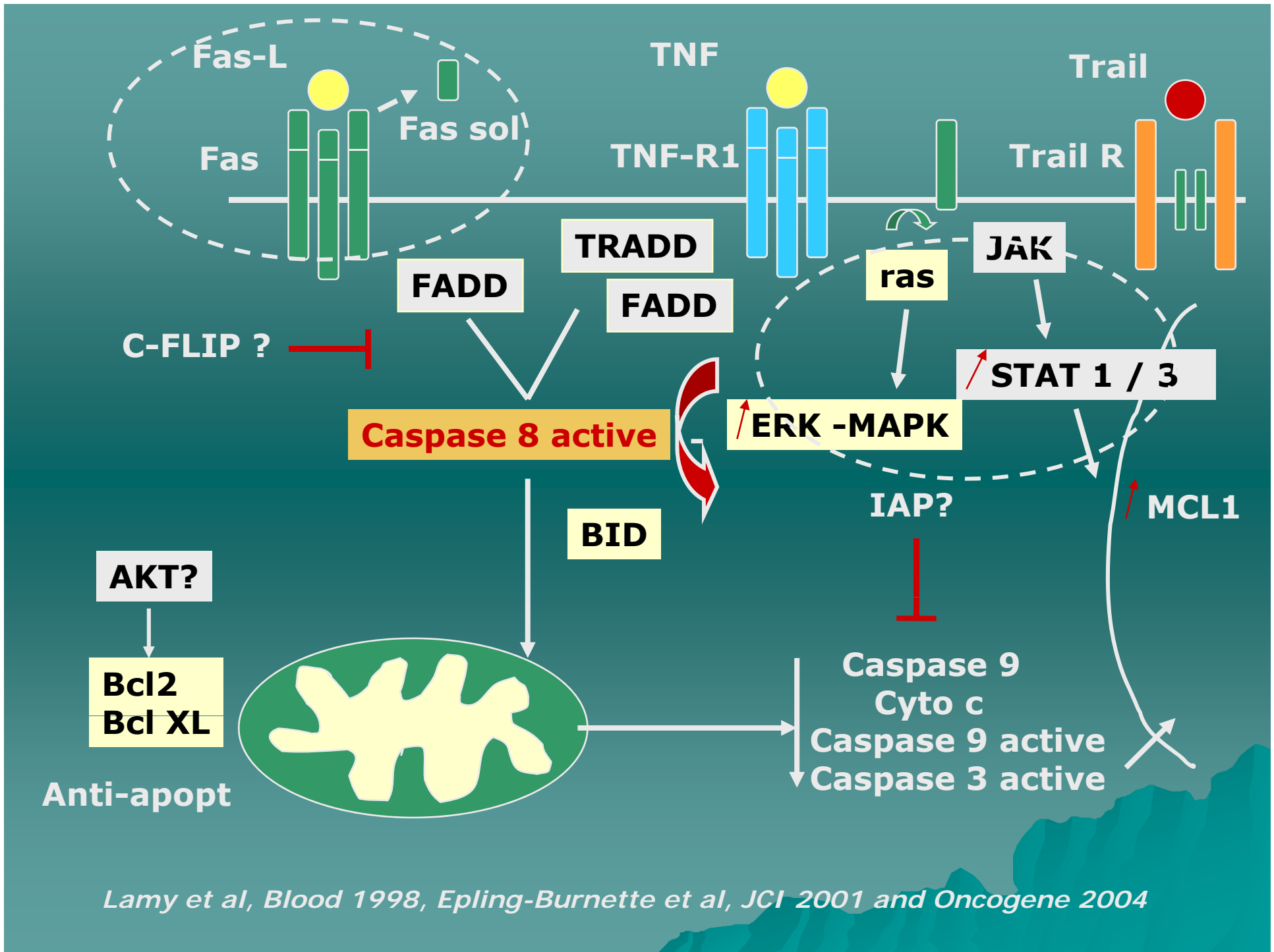
Neutropenia

Soluble Fas-L

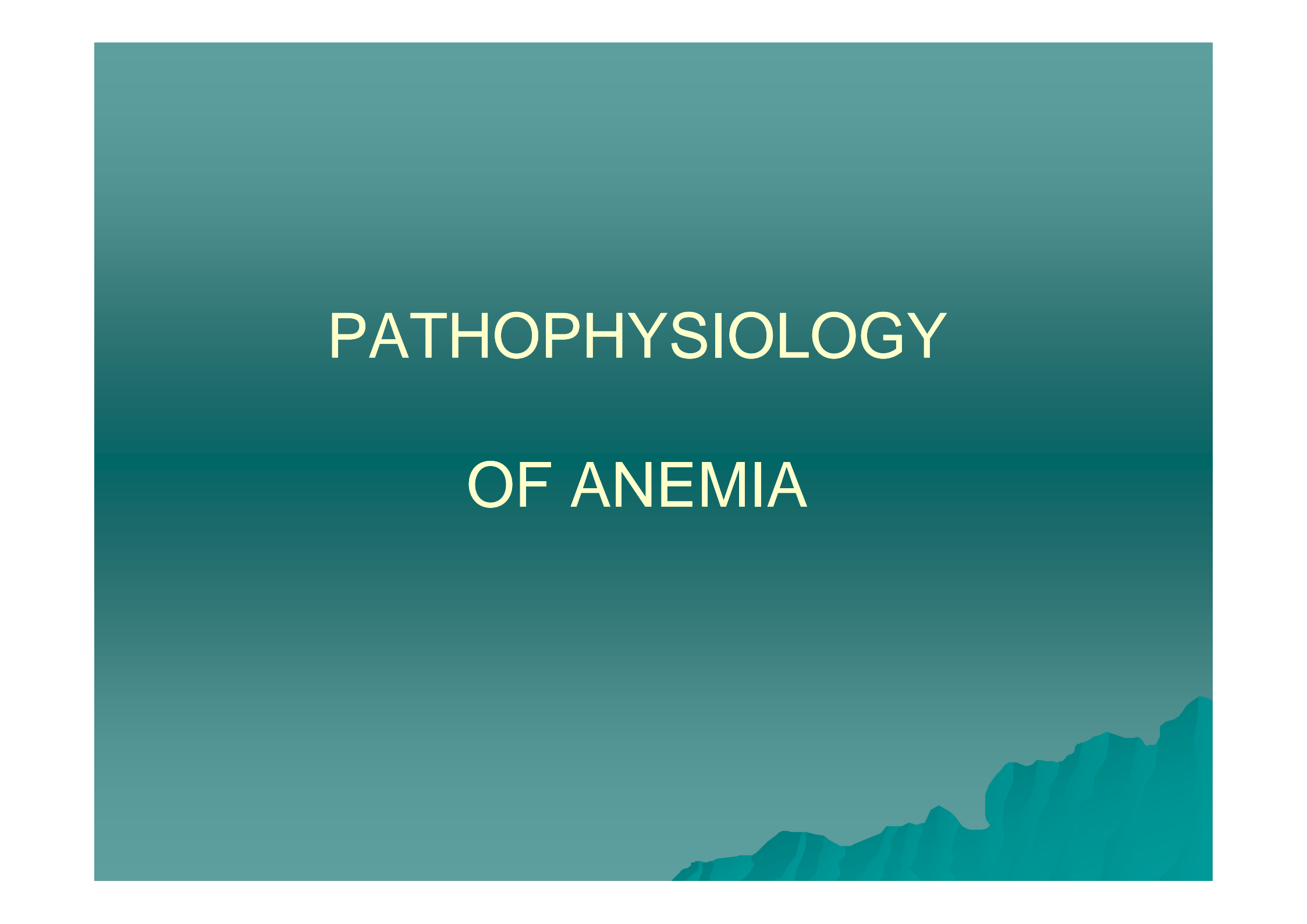
Apoptosis

neutrophils

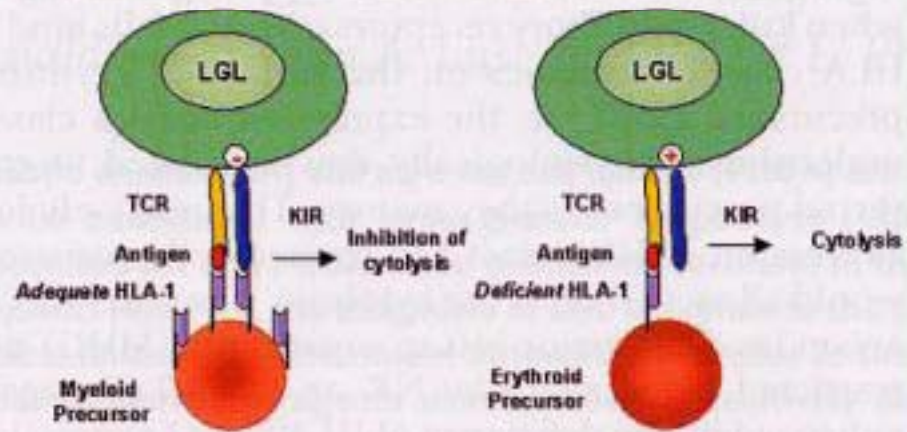




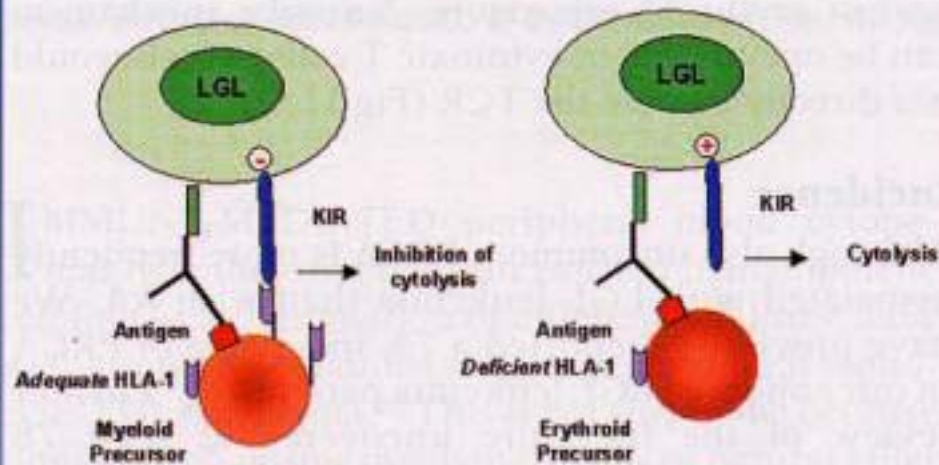
PATHOPHYSIOLOGY OF ANEMIA

The background is a solid teal color. At the bottom right corner, there is a stylized, low-poly silhouette of a mountain range in a slightly darker shade of teal.

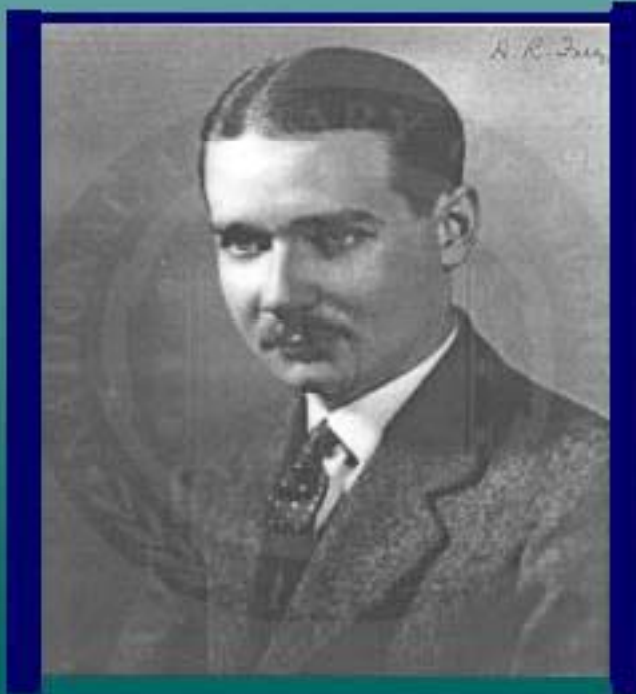
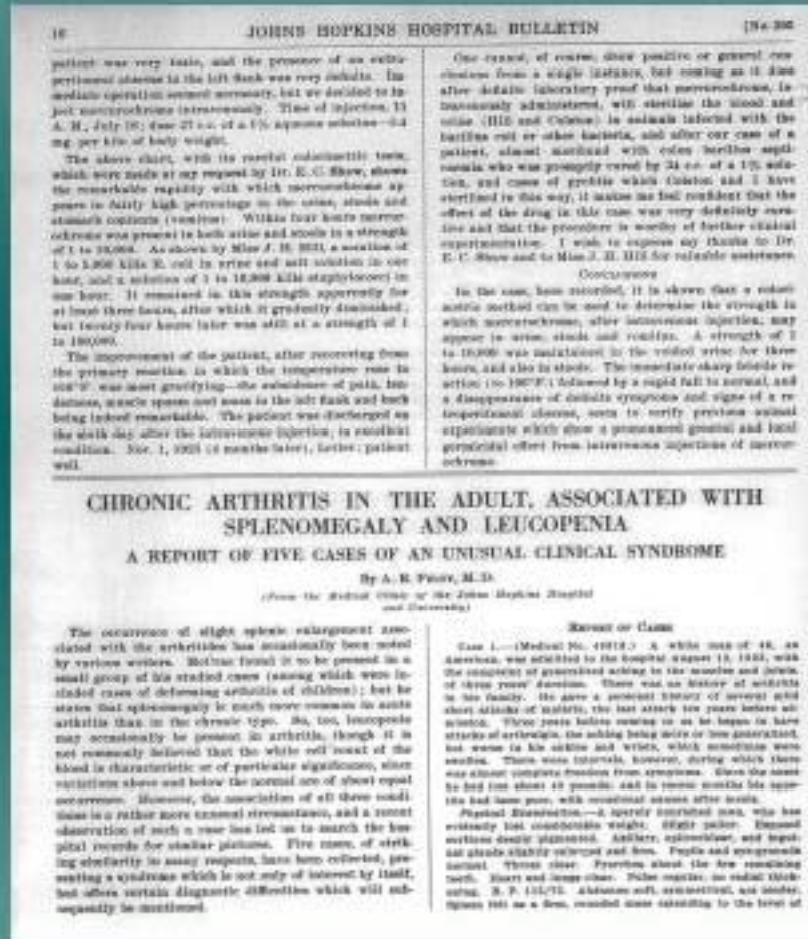
A. MHC-Restricted Cytotoxicity



B. Non-MHC-Restricted Cytotoxicity



Felty's Syndrome

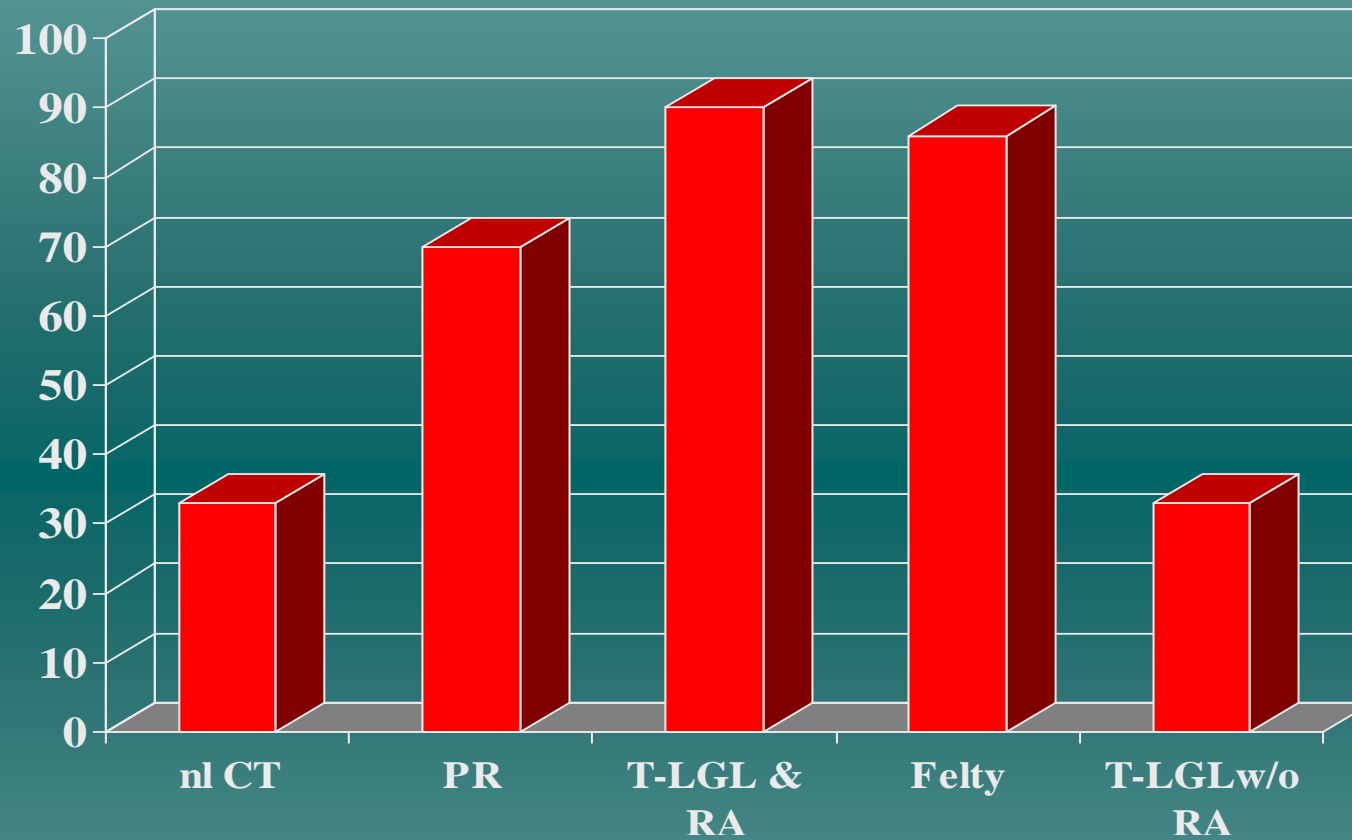


Observation and reporting by Augustus Roi Felty (1895-1964) as a Medical Resident at Johns Hopkins Hospital in 1924.

FELTY'SD and LGL/RA: same disease?

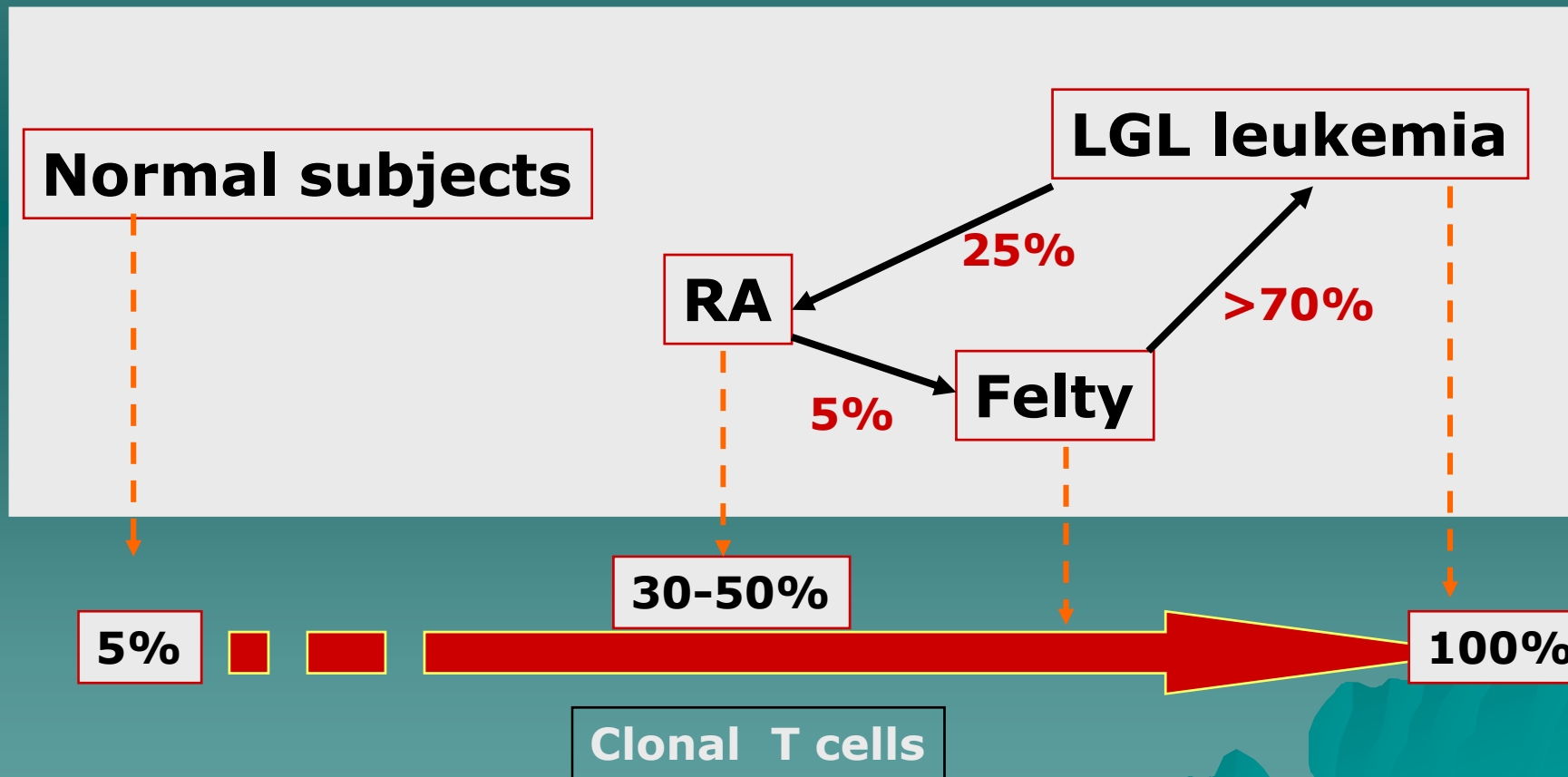
- ◆ Proinflammatory Cytokine Profile
 - ◆ RANTES, MIP-1 β , IL-18
- ◆ Seroreactivity to HTLV-I env p21e in RA
- ◆ CD3 $+$, CD57 $+$, clones in RA
 - ◆ Synovial Fluid: 100%
 - ◆ Blood: 70%
- ◆ Synovial and T-LGL resistant to Fas death and express NKG2D NK receptors

HLA-DR4 and T-LGL/Felty



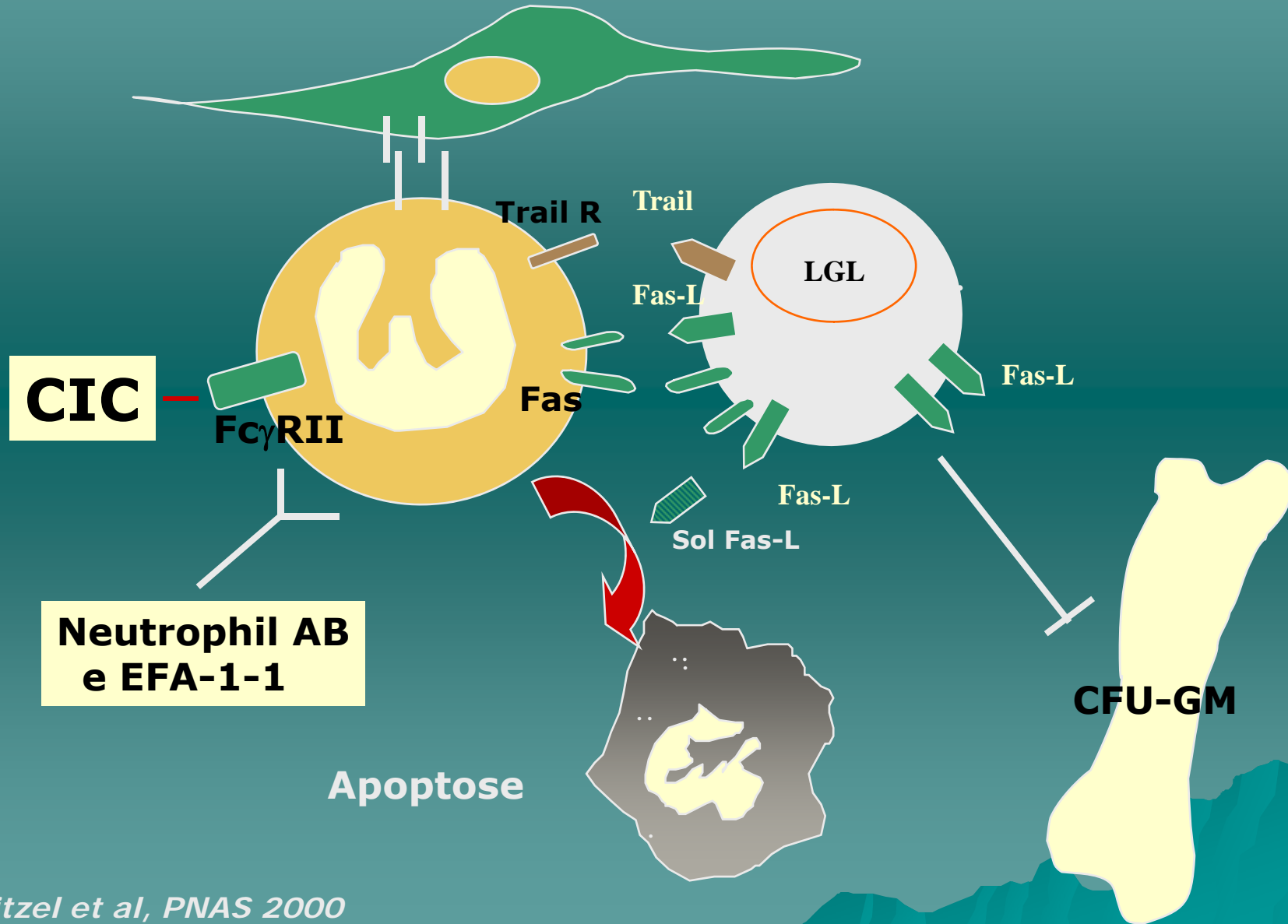
*Starkebaum et al. Arthritis Rheum., 1997, Bowman et al. Arthritis Rheum. 1994.
Dinant et al. Arthritis Rheum. , 1980, Lanchbury et al. Hum Immunol. , 1991.*

LGL and Felty



PATHOPHYSIOLOGY OF NEUTROPENIA





LGL Sera Causes Apoptosis of Neutrophils

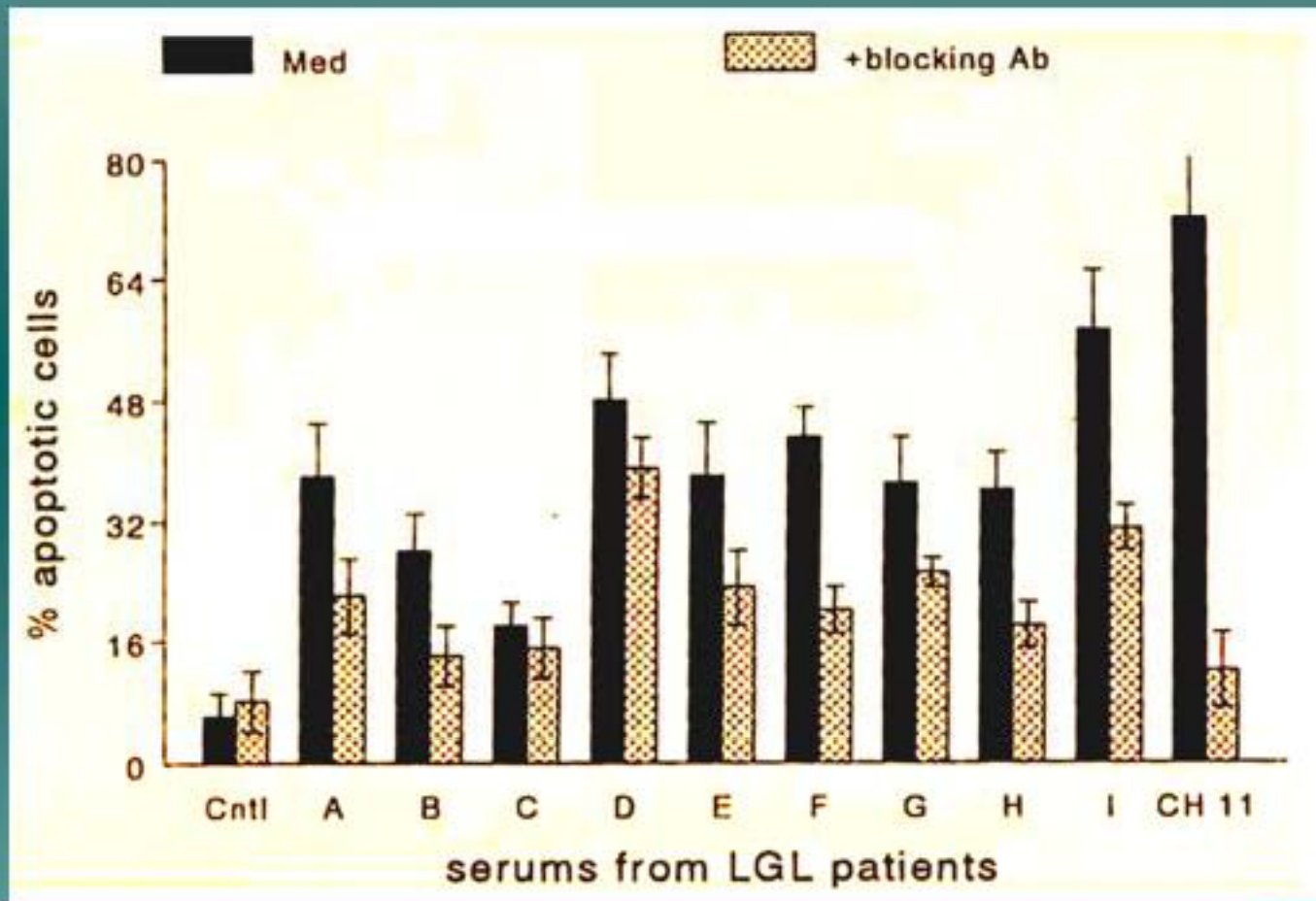


Table 1. Decrease in levels of Fas ligand with treatment (Rx) in 14 patients with large granulocyte lymphocyte leukemia

Patient	Indication for Rx	Rx	Clinical Response	Molecular Response	Fas Ligand Before Rx (mmol/L)	Fas Ligand During Rx (mmol/L)
1	Neutropenia	MTX	CR	Yes	0.56	Undetectable
2	Neutropenia	MTX	CR	No	0.28	Undetectable
3	Neutropenia	MTX	CR	Yes	0.21	Undetectable
4	Neutropenia	MTX	CR	No	0.57	0.12
5	Neutropenia	MTX	CR	Yes	0.32	Undetectable
6	Neutropenia	MTX	PR	—	0.64	0.27
7	Neutropenia	MTX	PR	—	0.54	Undetectable
8	Neutropenia	MTX	CR	ND	2.18	0.81
9	Neutropenia	MTX	CR	No	1.38	Undetectable
10	Neutropenia	2CdA	CR	Yes	0.39	0.11
11	Neutropenia	MTX	CR	Yes	0.31	0.29
12	Neutropenia	None	CR	No	1.24	Undetectable
13	Anemia	MTX	CR	ND	0.81	Undetectable
14	Anemia	Cy	PR	—	0.47	0.13

MTX indicates oral low-dose methotrexate; CR, complete response; PR, partial response; ND, evaluation not done; 2CdA, 2-chlorodeoxyadenosine; and Cy, oral low-dose cyclophosphamide. A dash indicates not applicable, as patient did not achieve CR.

APPROCHES THERAPEUTIQUES

◆ Indications

- Cytopénies sévères
(anémies/neutropénies)
- Infections récurrentes
- Splénomégalie + + +

◆ Formes agressives

THERAPEUTIC OPTIONS

- ◆ Growth Factors
- ◆ Splenectomy
- ◆ Prednisone

- ◆ Methotrexate and Cytosan
- ◆ Cyclosporin A

- ◆ Purines Analogues: 2CDA/Fluda/DeoxyC
- ◆ Campath

- ◆ Polychemotherapy: FND...

- ◆ Allo BMT

LGL LEUKEMIA AND METHOTEXATE

- ◆ Dhodapkar n = 2 CR 2/2
- ◆ Loughran n = 10 CR-VGPR 6/10
- ◆ Hamidou n = 4 CR-VGPR 3/4
- ◆ Lamy (Fr registry) n = 25 CR-VGPR 17/25

CICLOSPORINE A

	<i>n</i>	Response			Death	Median follow-up (months)
		CR	PR	NR		
T-LGL	25	7	7	11	7	46
T-LGL leukaemia	12	5	3	4	4	51
T-LGL/MDS	10	2	2	6	3	45
T-LGL LP	3	0	2	1	0	42
Clonal	19	7	4	8	7	46
Oligoclonal	3	0	1	2	0	40
Non-clonal	3	0	2	1	0	42

	Responders (<i>n</i> = 14)	Non-responders (<i>n</i> = 11)	<i>P</i> -value
HLA-DR4	9	1 (of 10)	0.01
Median LGL count ($\times 10^9/l$)	0.846	0.370	< 0.03
Median ANC ($\times 10^9/l$)	0.441	0.580	NS
Age (years)	58.5	60	NS
BM lymphoid aggregates	7 (of 13)	6 (of 11)	NS
BM hypocellularity	4 (of 13)	4 (of 11)	NS
Deaths	2	5	NS
T-LGL/MDS	4	6	NS
TCR clonality	11	8	NS

Battiwalla et al, 2003

LGL Leukemia and neutropenia

indolent or asymptomatic neutropenia

Recurrent Infections

Wait and see/ G-CSF test

Cytoxan

CyA (DR4)

Methotrexate

Evaluation at 3 months

Switch
MTX vs CPM
MTX vs CyA
CyA vs MTX/CPM

Response

Failure

Alternative TT

Maintenance

Conclusions

- ◆ Felty's SD and LGL Leukemia are part of the same disease
- ◆ LGL is a Ag driven activated T/NK cell, with a clonal expansion associated with dysregulated apoptosis leading to both malignant and auto-immune diseases.
- ◆ Neutropenia associated with LGL Leukemia is related to impaired production, distribution and Fas mediated apoptosis
- ◆ Optimal treatment lies on MTX/CPM/CYA

ACKNOWLEDGEMENTS

**J.Liu
PK.Burnette**

**H.Lee Moffitt Cancer Center
Tampa FL- USA**

**B.Drenou
L.Amiot**

**University Hospital
Rennes. France**

**R.Zambello
G.Semenzato**

Padova Italy

J.Donadieu

Neutropenia French Registry

T.Loughran

Penn State University USA

Neutropénies de l'adulte: Principales étiologies

- ◆ Pseudoneutropénie
- ◆ Iatrogènes, toxiques, infectieuses
- ◆ Envahissement médullaire par une hémopathie maligne ou néoplasie
- ◆ *Neutropénies dites immunes*
- ◆ *Neutropénies idiopathiques*

Cytopénies auto-immunes

- ◆ Cytopénies dans lesquelles une agression auto-immune provoque une destruction prématurée d'une ou plusieurs lignées sanguines
- ◆ Classiquement **périphérique**, Il existe en fait de nombreux exemples où le mécanisme auto-immun agit sur une cible **centrale**
- ◆ Le résultat est une cytopénie concernant la lignée cellulaire correspondante
- ◆ Le caractère régénératif n'est en fait associé qu'au caractère périphérique

Spectre des Neutropénies AI

NAI primitives

**NAI et
médicaments**

**NAI et
maladie AI**

**NAI et
Clone T**

**NAI et
Lymphopathie**

Causes des neutropénies immunes

- ◆ Neutropénies alloimmunes
- ◆ **Neutropénies autoimmunes**
 - Formes primitives
 - Associées à des maladies de système
 - Associées avec des maladies hématologiques
 - Associées à des médicaments
- ◆ **Neutropénies idiopathiques**

Neutropénies Immunes de l'adulte:

1) Connectivites:

- **PR - Syndrome de Gougerot-Sjögren - LED -**
Slérodermie - Dysthyroïdie AI - Sharp- PPR - Hépatite
CA - Polymyosite

2) Maladies hématologiques:

- **Cytopénies auto-immunes: Evans, PTI, AHAI - SAM**
- **Maladie de Hodgkin - LMNH - LLC - MW - LAI -**
Myélome
- **Leucémies LGL**

3) Néoplasies:

4) Déficits Immunitaires:

- **Déficit NK - Fc γ RIIIb - IgG2/IgA/IgG3 - WHIM**

5) Neutropénies cycliques de l'adulte

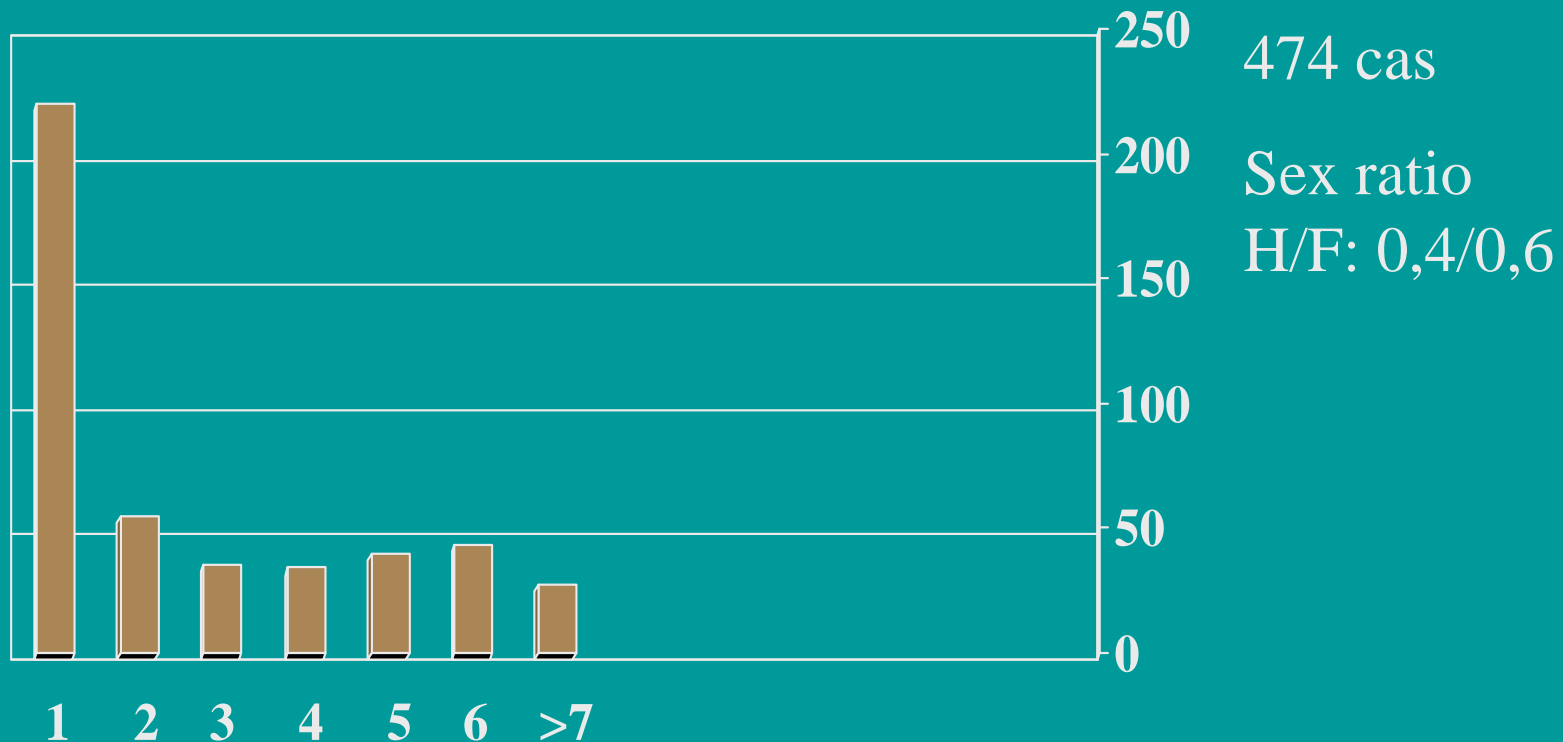
6) Post-BMT:

7) Neutropénie chronique auto-immune isolée:

8) Iatrogènes

Répartition des demandes de recherche d'AAC anti-neutrophiles par tranches d'âge entre 06/99 et 04/04

■ Nombre de cas par décennie



Antigènes des polynucléaires neutrophiles

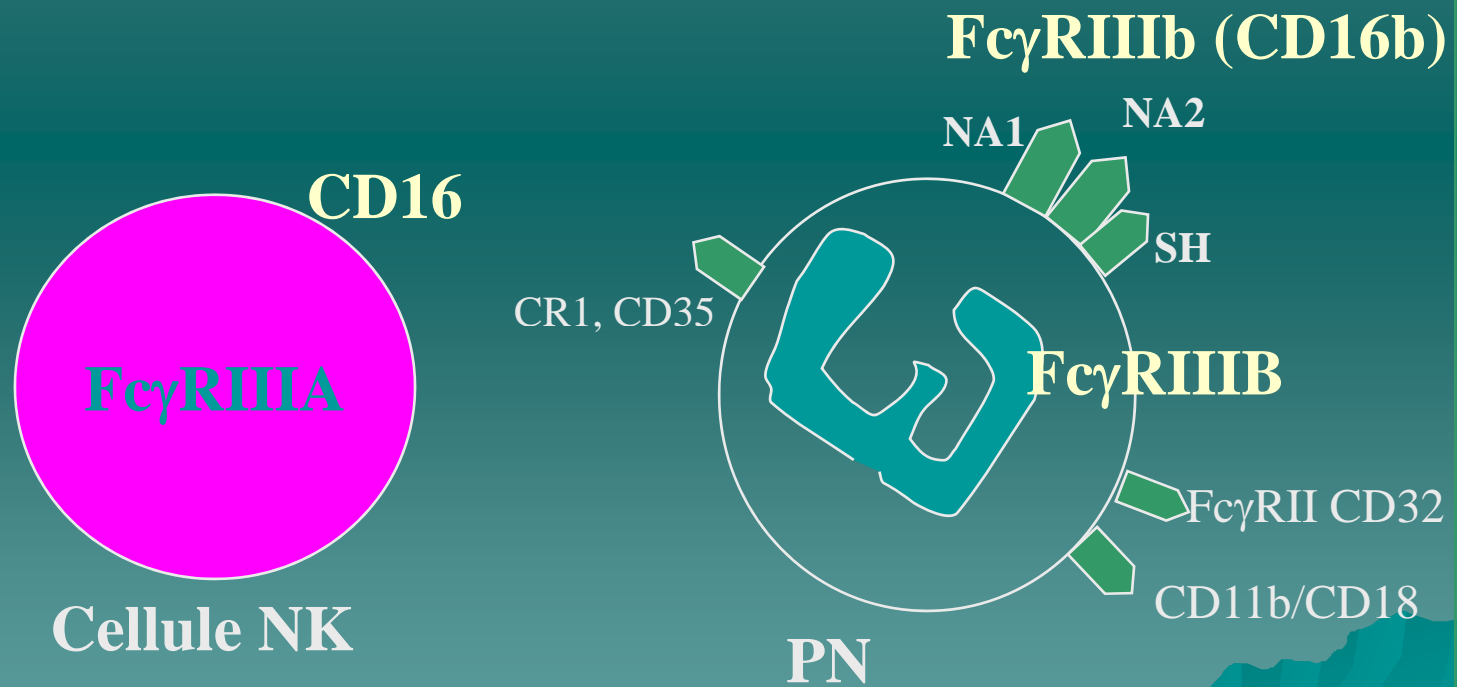
Nomenclature classique		Nomenclature ISBT		Fréquence du phénotype chez les caucasoïdes
Système	Antigènes	Système	Antigènes	
NA	NA1	HNA-1	HNA-1a	58
	NA2		HNA-1b	88
	SH		HNA-1c	5
NB	NB1	HNA-2	HNA-2a	97
5	5 ^a	HNA-3	HNA-3a	97
Mart	Mart ^a	HNA-4	HNA-4a	99
Ond	Ond ^a	HNA-5	HNA-5a	96

Antigènes des polynucléaires neutrophiles impliqués dans les NAI

Nomenclature classique		Nomenclature ISBT		Localisation de l'antigène	
Système	Antigènes	Systèmes	Antigènes	GP	CD
NA	NA1	HNA-1	HNA-1a	FCγRIIIb	CD16
	NA2		HNA-1b		
	SH		HNA-1c		
NB	NB1	HNA-2	HNA-2a	56-64 kD	CD177
5	5 ^a	HNA-3	HNA-3a	70-95kD	inconnu
Mart	Mart ^a	HNA-4	HNA-4a	CR3	CD11b
Ond	Ond ^a	HNA-5	HNA-5a	LFA-1	CD11a

Anticorps anti-PN

Alloag PN: NA1, NA2, NB1, NB2, 5a,5b, 9a,
MART, OND, SH



AC anti-PN: détection

- ◆ Écueils:
- ◆ 2 méthodes: détection des AC dans le sérum (NA1)
 - Test d'IF
 - Test d'agglutination (Anti-HLA? (+ sujets n \bar{x}))
- ◆ Détection des Ac à la surface des PN

Bux (1993, 1999)
- ◆ Test d'immobilisation des ag gran. (MAIGA)
- ◆ Test utilisant des cellules transfectées C-DNA des \neq isoformes de Fc γ RIIIb

AC anti-PN: résultats

Neutropénie et connectivites: Ac sériques

- PR neutropéniques: 30 à 59%
- PR non neutropéniques: 10 à 50%
- LED: 30 à 40%
- Autres causes: 20 à 75%

AC anti-PN: résultats

Spécificité de ces AC ?

AlloAC (*Goldschmeding 1988*)

CIC (*Hayashi 1997*)

36/91 sérum +

*après élution seuls 2 réagissent avec
des cibles ag PN.*

Progéniteurs médullaires et NAI

1) *Compartiments médullaires:*

- Granulopoïèse inefficace blocage de maturation myélocytaire
- % de PN nl dans 25-30% des cas
- Hypoplasie < 4%

2) *CFU-GM:*

- ↘ CFU-GM dans 15 à 30 %
- LTCIC/ LTBMsc/CD34+ nl ou augmenté
- Inhibition par AC: SF (80%), LED (43%), PR (12%)
- Inhibition par LT: 10 à 30% des NAI.

Autres mécanismes dans les NAI

- ◆ *Altération de la phagocytose et du chimiotactisme*
- ◆ *Séquestration splénique*
- ◆ *Activité NK réduite (Witte , 1996)*
 - AC dirigé contre 58kD (PN, NK, EBV)

Neutropénie cyclique de l'adulte

Pathologies associées:

- Leucémie LGL+++
- Crohn
- DICS (déficit CD80)
- PPR

Physiopathologie:

- Quid du gène de l'élastase ?

Autres Neutropénies immunes

Iatrogènes:

. Fludarabine . AntiCD20

CMV: (BMT 1996)

. CMV et CD13

AC+ = 15/33 CMV+ vs 0/24 CMV-

Neutropénie chronic idiopathique de l'adulte

(Papadaki) incidence: 2 à 4 10^6

LT CD45

↗ Mol. Adhésion:
sElam, sIcam, sVcam

TGF-beta1 ↗

IgA ↗
IgG3 ↘

↗ IL1, TNF alpha
IL8, Rantes

HLA
DRB1 1302



PN

↗
C.Endot activées
diapédèse
Migrationsous.end



Schéma d'exploration d'une neutropénie isolée chez l'adulte

Quand?: 2 critères: - taux de PN
($<0.5-1 \times 10^9/l$)
- les accidents infectieux

Quels examens?

- contrôle, cycle
- myélogramme: éliminer une hémopathie maligne (Caryotype)
- Phénotype lymphocytaire. Répertoire T
- AC anti PN. spécificité ag
- Bilan auto-immun
- (CFU-GM. Effet inhibiteur du sérum, LyT)
- ELP/ Sous-type des Igs