



**HAL**  
open science

# La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : exploration phénotypique et fonctionnelle

Laure Marchal

► **To cite this version:**

Laure Marchal. La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : exploration phénotypique et fonctionnelle. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01733157

**HAL Id: hal-01733157**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733157v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I**  
2012

---

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional  
Le 14 Mai 2012

par Laure MARCHAL  
née le 01 Février 1985 à Lunéville (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés :  
exploration phénotypique et fonctionnelle**

---

**Membres du Jury**

**Président :**

M le Professeur JOUZEAU Jean-Yves, PU-PH CHU Nancy

**Juges :**

M le Docteur LESESVE Jean-François, PH CHU Nancy

Mme le Docteur FAIVRE Béatrice, MCU Faculté de pharmacie Nancy

M le Docteur DE CARVAHLO Marcelo, MCU-PH CHU Nancy

M le Professeur FEUGIER Pierre, PU-PH CHU Nancy

M le Docteur MOSSAFA Hossein, laboratoire Pasteur CERBA Cergy Pontoise

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2011-2012**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

**Responsable de la filière Officine :**

**Responsables de la filière Industrie :**

Francine KEDZIEREWICZ

Francine PAULUS

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement Pharmaceutique  
Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

## ENSEIGNANTS

Section  
CNU\*

## Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ☽	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN ☽	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV <sup>3</sup>	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>3</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

<sup>3</sup> En attente de nomination

\*Discipline du Conseil National des Universités :

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES

**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT  
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR  
AUTEUR ».



## **REMERCIEMENTS**

### **Aux membres du jury**

\*\*\*

#### **Président du jury**

**Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU**

PU-PH, laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU de Nancy

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.*

*Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.*

#### **Directeur de Thèse**

**Monsieur le Docteur Jean-François LESESVE**

PH, service d'Hématologie biologique, CHU de Nancy

*Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail et de le diriger efficacement tout au long de sa réalisation. Je vous remercie pour votre confiance et votre implication.*

*Veillez trouver ici le témoignage de mon grand respect et de ma profonde gratitude.*

#### **Co-Directrice de thèse**

**Madame le Docteur Béatrice FAIVRE**

Maitre de conférence, Faculté de Pharmacie Nancy-Université de Lorraine

*Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce sujet.*

*Que ce travail, que vous me faites l'honneur de juger, témoigne de ma reconnaissance.*

#### **Juges**

**Monsieur le Docteur Marcelo DE CARVAHLO**

MCU-PH, Laboratoire d'Immunologie CHU de Nancy

*Je vous remercie de votre participation dans la réalisation de ce travail. Vous me faites de plus l'honneur de le juger, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.*

**Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER**

PU-PH, service d'Hématologie clinique, CHU de Nancy

*Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury et de juger mon travail en qualité de clinicien.*

*Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.*

**Monsieur le Docteur Hossein MOSSAFA**

Généticien, Laboratoire CERBA, Cergy pontoise

*C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges.*

*Vous avez fait le déplacement jusque Nancy pour juger ce travail sur la LPLB.*

*Soyez assurez de ma sincère gratitude.*

**Monsieur le Professeur Xavier TROUSSARD**

PU-PH, Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU de Caen

*Votre emploi du temps ne vous a pas permis de participer au jury. Je pense cependant que vous lirez ce travail attentivement. Nous vous remercions pour l'intérêt manifesté pour ce travail. Nous associons à cette dédicace votre assistant, Monsieur Edouard*

*CORNET, très impliqué dans l'étude de la LPLB.*

**A tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce travail**

\*\*\*

**Monsieur le Professeur FAURE**  
**et l'ensemble des responsables de la plateforme Nancytomique du CHU Nancy**

**Dr Frédéric MASSIN**

*Merci de m'avoir formée sur l'Image Stream X Amnis® et de t'être autant impliqué dans la réalisation des manipulations. Tes conseils et ta grande disponibilité ont été précieux.*

**Sandra et Arthur**

*Un grand merci à vous deux pour votre aide précieuse et pour votre bonne humeur.*

**Aux patients**

\*\*\*

*Ils ont permis ce travail en acceptant qu'une partie de leurs prélèvements sanguins soit utilisée pour des buts scientifiques.*

## **A ma famille, à mes amis**

\*\*\*

### **Papa, Maman**

Merci pour les valeurs que vous nous avez transmises, notamment la valeur du travail qui m'a menée jusqu'ici. Et surtout merci pour votre amour, et pour la belle famille que nous formons.

### **Perrine (Xavier et Luce), Lise, Pierre-Luc**

On a déjà partagé beaucoup de très beaux moments, et je sais que les années à venir nous en réservent encore de nombreux, merci mes frères et sœurs.

### **Grand-mère**

A ma grand-mère, merci pour ton amour et ta bienveillance.

### **Edith, Raphy, Franck, Louane, Isabelle, Christophe et Hugo**

Ma nouvelle famille que je retrouve toujours avec beaucoup de plaisir. Merci pour votre grande gentillesse.

### **Julie et Juliette**

Mes amies de toujours, merci pour notre précieuse amitié, unique et irremplaçable.

### **Paul, Amélie, Claire, Anne-Lise, Caroline, Catherine, Joe, Agnès, Anthony, etc.**

Pour ces 4 belles années : de belles rencontres au départ et de vraies amitiés à l'arrivée !

### **Stéphane**

Merci pour tout : ton aide, tes conseils réconfortants, ton humour et ta grande patience.

A notre amour et à nos beaux projets...

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX.....</b>	<b>16</b>
<b>INDEX DES FIGURES .....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>I. La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB).....</b>	<b>20</b>
A. Introduction .....	20
B. Historique .....	20
C. Epidémiologie et données cliniques.....	20
D. Données biologiques .....	21
a. Hémogramme .....	21
b. Cytologie .....	22
c. Immunophénotypage .....	23
d. Biopsie ostéo-médullaire.....	24
e. Dosage sérique des Ig .....	24
E. Examen cytogénétique .....	24
a. L'isochromosome +i(3)(q10) .....	25
b. Instabilité chromosomique .....	26
c. Condensation prématurée des chromosomes.....	26
F. Analyse moléculaire .....	28
a. Gènes des chaînes lourdes des Ig .....	28
b. Réarrangements Bcl-2/ IgH.....	29
G. Études fonctionnelles .....	30
H. Etiologie .....	31
a. Facteur environnemental : le tabac.....	31
b. Influence génétique : une prédisposition familiale ?.....	32
c. Facteur infectieux : le virus Epstein-Barr.....	32
I. Origine de la lymphocytose.....	33

a. Défaut d'apoptose.....	33
b. Prolifération.....	34
c. Défaut de migration.....	35
J. Evolution .....	35
<b>II. Etude phénotypique .....</b>	<b>36</b>
A. Immunophénotypage des lymphocytes dans la LPLB : données issues de la littérature et de la cohorte lorraine .....	36
a. Introduction .....	36
b. Matériels et méthodes.....	39
c. Résultats .....	40
d. Discussion .....	45
e. Conclusion.....	49
B. Etude expérimentale : <i>Image Stream X AMNIS</i> ®.....	51
a. Introduction .....	51
b. <i>Image Stream X AMNIS</i> ® : présentation générale .....	51
1. Caractéristiques techniques.....	51
2. Applications .....	53
c. Analyse des lymphocytes de patients LPLB par l' <i>Image Stream X AMNIS</i> ® ..	54
1. Matériels et méthodes .....	54
2. Résultats.....	65
3. Discussion.....	80
C. Discussion générale : origine et nature des lymphocytes dans la LPLB .....	82
a. Lymphocytes B mémoires .....	82
b. La sous-population de lymphocytes B CD27+ IgM+ IgD+ .....	84
<b>III. Etude expérimentale fonctionnelle : stimulation des lymphocytes B par CpG-ODN .....</b>	<b>89</b>
A. Introduction .....	89
B. Matériels et méthodes .....	90
a. Patients .....	90
b. Purification des cellules mononucléées à partir de sang total selon leur gradient de densité.....	90

c. Marquage avec le fluorochrome carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	91
d. Distribution dans la microplaque de 96 puits à fond rond	92
e. Mesure de l'intensité de fluorescence de la CFSE à J3 et J5	92
<b>C. Résultats</b>	<b>93</b>
a. Les lymphocytes B prolifèrent en réponse au CpG-ODN dès J3	93
b. La prolifération des lymphocytes B des patients est inférieure à celle du témoin	95
<b>D. Discussion : TLR9 et LPLB</b>	<b>98</b>
a. Réponse des lymphocytes B à une stimulation du TLR9	98
b. Rôle du TLR9 dans le maintien des lymphocytes B mémoires et dans la LPLB ?	98
<b>Conclusion générale</b>	<b>100</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>101</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : acide desoxyribonucléique
- AF 647** : alexa Fluor 647
- APC** : allophycocyanin
- BOM** : biopsie ostéo-médullaire
- CCD** : détecteur à comptage de charge
- CD** : classe de différenciation
- CFSE** : fluorochrome carboxyfluorescein succinimidyl ester
- CG** : centres germinatifs
- DAPI** : di-amino phenyl-indol
- EBV** : virus d'Epstein Barr
- ECD** : phycoerythrin-texas red
- FFL** : fix facs lyse
- FICTION** : *fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics*
- FITC** : fluorescein isothiocyanate
- FISH** : *fluorescence in situ hybridization*
- FS** : *forward scatter*
- GFHC** : Groupe Français d'Hématologie Cellulaire
- IDEAS®** : *image data exploration and analysis software*
- IgH** : chaînes lourdes des Ig
- IL-2** : interleukine 2
- IMF** : intensité moyenne de fluorescence
- LLC** : leucémie lymphoïde chronique
- LPLB** : lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés
- MBR** : *major breakpoint region*
- mcr** : *minor cluster region*
- MGUS** : gammopathie monoclonale d'origine indéterminée
- PAF** : paraformaldéhyde
- PAMPs** : *pathogen-associated molecular patterns*
- PBS** : phosphate buffered saline
- PCC** : condensation prématurée des chromosomes



**PC5** : phycoerythrine-Cyanin 5

**PC7** : phycoerythrine-Cyanin 7

**PCR** : *polymerase chain reaction*

**PE** : phycoerythrine.

**PHA** : phytohémagglutinine

**PRRs** : *pattern-recognition receptors*

**SAC** : *Staphylococcus aureus* Cowan strain I

**SC** : *side Scater*

**SNP** : *single nucleotide polymorphism*

**SSC** : side Scatter

**SVF** : sérum de veau fœtal

**TLR9** : *toll-like receptor 9*

**TNF** : *tumor necrosis factor*

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau I. Causes des lymphocytoses polyclonales.....	22
Tableau II. Phénotypes issus de la littérature.....	37
Tableau III. Immunophénotypages des patients de la cohorte lorraine : pourcentages de positivité des différents marqueurs phénotypiques .....	40
Tableau IV. Rapport kappa/lambda chez les patients LPLB.....	40
Tableau V. IMF des Ig de surface .....	41
Tableau VI. Cas de LPLB CD5+ .....	44
Tableau VII. Taux d'IgM sérique selon l'expression ou non du CD5.....	44
Tableau VIII. Cas de LPLB CD27-.....	46
Tableau IX. Fréquence d'expression des différents marqueurs lymphocytaires au sein de la cohorte lorraine et parmi les cas décrits dans la littérature. ....	50
Tableau X. Marqueurs étudiés pour chaque patient et témoin.....	56
Tableau XI. Recueil des signaux provenant de chaque fluorochrome dans les différents canaux.....	58
Tableau XII. Taux d'expression de CD27 par les lymphocytes B chez les témoins et les patients. ....	66
Tableau XIII. Pourcentage de lymphocytes B CD5+ chez les témoins et les patients ...	71
Tableau XIV. Taux d'expression de Ki67 par les lymphocytes B chez les témoins et les patients .....	78
Tableau XV. Pourcentages de prolifération des lymphocytes B.....	93

## INDEX DES FIGURES

Figure 1. Aspects cytologiques hétérogènes des lymphocytes binucléés au cours de la LPLB. ....	23
Figure 2. Analyse immunohistochimique des lymphocytes par marquage des chaînes kappa (rouge) et lambda (orange). ....	24
Figure 3. Isochromosome +i(3q). ....	24
Figure 4. Condensation prématurée de la chromatine. ....	27
Figure 6. Distribution des intensités de fluorescence des IgD de surface au sein de la cohorte lorraine. ....	42
Figure 5. Distribution des intensités de fluorescence des IgM de surface au sein de la cohorte lorraine. ....	41
Figure 7. Caractéristiques techniques de l' <i>Image Stream X AMNIS</i> ®. ....	52
Figure 8. Représentation schématique de l' <i>Image Stream X AMNIS</i> ®. ....	51
Figure 9. Applications de l' <i>Image Stream X AMNIS</i> ®. ....	52
Figure 10. <i>IDEAS</i> ® : logiciel d'analyse d'image. ....	59
Figure 11. Sélection des cellules isolées « <i>single</i> » parmi l'ensemble des événements. ....	61
Figure 12. Sélection des images nettes « <i>focus</i> » parmi les événements isolés. ....	62
Figure 13. Sélection des lymphocytes B parmi les cellules « <i>focus</i> ». ....	62
Figure 14. Expression des CD20 (canal 5) et CD14 (canal 2) par les cellules « <i>focus</i> ». ....	62
Figure 15. Discrimination des lymphocytes « non circulaires » et des lymphocytes « circulaires » parmi l'ensemble des lymphocytes B grâce à la <i>feature Circularity DAPI</i> . ....	64
Figure 16. Sélection manuelle des lymphocytes binucléés parmi les lymphocytes B non circulaires. ....	64
Figure 17. Expression de CD20 (canal 2) et CD27 (canal 5) par les cellules « <i>focus</i> » et par les lymphocytes binucléés « tagués ». ....	65
Figure 18. Expression de FMC7 (canal 2) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ». ....	67

Figure 19. Expression des CD20 (canal 5) et CD21 (canal 2) par les cellules « focus ».	68
Figure 20. Absence d'expression de CD21 (canal 5) par les lymphocytes binucléés « tagués ».	68
Figure 21. Expression des CD20 (canal 2) et CD40 (canal 3) par les cellules « focus ».	69
Figure 22. Expression de CD5 (canal 5) parmi les lymphocytes B « circulaires » et « non circulaires ».	71
Figure 23. Expression de CD5 (canal 5) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ».	72
Figure 24. Expression des CD20 (canal 2) et CD23 (canal 4) par les cellules focus.	74
Figure 25. Expression de CD23 (canal 4) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ».	75
Figure 26. Expression de TLR9 (canal 2) par les cellules CD20+.	76
Figure 27. Intensité de fluorescence de TLR9 à la surface des lymphocytes B chez les patients et les témoins.	76
Figure 28. Intensité de fluorescence de TLR9 chez les patients à la surface des lymphocytes B « circulaires » et « non circulaires ».	77
Figure 29. Expression des CD20 (canal 2) et CD10 (canal 3) par les cellules « focus ».	78
Figure 30. Expression de Ki67 (canal 11) par les cellules CD20+ et les lymphocytes binucléés « tagués ».	79
Figure 31. Surexpression de TLR9 par les lymphocytes B binucléés.	81
Figure 32. Les sous-populations de lymphocytes B CD27+.	83
Figure 33. Diversité de la population B.	84
Figure 34. Schéma modifié de la génération des différentes sous-populations de lymphocytes B mémoires.	85
Figure 35. Proposition de deux voies de différenciation des lymphocytes B.	87
Figure 36. Schéma de plaque pour l'étude de prolifération des lymphocytes B.	92
Figure 37. Prolifération à J3 et J5 des lymphocytes B dans les puits de contrôle négatif (NEG) et les puits contenant le CpG-ODN (ODN).	94
Figure 38. Prolifération des lymphocytes B témoins avec et sans CpG-ODN.	96
Figure 39. Prolifération des lymphocytes B de 3 patients LPLB à J5 avec et sans CpG-ODN.	97

## Introduction

La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB) est une entité hématologique rare connue depuis environ 30 ans mais encore mal comprise du fait de la rareté des patients et des expérimentations destinées à élucider ses mécanismes. Ce travail a tenté d'approfondir deux aspects de la LPLB. Le premier concerne le profil phénotypique des cellules, étudié à partir de la confrontation des données issues de la cohorte lorraine et de celles issues de la littérature, ainsi que par l'analyse des lymphocytes par un nouveau système d'imagerie en flux, l'*Image Stream X AMNIS*®. Le second aspect est l'étude de la prolifération des lymphocytes B après stimulation par un ligand du *Toll-like receptor 9* (TLR9) suite à la mise en évidence de l'expression du TLR9 par les cellules pathologiques.

# **I. La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB)**

## **A. Introduction**

La LPLB est une entité rare de description récente où l'on observe, le plus souvent chez une femme fumeuse d'âge moyen, une lymphocytose chronique polyclonale caractérisée par la présence de lymphocytes binucléés à l'examen du frottis sanguin.

## **B. Historique**

La LPLB a été décrite pour la première fois en 1982 par Gordon et al (1982). Il décrit chez trois patientes une lymphocytose absolue chronique et polyclonale avec des lymphocytes binucléés dans le sang périphérique, associée à une élévation polyclonale du taux d'IgM sérique et l'expression de l'antigène HLA-DR7. Depuis, environ 250 cas ont été décrits dans la littérature, dont la moitié issue de séries françaises. Un registre national associé à une biothèque est en cours de validation afin de mieux recenser l'existant. Il sera piloté par le CHU de Nancy, sous l'égide du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) et de l'intergroupe GOELAMS/LLC.

## **C. Epidémiologie et données cliniques**

La LPLB est principalement rencontrée chez des femmes généralement fumeuses à un âge médian de 40 à 50 ans. Elle est parfois diagnostiquée chez des hommes (environ 10% des cas). L'incidence de la LPLB n'est pas connue. Elle est difficile à évaluer car la LPLB est probablement sous-diagnostiquée en raison de la non spécificité du tableau clinique et de la difficulté de détection des cellules anormales sur le frottis sanguin.

Comme le montrent les cas rapportés, le nombre des diagnostics de LPLB semble cependant s'être accru grâce à une meilleure connaissance de ce syndrome (en particulier en Europe) et à la diffusion progressive de l'information auprès de la communauté médicale (Mossafa et al, 1998 ; Cornet et al, 2009 ; Lesesve et al, 2009). En France une cohorte de 111 patients a pu être analysée (Cornet et al, 2009).

Le tableau clinique associe souvent une grande asthénie à des douleurs mal définies (céphalées, douleurs articulaires, etc.), ceci restant non explicitement publié. Une splénomégalie est signalée dans moins de la moitié des cas, toujours modérée et isolée. Il n'existe pas d'hépatomégalie, rarement des adénopathies de taille inférieure à 2 centimètres sont observées. Les signes fonctionnels décrits par les patientes constituent parfois un tableau proche de celui décrit lors de fibromyalgie (asthénie, algies diverses : céphalées, douleurs musculaires ou articulaires, troubles psychiques). La question du diagnostic différentiel peut se poser (étude en cours).

## **D. Données biologiques**

### **a. Hémogramme**

L'hémogramme indique une lymphocytose absolue (entre 4 et 10  $\times 10^9/L$  le plus souvent). Dans 10% des cas cependant, la lymphocytose est absente (Troussard et al, 2008). Une lymphocytose absolue ( $>4 \times 10^9/L$ ) et chronique chez l'adulte impose des explorations car elle traduit le plus souvent la présence d'un syndrome lymphoprolifératif chronique B (SLPC-B). Les lymphocytoses polyclonales bénignes sont rares chez l'adulte. Elles peuvent survenir suite à un stress ou à une infection virale. Elles sont alors transitoires. L'observation d'une lymphocytose polyclonale durable a été décrite dans les hyposplénismes, la maladie de Gaucher, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la maladie de Hodgkin dans sa forme à prédominance lymphocytaire (Tableau I d'après Granados et al, 1998).

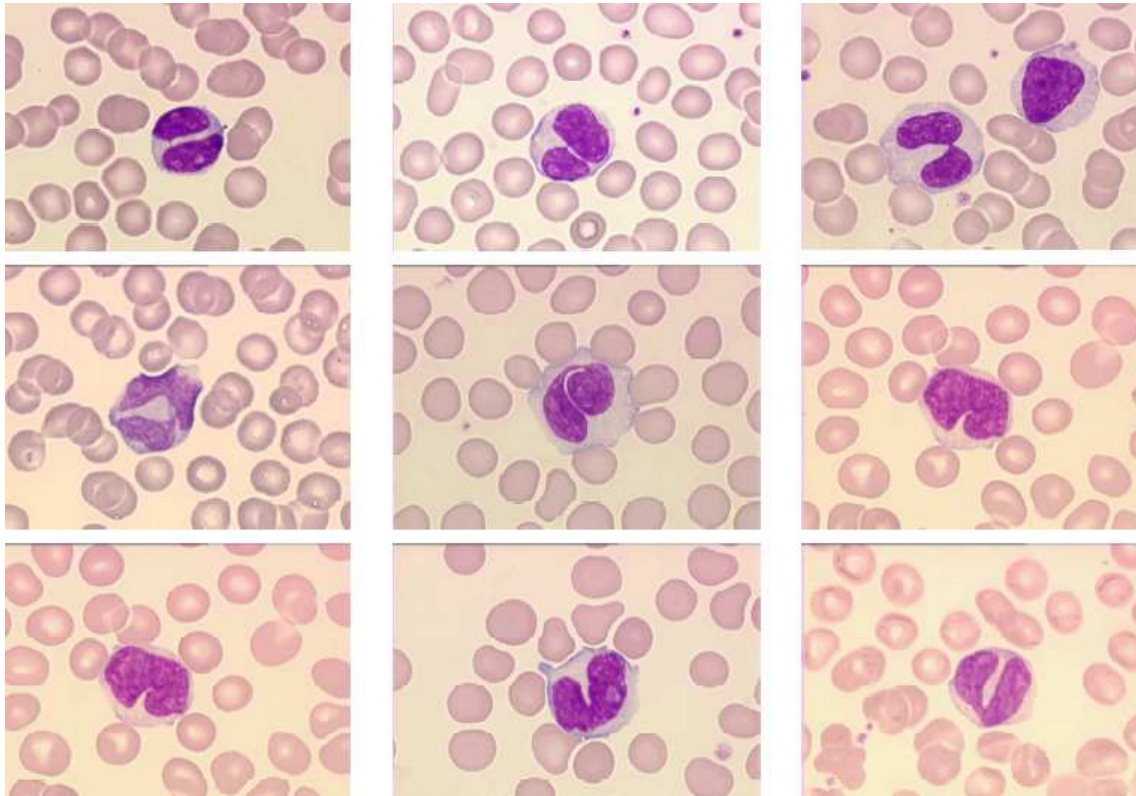
**Tableau I. Causes des lymphocytoses polyclonales.  
D'après Granados et al (1998).**

<b>Infectious</b> <sup>20</sup>	Epstein Barr virus <sup>24</sup>
Pertussis	Type VI herpes virus <sup>26</sup>
Rickettsia <sup>23</sup>	Varicella Zoster virus
Syphilis	Cytomegalo virus <sup>24,25</sup>
Bruceellosis	Viral hepatitis
Shigella	Diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome <sup>33,34,51,64</sup>
Tropical splenomegaly <sup>35-38</sup>	Acute infectious lymphocytosis <sup>29,30,65</sup>
Babesiosis <sup>27</sup>	Measles
Toxoplasmosis <sup>28</sup>	Mumps
<b>Drugs</b> <sup>20,39,40</sup>	Interleukine <sup>2</sup>
Allopurinol <sup>39</sup>	Isoniazid <sup>39</sup>
Atenolol	Mexiletine
Captopril	Mesalazine <sup>69</sup>
Carbamazepine <sup>39,66</sup>	Minocycline <sup>39,43</sup>
Catecholamines <sup>62</sup>	Norfloxacin <sup>70</sup>
Chlorpropamide	Para-amino salicylic acid <sup>20</sup>
Dapsone <sup>39</sup>	Phenobarbital <sup>39</sup>
Diltiazem	Phenytoin <sup>24,39</sup>
Enalapril <sup>39</sup>	Sulphasalazine <sup>39,71-73</sup>
Fenoprofen <sup>39</sup>	
Halothane <sup>67</sup>	
Insulin <sup>68</sup>	
<b>Paraneoplastic</b>	
Malignant thymoma <sup>44-46</sup>	
Nodular lymphocyte predominance Hodgkin disease <sup>47</sup>	
<b>Genetic</b>	
Autoimmune lymphoproliferative syndrome <sup>48,49</sup>	
<b>Miscellaneous</b>	
Hyposplenic states <sup>50-53</sup>	
Chronic natural killer lymphocytosis <sup>56,59</sup>	
Persistence binucleated polyclonal B lymphocytosis <sup>1-5, 7,11</sup>	
Exercise-induced and stress <sup>60,62</sup>	
Post-perfusion syndrome <sup>54,55</sup>	

## b. Cytologie

L'examen du frottis sanguin chez les patients LPLB montre des lymphocytes dont les aspects morphologiques sont hétérogènes (Figure 1) (Troussard et al, 2008). Ils sont le plus souvent de taille augmentée, ont un cytoplasme étendu, faiblement basophile. Le noyau a des contours irréguliers, il est plus ou moins échancré, de l'indentation simple à une forme bilobée voire binucléée, qui caractérise donc une minorité de cellules. Rarement, on peut observer trois, voire quatre noyaux séparés. Un pourcentage variable (1 à 10%) de lymphocytes à deux noyaux est détecté (Mossafa et al, 1999). La chromatine est toujours condensée, et un petit nucléole est parfois visible. Ces lymphocytes binucléés sont eux-mêmes hétérogènes morphologiquement (étude en cours, non publiée).





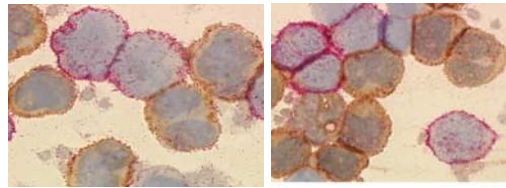
**Figure 1. Aspects cytologiques hétérogènes des lymphocytes binucléés au cours de la LPLB.  
D'après Troussard et al (2008).**

La présence de lymphocytes binucléés n'est cependant pas spécifique de la LPLB. Elle a été décrite après irradiation (Roy-Taranger et al, 1965) ou infection, plus rarement dans certains cas de leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Lanson et al, 2011) ou encore chez les patients atteints de sclérose en plaques traités par natalizumab (Leclerc et al, 2011). Une étude est en cours pour préciser la spécificité de ces atypies morphologiques (Gressot AL, thèse d'exercice en cours).

### **c. Immunophénotypage**

L'immunophénotypage montre que la lymphocytose est constituée en majorité de cellules B exprimant les classes de différenciation (CD) CD19, CD20, et CD22. Le caractère polyclonal est alors affirmé par l'expression des chaînes légères kappa et lambda, aussi bien par les cellules binucléées que non binucléées. Des techniques d'immunocytochimie sur « cytopins » utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes légères kappa et lambda montrent en effet que les lymphocytes binucléés expriment soit les chaînes légères kappa, soit les chaînes légères lambda

(Figure 2) (Mossafa et al, 1999), confirmant la polyclonalité B.



**Figure 2. Analyse immunohistochimique des lymphocytes par marquage des chaînes kappa (rouge) et lambda (orange).**

Les lymphocytes B coexpriment également le plus souvent les immunoglobulines de surface de type IgM et IgD, ainsi que le CD27, considéré comme le marqueur des lymphocytes B mémoires (Loembe et al, 2002).

#### **d. Biopsie ostéo-médullaire**

L'étude des biopsies ostéo-médullaires (BOM) montre une infiltration interstitielle et intra-sinusoïdale. L'envahissement intravasculaire est évocateur des lymphomes de la zone marginale (Feugier et al, 2004), ce qui constitue un « piège » diagnostique, mais qui constitue aussi une information intéressante si on estime que la LPLB est un état pré-lymphomateux.

#### **e. Dosage sérique des Ig**

Le dosage des immunoglobulines sériques révèle une élévation constante, persistante, et polyclonale du taux d'IgM, associée à des taux normaux ou diminués des IgA et IgG.

### **E. Examen cytogénétique**

Des anomalies chromosomiques récurrentes ont été observées chez plus de 75% des patients : isochromosome +i(3)(q10) surnuméraire associé ou non à la présence d'un phénomène de condensation prématurée des chromosomes (PCC) et/ou une instabilité chromosomique (Cornet et al, 2009).

### a. L'isochromosome +i(3)(q10)

L'examen cytogénétique montre la présence d'un isochromosome +i(3q) consistant en une duplication partielle du bras long du chromosome 3 dans 77% des cas de LPLB (Figure 3).



**Figure 3. Isochromosome +i(3q).**  
**D'après Troussard et al, 2008.**

La présence d'un isochromosome +i(3q) décrite pour la première fois en 1989 a été constatée dans 3/26 métaphases d'un patient ayant une LPLB (Perreault et al, 1989). L'analyse cytogénétique conventionnelle a par la suite permis de rapporter l'+i(3q) comme étant une observation récurrente chez une série de 25 patients (Mossafa et al, 1996 ; Mossafa et al, 1999) et chez trois patients (Callet-Bauchu et al, 1997). L'utilisation de l'hybridation *in situ* en fluorescence (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) sur des cellules en métaphase permet d'observer un plus grand nombre de mitoses et de détecter la présence du dérivé du chromosome 3 surnuméraire +i(3q) là où la technique de cytogénétique conventionnelle ne l'aurait pas décelé. Cette anomalie n'est cependant pas tout à fait spécifique de la LPLB. Elle a aussi été décrite dans certains rhabdomyosarcomes, carcinomes pulmonaires ou prostatiques et lors du passage de l'hyperplasie au carcinome du col utérin (Heselmeyer et al, 1996). Elle a été également observée dans un cas de maladie de Waldenström et dans des rares cas de LLC (Wong et al, 2002).

Les travaux de l'équipe lyonnaise (Callet-Bauchu et al, 1997) ont montré chez trois patients par la technique FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics), associant une étude immunologique puis une hybridation *in situ*, que le

+i(3) (q10) était restreint aux lymphocytes B, binucléés ou non, et exprimant les chaînes légères kappa ou lambda. De son côté, l'équipe de Mossafa a montré chez deux patients que l'anomalie était trouvée dans les cellules non binucléées (Mossafa et al, 1999). Ces deux observations montrent que l'anomalie n'est pas restreinte aux cellules binucléées.

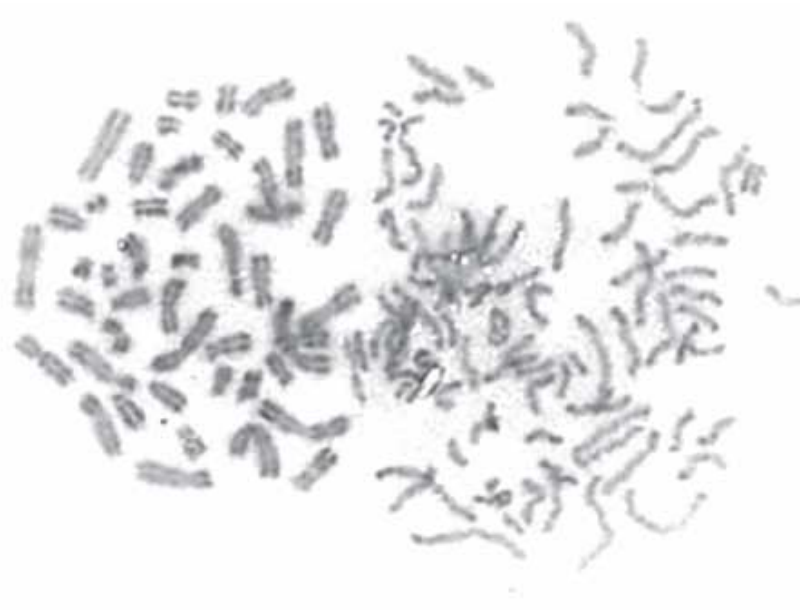
Une trisomie 3 peut également être détectée en plus de l'isochromosome surnuméraire +i(3q) (Callet-bauchu et al, 1999), suggérant que la LPLB est associée à une élévation de l'instabilité du chromosome 3. Le rôle du chromosome 3 dans la survenue de la LPLB reste incertain. Le gain du chromosome 3 a été démontré comme étant une aberration génétique pivot dans la transition de plusieurs états précancéreux, tels que la dysplasie/carcinome *in situ* au cancer invasif du col utérin (Heselmeyer et al, 1996). Cette anomalie +i(3q) pourrait avoir un rôle dans l'émergence d'une sous-population clonale et/ou maligne. Grâce à la réalisation de puces à acide desoxyribonucléique (ADN) de type SNP (single nucleotide polymorphism) chez dix patients LPLB (Cornet et al, publication soumise), il a été mis en évidence dans la fraction cellulaire CD19+ des gains de nombre de copies de gènes sur l'ensemble du bras long du chromosome 3 ou sur seulement une partie de ce dernier. La taille des gains est variable entre les patients : de 30 kilobases à la totalité du 3q. Chez 7 patients sur 9, l'amplification d'une région génomique particulière a été identifiée. Il s'agit du gène *MECOM* (MDS1 EVI1 complex, 3q26.2) qui pourrait intervenir dans la physiopathologie de la maladie.

### **b. Instabilité chromosomique**

L'instabilité chromosomique est fréquemment observée chez les patients présentant une LPLB (>2/3 des cas) (Troussard et al, 2009). C'est une instabilité assez polymorphe qui est caractérisée par la présence d'autres anomalies clonales indépendantes telles que del(6q), +der(8), + 8, etc.

### **c. Condensation prématurée des chromosomes**

Un phénomène de condensation prématurée des chromosomes est décrit dans la LPLB (Figure 4). Il est présent dans 50% des cas, et est associé à l'isochromosome i(3q) dans 41% des cas.



**Figure 4. Condensation prématurée de la chromatine.**

**D'après Troussard et al, 2008.**

Durant un cycle cellulaire normal, pendant la mitose, la condensation chromosomique assure une ségrégation appropriée de l'information génétique. Les enzymes mises en jeu sont entre autres les condensines et les topoisomérases (Lee et al, 2007). La condensation prématurée des chromosomes est un phénomène qui s'observe suite à la fusion de cellules en mitose et de cellules en interphase, provoquant l'entrée en mitose des cellules interphasiques. Le noyau en métaphase induit la condensation de la chromatine du noyau interphasique. La morphologie dépend des cellules en interphase (la PCC de cellules en G1 donnera des chromatides simples, alors que la PCC de cellules en phase S donnera des chromatides fragmentés, etc). Dans la LPLB, la morphologie de la PCC indique une condensation des cellules en G1 ou G2. Le phénomène de PCC a été décrit à l'origine dans les cellules normales traitées par les extraits de moisissure ou par la cytochalasine B et dans les cellules infectées par les virus de la famille *herpesviridae*. Le cas du virus d'Epstein-Barr (EBV) a surtout été étudié : pour se répliquer dans la cellule infectée, le virus EBV utilise une kinase spécifique, EBV BGLF4 kinase, qui induit des événements «mitose-like ». Lee et al (2007) démontrent que durant la réactivation du virus, lors de la réplication d'EBV, la chromatine est condensée et que seule la kinase BGLF4 peut induire la condensation de l'ADN cellulaire via la phosphorylation de la condensine cellulaire et de la Topoisomérase II, couplée avec de multiples événements de type « mitosis-like ».

La PCC est observée quand les changements nucléaires de la cellule ne sont pas adaptés à la phase cellulaire morphologique dans laquelle elle se trouve, ce qui indiquerait une induction exogène de la réplication du matériel génétique ou une mitose provoquée. Elle peut être observée suite à une irradiation, ou en fin de vie (pré-mortem) ce qui suggère qu'elle a lieu dans les cellules en détresse, condamnées à mourir. Elle est rarement observée chez les patients avec une hémopathie ou une tumeur solide.

Chez les patients avec une LPLB, selon Troussard et al (2002), ce phénomène peut être la conséquence de la fusion d'une cellule en métaphase avec une cellule en interphase, d'un dysfonctionnement de la membrane cellulaire avec séparation asynchrone des cellules filles après duplication de l'ADN, ou d'une réplication tardive avec asynchronisme au sein des mêmes cellules d'une partie des chromosomes en métaphase et de l'autre en interphase. La PCC étant un phénomène dû à la présence de mitoses asynchrones dans des cellules multinucléées, il a donc été supposé suite à l'observation de PCC dans les lymphocytes de LPLB qu'il pouvait s'agir de cellules multinucléées polyploïdes. Cependant il a été montré que les lymphocytes B binucléés ne sont pas hyperploïdes (Callet-Bauchu et al, 1997). Toutefois, les lymphocytes étudiés qui ont permis de démontrer l'absence d'hyperploïdie ne présentaient pas de PCC.

## **F. Analyse moléculaire**

### **a. Gènes des chaînes lourdes des Ig**

- Etude du réarrangement :

Pour déterminer si les lymphocytes observés dans LPLB représentent une expansion cellulaire monoclonale, biclonale, ou polyclonale, l'étude du réarrangement des gènes des Ig par technique *polymerase chain reaction* (PCR) ou par Southern Blot est indispensable. L'immunophénotypage lymphocytaire montre une population polyclonale, mais il est nécessaire de vérifier l'absence d'une sous-population clonale. Durant la maturation des lymphocytes B, les gènes des Ig subissent un processus complexe de réarrangement afin de diversifier les séquences codant pour les anticorps. Ainsi les lymphocytes polyclonaux affichent un réarrangement polyclonal des chaînes

lourdes des Ig (IgH), alors que les cellules B néoplasiques dérivent d'un seul clone ayant un réarrangement spécifique et unique.

Dans la LPLB, l'étude du réarrangement des gènes des Ig montre dans la plupart des cas un réarrangement polyclonal des IgH sans restriction (Mossafa et al, 1998 ; Troussard et al, 2008). Aucun usage préférentiel du répertoire des gènes VH ne semble être mis en évidence. De rares cas de réarrangement monoclonal ont curieusement été rapportés (Chan et al, 1990 ; Delage et al, 1997 ; Wolowiec et al, 2008).

#### - Etude des mutations somatiques

Des mutations somatiques apparaissent au cours de la différenciation du lymphocyte B. Il s'agit d'un processus d'hypermutation somatique programmé durant lequel l'introduction aléatoire et progressive de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes des Ig contribue à l'augmentation de la diversité des Ig. Normalement les cellules B mémoire possèdent des récepteurs antigéniques de forte affinité, résultat de nombreuses mutations somatiques du gène IgV entre autres. Chez les patients avec LPLB, l'étude de clones de lymphocytes B met en effet en évidence une proportion plus élevée de clones mutés que ce qui est rapporté pour des lymphocytes sanguins normaux. Mais d'après la répartition de ces mutations il n'est pas évident que ces lymphocytes aient subi une sélection antigénique (Loembe et al, 2002 ; Salcedo et al, 2002 ; Troussard et al, 2009).

### **b. Réarrangements Bcl-2/ IgH**

La présence de réarrangements t(14;18) entre le locus de la chaîne lourde des IgH du chromosome 14 et celui de proto-oncogène Bcl-2 du chromosome 18 est rapportée dans la LPLB. Ce réarrangement Bcl2/IgH a une importance particulière dans les proliférations malignes lymphoïdes puisqu'elle induit, par la surexpression de l'oncogène Bcl-2, une inhibition de l'apoptose. Elle est retrouvée dans 85% des lymphomes folliculaires. Elle est également présente dans la population générale à hauteur d'environ 50%, et sa fréquence augmente avec l'âge et le tabac.

Dans la LPLB, les réarrangements t(14;18) rapportés sont multiples et impliquent à la fois les points de cassure MBR (major breakpoint region) et mcr (minor cluster region) (Lancry et al, 2001). Pour comparaison, dans le lymphome folliculaire, les fragments multiples sont rares et n'excèdent jamais deux fragments. Himmelmann et al (2001) ont

montré par PCR en temps réel que les patients LPLB présentent un nombre de cellules portant cette translocation qui est environ 100 fois supérieur à celui de donneurs sains. Ces observations mènent à supposer que la t(14;18) pourrait être à l'origine de l'expansion des lymphocytes B dans la LPLB. Pourtant les auteurs montrent que la translocation n'est trouvée que dans un nombre réduit de lymphocytes B (environ 1/1000). D'autre part, ils ne mettent pas en évidence de surexpression de la protéine Bcl-2. Le travail de Lancry (Lancry et al, 2001), rapporte également un taux de protéine Bcl-2 normal comparé à une population témoin. Seule l'équipe de Delage (Delage et al, 1997) aurait démontré une surexpression de Bcl-2.

Himmelmann et al (2001) concluent que l'accumulation des lymphocytes B ne serait donc probablement pas liée à la surexpression de Bcl-2. Il est plus probable que la présence de la t(14;18) soit la conséquence de l'expansion des lymphocytes B, et non la cause. Il est possible que la t(14;18) soit particulièrement fréquente parmi les lymphocytes B mémoires IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>. L'expansion de cette sous-population de lymphocytes B dans la LPLB expliquerait donc l'augmentation du nombre de lymphocytes B portant la t(14;18). Cette hypothèse pourrait également expliquer le nombre élevé de cellules portant la t(14;18) chez les personnes âgées et les gros fumeurs, puisque le nombre de lymphocytes B mémoires IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> augmente avec l'âge (Agematsu et al, 1997), et probablement aussi chez les fumeurs.

## **G. Études fonctionnelles**

Les propriétés fonctionnelles des lymphocytes B de la LPLB n'ont pas encore fait l'objet d'investigations poussées en dehors du travail de thèse de M. Loembe (2004). Elle a montré que, contrairement aux lymphocytes B normaux, les cellules de patientes LPLB ne proliféraient pas en réponse à la stimulation du récepteur CD40, indiquant un défaut possible dans la cascade d'activation de CD40. L'amplification PCR et le séquençage de CD40, de même que la caractérisation du récepteur par cytométrie, ont éliminé l'hypothèse d'un défaut de structure ou d'expression de la molécule.

Par ailleurs, d'autres études fonctionnelles ont été menées. Roussel et al (2003) ont montré que les cellules étaient résistantes à la stimulation de Fas en dépit d'une expression élevée de son ligand (Fas-L), et Himmelmann et al (2001) ont montré que les



lymphocytes B des patients LPLB produisent des hauts niveaux d'IgM après stimulation in vitro par l'interleukine 2 (Il-2) et par le *Staphylococcus aureus* Cowan Strain I (SAC), le taux d'IgG restant très faible.

Une partie de notre travail a consisté à explorer la réponse des lymphocytes B de patients LPLB à une stimulation du récepteur TLR9.

## **H. Etiologie**

### **a. Facteur environnemental : le tabac.**

La très haute prévalence de fumeurs parmi les patients atteints de LPLB a tout d'abord fait évoquer le rôle du tabac dans la survenue de ce syndrome. Cette hypothèse a été confortée par l'observation d'une patiente chez laquelle l'arrêt du tabac a coïncidé avec une normalisation de la lymphocytose, puis, à la reprise de la cigarette, avec une nouvelle élévation du nombre de lymphocytes (Carstairs et al, 1985). Par la suite, une normalisation de la lymphocytose et du taux d'IgM sériques a également été identifiée chez d'autres patients à l'arrêt du tabac (Bain et al, 1998 ; Rodriguez et al, 1996 ; Tonelli et al, 2000). Dans la série du GFHC, seule une patiente n'a jamais fumé (Troussard et al, 2009). Toutefois, l'arrêt du tabac ne coïncide pas toujours avec une réduction du nombre de lymphocytes B et, surtout, les anomalies génétiques spécifiques de la LPLB semblent persister (Mossafa et al, 1999). De plus, les lymphocytes B binucléés atypiques peuvent rester détectables chez les ex-fumeurs, même en absence d'une lymphocytose absolue (Bain et al 1998, Himmelmann, et al 2001 ; Rodriguez et al, 1996). D'autre part, l'exploration de témoins fumeurs ne permet pas de mettre en évidence des lymphocytes binucléés (Troussard et al, 2009), ou encore la présence de réarrangements Bcl2/Ig multiples (Delage, et al 2001). Enfin, la LPLB ayant également été diagnostiquée chez des non-fumeurs (on ne peut cependant pas exclure un tabagisme passif), il semblerait que le tabac ne constitue pas un facteur primaire.

### **b. Influence génétique : une prédisposition familiale ?**

L'association de la LPLB au phénotype HLA-DR7 semble forte, elle varie de 60% (Schmidt-Hieber et al, 2008) à 90% (Himmelmann et al, 2001) des patients contre 20 à 30% au sein de la population caucasienne, laissant suggérer l'existence d'une prédisposition génétique. Chez les patients LPLB en France la fréquence du phénotype DR7 est de 69% (environ 50 patients étudiés, en cours). La description de cas familiaux de LPLB chez des jumeaux (Carr et al, 1997) ou chez un frère et une soeur (Himmelmann et al, 2001) renforce l'hypothèse d'une composante génétique. De plus, dans la cohorte lorraine, 3 patients ont des parents atteints d'autres maladies hématologiques (Lesesve et al, 2011).

Dans le but d'évaluer une éventuelle prédisposition génétique, Delage et al (2001) ont entrepris l'étude d'une famille élargie couvrant trois générations (neuf parents au premier degré, quatorze au second degré) d'une patiente LPLB. Le diagnostic a été posé chez trois parents de premier degré. Fait notable, l'allèle HLA-DR7 n'était cependant pas présent chez cette famille. Une seconde étude, présentée par Himmelmann et al (2001), a été menée auprès des quatre membres d'une même famille présentant tous les facteurs de prédisposition potentiels associés à la LPLB à savoir : tabagisme, expression de l'allèle HLA-DR7 et sérologie EBV positive. L'étude a permis l'identification d'un cas de LPLB supplémentaire chez l'un des frères de la patiente index. Dans la cohorte lorraine, il existe deux cas familiaux. Le premier a été particulièrement étudié, une mère et une fille présentant une LPLB. La mère présente l'antigène HLA-DR7, alors que la fille n'en est pas porteuse. Ce cas particulier, qui peut suggérer une prédisposition familiale, confirme aussi que la prédisposition génétique à la LPLB n'est pas liée uniquement au phénotype HLA. Le deuxième cas concerne deux sœurs (dans une fratrie de 5 filles dont 3 ont été étudiées) (Lesesve et al, 2011).

### **c. Facteur infectieux : le virus Epstein-Barr.**

La morphologie particulière des lymphocytes B observés dans la LPLB pouvant suggérer une infection virale, l'identification des facteurs infectieux possiblement impliqués dans la pathogenèse du syndrome a été effectuée. L'EBV constituait le candidat le plus plausible étant donné sa capacité à transformer les lymphocytes B puis à induire leur expansion polyclonale, ainsi que son association fréquente avec des proliférations lymphoïdes.

La majorité des patients atteints de LPLB présente une sérologie EBV positive, indicatrice d'une infection antérieure par ce virus. Cependant, 90% à 95% de la population adulte est porteuse du virus sous forme latente et asymptomatique. De plus la détection effective du génome viral chez les patients atteints de LPLB, que ce soit par hybridation *in situ* ou amplification PCR, est irrégulière (Larcher et al, 1995, Mitterer et al, 1995) et plutôt rare. En dehors d'un cas, aucun des patients lorrains ne présente d'amplification virale (non publié).

En conclusion, les études menées au cours des vingt dernières années concernant la LPLB mettent principalement en avant des éléments en faveur d'une origine génétique au syndrome. Cependant les facteurs ou la combinaison de facteurs impliqués dans la pathogenèse du syndrome restent incertains.

## **I. Origine de la lymphocytose**

Plusieurs hypothèses sont émises concernant le mécanisme à l'origine de la lymphocytose chez les patients LPLB. S'agit-il d'une accumulation ou d'une prolifération des lymphocytes ? La réponse n'est pas encore élucidée.

### **a. Défaut d'apoptose**

La première hypothèse est celle d'un défaut d'apoptose des lymphocytes. Les réarrangements Bcl-2/IgH multiples mis en évidence dans la LPLB fait supposer que l'accumulation des lymphocytes B est liée à une surexpression de Bcl-2, protéine antiapoptotique. Pourtant il semble que le taux de Bcl-2 soit normal comparé à une population témoin. En revanche une hyper expression de la protéine Bcl-xL, protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 est rapportée dans la LPLB (Himmelman et al, 2001 ; Lancry et al, 2001). Bcl-xL est impliquée dans le signal de transduction de la voie apoptotique Fas-dépendante. Sa surexpression pourrait conférer aux cellules une résistance à cette voie. En effet, Roussel et al (2003) ont montré que les cellules B polyclonales sont résistantes *in vitro* à la signalisation Fas (pro-apoptotique) alors qu'elles expriment fortement les récepteurs Fas. Sachant qu'il existe également des

défauts de la voie de survie CD40 dépendante (Loembe et al, 2001), l'accumulation des lymphocytes pourrait être le résultat des signaux conflictuels entre CD40 et Fas.

D'autres éléments sont en faveur d'un défaut d'apoptose. L'étude de Feugier et al (2004), a par exemple montré que les lymphocytes B ne présentaient pas de tendance à proliférer (peu de cellules en phase S ou G2).

De son côté, l'équipe de Loembe (Loembe et al, 2002) fait l'hypothèse d'un défaut d'élimination des lymphocytes de faible affinité au sein des centres germinatifs (CG). Dans le CG, la sélection des clones B mutés dotés d'une affinité accrue pour l'antigène constitue une étape clé de la maturation d'affinité qui suit le processus d'hypermutation somatique. Chez les patients LPLB, l'analyse multinomiale de la répartition des mutations silencieuses et recombinantes dans les régions de structure framework des gènes des Ig ne met pas en évidence de preuve de la sélection antigénique.

D'autre part, les lymphocytes de la LPLB, porteurs du CD27, peuvent être identifiés comme des lymphocytes B mémoires. On pourrait alors supposer que leur accumulation résulte du caractère même de ces cellules B mémoire. Le but des cellules B mémoire est de procurer à l'individu une protection de longue durée contre l'antigène qui leur est spécifique (Tangye et al, 2009). Le pic de fréquence de ces cellules est situé à 4 semaines après l'immunisation. Leur taux décroît ensuite rapidement, mais elles peuvent persister à des taux indétectables durant la vie de leur hôte. Selon les études récentes une exposition répétée à l'antigène n'est pas nécessaire à cette survie prolongée. Il existe donc des mécanismes qui permettent à certaines cellules d'échapper à l'apoptose de façon naturelle (Tangye et al, 2009). Les cellules dans la LPLB pourraient utiliser ces mécanismes et ainsi persister en grand nombre.

## **b. Prolifération**

La seconde hypothèse proposée pour expliquer la lymphocytose dans la LPLB repose sur l'idée d'une prolifération des cellules, qui pourrait être secondaire à une stimulation antigénique chronique. Le lien entre agent infectieux et syndrome lymphoprolifératif est bien connu. Après la primo-infection, l'EBV persiste à vie sous forme d'ADN génomique circulaire dans quelques lymphocytes B non éliminés par le système

immunitaire et qui se sont différenciés en lymphocytes B mémoires. L'hypothèse d'un facteur, peut-être environnemental, capable de réactiver de façon chronique l'infection peut être soulevée. Mais les études sont insuffisantes pour exclure ou confirmer le rôle de l'EBV dans la LPLB.

### **c. Défaut de migration**

Feugier et al (2004) avancent une dernière théorie : un défaut de migration des lymphocytes pourrait être à l'origine de l'accumulation des lymphocytes dans la LPLB. L'infiltration intravasculaire particulière mise en évidence par l'étude des BOM peut en effet suggérer une anomalie de la migration leucocytaire. L'expression altérée des molécules d'adhésion comme CD62, CD11c, CD29, CD49d et CD31 (PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule) argumente également dans ce sens.

Il est prévu de reprendre cette exploration des molécules d'adhésion (E. Cornet, Caen) à partir des cellules conservées dans la bibliothèque.

## **J. Evolution**

L'évolution de la LPLB semble indolente. Avec un recul supérieur à vingt ans, le suivi à long terme montre le plus souvent que les patients restent stables cliniquement et biologiquement (Cornet et al, 2008). L'abstention thérapeutique est la règle. Cependant, quelques cas d'évolutions vers des lymphomes ont été rapportés. Un cas de survenue d'un blastome pulmonaire 20 ans après le diagnostic de LPLB a été signalé (Lawlor et al 1991). Un autre patient a développé un lymphome B à grandes cellules 19 ans après le diagnostic de LPLB (Roy et al 1998). Certains patients développent une gammopathie monoclonale d'origine indéterminée (MGUS). Et dans la série du GFHC (Cornet et al, 2008) 3 patients sur 111 ont présenté une évolution vers un lymphome non hodgkinien : 2 lymphomes diffus à grandes cellules et 1 lymphome splénique de zone marginale. L'émergence d'une sous-population clonale étant possible, la surveillance et le suivi régulier des patients sont donc préconisés (consultation annuelle, voire semestrielle).

## II. Etude phénotypique

L'étude phénotypique des lymphocytes B dans la LPLB permet d'identifier les cellules en cause, et d'obtenir des informations sur leur stade de développement et sur leur origine. Dans ce travail, les immunophénotypages issus des données de la littérature et de la cohorte lorraine ont été analysés. Tous ont été réalisés par des techniques utilisant des doubles marquages. La synthèse de ces données permet d'établir un profil phénotypique quasi-constant dans la LPLB. Nous le définirons.

Dans un deuxième temps est présentée l'étude phénotypique des cellules réalisée grâce à l'appareil *Image Stream X Amnis*®, système innovant d'imagerie en flux, permettant d'affiner l'analyse immunophénotypique grâce à la visualisation des cellules. Cette partie totalement originale a permis de préciser et contredire certaines données (connues ou supposées).

### A. Immunophénotypage des lymphocytes dans la LPLB : données issues de la littérature et de la cohorte lorraine

#### a. Introduction

L'immunophénotypage par cytométrie en flux permet de caractériser la population lymphoïde anormale dans la LPLB. Il permet de confirmer sa nature lymphoïde B et sa polyclonalité : les lymphocytes sont CD19+, CD20+, sans monotypie des chaînes légères des Ig de surface.

Peu d'équipes ont étudié de façon approfondie les marqueurs de surface des lymphocytes au cours des LPLB. Il est difficile de tirer des conclusions de ces diverses observations rapportées car ces analyses reposent sur des protocoles d'immunophénotypage variés et pas toujours indiqués avec précision (expression de chaque marqueur évaluée sur l'ensemble des cellules mononucléés ou sur les lymphocytes B, individuellement ou en association avec d'autres marqueurs). De plus, les études phénotypiques sont souvent établies sur de petites cohortes. La plus grosse

série est lorraine (plus de 50 patients avec des phénotypes répétés). Aucune série n'a été étudiée avec des appareils multicolours, certes très performants pour l'identification des cellules en faible pourcentage mais apparus trop récemment sur le marché pour avoir été utilisé dans l'étude de cette pathologie particulière.

Les données issues de la littérature (Tableau II) témoignent de l'expression invariable des marqueurs spécifiques de la lignée lymphoïde B comme CD19, CD20, CD22, CD24, CD79b. Certaines études montrent l'expression des IgM et IgD, CD27, CD21, FMC7. Les CD10 et CD103 sont en revanche absents ; et les résultats sont variables au sujet des CD5, 11c, 23, 25 et 38. Notre série permet de préciser ces données.

**Tableau II. Phénotypes issus de la littérature.  
D'après Loembe (2004) (vérifié et complété).**

<b>Auteurs</b>	<b>Cas (n)</b>	<b>Marqueurs de surface (CD)</b>
Gordon et al, 1982	3	sIgM, sIgD
Perreault et al, 1989	6	sIgM, CD19+
Lawlor et al, 1991	1	sIgM, CD 19+, 20+, FMC7+
Tissot et al, 1991	1	sIgM, sIgD, CD19+
Chow et al, 1992	1	CD20+
Agrawal et al, 1994	1	CD22+, 37+, FMC7+ CD23-
Troussard et al, 1994	6	CD19+, 11b+, 20+, 21+ (2/3 t), 22+, 24+, 25+ (2/6 t), FMC7+ (3/4 t) CD10-, 11c-, 23-, 38-
Mitterer et al, 1995	1	sIgM, sIgD, CD19+, 20+, 21+, 22+, 25+. 54+, FMC7+
Larcher et al, 1997	1	CD5-, 10-, 23-
Rodriguez et al, 1996	1	CD19+, 20+, 21+, 22+
Troussard et al, 1996		
Mossafa et al, 1996	25	CD19+, CD20+ (15/15t), 22+, (15/15t), FMC7+ (13/16 t)
Troussard et al, 1997		CD10- (15/15t), 11c- (15/15t), 13- (15/15t), 14- (15/15t), 23-, 33- (15/15t)
Mossafa et al, 1999		
Delage et al, 1997		
Delage et al, 1998	11	sIgM, sIgD (4/4 t), CD19+, 27+ (4/4 t)
Roy et al, 1998		CD5-
Loembe et al, 2002		
Bain et al, 1998	1	CD19+, 22+, 37+

Callet-Bauchu et al, 1997	4	CD19+, 20+
Callet-Bauchu et al, 1999		CD5-
Carr et al, 1997	2	CD19+, FMC7+ CD25- (1/1 t)
Granados et al, 1998	1	CD19+, 20+ CD5 <sup>low</sup> , 11c <sup>low</sup> , 23 <sup>low</sup> CD10-, 25-, 103-
Reeder et al, 1999	1	CD19+, CD5+
Woessner et al, 1999	1	CD19+, 25+
Espinete et al, 2000		CD11c <sup>low</sup> CD3-, 5-, 23-
Tonelli et al, 2000	1	sIgM, sIgD, CD19+
Reimer et al, 2000	1	CD19+ CD5 <sup>low</sup> , 23 <sup>low</sup> CD10-
Gomez et al, 2000	1	CD19+, 22+, 23+, 25+, 38+, 79b+ CD2-, 11c-, 103-
Gil-Fernandes et al, 2001	1	CD19+, 20+, 22+, 79b+, FMC7+
Himmelmann et al, 2001	5	sIgD, CD23+ (4/5), 25+, 27+, 148+ CD5-, 10-, 38-
Ide et al, 2002	1	sIgM, sIgD, CD19+, 20+, 21+, 22+, FMC7+ CD23 <sup>low</sup> CD5-, 10-
Salcedo et al, 2002	3	CD19+, 11c+, 21+, 23+, 24+, 25+, 27+, 79+, 95+, FMC7+ CD5-
Granel et al, 2002	3	CD19+ CD5-, 23-
Schoner-marck et al, 2003	1	CD19+ CD5-, 10-
Vincenot-Blouin et al, 2003	1	CD19+, 20+ CD5-, 10-
Feugier et al, 2004	8	sIgM (6/7 t), sIgD (3/6 t), CD19+, 11c+ (3/6 t), 22+, 79+, FMC7+ (6/7 t) CD38 <sup>low</sup> (3/7 t) CD5-, 10-, 54-, 62E-, 62P-
De Haan et al, 2006	1	CD19+, FMC7+ CD5-, 10-
Wolowiec et al, 2007	4	CD19+ CD5-
Schmidt-Hieber et al, 2008	25	CD19+, 25+ (7/25t), 27+ (24/25t), FMC7+ (24/25t) CD5 <sup>low</sup> (12/25), 23 <sup>low</sup> (24/25 t),



		CD10-, 25-, 103-
Del Guidice et al, 2009	5	CD19+, 11a+, 11c+, 18+, 20+, 22+, 25+, 27+, 79b+, FMC7+ CD5-, 10-, 23-, 31-, 38-

*Notes : t : testé (par exemple : 2/3t signifie : 2 patients sur 3 évalués)*

## **b. Matériels et méthodes**

L'immunophénotypage lymphocytaire des patients de la cohorte lorraine a été réalisé dans le service d'hématologie biologique du CHU Nancy sur cytomètre en flux Facscalibur (Becton Dickinson, San Diego, EU). L'analyse a été réalisée sur sang total EDTA. La lyse érythrocytaire a été effectuée après l'immunomarquage (solution de lyse : BD Facs Lysine Solution).

Les leucocytes ont été marqués par immunofluorescence directe par un anticorps monoclonal anti-CD19 couplé à un fluorochrome pour isoler l'ensemble des lymphocytes B (anticorps anti-CD19 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine : anti-CD19 FITC, anticorps anti-CD19 couplé à la phycoérythrine cyanine 7 : anti-CD19 PC7, ou anticorps anti-CD19 couplé avec la R-phycoérythrine-cyanine 5 : anti-CD19 RPE-Cy5).

Puis, par une analyse deux couleurs, ces lymphocytes B ont été caractérisés par l'étude de leurs antigènes de différenciation ou d'activation (CD5/CD10/CD11c/CD19/CD20/CD22/CD23/CD24/CD25/CD27/CD38/CD40/CD43/CD79b/CD103/FMC7/Kappa/Lambda), et éventuellement d'autres marqueurs supplémentaires (CD21/CD30/CD34/CD95/CD103/CD122/CD138/CD154). L'interprétation des résultats a été réalisée à partir de l'exploitation d'histogrammes biparamétriques. Les éléments lymphoïdes ont tout d'abord été ciblés (fenêtre R1) sur la représentation biparamétrique taille /structure. Puis, en fonction des combinaisons des fluorochromes présents dans chaque tube, les antigènes des éléments lymphoïdes ont été déterminés en utilisant les représentations biparamétriques FL1 FITC/FL2 PE, FL1 FITC/FL3 PC5, ou FL2 PE/FL3 PC5 conditionnées sur R1.

### c. Résultats

La cohorte lorraine comporte 53 patients. Un immunophénotypage souvent extensif de la population lymphocytaire B a été réalisé chez 50 patients. 31 d'entre eux ont bénéficié de phénotypes répétés dans le temps (de 2 à 8 phénotypes). Le tableau III indique pour les principaux marqueurs phénotypiques le nombre de cas étudiés et le nombre de cas positifs (le seuil de positivité étant fixé à 20% de la population cellulaire).

**Tableau III. Immunophénotypages des patients de la cohorte lorraine : pourcentages de positivité des différents marqueurs phénotypiques**

	CD19	CD5	CD10	CD11c	CD20	CD22	CD23	CD24	CD25	CD27	CD38	CD43	CD79b
<b>Nb cas étudiés (n)</b>	50	50	48	44	48	48	49	43	45	44	49	49	49
<b>Positifs (n)</b>	49	7	0	16	44	46	9	39	0	37	0	0	46
<b>Positifs (%)</b>	98	13	0	36	92	96	18	91	0	84	0	0	94

	FMC7	CD95	CD103	CD21	CD40	CD30	CD34	CD122	CD138	CD154
<b>Nb cas étudiés (n)</b>	49	4	45	26	20	23	13	22	20	8
<b>Positifs (n)</b>	45	0	1	26	20	0	0	0	0	0
<b>Positifs (%)</b>	92	0	2	100	100	0	0	0	0	0

*Note : le seuil de positivité est fixé à 20% de la population cellulaire.*

### Chaînes légères kappa et lambda

On observe une expression de la chaîne légère lambda plus fréquente qu'attendue. Le rapport kappa/lambda est de 1,27 en moyenne (Tableau IV). Il est donc plus faible que dans la population générale où le rapport attendu est de 2 (Grey et al, 1971).

**Tableau IV. Rapport kappa/lambda chez les patients LPLB**

<b>Rapport kappa/lambda</b>	
Moyenne	1,27
Médiane	1,33
Ecart-type	0,33

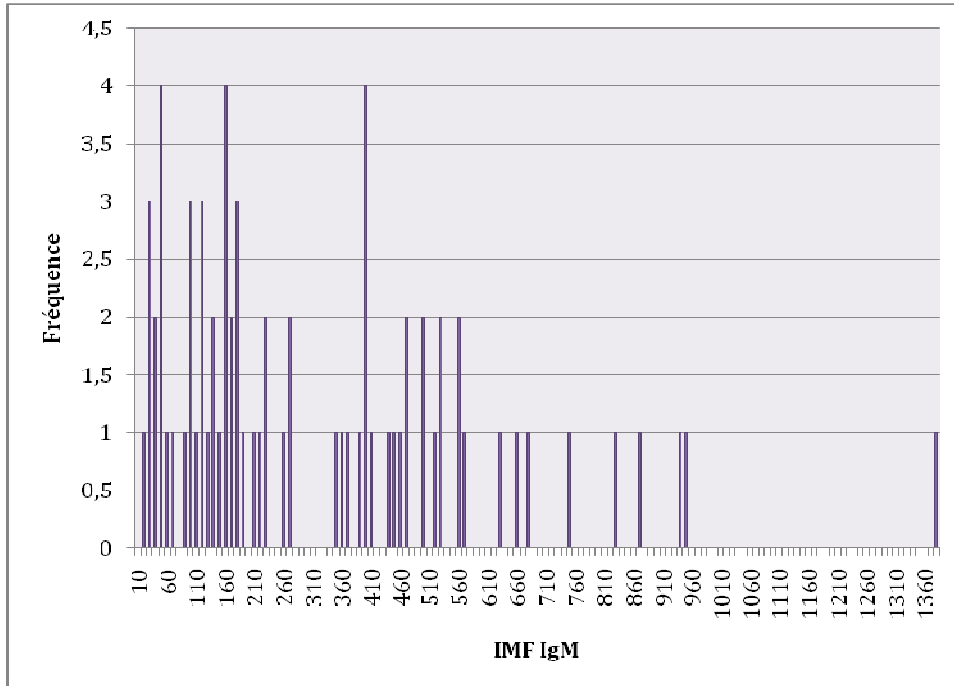
Par ailleurs, l'expression des chaînes légères kappa et lambda est forte dans respectivement 91% et 77% des cas (une intensité de fluorescence forte étant définie par une intensité moyenne de fluorescence (IMF) supérieure à 100, valeur de référence établie dans notre laboratoire avec notre protocole).

### **Ig de surface**

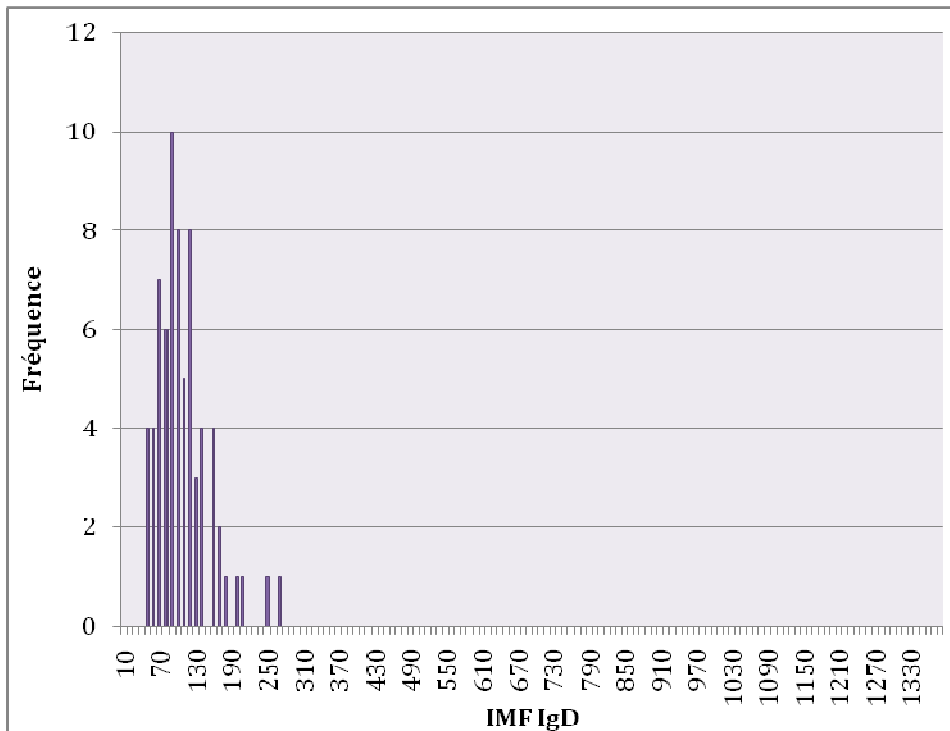
Parmi 45 patients testés, 44 présentent une population B portant à leur surface à la fois IgM et IgD. L'expression d'IgM seule a été détectée chez un seul patient. Dans 78% des cas l'intensité de fluorescence des IgM est supérieure à celle des IgD. La moyenne des IMF des IgM de surface est de 316, avec une médiane à 222, contre respectivement 105 et 95 pour les IgD (Tableau V). Les résultats nancéens vont donc dans le sens des données de la littérature, avec une population majoritairement  $IgM^{high} IgD^{dim}$ . Toutefois, l'histogramme de distribution des IMF des IgM (Figure 5) met en évidence deux populations distinctes :  $IgM^{low}$  et  $IgM^{high}$ , alors que l'histogramme de distribution des MFI des IgD (Figure 6) montre une distribution plus homogène correspondant à une unique population  $IgD^{low}$ .

**Tableau V. IMF des Ig de surface**

<b>IMF IgS</b>	<b>IgM</b>	<b>IgD</b>
Médiane	222	95
Moyenne	316	105
Ecart-type	270	45



**Figure 5. Distribution des intensités de fluorescence des IgM de surface au sein de la cohorte lorraine.**



**Figure 6. Distribution des intensités de fluorescence des IgD de surface au sein de la cohorte lorraine.**

### **FMC7**

L'expression de FMC7 est positive dans 92% des cas. Elle est forte dans 76% des cas.

### **CD5**

L'analyse des immunophénotypages de la cohorte lorraine révèle que la majorité des cas sont CD5- (87%), mais on note de rares cas d'expression partielle (13%). Le Tableau VII présente les 7 cas de la cohorte lorraine où une expression du CD5 a été notée. On peut relever une lymphocytose dans 6 cas sur 7, avec un pourcentage de binucléés assez important (jusqu'à 10%). Le taux d'IgM est plus élevé que dans les cas de LPLB CD5- (Tableau VIII). La comparaison des moyennes du taux d'IgM entre les groupes CD5+ et CD5- par un test de Student ne montre cependant pas de différence significative entre les deux groupes au risque de 5%.

L'i(3q) est présent dans 4 cas sur 7, et une anomalie du chromosome 3 dans 6 cas sur 7. Ces cas de LPLB CD5+ semblent être majoritairement des cas représentatifs de LPLB. L'expression du CD5 ne doit donc pas mettre en doute le diagnostic de LPLB. On constate même chez certaines de ces patientes suivies régulièrement une évolution clinique ou biologique. Une augmentation importante de la lymphocytose a été notée chez l'une d'entre-elles. Chez une deuxième il a été relevé une augmentation de la splénomégalie, puis l'apparition d'une hépatomégalie, associées à l'augmentation des IgM avec restriction de l'hétérogénéité.

**Tableau VI. Cas de LPLB CD5+**

Lymphocytes CD19+ (%)	Lymphocytes		Age (ans)	Tabac	Lymphocytes (G/L)	Binucléés (%)	Ig M sérique (g/L)	HLA DR7	+i(3)(q10)
	CD19+ CD5+ (%)	MFI							
53	31 f	f	40	O	5,06	2	7,1	NON	NON
55	39 f	f	40	O	2,90	5	10,5	OUI	OUI
67	21	ND	35	O	5,96	4	4,7	NON	OUI
77	49	ND	37	O	6,66	5	9,0	OUI	OUI
60	21	ND	18	O	5,84	5	2,5	NON	OUI
28	18	ND	40	ND	5,33	3	ND	ND	NON (mais +(3) et inv(3))
51	23	ND	43	O	6,08	10	7,9	OUI	NON (mais +(3))

*Note : valeurs de référence pour le dosage des IgM chez une femme : de 20 à 44 ans : 0,71 à 2,09 g/L.*

*f : faible, ND : non déterminé*

**Tableau VII. Taux d'IgM sérique selon l'expression ou non du CD5**

Taux IgM	LPLB CD5-	LPLB CD5+
Moyenne	5,79	7,25
Médiane	5,16	7,73

*Note : en cas de dosages répétés pour un même patient, une moyenne a été calculée.*

### **Intensité d'expression**

Les IMF ont été relevées pour quelques-uns des marqueurs phénotypiques. Il en ressort que l'expression du CD22 est toujours faible, alors que celles des CD20 et CD79b sont toujours fortes.

#### **d. Discussion**

Nous focaliserons sur quelques marqueurs avant de discuter les résultats plus globalement.

Le Tableau IX représente le pourcentage de cas positifs ou positifs faibles pour chaque marqueur parmi le nombre total de cas étudiés dans la littérature et dans la cohorte lorraine.

##### **Ig de surface**

Au cours de la LPLB, les lymphocytes B expriment à leur surface à la fois IgM et IgD. Nos résultats sont en accord avec une petite série de 3 patients (Salcedo et al, 2002) : l'expression des IgM semble forte, celle des IgD plus faible, donnant une population  $IgM^{high} IgD^{dim}$ . La co-expression des IgM et IgD a longtemps laissé suggérer que les lymphocytes B de la LPLB dérivent de lymphocytes B naïfs (Gordon et al, 1982). Des travaux ont par la suite montré qu'il pouvait au contraire s'agir de cellules mémoires. En effet, l'expression des IgM et IgD s'accompagne de celle du CD 27 (Himmelman et al, 2001). Parmi les lymphocytes B exprimant à la fois des IgM et IgD de surface, on distingue classiquement les lymphocytes B naïfs  $CD27^- IgM^+ IgD^+$  et les lymphocytes B mémoires  $CD27^+ IgM^+ IgD^+$ . Ces lymphocytes mémoires sont  $IgM^{high} IgD^{low}$  et seraient issus de la zone marginale splénique (Weller et al, 2004). La présence de deux groupes de patients soit  $IgM^{high}$ , soit  $IgM^{low}$ , n'a pas d'explication à ce stade.

##### **CD27**

Le CD27 est une glycoprotéine de type I, membre de la famille des récepteurs TNF (*tumor necrosis factor*). Il est exprimé par la majorité des lymphocytes T (thymocytes médullaires, lymphocytes T matures et activés), par les cellules NK, les macrophages, et enfin par des sous-populations de lymphocytes B. Son activation à la surface des lymphocytes B induit préférentiellement la différenciation plasmocytaire (Jacquot, et al 1997) et la sécrétion importante d'Ig de toutes classes (Agematsu et al, 1997). CD27 est de plus exprimé spécifiquement à la surface des lymphocytes B dotés de gènes des Ig hypermutés. A ce titre, il a été désigné comme un marqueur spécifique des B mémoires (Klein et al, 1998). Il faut noter que des données plus récentes mettent en cause

l'association établie entre le CD27 et les cellules mémoires, puisque des cellules B exprimant des IgG en absence du CD27 ont été détectées en périphérie chez l'humain (Fecteau et al, 2006).

Dans notre série, le CD27 est exprimé dans 84% des cas. On peut relever de rares cas CD27- (n=4) (Tableau VI), chez qui on note une lymphocytose modérée voire absente dans un cas. Le pourcentage de binucléés est également modéré. Enfin, le taux d'IgM sérique est légèrement augmenté (n=2) ou normal (n=2). L'+i(3)(q10) est absent dans 2 cas, présent dans un cas, et n'a pas été recherché pour le dernier cas. Il semblerait donc que l'absence d'expression du CD27 par les lymphocytes B puisse mener à une réévaluation du diagnostic de LPLB.

**Tableau VIII. Cas de LPLB CD27-**

Lymphocytes CD19+ (%)	Lymphocytes			Lymphocytes (G/L)	Binucléés (%)	Ig M sérique (g/L)	HLA DR7	+i(3)(q10)
	CD19+ CD27+ (%)	Age (ans)	Tabac					
30	13	34	O	5,14	1	3,6	OUI	NON
32	15	42	O	5,6	2	3,5	/	/
33	14	41	O	4,47	2	1,17	OUI	NON
26	14	42	O	3,83	3	1,69	OUI	OUI

*Note : valeurs de référence pour le dosage des IgM chez une femme : de 20 à 44 ans : 0,71 à 2,09 g/L.*

### **CD 21**

Le CD21 est une glycoprotéine transmembranaire, récepteur du complément C3d et du virus d'Epstein Barr. Il est exprimé sur les lymphocytes B à un stade intermédiaire de maturation médullaire, persistant jusqu'à un stade immunoblastique, où il disparaît, sauf après activation par le virus d'Epstein Barr. Il participe à la régulation de l'activation et de la prolifération des lymphocytes B.

Chez les patients atteints de LPLB, la persistance du CD 21 est un élément qui serait en faveur d'un rôle de l'EBV dans la survenue de la LPLB.



### **FMC7**

FMC7 est un épitope du CD20 exprimé par 50 à 100% des lymphocytes B chez les individus sains (Schmidt-Hieber et al, 2008). Il est également positif dans la plupart des syndromes lymphoprolifératifs B sauf la LLC.

Au cours de la LPLB, l'expression de FMC7 est nettement positive et forte sur une majorité de lymphocytes B, en rapport probable avec une expression forte et constante du CD20.

### **CD5**

Le CD5 est un marqueur exprimé par les cellules T et par une sous-population de cellules B. Les lymphocytes B CD5+ sont appelés cellules B1. Le marqueur CD5 est également exprimé par les lymphocytes B des désordres lymphoprolifératifs comme la LLC et le lymphome du manteau.

Chez les sujets LPLB, l'expression du CD5 est inhabituelle mais peut être observée, parfois partiellement. La plupart des études concluent à l'absence d'expression du CD5 (Feugier et al, 2004 ; Himmelmann et al, 2001 ; Mossafa et al, 2004 ; Cornet et al, 2009), alors que les équipes de Schmidt-Hieber (2008) et de Salcedo (2002) notent une expression faible de CD5. Reeder et al. (1999) rapportent également un cas de LPLB avec expression du CD5. Ces discordances illustrent la difficulté de comparer des données issues de protocoles d'immunophénotypage variés (stratégie de gating, seuil de positivité, etc).

### **CD23**

Le marqueur CD23 est une glycoprotéine transmembranaire. C'est un récepteur de faible affinité pour les IgE. Il capte les complexes immuns contenant des IgE et intervient dans la présentation des antigènes par les lymphocytes B aux lymphocytes T. Il est exprimé principalement par les lymphocytes B (apparaît à un stade tardif de maturation et disparaît sur les plasmocytes) et par les monocytes. Son expression est positive au cours de la LLC. Il est classiquement décrit comme un marqueur d'activation des lymphocytes B naïfs. La majorité des lymphocytes B mémoires seraient CD 23- (Veneri et al, 2009).

Les premières études concernant les lymphocytes B de la LPLB concluaient à l'absence du CD23 (Troussard et al, 1997 ; Mossafa et al, 1999). Des études plus récentes (Schmidt-Hieber et al, 2008 ; Salcedo et al, 2002 ; Himmelmann et al, 2001) ont en revanche rapporté une expression faible du CD23. Dans notre série, l'expression du CD23 est habituellement négative. Lorsqu'elle est présente, son intensité est faible. Cette expression faible est majoritairement rendue négative, et de rares fois positive. Ces observations montrent l'importance du positionnement du seuil de positivité en cytométrie en flux pour l'interprétation du résultat.

### **CD25**

Le CD25, chaîne alpha du récepteur à l'Il-2, est exprimé sur de nombreuses cellules activées, incluant des lymphocytes T, lymphocytes B et les monocytes. Il est également rencontré sur des cellules T et B transformées, des sous-populations de lymphocytes B au repos, des thymocytes, des cellules myéloïdes, etc. Son expression au cours de la LPLB semble variable. On relève 51% de cas positifs dans la littérature, mais l'expression reste toujours négative dans notre série.

### **CD40**

L'expression du CD40 n'a été analysée dans aucun cas relevé dans la littérature mais a été étudiée chez 20 patients de la cohorte lorraine : elle est positive dans tous les cas. CD40 est un membre de la famille des récepteurs TNF. Il est exprimé à la surface des lymphocytes B. La stimulation du CD40 par le CD154 (CD40L) exprimé par les LT influence la réponse au niveau de la prolifération, de la différenciation, de la commutation isotypique, de la formation des CG et de la génération des cellules B mémoires. Au cours de la LPLB, Loembe et al (2001) ont observé grâce à l'utilisation du système de culture basé sur l'activation cellulaire via CD40, une inhibition de la prolifération des lymphocytes après stimulation par le CD40. Il existerait donc une anomalie de la voie CD40-CD40L malgré l'expression de CD40 par les lymphocytes binucléés.

### **Voies de signalisation**

L'analyse des marqueurs CD30, 34, 122, 138, et 154, acteurs des voies de signalisation, montre une expression toujours négative (le nombre de patients testés étant respectivement de 23, 13, 22, 20 et 8).

### **Autres marqueurs**

L'expression de CD10, marqueur des lymphocytes B des CG, est négative. Celle de CD38 (marqueur des B immatures et des CG) est variable : les cas lorrains sont CD38- en totalité, alors que les quelques cas CD38 faibles ou positifs sont rapportés dans la littérature. L'absence de CD38 et CD10 montre que les lymphocytes de la LPLB ne dérivent pas des CG. Enfin, CD103 exprimé dans les leucémies à tricholeucocytes n'est pas détecté, alors que le CD11c, second marqueur spécifique de ces désordres, est quant à lui détecté de manière variable. L'expression du CD95 est elle aussi variable : les quatre cas analysés à Nancy sont négatifs, alors que les trois cas de la littérature sont tous positifs.

### **e. Conclusion**

En conclusion, si des marqueurs phénotypiques doivent être retenus comme critères diagnostiques obligatoires dans la LPLB, ce sont les marqueurs lymphoïdes B (CD19, CD20, CD22, CD24, CD40, CD79b) ainsi que le CD27, CD21 et FMC7. Les CD10, CD43, CD38 et CD103 sont absents. L'absence d'expression du CD5 n'est pas un critère car de rares cas de LPLB typiques montrent une expression partielle du CD5.

Par ailleurs, les intensités de marquage sont caractéristiques : CD20 fort, IgM<sup>fort</sup>, IgD<sup>faible</sup>, CD22<sup>faible</sup>, CD79b<sup>fort</sup>. Le phénotype attendu des cellules lymphoïdes de la LPLB serait donc : B, IgM<sup>high</sup> + D<sup>low</sup>, CD19+, CD5<sup>low</sup>-/+, CD10-, CD11c-/+, CD20<sup>high</sup>+, CD21+, CD22<sup>low</sup>+, CD23-/+, CD24+, CD25-, CD27+, CD38-/+, CD40+, CD43-, CD79b<sup>high</sup>+, CD103-, FMC7<sup>high</sup>+

Tableau IX. Fréquence d'expression des différents marqueurs lymphocytaires au sein de la cohorte lorraine et parmi les cas décrits dans la littérature.

Marqueurs	CD19		CD20		CD22		CD24		CD79b		FMC7		CD27		CD21		CD5		CD11c		CD23		
	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	
L : littérature / CL : cohorte lorraine																							
Nb cas étudiés (n)	118	50	38	48	42	48	9	43	18	49	68	49	38	44	9	26	76	50	32	44	79	49	
<b>Cas positifs (%)</b>	<b>100</b>	<b>98</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>100</b>	<b>91</b>	<b>100</b>	<b>94</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>97</b>	<b>84</b>	<b>89</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>13</b>	<b>25</b>	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	
<b>Cas positifs faibles (%)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	18	/	6	/	34	/	

CD38		CD25		CD95		CD10		CD103		CD40		CD37		CD43		CD54		CD148		62E		62P	
L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL	L	CL
24	49	49	45	3	4	71	48	27	45	/	20	2	/	/	49	9	/	5	/	8	4	8	/
<b>4</b>	<b>0</b>	<b>51</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>/</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>/</b>	<b>100</b>	<b>/</b>	<b>0</b>	<b>/</b>	<b>0</b>	<b>/</b>
13	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Notes : Le seuil de positivité est fixé à 20% de la population cellulaire. Les pourcentages de CD19 et CD20 sont inférieurs à 100% en raison des rares cas où la population de lymphocytes B est inférieure à 20% de la population lymphoïde totale.

## **B. Etude expérimentale : *Image Stream X AMNIS*®**

### **a. Introduction**

L'analyse classique des lymphocytes B de patients LPLB par cytométrie en flux permet l'immunophénotypage global de la population lymphocytaire B totale, ce qui limite l'interprétation à des populations cellulaires (ensemble de cellules). Les lymphocytes B binucléés sont minoritaires (1 à 10% des lymphocytes) et ne sont pas individualisés lors de l'analyse par deux couleurs. Ces lymphocytes binucléés expriment-ils les mêmes marqueurs que le reste de la population lymphocytaire B ? L'étude des cellules par *Image Stream X AMNIS*®, système d'imagerie en flux, permet d'affiner l'analyse immunophénotypique grâce à la visualisation des cellules. L'*Image Stream X AMNIS*® offre un phénotype visuel des lymphocytes B, cellule par cellule.

Ce travail présente la démarche suivie pour mettre au point un protocole d'étude des lymphocytes binucléés par l'*Image Stream X AMNIS*® ainsi que les premiers résultats obtenus. Il est totalement original.

### **b. *Image Stream X AMNIS*® : présentation générale**

L'imagerie en flux proposée par *Image Stream X AMNIS*® combine cytométrie en flux et imagerie photonique, permettant d'obtenir des données quantitatives immunophénotypiques et morphologiques sur des cellules en suspension. Le système rend possible la visualisation de la morphologie cellulaire et de la localisation de sondes fluorescentes dans des sous-populations.

#### 1. Caractéristiques techniques

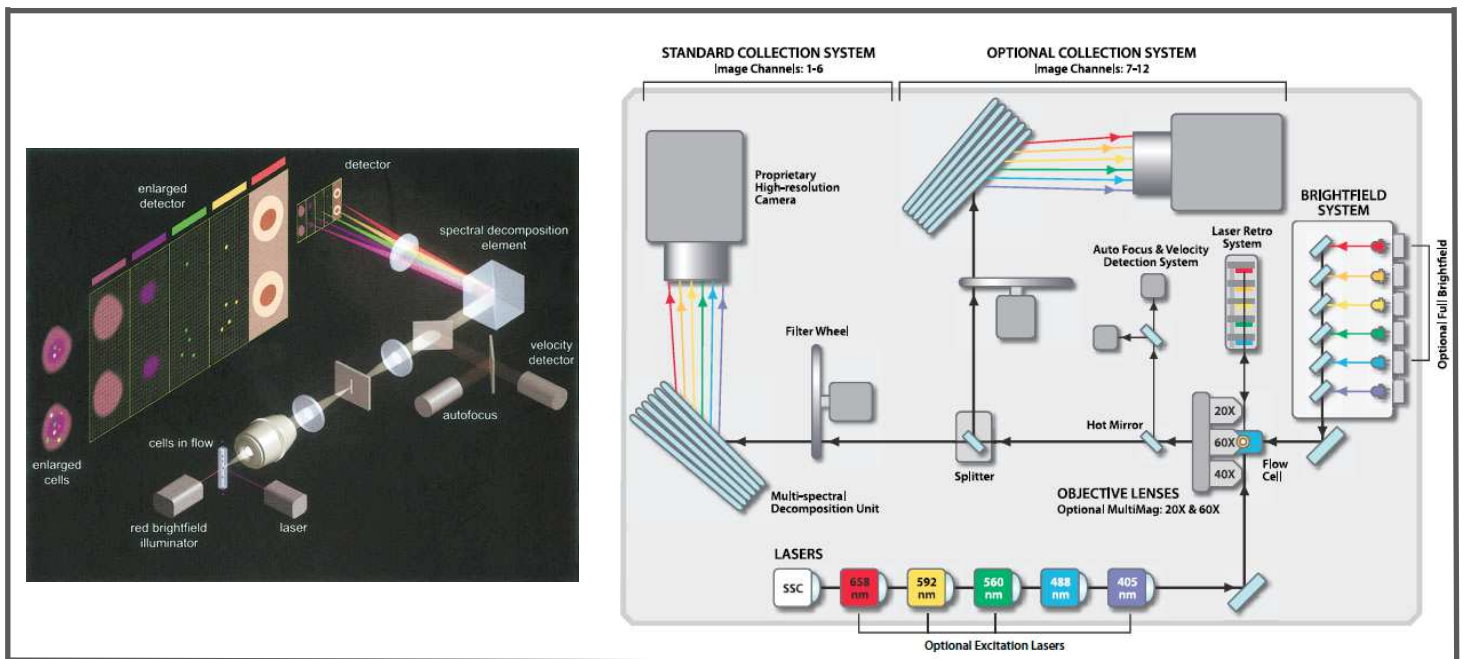
L'*Image Stream X AMNIS*® est présenté comme un cytomètre en flux de seconde génération. Il possède la sensibilité de fluorescence des cytomètres en flux actuels, analyse des échantillons à des vitesses de plus de 1000 cellules par seconde. 5 lasers d'excitation et 12 canaux de détection sont à bord (Figure 7).

Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal	Canal
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
420-480 nm	480-560 nm	560-595 nm	595-660 nm	660-740 nm	740-800 nm	420-505 nm	505-570 nm	570-595 nm	570-595 nm	595-660 nm	660-740 nm	740-800 nm

Lasers d'excitation	405 nm diode laser	488 nm diode laser	561 nm diode laser	592 nm diode laser	658 nm diode laser
---------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

**Figure 7. Caractéristiques techniques de l'Image Stream X AMNIS ®  
12 canaux images et 5 lasers d'excitation.**



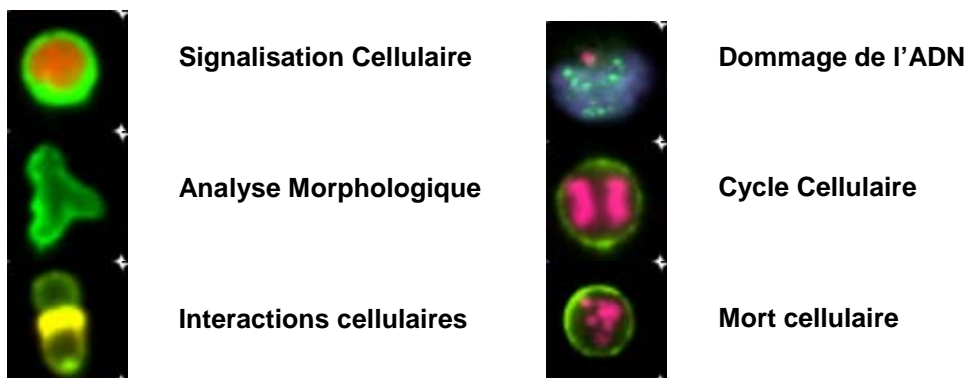
**Figure 8. Représentation schématique de l'Image Stream X AMNIS ®  
D'après Amnis Corporation et George et al, 2004.**

La figure 8 illustre le fonctionnement et les éléments clés de l'Image Stream X AMNIS®. Les cellules sont concentrées en un flux par focalisation hydrodynamique. Elles passent devant différentes sources lumineuses dont 5 lasers d'excitation différents

et une lumière blanche (« *brightfield* »). La lumière est recueillie avec un objectif d'imagerie (X20, 40 ou 60) et passe à travers un système de décomposition spectrale. Les différentes bandes spectrales ainsi séparées sont projetées sur un détecteur à comptage de charge (CCD) qui permet la conversion des photons en pixel. Chaque image est ainsi décomposée en 6 sous-images, chacune correspondant à une composante de couleur différente. Le CCD est exploité en le couplant à une technique appelée TDI « *Time Delay Integration* ». Il s'agit d'un mode de détection spécialisé qui utilise une cellule de mesure de la vitesse de passage des cellules. Il garantit la qualité et la sensibilité des images provenant de cellules en mouvement.

## 2. Applications

L'analyse de cellules, vivantes ou fixées, par *l'Image Stream X AMNIS®* et par le logiciel d'analyse d'image *IDEAS® (Image Data Exploration and Analysis Software)* permet d'étudier la signalisation cellulaire, la translocation nucléaire de facteurs de transcription, la colocalisation de marqueurs de surface, l'apoptose, la coopération cellulaire, etc (Figure 9).



**Figure 9. Applications de *l'Image Stream X AMNIS®*.**

**D'après Amnis Corporation.**

### **c. Analyse des lymphocytes de patients LPLB par l'*Image Stream X AMNIS*®**

L'*Image Stream X AMNIS*® offre la possibilité d'obtenir un phénotype visuel des lymphocytes B. L'étude des lymphocytes B fixés et marqués par l'analyseur et par son logiciel d'analyse d'image *IDEAS*® permet d'obtenir des données phénotypiques objectives sur un grand nombre de lymphocytes morphologiquement binucléés.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1) Patients

Cette étude a été menée sur 11 patientes avec LPLB âgées de 24 à 59 ans appartenant à la cohorte lorraine. 5 mL de sang ont été prélevés sur tube hépariné (héparinate de lithium, bouchon vert) lors de consultations de suivi des patients, puis analysé aussitôt (n= 7) ou après congélation (n= 4). 10 témoins ont été analysés en parallèle.

### 1.2) Purification des cellules mononucléées à partir de sang total selon leur gradient de densité

Après dilution dans du PBS (Tampon de lavage : Dulbecco's phosphate buffered saline, Eurobio, Courtaboeuf, France), le sang est déposé sur le milieu de séparation Gradient de Ficoll (TM : LSM 1077, Lymphocyte Separation Medium, PAA Laboratories, Germany), en respectant la proportion de 2 volumes de sang dilué pour 1 volume de milieu de séparation. Après centrifugation à 1200g pendant 20 minutes à température ambiante, l'anneau de cellules mononucléées situé à l'interface entre le plasma et le milieu de séparation est récupéré, puis lavé dans du PBS avec une centrifugation à 600g pendant 10 minutes, à température ambiante. Le culot obtenu est alors récupéré par inversion, un nouveau lavage des cellules est effectué dans 10mL de PBS. Le culot est remis en suspension dans 1mL de PBS. Avant de procéder à la numération cellulaire, 50µL de la suspension cellulaire contenu dans le culot sont prélevés et incubés avec 5µL d'anticorps anti-CD45 FITC (A07782, clone J.33, Human CD antibodies, IoTest®, Beckman-Coulter) pendant 20 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de 0.5mL de paraformaldéhyde (PAF) 1% de PBS. Le comptage se fait



grâce à l'ajout de billes de comptage (Flow-count™ 7547053, Beckman-Coulter, Ireland Inc) et à un protocole adapté sur le cytomètre en flux (Cytomics FC500, Beckman-Coulter). Si la suite de la manipulation est reportée, les cellules sont congelées. Après séparation des cellules mononucléées sur gradient de densité, les cellules sont reprises dans 0,5mL de milieu de culture RPMI froid. Une plus grande dilution est réalisée si la numération excède 10 millions de cellules/mL. Le sérum de veau fœtal (SVF) - DMSO 20% est ajouté, goutte à goutte, à un volume égal au volume de cellules dans le RPMI. La suspension cellulaire est rapidement distribuée dans les cryotubes qui sont placés à -20°C puis -80°C. En temps voulu, l'aliquot est décongelé au bain-marie puis rapidement repris dans 45mL de RPMI et centrifugé à 1800 tours pendant 10min. Un lavage au PBS est ensuite effectué.

### **1.3) Marquage des cellules**

#### **1.3.1) Définition des marqueurs d'intérêt**

Le choix des marqueurs s'est inspiré du profil phénotypique obtenu par l'immunophénotypage lymphocytaire B réalisé chez les patients LPLB en cytométrie en flux. Ce profil, comme indiqué précédemment, est le suivant : CD19+, 20+, 22+, 24+, 79b+, 27+, 21+, 40+, FMC7+, CD10-, 103-. Pour les CD5, 11c, 23, 25 et 38, les données sont moins tranchées. Des essais ont été réalisés (Tableau X) avec, parmi les marqueurs positifs, les CD20, CD21, CD27 CD40 et FMC7. Parmi les marqueurs négatifs, le CD10 a été étudié. Enfin le CD5 et le CD23 ont également été analysés. D'autres marqueurs complètent cette liste. Il s'agit tout d'abord du CD14. En effet, l'analyse des premières images a montré la difficulté de différencier un lymphocyte binucléé d'un monocyte. Il a donc été jugé nécessaire de vérifier l'absence de marquage aspécifique du CD20 sur les monocytes. L'expression du TLR9 a également été étudiée afin de vérifier sa surexpression à la surface des lymphocytes B binucléés (Sokolowska-Gillois, 2009). Enfin l'expression de Ki67, marqueur de prolifération, a également été étudiée.

**Tableau X. Marqueurs étudiés pour chaque patient et témoin.**

Patients		Témoins	Marqueurs étudiés		
1	GIM.	0	DAPI	CD19 ECD + TLR9 FITC	
2	BRO.	0	DAPI	CD20 FITC CD19 ECD + CD27 PE	
3	GEN.	1	DAPI	CD20 PC5 CD27 PE + TLR9 FITC	
4	PET.	1			
5	JEA.	1			
6	MAL.	2	DAPI	CD20 PC5 CD27 PE + TLR9 FITC + CD5 APC	
7	DAU.	0	DAPI	CD20 FITC	CD5 PC5 + CD23 ECD
					CD10 PE
					Ki67 AF647
					CD14 FITC
				CD20 PC5	CD21 FITC
		FMC7 FITC			
8	ROL.	1	DAPI	CD20 FITC	CD27 PC5
					CD5 PC5
				CD20 PC5	TLR9 FITC
					CD14 FITC
9	DAN.	1	DAPI	CD20 FITC	CD27 PC5 + TLR9 PE
					CD5 PC5 + CD14 PE
					CD23 ECD
					Ki67 AF647
10.	RIC.	2	DAPI	CD20 FITC	CD27 PC5
					CD5 PC5
11.	TEN.	1	DAPI		CD23 ECD
					Ki67 AF647
					TLR9 FITC
				CD20 PC5	CD14 FITC
			FMC7 FITC		

Légende :

**AF 647** : Alexa Fluor 647 ; **APC** : Allophycocyanin ; **DAPI** : Di-amino Phenyl-indol ; **ECD** : Phycoerythrin-texas Red ; **FITC** : fluorescein isothiocyanate ; **PC5** : Phycoerythrin-Cyanin 5 ; **PE** : Phycoerythrine.

### 1.3.2) Choix des fluorochromes

La préparation d'un ou de plusieurs tubes a été réalisée (Tableau X), chaque tube contenant au minimum un Ac anti-CD20 (FITC ou PC5) et le marqueur nucléaire DAPI. Pour chaque marqueur, un tube dit « monomarquage » doit être préparé : il servira à la mise au point des compensations. Il ne contient que la suspension cellulaire et le marqueur étudié. Les tubes dits « multimarquages » mettent en présence la suspension cellulaire avec les différents marqueurs analysés ensemble. La liste des fluorochromes utilisés est donnée dans la légende du tableau X.

### 1.3.3) Protocole de marquage

#### ❖ Incubation avec les marqueurs membranaires

50 à 100µL de suspension cellulaire sont placés dans des tubes à hémolyse (volume à adapter pour l'obtention d'1 million de cellules) et incubés pendant 15 minutes à l'obscurité et à 4°C avec 5 µL de marqueurs membranaires.

#### ❖ Fixation et perméabilisation

*Deux protocoles de fixation / perméabilisation ont été testés, les deux pouvant être utilisés indifféremment :*

##### ○ Réactif A et B du Kit Intra Stain, réactif (#k2311, Dako, Denmark)

Les cellules sont fixées avec 100µL de réactif A du Kit Intra Stain, réactif (#k2311, Dako, Denmark) puis incubées 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Un lavage est ensuite réalisé avec 2mL de PBS, avec une centrifugation à 300g pendant 5 minutes. 100µL du réactif B du Kit Intra Stain (#k2311, Dako, Denmark) sont ajoutés pour la perméabilisation des cellules avant incubation pendant 15 minutes à température ambiante avec 3µl de marqueurs intracellulaires (DAPI, TLR9, Ki67). Les cellules sont ensuite lavées avec 2mL de PBS, puis centrifugées à 300g pendant 5 minutes avant de les analyser sur l'*Image Stream X Amnis®*

##### ○ Fix Facs Lyse

Une solution est préparée à partir de Fix Facs Lyse (FFL) selon le schéma suivant : un volume de FFL pour 3 volumes de paraformaldehyde à 10% et 6 volumes d'eau

distillée. Les cellules sont incubées avec 500µL de cette solution durant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Un double lavage est ensuite réalisé avec 2mL de PBS, avec une centrifugation à 300g pendant 5 minutes. 100µL de Triton X-100 (protein grade – calbiochem) dilué au 1/100 dans du PBS sont ajoutés pour la perméabilisation des cellules avant incubation pendant 15 minutes à température ambiante avec 3µl de marqueurs intracellulaires (DAPI, TLR9, Ki67). Un double lavage des cellules est ensuite réalisé avec 2mL de PBS et une centrifugation à 300g pendant 5 minutes, avant l'analyse sur l'*Image Stream X Amnis®*.

#### **1.4) Acquisition des données par *Image Stream X Amnis®***

Pour l'étude des lymphocytes binucléés, l'*Image Stream X Amnis®* a été configuré avec 4 lasers : 405, 488, 658 et 785. Chaque laser a été réglé respectivement à une intensité de 5, 50, 50, et 20. Le tableau XI rapporte les signaux recueillis dans les différents canaux selon le fluorochrome utilisé. L'acquisition du nombre d'événements a été réglée à 20 000 cellules par échantillon, dont les images ont été obtenues à un grossissement de X60. Les images saturées ont été éliminées en réglant l'intensité maximale d'acquisition des données à 4000 pixels. L'élimination des déchets a été prévue en collectant uniquement des images pour les événements d'aire supérieure à 25 µm<sup>2</sup>. De la même manière, la limite supérieure a été fixée à 50 µm<sup>2</sup> pour éliminer les amas cellulaires.

**Tableau XI. Recueil des signaux provenant de chaque fluorochrome dans les différents canaux.**

Canal	Fluorochrome
1	<i>Brightfield</i>
2	FITC
3	PE
4	ECD
5	PC5
6	<i>SSC (Side scatter)</i>
7	DAPI
11	APC
	AF 647

## 1.5) Analyse des données par le logiciel IDEAS® (Image Data Exploration and Analysis Software)

### 1.5.1) Logiciel d'analyse d'image IDEAS®

Le principal intérêt de l'*Image Stream X AMNIS*® couplé au logiciel d'analyse d'image *IDEAS*® (Figure 10) est sa capacité, en utilisant des stratégies classiques de « *gating* », à discriminer des populations cellulaires en fonction de critères morphologiques grâce à l'analyse des images, et en fonction de l'intensité de fluorescence des marqueurs utilisés. Une caractéristique particulièrement utile de ce logiciel est la possibilité, en sélectionnant une cellule à partir de son image, de situer son point sur un graphe. L'inverse est également vrai : les images d'une population ou d'un seul point sur un nuage de points peuvent être spécifiquement visualisées.

Les algorithmes du logiciel *IDEAS*® permettent de créer deux types de fonctions : le *mask* et la *feature*. Le *mask* se réfère à l'ensemble des pixels qui composent la région d'intérêt. La *feature* est une fonction de calcul. Elle se réfère aux valeurs calculées par *IDEAS*® à partir des intensités des pixels de l'image. Elle peut être appliquée à un masque. Dans cette étude nous avons utilisé les *feature Area*, *Aspect Ratio*, *Dégradé RMS*, *Circularity*.

Le processus de compensation est effectué par le logiciel *IDEAS*® à partir de données obtenues par les tubes « monomarquages » contenant un unique fluorochrome. Ces tubes sont préparés pour chaque fluorochrome utilisé. La fluorescence est détectée dans le canal spécifique du marqueur et dans les canaux adjacents. Le pourcentage de signal non spécifique est évalué pour chaque marqueur dans chaque canal, et le logiciel calcule une matrice de compensation.

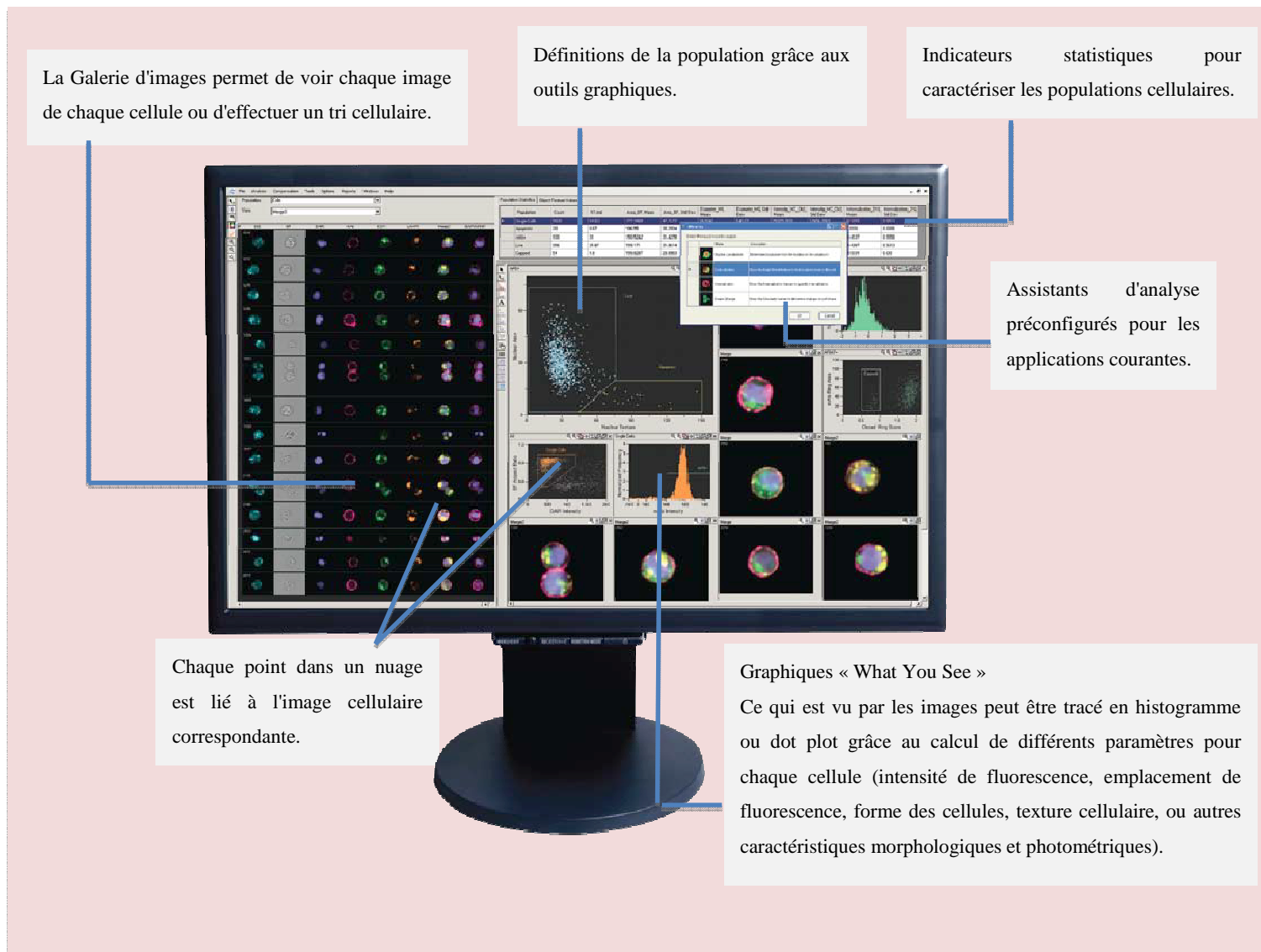


Figure 10. IDEAS® : logiciel d'analyse d'image.

D'après Amnis Corporation.

### 1.5.2) Sélection des cellules isolées

La première étape lors de l'analyse des données par *IDEAS*®, après avoir appliqué les compensations, est la sélection des cellules isolées. Il faut pour cela tracer le *dot plot* *Areas versus Aspect ratio* (Figure 11). L'*Aspect ratio* correspond au rapport entre la longueur et la largeur d'un événement. Les éléments ayant un *Aspect ratio* proche de 1.0 correspondent aux cellules isolées.

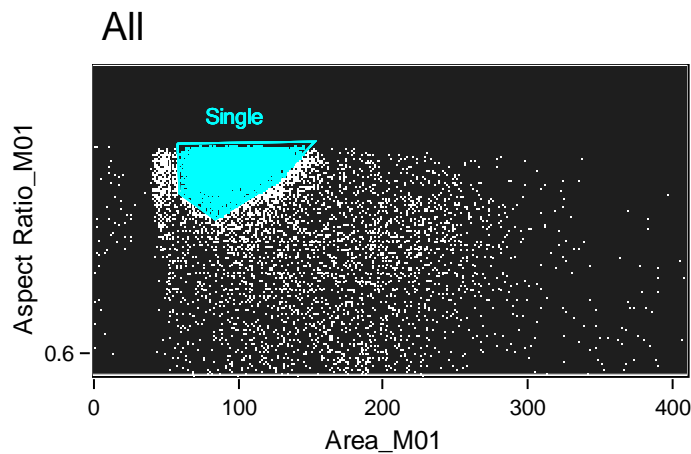


Figure 11. Sélection des cellules isolées « *single* » parmi l'ensemble des événements.

### 1.5.3) Sélection des images nettes

Parmi les éléments isolés, il faut ensuite éliminer les images floues en traçant cette fois l'histogramme de la fonction *Dégradé RMS* (Figure 12). Le *dégradé RMS* évalue les fortes variations de valeurs de pixels voisins dans une image. Plus une image est nette, plus le *dégradé RMS* est important.

### 1.5.4) Sélection des cellules CD20+

L'étape suivante est le *gating* des lymphocytes B CD20+ parmi les cellules « *focus* » (Figure 13).

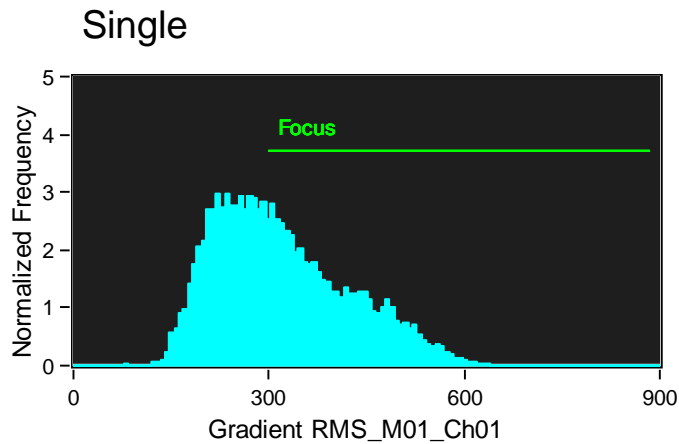


Figure 12. Sélection des images nettes « *focus* » parmi les événements isolés.

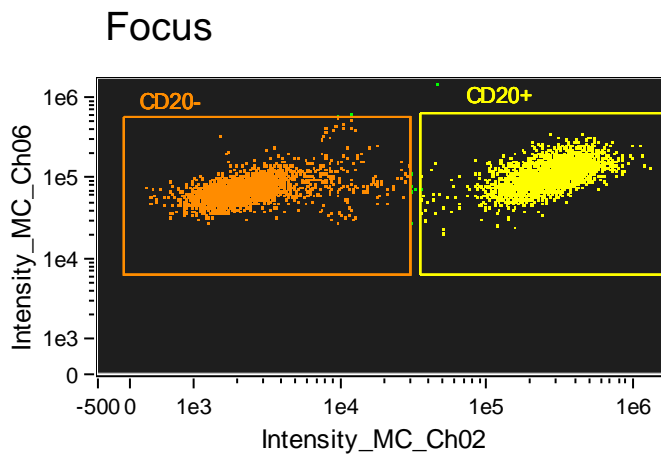
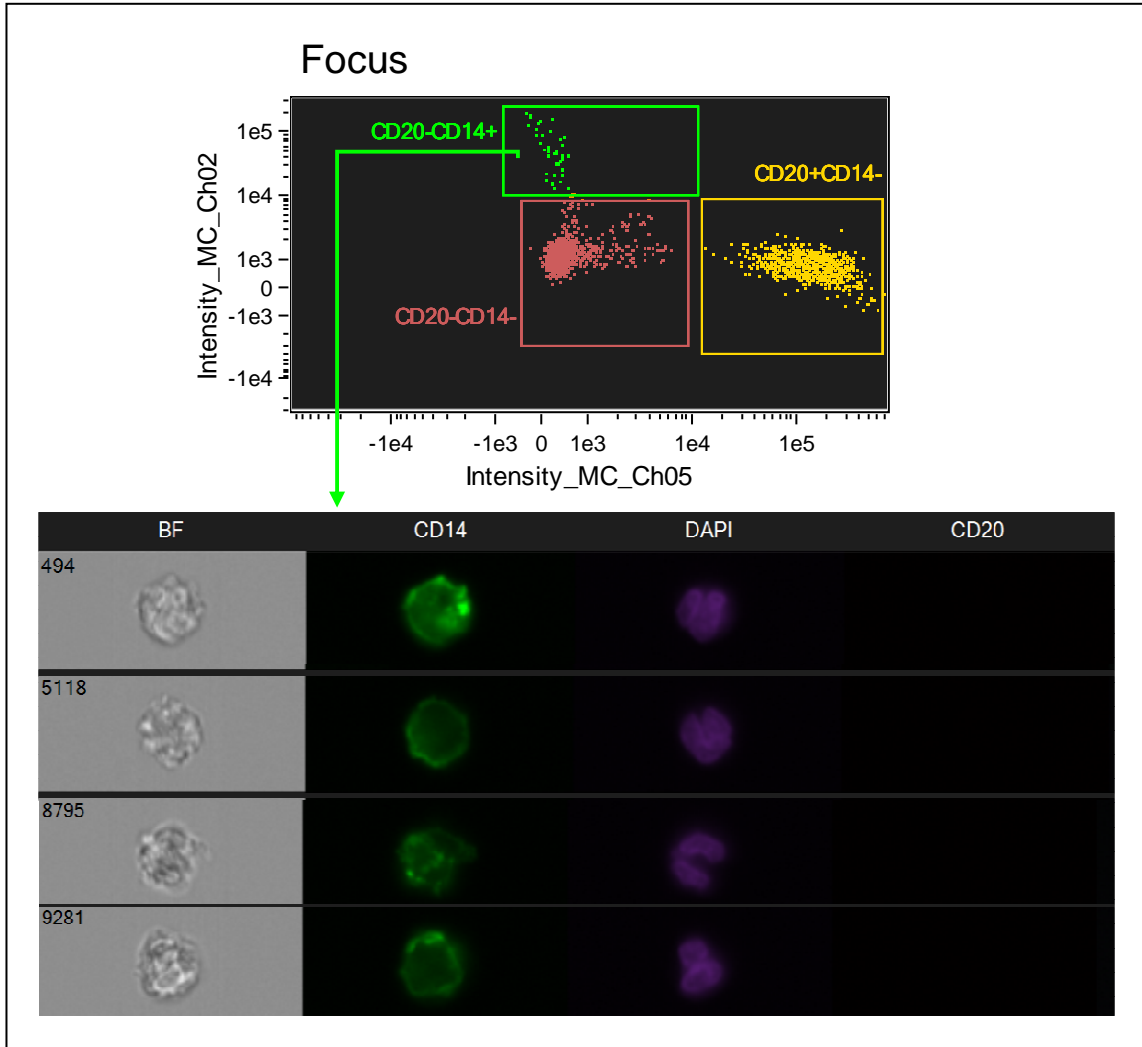


Figure 13. Sélection des lymphocytes B parmi les cellules « *focus* ».

### 1.5.5) Vérification de l'absence de population CD20+ CD14+

L'analyse des premières images a montré la difficulté de différencier un lymphocyte binucléé d'un monocyte dans la mesure où les lobulations du noyau des monocytes peuvent évoquer celle des lymphocytes binucléés. L'absence de marquage aspécifique du CD20 sur les monocytes a donc été vérifiée par la suite chez 5 patientes et 5 témoins. L'absence de double marquage CD20+/CD14+ a été démontrée à chaque fois (Figure 14).



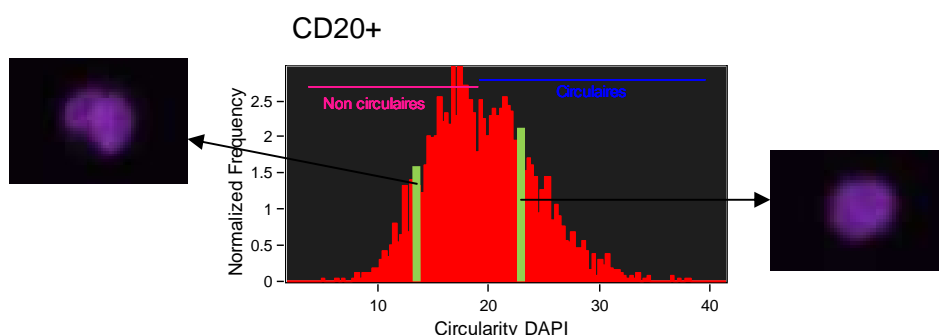


**Figure 14. Expression des CD20 (canal 5) et CD14 (canal 2) par les cellules « focus ».**

L'étude de l'expression des CD20 et CD14 montre l'absence de population CD20+ CD14+. A noter, les noyaux de la population CD14+ ont une forme échancrée qui se rapproche de celle de certains lymphocytes binucléés.

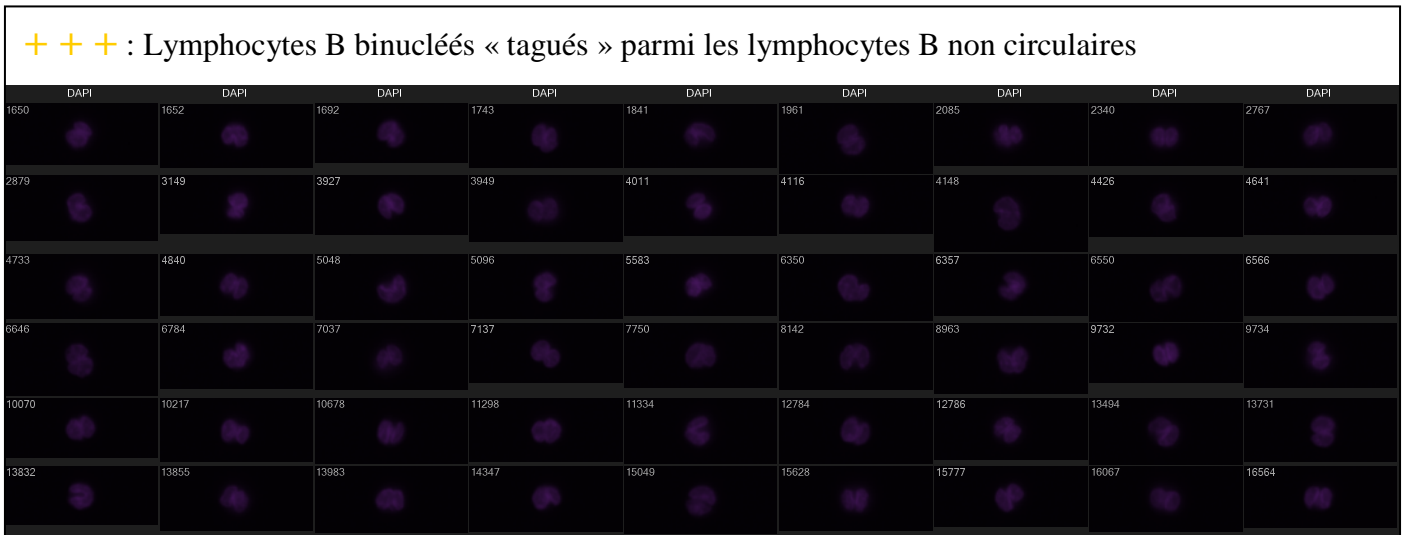
### 1.5.6) Discrimination des lymphocytes binucléés

Enfin, la dernière étape consiste en un tri des images afin de séparer les images correspondantes aux lymphocytes binucléés de celles correspondantes au reste de la population CD20+. Pour cela, différentes *features* proposées par le logiciel ont pu être appliquées à nos données. Les *features* *Symetrie*, *Lobe count*, et *Circularity* ont été sélectionnées car elles semblaient être les plus adaptées à notre problématique. Ces différentes *features*, appliquées à l'image du noyau (c'est-à-dire au *mask* DAPI), permettent la discrimination de l'ensemble des images selon, respectivement, l'existence d'une symétrie dans le noyau, l'individualisation d'un ou de plusieurs lobes dans le noyau, ou encore selon la circularité du noyau. Les *features* *Symetrie* puis *Lobe count* ont été testées puis abandonnées car insuffisamment discriminantes. L'application de la *feature* *Circularity* sur le *mask* DAPI a donné de meilleurs résultats (Figure 15). *IDEAS*® classe les images selon la circularité croissante du noyau des cellules. Les lymphocytes binucléés sont parmi les moins circulaires. Ce choix a par la suite été confirmé comme étant le plus discriminant grâce à l'utilisation de l'application *Find the best feature* par *IDEAS*®. *IDEAS*® calcule le pouvoir discriminant des différentes *features* pré-sélectionnées par l'utilisateur. La *feature* *Circularity* appliquée au *mask* DAPI apparaît ici comme ayant le plus fort pouvoir discriminant.



**Figure 15. Discrimination des lymphocytes « non circulaires » et des lymphocytes « circulaires » parmi l'ensemble des lymphocytes B grâce à la *feature* *Circularity* DAPI.**

Parmi les lymphocytes B « non circulaires », il est ensuite possible de sélectionner manuellement (de « taguer ») les images correspondantes aux lymphocytes binucléés (Figure 16). Ces images « taguées » peuvent ensuite être situées sur un *dot plot* : leur emplacement est matérialisé par *IDEAS®* grâce à une croix jaune.



**Figure 16. Sélection manuelle des lymphocytes binucléés parmi les lymphocytes B non circulaires.**

## 2. Résultats

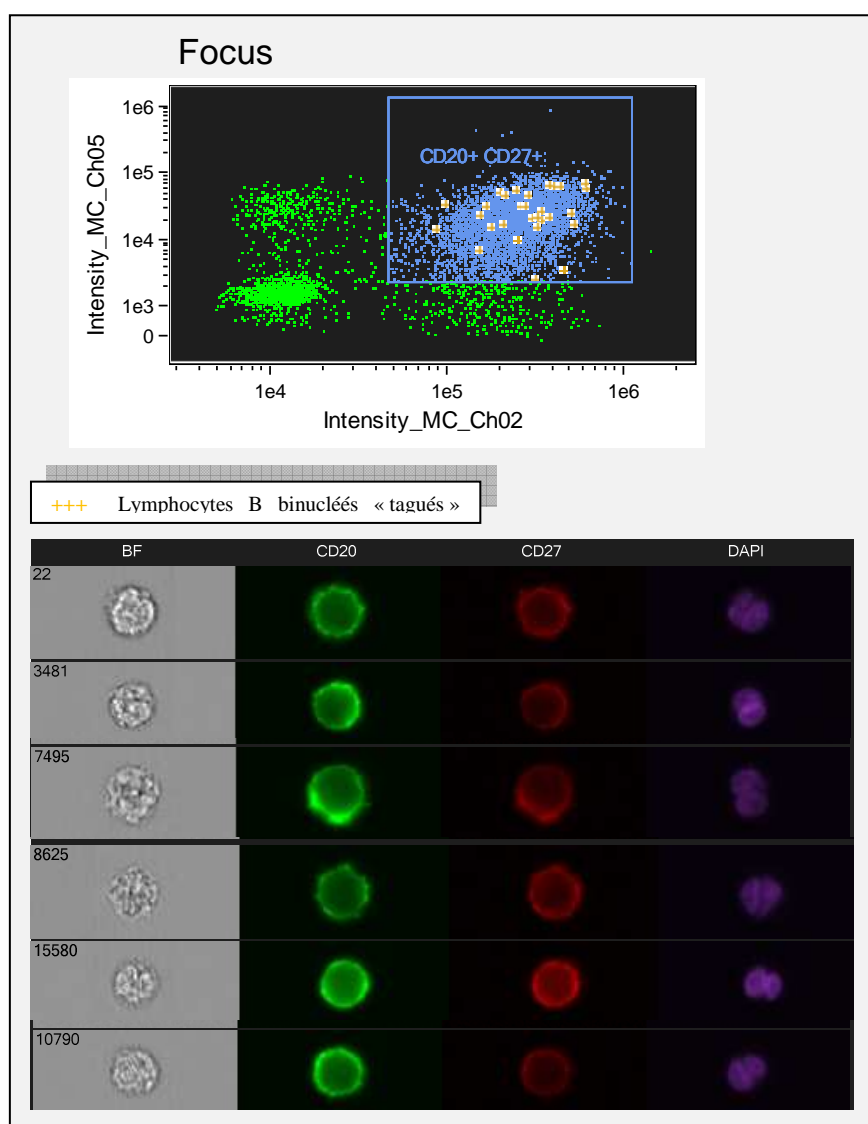
### 2.1) Expression de CD27

L'expression de CD27 a été étudiée d'abord chez 2 patients et 2 témoins par un marquage DAPI / CD20 FITC / CD27 PE. Le CD27 PE a été abandonné à la faveur du CD27 PC5 pour un meilleur marquage. 4 patients et 5 témoins ont été étudiés par un marquage DAPI / CD20 PC5 / CD27 PC5.

Les résultats indiquent, comme attendu, un pourcentage plus élevé de lymphocytes B CD27+ chez les patients par rapport aux témoins (Tableau XII). D'autre-part, chez les différents patients étudiés, les lymphocytes binucléés expriment toujours CD27 (Figure 17), confirmant les données phénotypiques obtenues par CMF.

**Tableau XII. Taux d'expression de CD27 par les lymphocytes B chez les témoins et les patients.**

Lymphocytes B CD27+ (%)			
Témoins	41,60	Patients	67,30
	18,70		64,50
	35,70		79,30
	44,70		75,90
	34,80		/



**Figure 17. Expression de CD20 (canal 2) et CD27 (canal 5) par les cellules « focus » et par les lymphocytes binucléés « tagués ».**

Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». Le logiciel *IDEAS*® matérialise ces binucléés par une croix jaune sur le *Dot Plot*. Les binucléés tagués expriment tous CD27.

## **2.2) Expression de FMC7**

L'expression de FMC7 a été évaluée chez 3 patients et 1 témoin par un marquage DAPI / CD20 PC5 / FMC7 FITC. Seuls les résultats d'un patient sont exploitables. L'analyse par *Image Stream X AMNIS*® montre l'expression de FMC7 par les lymphocytes B, en accord avec les données phénotypiques de la littérature et de la cohorte lorraine.

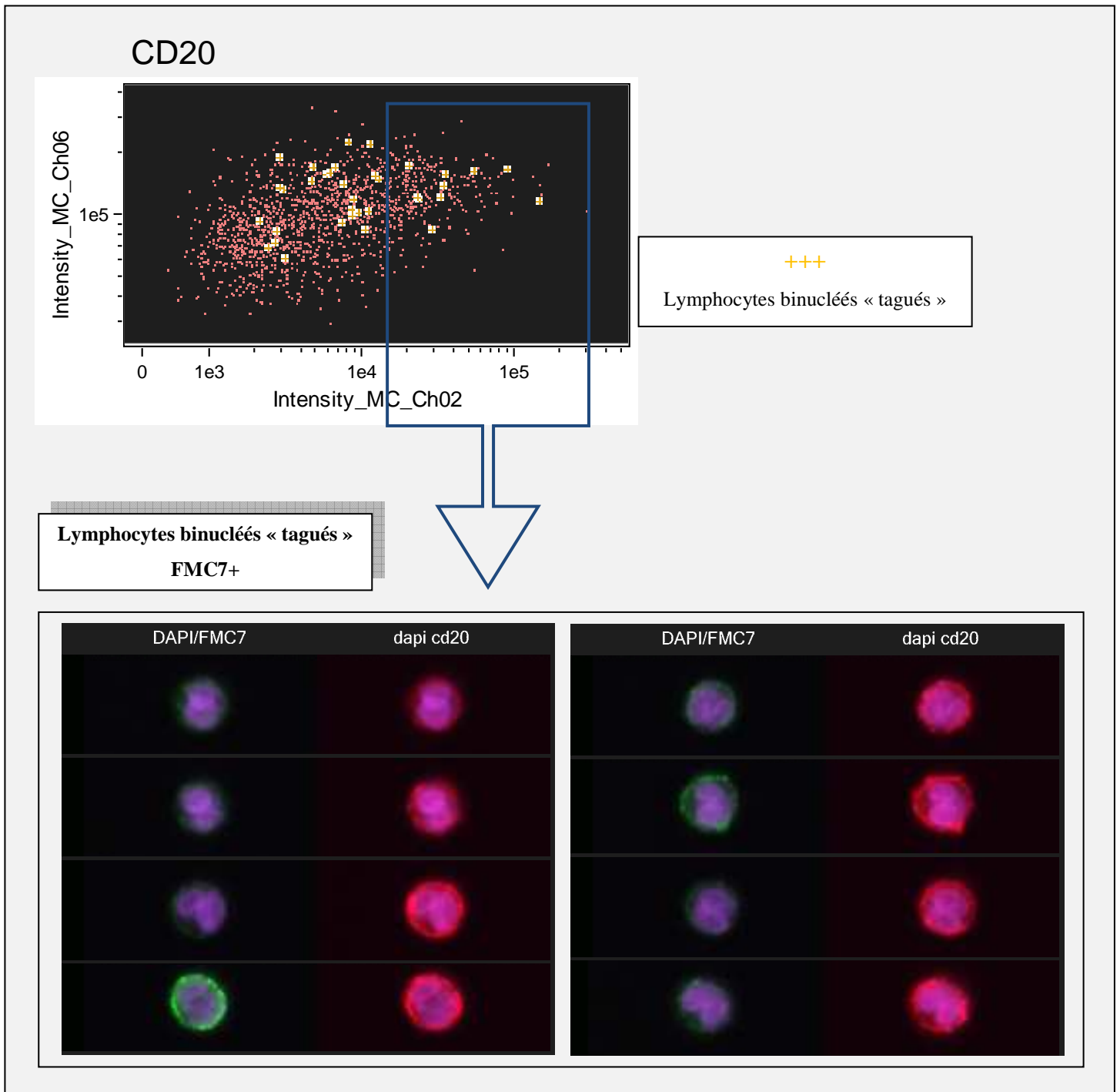
D'autre-part, la matérialisation des lymphocytes B binucléés « tagués » sur le *dot plot* FMC7 *versus* SSC construit à partir des cellules CD20+ montre une expression variable de FMC7 par les lymphocytes binucléés. Une partie des binucléés expriment FMC7, avec une intensité plus ou moins forte, alors qu'une autre partie de la population reste FMC7- (Figure 18).

## **2.3) Expression de CD21**

L'expression de CD21 a été évaluée chez une patiente par un marquage DAPI / CD20 PC5 / CD21 FITC.

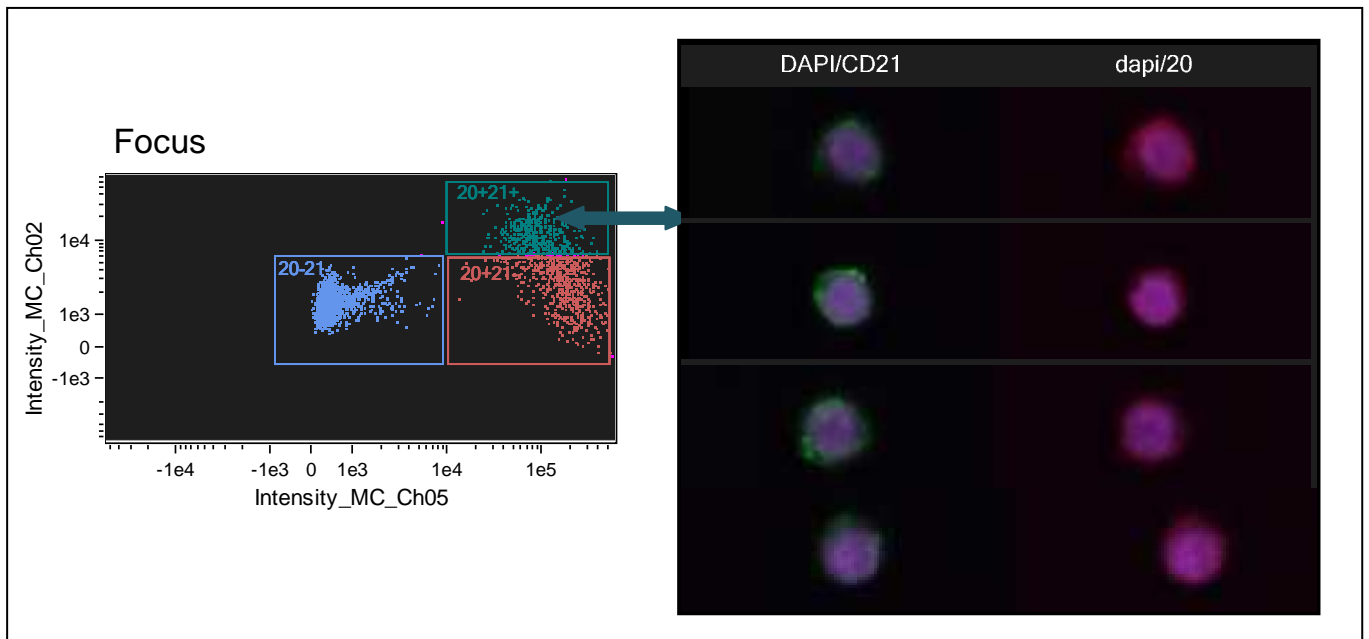
Chez cette patiente, il existe une population CD20+ CD21+ (Figure 19), mais aucun lymphocyte binucléé « tagué » n'exprime CD21 (Figure 20).

Il semblerait donc qu'il existe pour le CD21 une différence d'expression entre les lymphocytes B binucléés et les autres cellules B de la population anormale : la population B exprime en majorité CD21, mais les lymphocytes binucléés se distinguent par l'absence d'expression de ce marqueur.

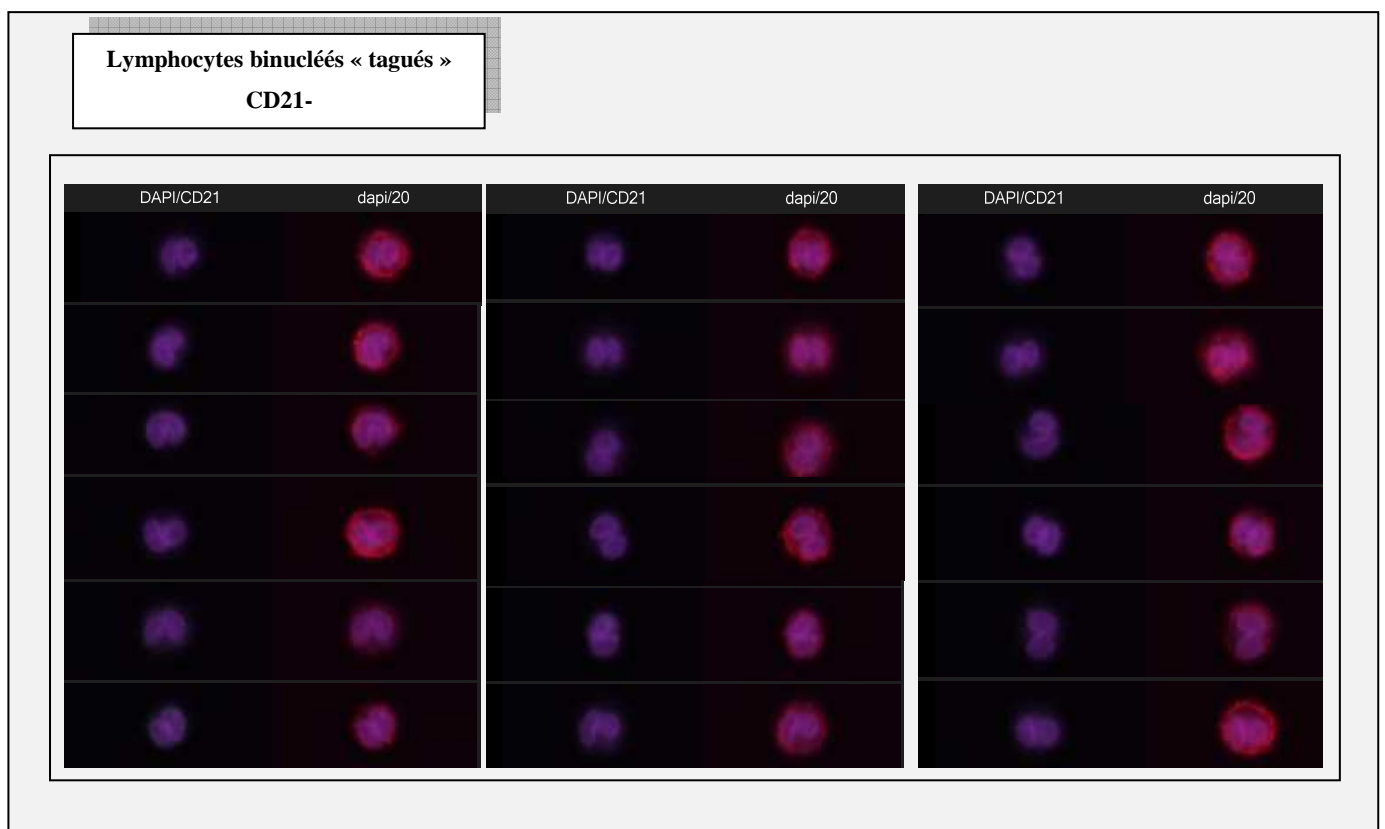


**Figure 18. Expression de FMC7 (canal 2) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ».**

Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». Le logiciel IDEAS® matérialise ces binucléés par une croix jaune sur le *Dot Plot* FMC7 en fonction de la structure SSC (canal 6).



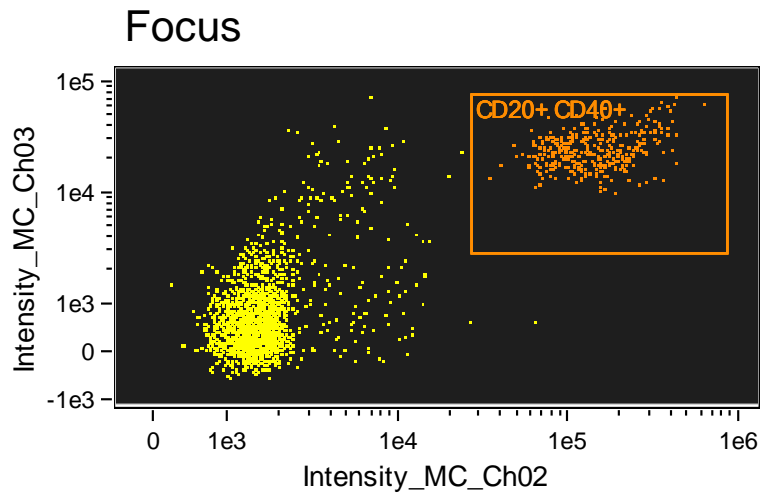
**Figure 19. Expression des CD20 (canal 5) et CD21 (canal 2) par les cellules « focus ».**  
 Une partie de la population CD20+ exprime le CD21.



**Figure 20. Absence d'expression de CD21 (canal 5) par les lymphocytes binucléés « tagués ».**  
 Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». On note l'absence d'expression de CD21 par ces binucléés « tagués ».

## **2.4) Expression de CD40**

L'expression de CD40 a été évaluée chez un patient par un marquage DAPI / CD20 FITC / CD40 PE. Les résultats montrent que l'ensemble de la population B, dont les lymphocytes binucléés, expriment CD40 (Figure 21).



**Figure 21. Expression des CD20 (canal 2) et CD40 (canal 3) par les cellules « focus ».**  
L'ensemble de la population CD20+ exprime CD40.

## **2.5) Expression de CD5**

L'expression de CD5 a été évaluée chez 6 patientes et 7 témoins : le 1<sup>er</sup> couple patient-témoin par un marquage DAPI / CD20 PC5 / CD5APC (résultats non concluants à cause de compensations difficiles), puis les 3 autres par un marquage DAPI / CD20 FITC / CD5 PC5.

Il ressort de l'étude des données phénotypiques de la littérature et de la cohorte lorraine que l'expression du CD5 au cours de la LPLB est négative, avec toutefois de rares cas d'expression partielle. Les cas analysés par *Image Stream X AMNIS*® sont des cas de la cohorte lorraine pour lesquels l'expression du CD5 a toujours été trouvée négative.

Chez les patientes comme chez les témoins étudiés, une population CD20+ CD5+ minoritaire est mise en évidence (toujours <13% des lymphocytes B totaux) (Tableau XIII).

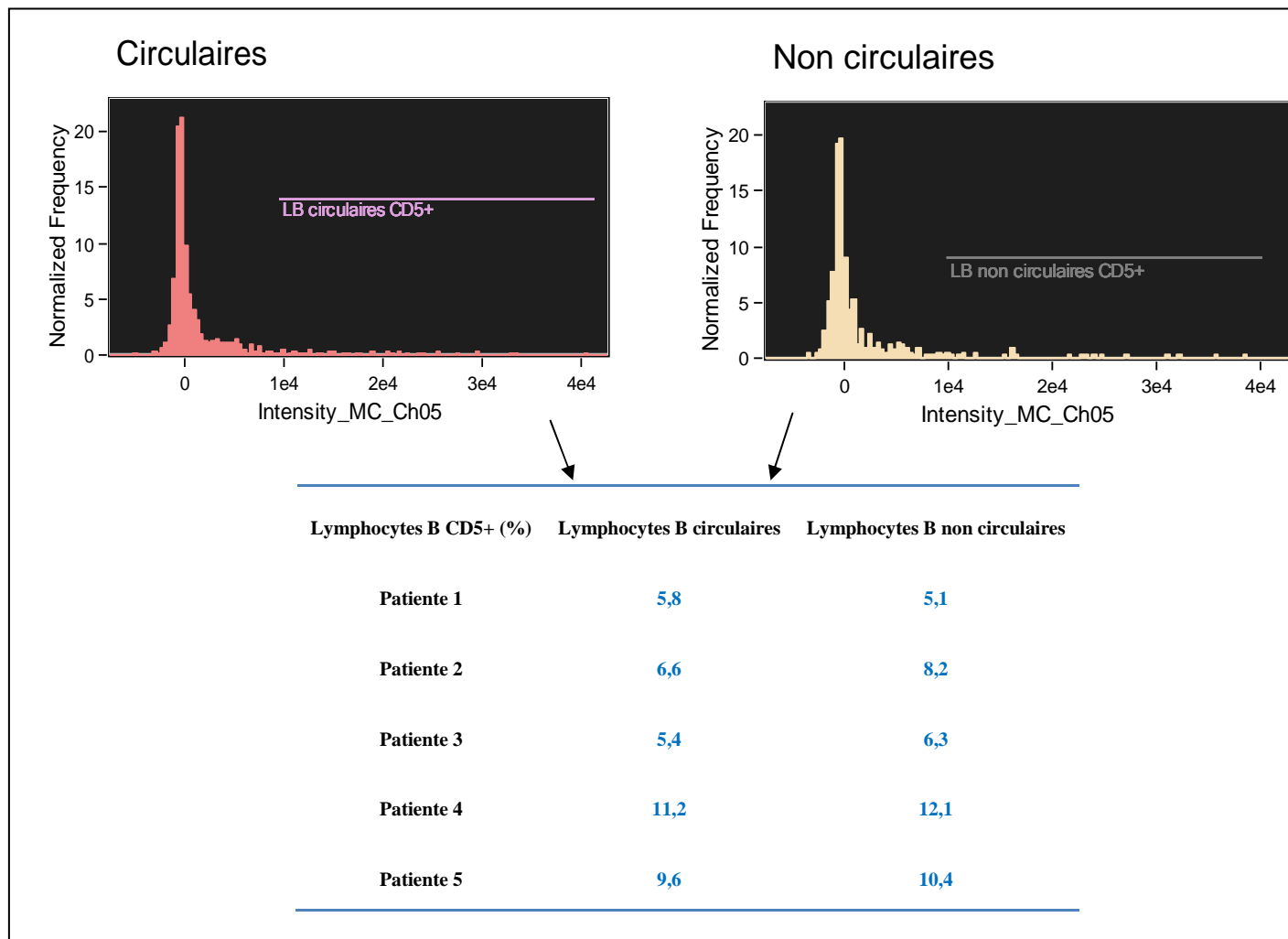


**Tableau XIII. Pourcentage de lymphocytes B CD5+ chez les témoins et les patients**

<b>Lymphocytes B CD5+ (%)</b>			
	9,2		5,8
	5,3		6,4
<b>Témoins</b>	3,7	<b>Patients</b>	6,1
	4,6		12,5
	8,2		12,4

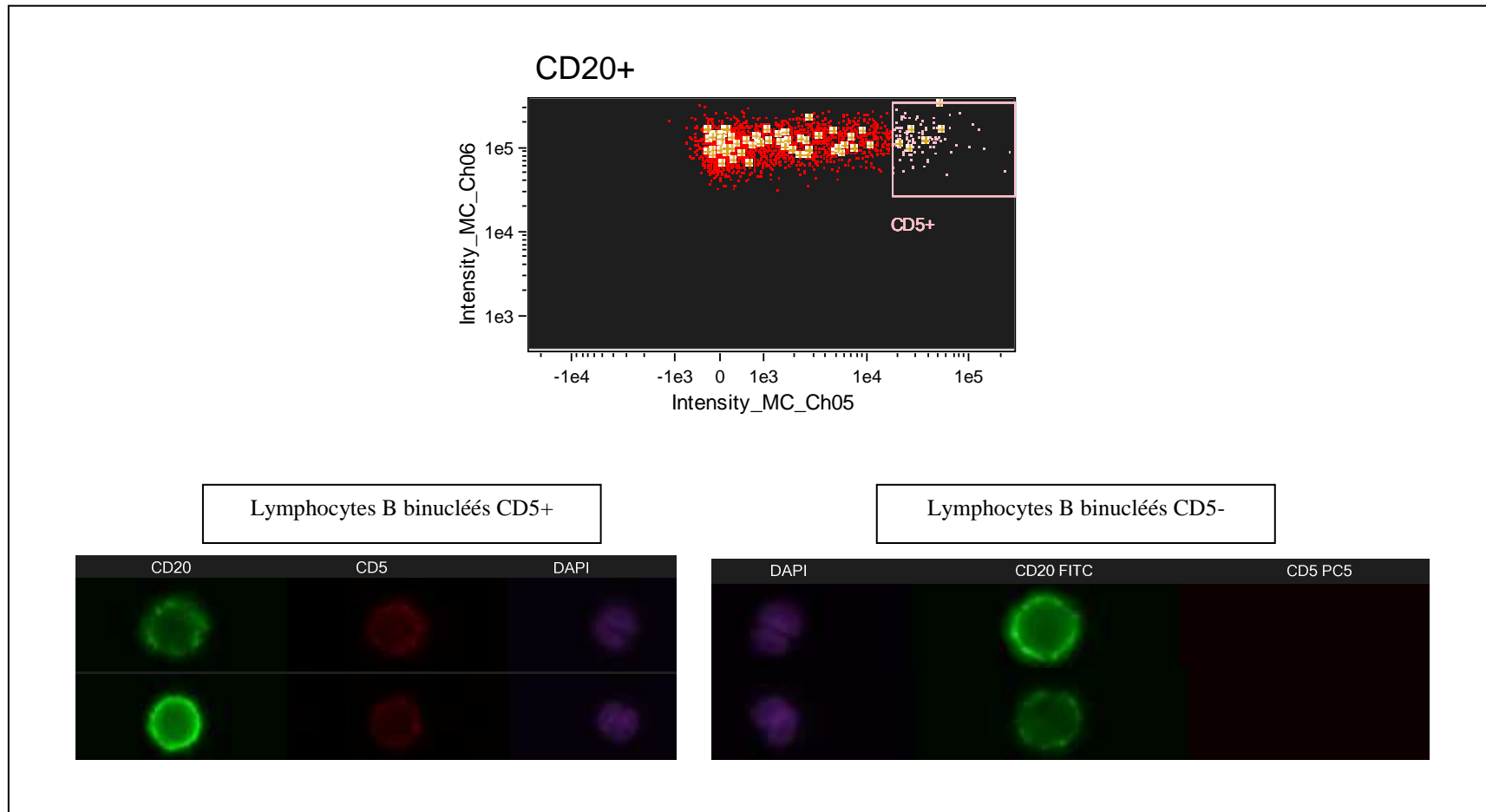
Après distinction des lymphocytes B « circulaires » et des lymphocytes B « non circulaires » grâce à l'application de la *feature* « *Circularity DAPI* », la comparaison de l'expression du CD5 parmi ces deux populations de lymphocytes B donne pour chaque patiente des résultats comparables (Figure 22).

De plus, la matérialisation des lymphocytes B binucléés « tagués » sur le *dot plot* CD5 *versus* SSC construit à partir des cellules CD20+ (Figure 23) illustre la répartition des lymphocytes B binucléés « tagués » en fonction de l'expression de CD5 : la majorité est CD5-, seuls de rares lymphocytes binucléés sont CD5+.



**Figure 22. Expression de CD5 (canal 5) parmi les lymphocytes B « circulaires » et « non circulaires ».**

Le pourcentage de cellules exprimant le CD5 parmi les lymphocytes B « circulaires » est comparable à celui des lymphocytes B « non circulaires ».



**Figure 23. Expression de CD5 (canal 5) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ».**

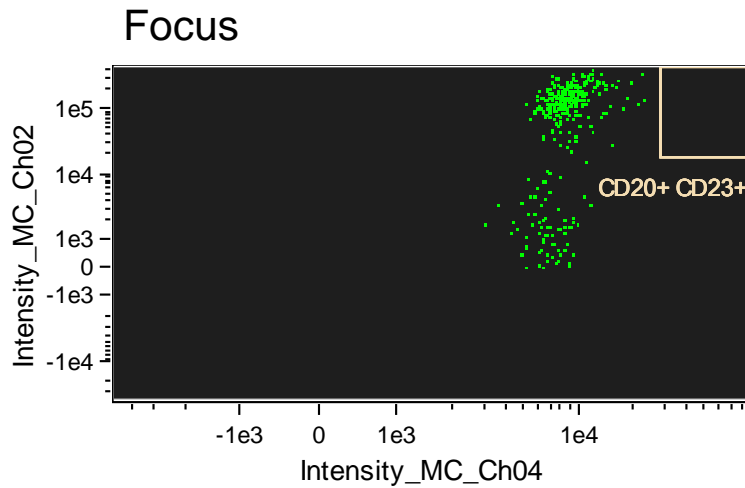
Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». Le logiciel *IDEAS*® matérialise ces binucléés par une croix jaune sur le *Dot Plot* CD5 en fonction de la structure SSC (canal 6). Les binucléés sont répartis de façon homogène en fonction de l'expression de CD5, la majorité est CD5-, quelques-uns sont CD5+.

## 2.6) Expression de CD23

L'expression de CD23 a été évaluée chez 4 patientes et 4 témoins par un marquage DAPI / CD20 FITC / CD23 ECD.

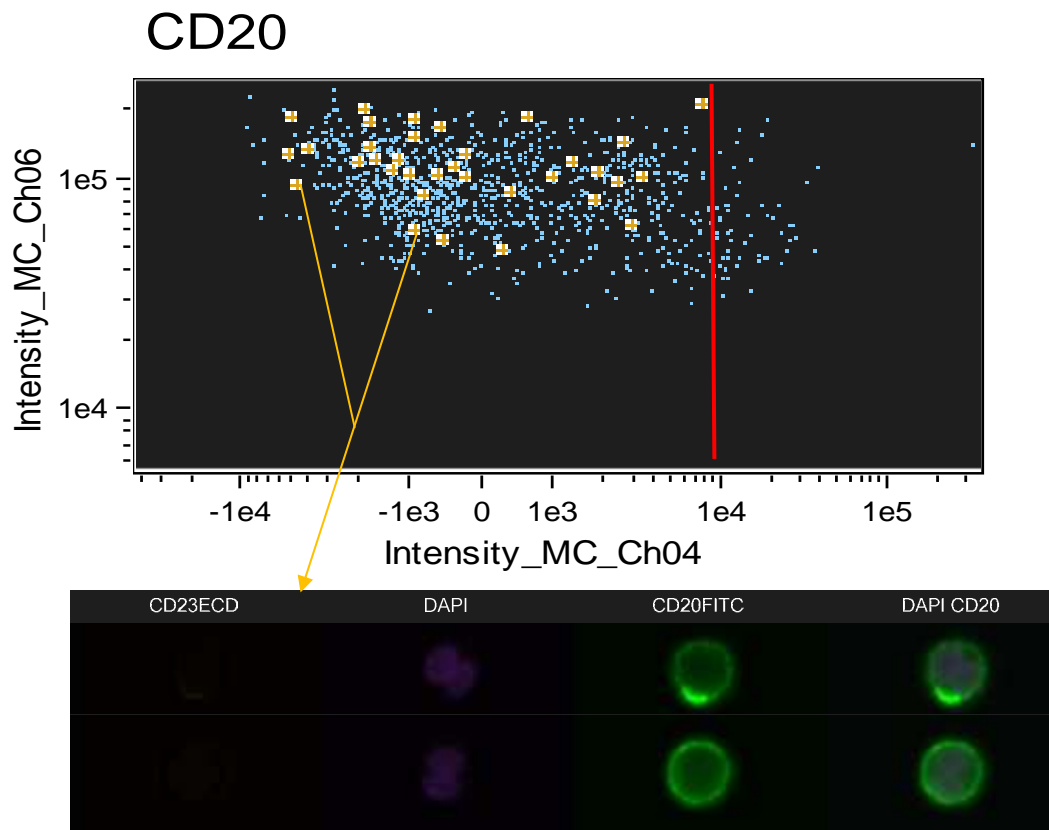
Chez les patientes comme chez les témoins étudiés, la population CD20+ CD23+ mise en évidence est très minoritaire (toujours <5%) voire nulle (Figure 24).

D'autre-part, pour chaque patient, la matérialisation des lymphocytes B binucléés « tagués » sur le *dot plot* CD23 versus SSC construit à partir des cellules CD20+ montre l'absence d'expression de CD23 par les lymphocytes B binucléés (Figure 25).



**Figure 24. Expression des CD20 (canal 2) et CD23 (canal 4) par les cellules focus.**

On note l'absence de population CD20+ CD23+.



**Figure 25. Expression de CD23 (canal 4) par les cellules CD20+ et par les lymphocytes binucléés « tagués ».**

Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». Le logiciel *IDEAS*® matérialise ces binucléés par une croix jaune sur le *Dot Plot* CD23 en fonction de la structure SSC (canal 6). Les binucléés se situent en dessous du seuil de positivité pour le CD23 : aucune expression de CD23 parmi les binucléés.

## 2. 7) Expression de TLR9

L'expression de TLR9 a été évaluée chez 8 patientes et 9 témoins par un marquage DAPI / CD20 PC5 / TLR9 FITC. Un essai a été réalisé chez un patient avec un marquage DAPI / CD20 FITC / TLR9 PE, donnant un marquage TLR9 trop faible.

Pour chaque patient et témoin, l'ensemble de la population B exprime TLR9 (Figure 26).

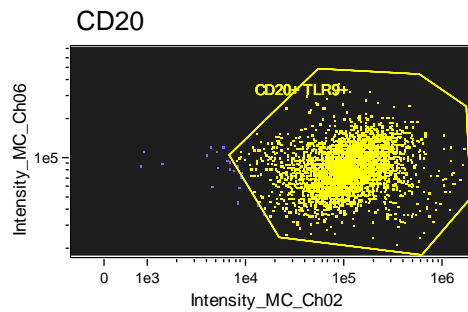


Figure 26. Expression de TLR9 (canal 2) par les cellules CD20+

La comparaison de l'intensité de fluorescence de TLR9 à la surface des lymphocytes B chez les patients par rapport aux témoins est présentée Figure 27. Aucune surexpression de TLR9 n'est notée chez les patients par rapport aux témoins.

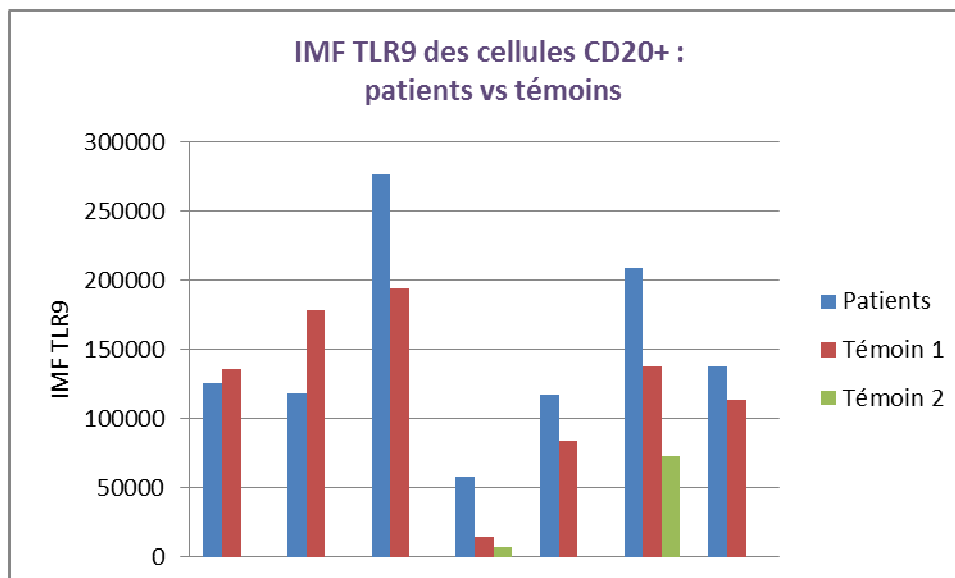
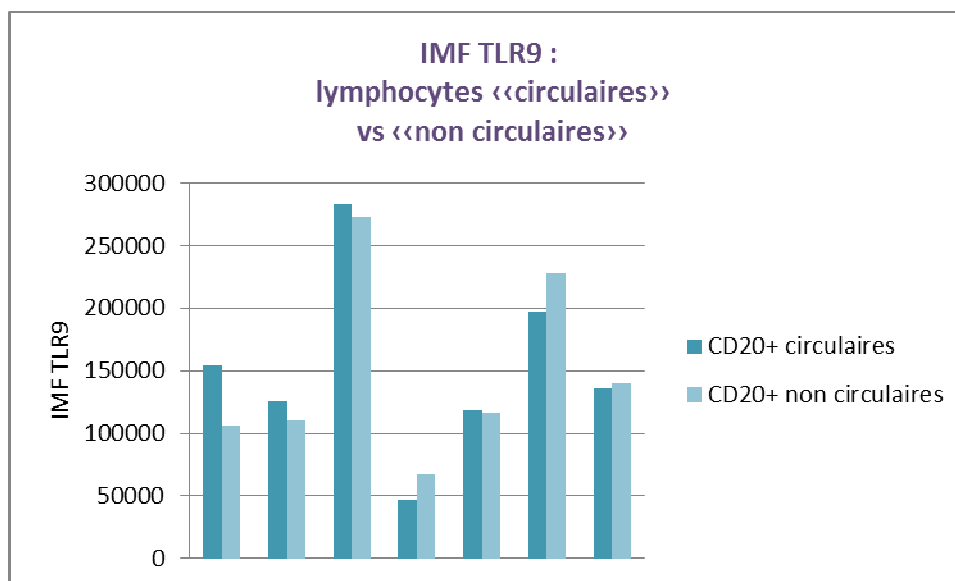


Figure 27. Intensité de fluorescence de TLR9 à la surface des lymphocytes B chez les patients et les témoins.

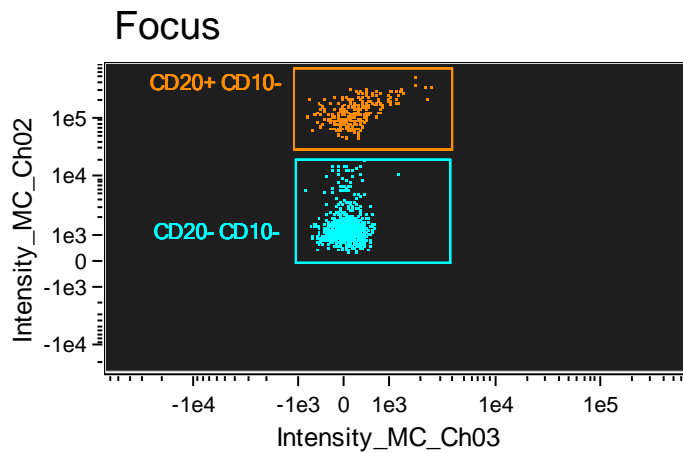
De plus, chez les patients, après distinction des lymphocytes B « circulaires » et des lymphocytes B « non circulaires » grâce à l'application de la *feature* « *Circularity DAPI* » sur la population CD20+, la comparaison de l'intensité d'expression de TLR9 à la surface des lymphocytes B « circulaires » par rapport aux lymphocytes B « non circulaires » est présentée Figure 28. Aucune différence notable n'est mise en évidence.



**Figure 28. Intensité de fluorescence de TLR9 chez les patients à la surface des lymphocytes B « circulaires » et « non circulaires ».**

### **2.8) Expression de CD10**

L'expression de CD10 a été évaluée chez un patient par un marquage DAPI/CD20 FITC /CD10PE. L'analyse par *Image Stream X AMNIS*® indique l'absence du CD10 à la surface des cellules CD20+ (Figure 29). Ceci est en accord avec les données phénotypiques de la littérature et de la cohorte lorraine.



**Figure 29. Expression des CD20 (canal 2) et CD10 (canal 3)  
par les cellules «focus».**

On note l'absence de population CD20+ CD10+.

### **2.9) Expression de Ki67**

Ki67 est un antigène nucléaire détectable dans les cellules en voie de multiplication au cours du cycle cellulaire. Il est absent des cellules quiescentes. Il est utilisé comme marqueur de prolifération.

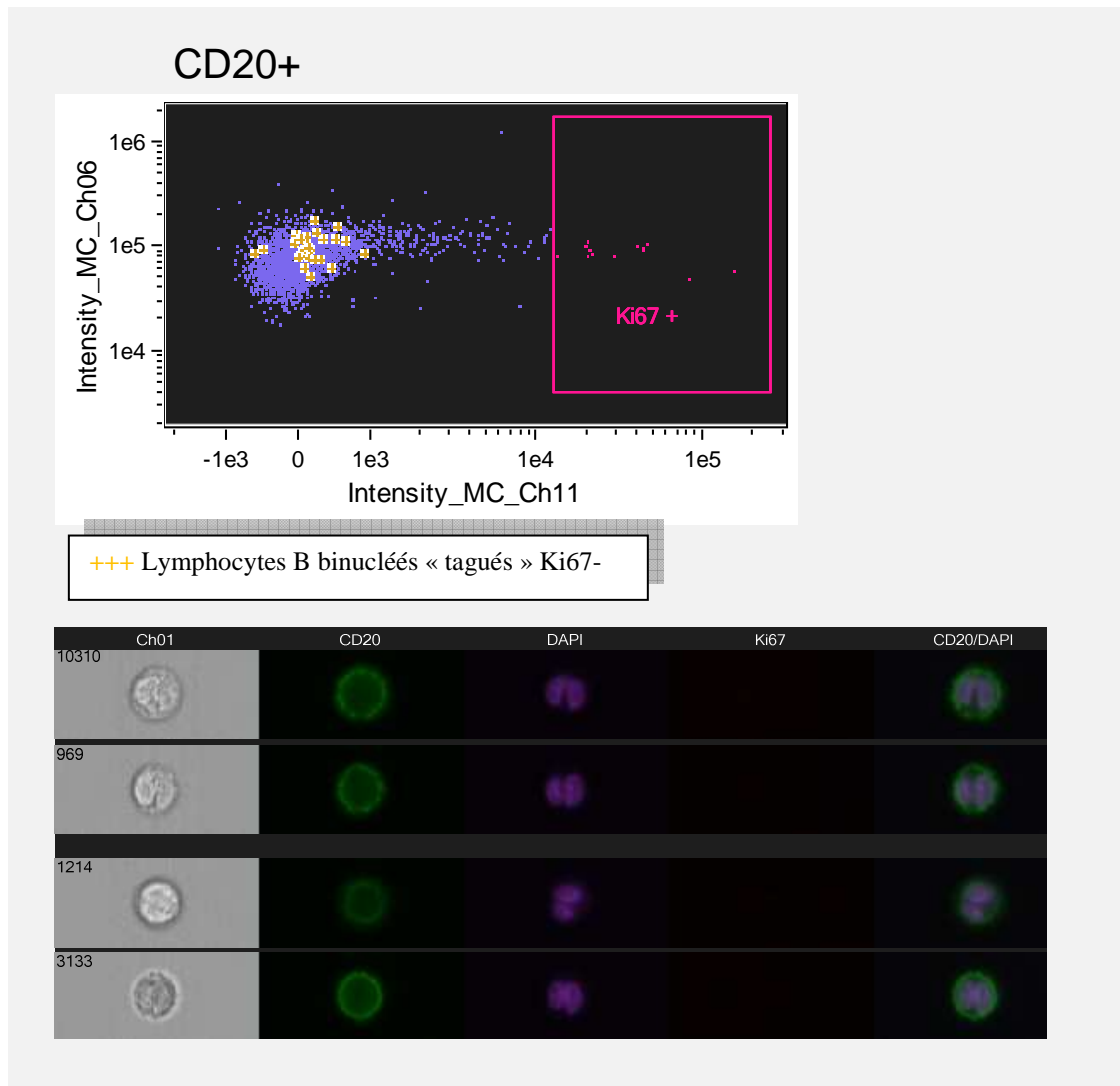
Son expression a été analysée chez 4 patients et 4 témoins par un marquage DAPI / CD20 FITC / Ki67 AF647. Elle est négative dans les deux groupes (Tableau XIV).

**Tableau XIV. Taux d'expression de Ki67 par les lymphocytes B chez les témoins et les patients**

<b>Lymphocytes B Ki67+ (%)</b>			
	0		1,79
<b>Témoins</b>	1,03	<b>Patients</b>	0,42
	0,47		0,18
	2,09		0,57



La matérialisation des lymphocytes B binucléés « tagués » par une croix jaune sur le *dot plot* Ki67 versus SSC montre l'absence d'expression de Ki67 par les lymphocytes B binucléés (Figure 30).



**Figure 30. Expression de Ki67 (canal 11) par les cellules CD20+ et les lymphocytes binucléés « tagués ».**

Les lymphocytes B binucléés ont été sélectionnés manuellement parmi les lymphocytes B « non circulaires ». Le logiciel IDEAS® matérialise ces binucléés par une croix jaune sur le *Dot Plot* Ki67 en fonction de la structure SSC (canal 6). Aucun lymphocyte binucléé n'exprime Ki67.

### 3. Discussion

L'intérêt principal de l'analyse des lymphocytes lors de LPLB par l'*Image Stream X AMNIS®* repose sur l'obtention de données objectives sur un nombre élevé de cellules en un temps relativement court. Le phénotype des lymphocytes B, et en particulier celui des lymphocytes binucléés, a ainsi pu être étudié selon une nouvelle approche.

Nos résultats montrent l'absence d'expression de CD21 à la surface des lymphocytes binucléés d'un patient. Si cette observation était confirmée, cela nuancerait les données phénotypiques de la littérature et de la cohorte lorraine qui indiquent que l'expression du CD21 au cours de la LPLB est positive. Il serait alors possible de rediscuter la place éventuelle de l'infection EBV dans cette entité, mais nos résultats restent trop limités pour discuter ce point.

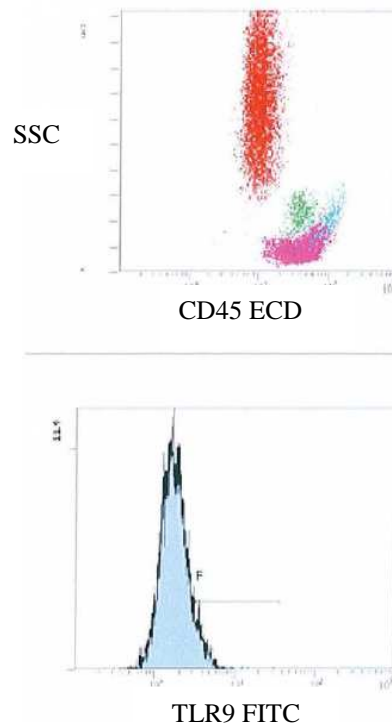
Concernant le CD23, il ressort de l'étude des données phénotypiques connues que son expression au cours de la LPLB est négative ou faible. Nos résultats nous permettent de conclure à l'absence d'expression du CD23 par les lymphocytes B binucléés, ce qui constitue un argument supplémentaire pour statuer.

Quant au CD5 nos résultats montrent une population B CD5+ présente à la fois chez les patients et les témoins dans les mêmes proportions. Elle correspond très certainement aux lymphocytes B CD5+ dits B1. La lignée B1 de lymphocytes B serait impliquée dans la réponse immunitaire humorale naturelle ou T-indépendante. Cette réponse est caractérisée par la sécrétion d'anticorps de faible affinité et polyréactifs dirigés principalement contre des antigènes bactériens de type lipopolysaccharides ou polysaccharides et contre des auto-antigènes. Chez l'homme adulte, les cellules B1 sont présentes dans la zone du manteau folliculaire des organes lymphoïdes secondaires et, en faible proportion (~15% des lymphocytes B totaux), dans le sang périphérique (Klein et al, 1998). Prédominante chez le fœtus et le nouveau-né, la lignée B1 céderait progressivement la place à la lignée B2, CD5-, impliquée dans la réponse humorale adaptative ou T-dépendante. Concernant les lymphocytes binucléés spécifiquement, nos résultats confirment la possibilité d'une expression partielle du CD5 par ces cellules, ce qui restait un point controversé.

Nous ne mettons pas en évidence de surexpression de TLR9 à la surface des lymphocytes B binucléés alors qu'au cours d'un travail précédent (Sokolowska-gillois,

2009), l'hypothèse d'une surexpression du TLR9 par les lymphocytes B binucléés avait été avancée (Figure 31). Cette contradiction est importante et doit être vérifiée, tant par *Image Stream X AMNIS®* que par CMF classique.

De même, nous ne discuterons pas de l'absence de FMC7 constatée chez un (seul) patient.



**Figure 31. Surexpression de TLR9 par les lymphocytes B binucléés.**

**D'après Sokolowska-gillois, 2009.**

Le nuage de points en bleu clair sur le scattergramme de répartition des cellules CD45+ en fonction de leur structure correspond aux cellules exprimant TLR9 de manière renforcée. Cette expansion bleu clair correspond par ailleurs à une sous-population lymphocytaire plus « structurée » qui pourrait être les lymphocytes binucléés (la quantification de la sous-population bleu clair correspond à la numération des lymphocytes binucléés sur frottis sanguin.)

L'*Image Stream X AMNIS®* rend possible l'analyse de sous-populations cellulaires, il est donc un outil précieux pour l'étude ciblée des binucléés. La recherche de marqueurs spécifiques qui aideraient au diagnostic ou au suivi de la LPLB est envisageable. Par exemple, l'étude de marqueurs de malignité ou de prolifération a un intérêt pour le suivi des patients. Dans notre étude, l'expression de Ki67 était négative chez les patientes analysées, mais il serait intéressant de renouveler l'étude chez un cas de LPLB en phase d'évolution.

En conclusion, l'*Image Stream X AMNIS®* est un outil de choix pour l'étude de la LPLB, désordre hématologique encore mal connu, et caractérisé par des cellules pathologiques présentes en faible nombre. Notre étude en a montré la faisabilité.

## **C. Discussion générale : origine et nature des lymphocytes dans la LPLB**

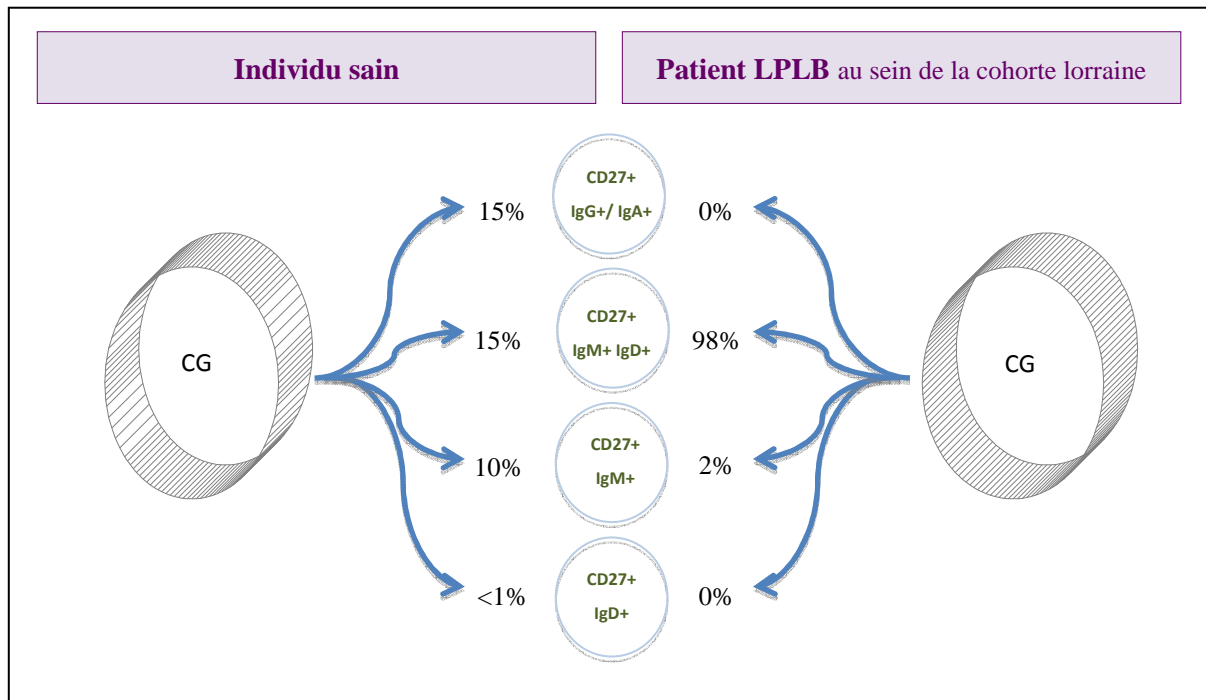
L'étude phénotypique des lymphocytes B de la LPLB donne des indications sur l'origine et la nature de ces cellules.

Les lymphocytes B de la LPLB expriment le CD27 (Himmelmann et al, 2001 ; Loembe et al, 2001), marqueur des lymphocytes B mémoires, et sont dotés de gènes des Ig hypermutés. Il s'agirait donc probablement de lymphocytes B mémoires.

### **a. Lymphocytes B mémoires**

Les cellules mémoires sont classiquement décrites comme des lymphocytes hautement spécifiques à durée de vie prolongée, exprimant CD27, acquis de façon contemporaine à la survenue des mutations somatiques. Elles sont générées en réponse à un contact antigénique. Elles persistent dans l'organisme et sont capables de produire rapidement des anticorps en réponse à un deuxième contact avec le même antigène. Chez les individus sains, 30 à 40% des lymphocytes B expriment CD27. Elles se subdivisent en lymphocytes B switchés IgG<sup>+</sup> ou IgA<sup>+</sup>, et en lymphocytes B non switchés IgM<sup>+</sup> et/ou IgD<sup>+</sup> (Klein et al, 1998).

Au cours de la LPLB, les lymphocytes expriment CD27 et portent comme Ig de surface à la fois IgM et IgD. Elles correspondraient donc à la sous-population de lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>. Cette sous-population représente normalement environ 15% des lymphocytes B. Dans la cohorte lorraine de patients LPLB, la quasi-totalité des lymphocytes B CD27<sup>+</sup> sont IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (Figure 32).



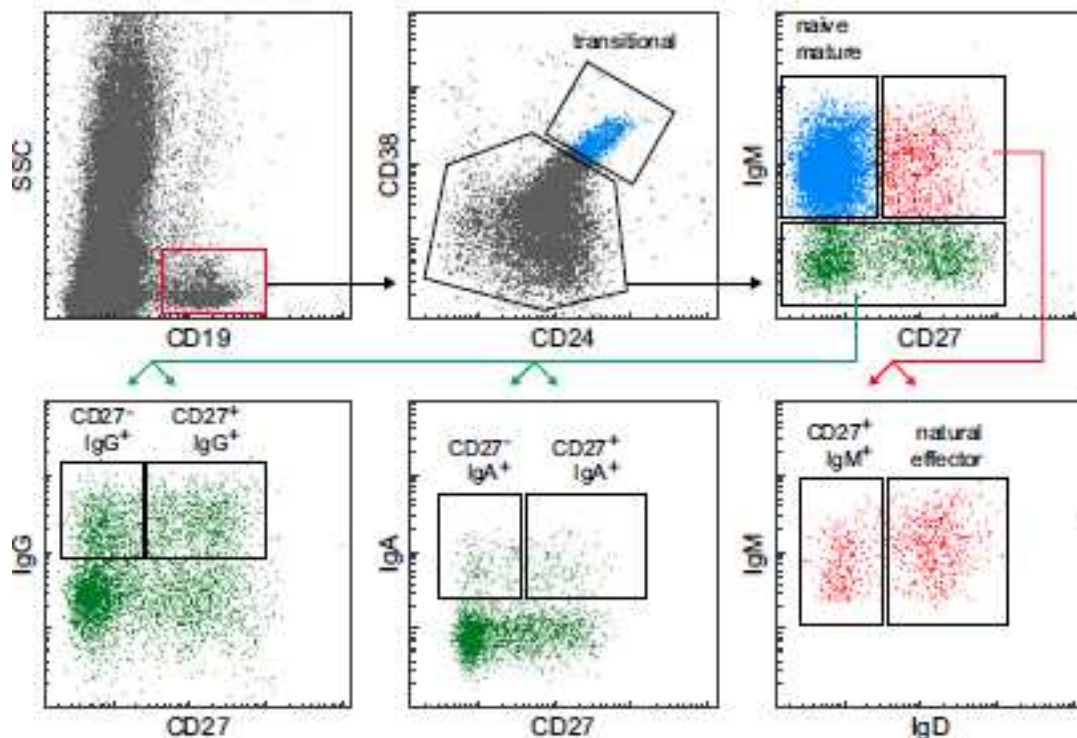
**Figure 32. Les sous-populations de lymphocytes B CD27+.**

**D'après Klein et al (1998).**

Chez les individus sains, la population de lymphocytes B CD27+ se subdivise en lymphocytes B IgM+ et/ou IgD+ et en lymphocytes B switchés IgG+ ou IgA+. Chez les patients LPLB, la quasi-totalité des lymphocytes B CD27+ sont représentés par les lymphocytes B IgM+ IgD+.

Il faut noter que des données récentes mettent en cause l'association établie entre le CD27 et les cellules mémoires, puisque des cellules B exprimant des IgG en l'absence du CD27 ont été détectées en périphérie chez l'humain (Fecteau et al, 2006).

Berkowska et al (2011) définissent six sous-populations de lymphocytes B mémoires (Figure 33) : quatre sous-populations CD27+ (IgM+ / IgM+ IgD+ / IgG+ / IgA+) et deux sous-populations CD27- (IgG+ / IgA+).



**Figure 33. Diversité de la population B.**

**D'après Berkowska et al (2011).**

Dans le compartiment CD19+ les lymphocytes B naïfs de transition sont identifiés comme CD38<sup>fort</sup> CD24<sup>fort</sup>.

Les lymphocytes B CD38<sup>faible</sup> CD24<sup>faible</sup> sont subdivisés selon l'expression d'IgM et de CD27. Les lymphocytes B naïfs matures sont définis comme CD27-IgM+. Les lymphocytes B CD27-IgM+ sont séparés selon l'expression d'IgD : IgD+ pour les « *natural effector* » et IgD- pour les « *IgM only* ». Les lymphocytes B IgM- sont séparés en 4 classes de lymphocytes B switchés selon l'expression d'IgA, d'IgG et de CD27.

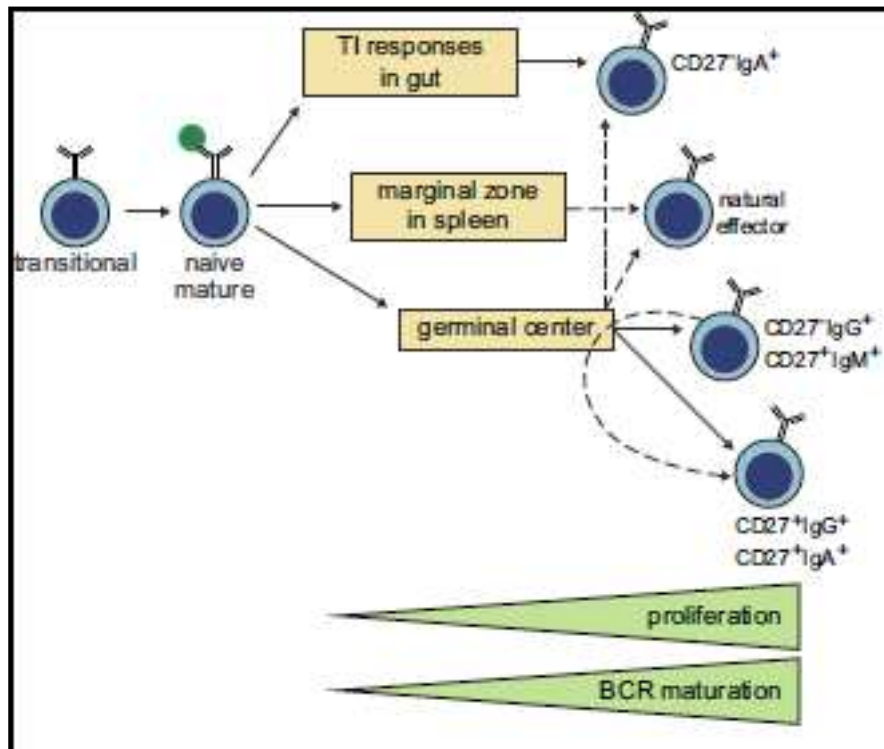
### **b. La sous-population de lymphocytes B CD27+ IgM+ IgD+**

#### **- Origine**

Les lymphocytes B mémoires CD27+ IgM+ IgD+ constitueraient une sous-population à développement extrafolliculaire.

En effet, l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes B mémoires ne seraient pas tous issus des CG a été émise (Weller et al, 2001 ; Berkowska et al, 2011). Berkowska et al (2011) ont entrepris l'analyse moléculaire détaillée comparative des gènes des Ig des

différentes sous-populations de lymphocytes B mémoires, et ont étudiés les populations B mémoires chez des patients atteints de déficit immunitaire avec hyper IgM lié à l'X. Chez ces patients, dits CD40-déficients, les CG sont manquants suite à une mutation du gène CD40L. Berkowska et al ont ainsi démontrés que les lymphocytes B mémoires dérivent de trois voies différentes (Figure 34).



**Figure 34. Schéma modifié de la génération des différentes sous-populations de lymphocytes B mémoires. D'après Berkowska et al (2011).**

Les lymphocytes B CD27- IgM+ et les lymphocytes B IgM+ IgD+ (ou « *natural effector* ») (au moins en partie) dérivent de réponses extrafolliculaires. Les lymphocytes B CD27- IgG+, CD27+ IgM+/IgG+/ IgA+ proviennent des CG.

Les lymphocytes B CD27-IgG+, CD27+ IgM+/IgG+/IgA+ sont issus des CG. Les lymphocytes B CD27-IgA+ et CD27+IgM+IgD+ sont présents chez les patients CD40L-déficients, ils auraient donc une origine extra-folliculaire. Les lymphocytes B CD27-IgA+ seraient l'équivalent circulants des lymphocytes B IgA+ présents au niveau

intestinal dans la *lamina propria*. Quant aux lymphocytes B CD27+IgM+IgD+, les observations des auteurs vont dans le sens de travaux antérieurs (Weller et al, 2001) : leur présence en quantité trois fois moins importante chez les patients CD40L-déficients suggère une origine extra-folliculaire pour une partie de cette sous-population. L'analyse moléculaire détaillée et comparative des gènes des Ig de cette sous-population permet aux auteurs de conclure que ces lymphocytes B semblent issus de la zone marginale splénique. Salcedo et al (2002) avaient également démontré que l'analyse des segments codant pour les domaines variables des chaînes lourdes d'Ig montrait la présence de mutations somatiques à une fréquence similaire de celle rapportée pour les lymphocytes B CD27+ de la zone marginale splénique.

D'autre part, les lymphocytes B CD27+IgM+IgD+ circulants et spléniques présentent un phénotype commun : CD27+IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup>CD21+CD23- et partagent un profil d'expression génique semblable (Weller et al, 2004). Les lymphocytes B CD27+IgM+IgD+ seraient donc l'équivalent circulant des lymphocytes B de la zone marginale splénique.

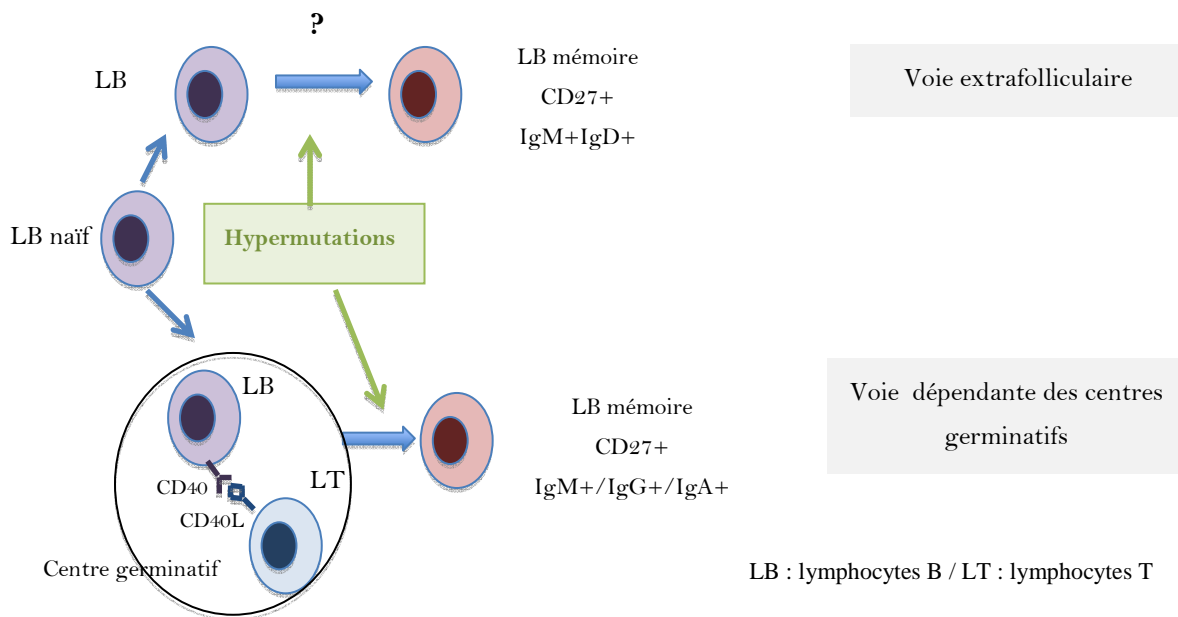
Chez les patients LPLB, l'analyse des lymphocytes B menée par l'équipe de Salcedo (2002) révèle un phénotype très proche de celui des lymphocytes B de la zone marginale splénique : les cellules sont CD27+ IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup>CD21<sup>high</sup>CD5<sup>low</sup>CD23<sup>low</sup>. De même, nos résultats issus de la synthèse des données de la littérature et des données locales indiquent un phénotype comparable CD27+ IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup>CD21+CD5<sup>low</sup>-/+ CD23-/+.

#### - Fonction

Les lymphocytes B CD27+ IgM+ IgD+ de la zone marginale splénique appartiennent à une sous-population B particulière dont la fonction principale serait la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques. Ils sont effectivement impliqués dans la protection contre les infections dues aux germes encapsulés comme *Streptococcus pneumoniae* (Kruetzmann et al, 2003). Chez les patients LPLB, Hafraoui et al (2009) ont démontré l'incapacité des lymphocytes B à produire des IgG spécifiques après une vaccination polysaccharidique anti-pneumococcique, suggérant un défaut de switch isotypique. Les épisodes infectieux chez les patients LPLB de la série lorraine ne sont ni sévères ni récurrents. Malgré l'apparente anergie des cellules B, aucun déficit immunitaire n'est donc relevé.



Au final, la population B IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> semble être le résultat, au moins en partie, d'une voie de différenciation extrafolliculaire permettant, grâce à une diversification du répertoire pré-immun par hypermutations somatiques préalables au contact avec l'antigène, de disposer d'une population B spécialisée dans la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques des bactéries encapsulées (Figure 35).



**Figure 35. Proposition de deux voies de différenciation des lymphocytes B.**

**D'après Weller et al (2001).**

Les lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> et les lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> switchés IgG<sup>+</sup> ou IgA<sup>+</sup> sont différenciés dans un CG au cours d'une réaction T-dépendante. Les lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> seraient issus d'une voie de différenciation extrafolliculaire et seraient responsables de la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques.

Notons que les travaux de Del Giudice et al (2009) chez des patients LPLB sont également en faveur d'une origine splénique. En effet, l'analyse histologique de la rate révèle un accroissement de la zone marginale des follicules spléniques, et l'étude des BOM montre une infiltration lymphoïde intra-sinusoïdale, de façon similaire à ce qui est observé dans les lymphomes de la zone marginale. Feugier et al (2004) avaient eux-

aussi mis en avant ces images évocatrices du lymphome de la zone marginale chez les patients LPLB. Del Guidice et al (2009) concluent donc à une expansion des lymphocytes B de la zone marginale splénique, qui infiltrent les sinusoides de la moelle osseuse et recirculent dans le sang périphérique.

En conclusion, l'analyse phénotypique des lymphocytes en expansion dans la LPLB et l'analyse moléculaire des gènes des Ig de ces cellules permettent de les identifier aux lymphocytes B CD27+ IgM+ IgD+ de la zone marginale splénique.

### III. Etude expérimentale fonctionnelle : stimulation des lymphocytes B par CpG-ODN

#### A. Introduction

Au cours d'un travail précédent (Sokolowska-gillois, 2009), il a été constaté une surexpression du TLR9 par les lymphocytes B binucléés de patients LPLB (7 patients étudiés). La chronologie de notre travail fait que nous avons étudié cette voie TLR avant d'entreprendre l'étude *Image Stream X Amnis*® qui a donné des résultats contradictoires.

Les *Toll-like receptors* appartiennent à la grande famille des *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs). Ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des « motifs moléculaires conservés » appelés *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) chez de nombreux pathogènes. Le premier membre de la famille, nommé toll, a été identifié chez *Drosophila melanogaster*. Dix TLRs ont été décrits chez l'homme. Les TLR-7 et 9 sont situés au niveau des endosomes. Le TLR-7 reconnaît les imidazoquinolines (molécules synthétiques antivirales), et TLR-9 les ADN bactériens au niveau des dinucléotides CpG non méthylés (Bernasconi et al, 2003). Les TLRs sont des protéines transmembranaires caractérisées par un domaine riche en leucine (« *leucine-rich region* » ou LRR) couplé à un domaine proche de celui du récepteur à l'IL-1, nommé « *toll/IL-1 receptor* » (TIR). Après la reconnaissance d'un ligand, deux molécules TLR s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent afin d'initier une cascade de signalisation aboutissant à l'induction d'une réponse pro-inflammatoire. Deux voies de signalisation sont initiées par les TLRs. La première aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans la production des cytokines pro-inflammatoires et la deuxième conduit à la sécrétion des interférons de type I impliqués dans la protection anti-virale. Les TLRs sont exprimés par de nombreux types cellulaires. Le TLR 9 est exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et par les lymphocytes B.

Comme indiqué précédemment, il avait été constaté chez les patients LPLB une surexpression du TLR9 à la surface des lymphocytes B binucléés (Sokolowska-Gillois, 2009) (cette surexpression n'a cependant pas été mise en évidence par l'analyse

phénotypique sur l'*Image Stream X AMNIS*® préalablement présentée dans ce travail). Nous avons voulu prolonger cette exploration, en étudiant la réponse des lymphocytes B de patients LPLB à une stimulation du TLR9 par son agoniste CpG-ODN. Il pourrait en effet être utile, dans un but thérapeutique éventuel, de savoir si une apoptose des cellules en est la conséquence. Les CpG-ODNs sont des OligoDéoxyNucléotides synthétiques agonistes du TLR9 dont les ponts phosphodiesters, liant les bases nucléotidiques, ont été remplacés par des ponts phosphotioates augmentant ainsi leur résistance aux nucléases. L'étude de la prolifération des lymphocytes B en présence de CpG-ODN de classe C a été réalisée chez des patients LPLB et des témoins après marquage avec le fluorochrome carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE).

## **B. Matériels et méthodes**

### **a. Patients**

Cette étude a été menée sur 9 patients\* avec LPLB. Le sang a été prélevé sur tube EDTA lors des consultations de suivi, puis analysé aussitôt ou congelé. Deux sangs témoins\* ont également été analysés. Les manipulations ont été réalisées au laboratoire d'Immunologie du CHU de Nancy, en collaboration avec Pr MC. Béné et Dr M. De Carvalho.

*\* (Seuls les résultats de 7 patients et 1 témoin sont exploitables).*

### **b. Purification des cellules mononucléées à partir de sang total selon leur gradient de densité**

Après dilution dans du PBS (Tampon de lavage : Dulbecco's phosphate buffered saline, Eurobio, Courtaboeuf, France), le sang est déposé sur le milieu de séparation Gradient de Ficoll (TM : LSM 1077, Lymphocyte Separation Medium, PAA Laboratories, Germany), en respectant la proportion de 2 volumes de sang dilué pour 1 volume de milieu de séparation. Après centrifugation à 1200g pendant 20minutes à température ambiante, l'anneau de cellules mononucléées situé à l'interface entre le plasma et le

milieu de séparation est récupéré, puis lavé dans du PBS avec une centrifugation à 600g pendant 10 minutes, à température ambiante. Le culot obtenu est alors récupéré par inversion, un nouveau lavage des cellules est effectué dans 10mL de PBS. Le culot est remis en suspension dans 1mL de PBS. Avant de procéder à la numération cellulaire, 50µL de la suspension cellulaire contenu dans le culot sont prélevés et incubés avec 5µL d'anticorps anti-CD45 FITC (A07782, clone J.33, Human CD antibodies, IoTest®, Beckman-Coulter) pendant 20 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de 0,5mL de paraformaldéhyde 1% de PBS. Le comptage se fait grâce à l'ajout de billes de comptage (Flow-count™ 7547053, Beckman-Coulter, Ireland Inc) et à un protocole adapté sur le cytomètre en flux (Cytomics FC500, Beckman-Coulter). Si la suite de la manipulation est reportée, les cellules sont congelées. Après séparation des cellules mononucléées sur gradient de densité, les cellules sont reprises dans 0,5mL de milieu de culture RPMI froid. Une plus grande dilution est réalisée si la numération excède 10 millions de cellules/mL. Le SVF DMSO 20% est ajouté, goutte à goutte, à un volume égal au volume de cellules dans le RPMI. La suspension cellulaire est rapidement distribuée dans les cryotubes qui sont placés à -20°C puis -80°C. En temps voulu, l'aliquot est décongelé au bain-marie puis rapidement repris dans 45mL de RPMI et centrifugé à 1800 tours pendant 10min. Un lavage au PBS est ensuite effectué.

### **c. Marquage avec le fluorochrome carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)**

Le CFSE est un marqueur intracellulaire utilisé pour étudier la prolifération cellulaire qui se caractérise par une diminution par deux de la fluorescence à chaque division cellulaire. Pour nos travaux, la suspension cellulaire est ajustée entre 2 et 5 millions de cellules par ml de RPMI additionné de 5% de SVF. Elle est incubée 5 à 8 min à l'abri de la lumière et à température ambiante en présence de CFSE à la concentration de 1µmol/L. L'ajout de protéines contenues dans du RPMI 5% SVF (5 fois le volume de la suspension cellulaire) stoppe le marquage CFSE. Une centrifugation 5min à 300G puis deux lavages dans 5mL de RPMI sont réalisés. Le marquage CFSE est vérifié à partir de 7µL de suspension cellulaire fixés par 0,5mL de PAF et à l'aide d'un protocole adapté sur le cytomètre en flux (Cytomics FC500, Beckman-Coulter).

#### d. Distribution dans la microplaque de 96 puits à fond rond

Une microplaque de 96 puits a été préparée selon le schéma Figure 36. Un témoin de prolifération négatif est constitué par une incubation des cellules en milieu seul et un témoin positif par une incubation des cellules en présence d'un mitogène (PHA: phytohémagglutinine). Les puits faisant l'objet de l'étude contiennent les cellules en présence de CpG ODN M362 (InvivoGEN®, San Diego, California, EU). La suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 5 millions de cellules par mL de RPMI 5% SVF. 200µL (soit 1 million de cellules) sont distribués dans chaque puits. Dans les puits servant de témoins positifs, la phytohémagglutinine (PHA) est ajoutée à une concentration de 10µg/mL. Dans les puits faisant l'objet de l'étude, le CpG ODN M362 est distribué pour l'obtention d'une concentration de 10µg/mL. La microplaque est incubée à 37°C dans une étuve humide avec 6% de CO<sub>2</sub>.

	J3	J5
<i>Puits témoins négatifs</i>	200 µL cellules	200 µL cellules
<i>Puits faisant l'objet de l'étude</i>	200 µL cellules 8 µL ODN à 25µmol/L	200 µL cellules 8 µL ODN à 25µmol/L
<i>Puits témoins positifs</i>	200 µL cellules 2µL PHA à 1mg/mL	200 µL cellules 2µL PHA à 1mg/mL

Figure 36. Schéma de plaque pour l'étude de prolifération des lymphocytes B après stimulation par CpG ODN.

#### e. Mesure de l'intensité de fluorescence de la CFSE à J3 et J5

La mesure de l'intensité de fluorescence de la CFSE a été réalisée à J3 et J5 afin d'observer la décroissance de la fluorescence intracellulaire, témoin de la prolifération des cellules CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>. Le culot au fond de chaque puit est homogénéisé. Les 200µL sont prélevés, lavés avec 2mL de PBS, centrifugés 5min à 1600 tours/min, puis incubés avec 5µL de chaque anticorps fluorescents CD45-PC5 (IM2652U, Clone Immu19.2, Human CD antibodies, IoTest®, Beckman-Coulter) et CD19-PC7 (IM3628, clone J4.119, Human CD antibodies, IoTest®, Beckman-Coulter) pendant 20min à l'obscurité. Un lavage est réalisé au PBS, puis les cellules sont fixées au PAF avant de

les analyser à l'aide d'un protocole adapté sur le cytomètre en flux (Cytomics FC500, Beckman-Coulter).

## C. Résultats

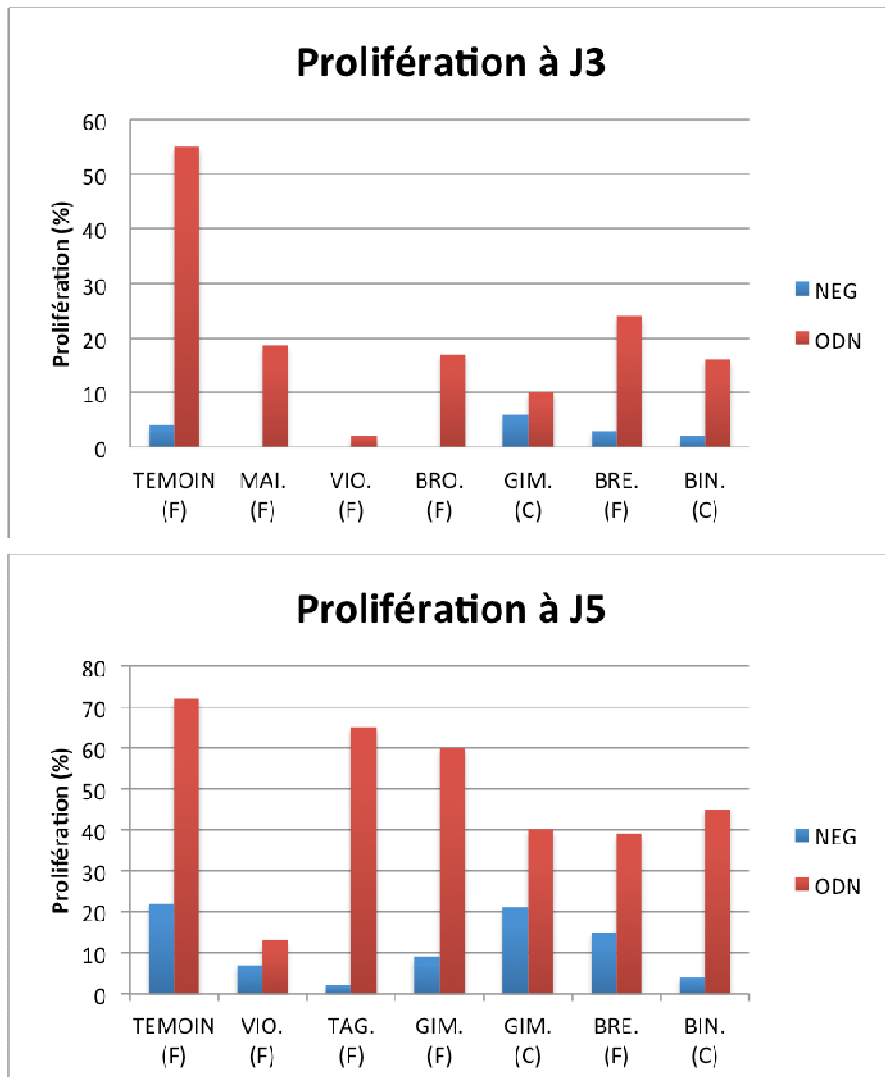
### a. Les lymphocytes B prolifèrent en réponse au CpG-ODN dès J3

Les premiers résultats présentés ici (Tableau XV, Figure 37) montrent que l'ODN entraîne une prolifération des lymphocytes B chez le témoin et chez les patients LPLB dès le 3<sup>ème</sup> jour après mise en culture des cellules. A J3 les pourcentages de prolifération s'élèvent de 2 à 55%. Le pourcentage de prolifération à J5 est toujours plus important : de 13 à 72%. La prolifération continue donc après J3. La prolifération dans les puits de contrôle négatif est négligeable (un maximum de 22% est relevé à J5 chez le témoin). La présence d'une prolifération significative dans les puits de contrôle positifs (PHA) a été vérifiée.

Tableau XV. Pourcentages de prolifération des lymphocytes B

Prolifération (%)	Puits			
	NEG		ODN	
	J3	J5	J3	J5
TEMOIN (F)	4	22	55	72
MAI. (F)	0	/	19	/
VIO. (F)	0	7	2	13
BRO. (F)	0	/	17	/
TAG. (F)	/	2	/	65
GIM. (F)	/	9	/	60
GIM. (C)	6	21	10	40
BRE. (F)	3	15	24	39
BIN. (C)	2	4	16	45

(C) : cellules congelées, (F) : cellules fraîches.



**Figure 37. Prolifération à J3 et J5 des lymphocytes B dans les puits de contrôle négatif (NEG) et les puits contenant le CpG-ODN (ODN).**

*(C) : cellules congelées, (F) : cellules fraîches.*



## **b. La prolifération des lymphocytes B des patients est inférieure à celle du témoin**

La Figure 38 illustre les résultats obtenus à partir des lymphocytes B témoins. Elle met en parallèle l'étude de la prolifération en l'absence de CpG-ODN et en présence de CpG-ODN. Les premiers *density plot* (*Forward Scatter* (FS) en fonction de *Side Scatter* (SC)) montrent le *gating* des cellules mononucléées. On note une population plus importante dans les puits avec CpG-ODN car les cellules ont proliféré. Les images suivantes (fluorescence CFSE en fonction du CD19) illustrent le *gating* des lymphocytes B (CD19+). En présence de CpG-ODN, on constate l'individualisation de différents nuages de points successifs. En effet, à chaque cycle de division des cellules la fluorescence diminue, ce qui est visualisé par une division du nuage de points. Les histogrammes qui suivent représentent l'intensité de fluorescence du CFSE des lymphocytes B à J3 puis J5. Le pourcentage de prolifération relevé correspond au pourcentage de cellules ayant subi au moins une division.

La prolifération des lymphocytes B constatée chez le témoin en présence de CpG-ODN est importante. Elle est de 72% à J5 contre 22% dans le puit négatif.

La Figure 39 présente les histogrammes de fluorescence de CFSE dans les puits sans CpG-ODN et avec CpG-ODN chez trois patients à J5. En présence du ligand du TLR9 la prolifération est plus importante. Elle reste malgré tout inférieure à celle relevée chez le témoin.

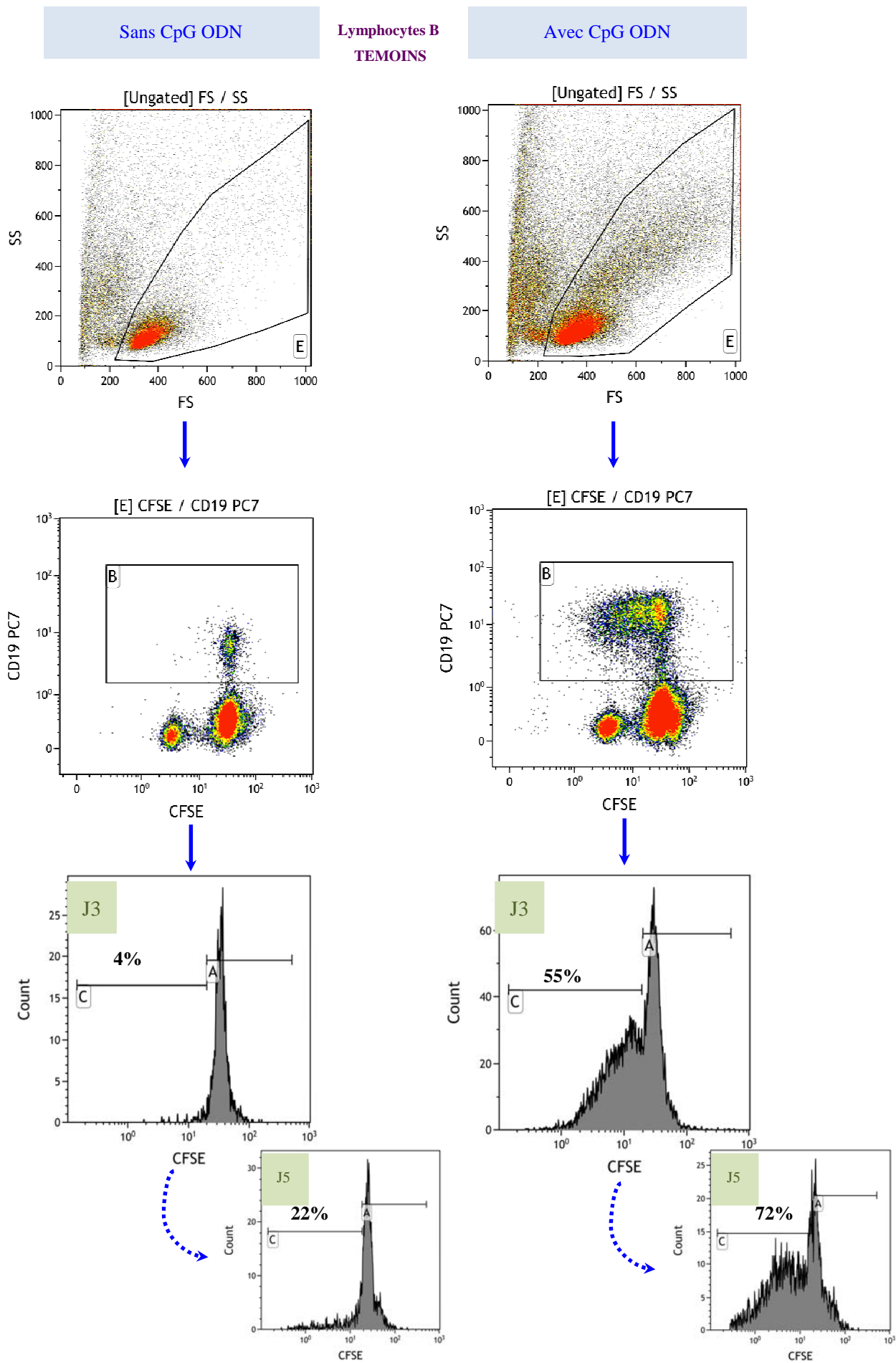
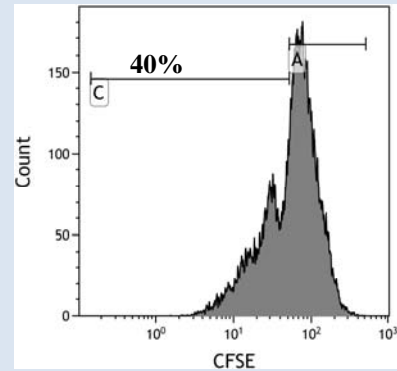
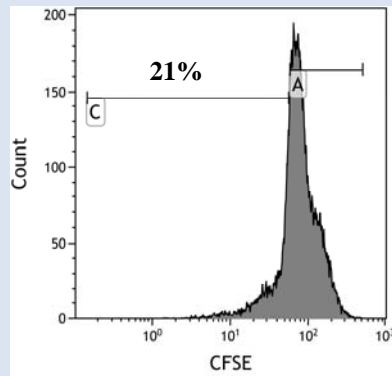


Figure 38. Prolifération des lymphocytes B témoins avec et sans CpG-ODN.

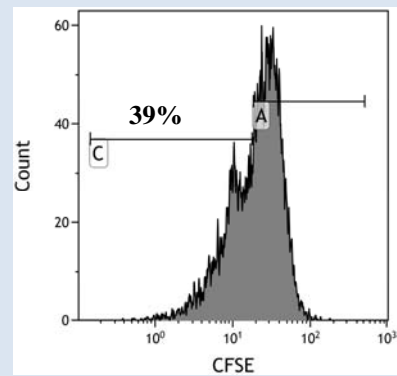
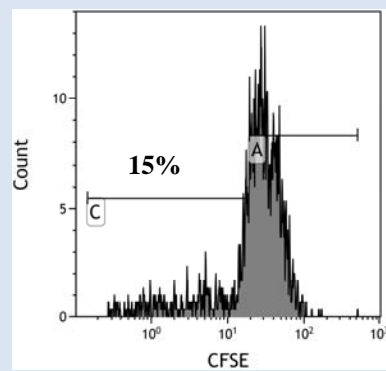
Sans CpG ODN

Avec CpG ODN

GIM. (C) J5



BRE. J5



BIN. J5

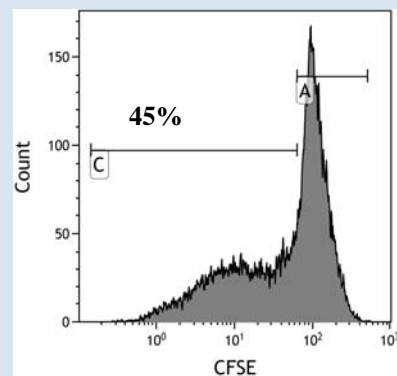
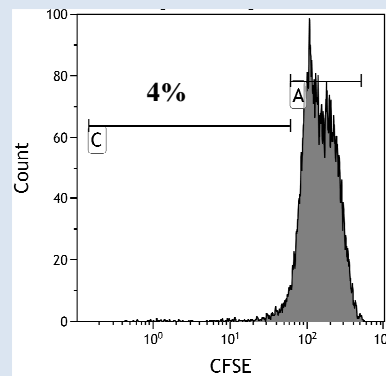


Figure 39. Prolifération des lymphocytes B de 3 patients LPLB à J5 avec et sans CpG-ODN.

## **D. Discussion : TLR9 et LPLB**

### **a. Réponse des lymphocytes B à une stimulation du TLR9**

Chez un individu sain, l'activation des lymphocytes B par le TLR9 induit leur prolifération (Hartmann et al, 2000). Dans les syndromes lympho-prolifératifs, des études ont également montré la prolifération des lymphocytes B, ainsi que l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et des molécules de présentation de l'antigène (Jahrsdorfer et al, 2005 ; Faure et al, 2007 ; Decker et al, 2000). D'autre part, il a été montré pour la LLC que la prolifération des cellules est suivie d'une augmentation de l'apoptose (Jahrsdorfer et al, 2005 ; Faure et al, 2007). Ces différentes observations permettent d'envisager le TLR9 comme cible thérapeutique dans les SLP.

Dans notre expérience de stimulation des lymphocytes B par un ligand du TLR9, on observe une prolifération des cellules à la fois chez le témoin et chez les patients LPLB. On peut constater que l'ensemble des patients testés présentent une réponse inférieure à celle du témoin (le nombre de témoins étudiés reste malgré tout insuffisant pour conclure de façon générale). La possible surexpression du TLR9 par les lymphocytes B binucléés des patients LPLB ne semble donc pas se traduire par une prolifération augmentée de ces cellules en réponse à une stimulation du récepteur par son ligand ODN. Toutefois la prolifération mise en évidence chez les patients montre que le récepteur TLR9 est fonctionnel. D'autre part elle indique que les cellules des patients sont capables de se multiplier, il ne s'agirait donc pas de cellules quiescentes.

### **b. Rôle du TLR9 dans le maintien des lymphocytes B mémoires et dans la LPLB ?**

Bernasconi et al (2003) ont étudié l'implication du TLR9 dans l'immunité acquise. Ils ont montré que l'expression des TLRs est modulée par le degré d'activation des cellules. La stimulation du BCR induit une surexpression du TLR9. Bourke et al. (2003) ont également montré que l'activation des lymphocytes B *in vivo* induit la surexpression des TLR7, 9 et 10. D'autre part, les cellules exprimant les TLRs peuvent être activées directement par des agonistes des TLRs ou nécessiter la présence de molécules co-stimulatrices. Bernasconi et al (2003) ont montré que les lymphocytes B

mémoires (CD27+) sont directement stimulés par CpG alors que les cellules naïves (CD27-) requièrent une stimulation parallèle du BCR par un anti-Ig. L'expression du TLR9 induite par l'activation du BCR dans les cellules B naïves empêche l'activation polyclonale lors d'une réponse immune primaire. Elle restreint en effet la stimulation (via TLR9) aux cellules B spécifiques de l'antigène. En revanche, l'expression constitutive du TLR9 par les cellules B mémoires permet une activation polyclonale du pool des lymphocytes B mémoires. En conclusion de leurs travaux, les auteurs concluent par l'idée d'un rôle nouveau des TLRs dans la réponse immune. A la surface des lymphocytes B, les TLRs interviendraient au niveau de la mémoire immunologique. L'expression constitutive des TLRs par les lymphocytes mémoires permettrait une stimulation polyclonale des lymphocytes B, induisant leur prolifération et leur différenciation, d'où une synthèse continue d'anticorps de spécificités différents, maintenant ainsi la mémoire sérologique.

D'autre part, Bourke et al (2003) soulèvent une hypothèse au sujet de l'implication des TLRs dans la croissance tumorale. En effet, ils observent une forte expression des TLRs 9 et/ou 10 dans les lymphocytes B transformés par l'EBV et dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, lymphome folliculaire, et myélome multiple. Ils suggèrent alors que la stimulation directe via les TLRs pourrait être le lien entre infection chronique et pathogénèse des lymphomes. En effet la stimulation des TLRs induit la production de chimiokines, amplifiant l'inflammation et indirectement la croissance tumorale.

Ces deux réflexions au sujet du rôle de TLR9 dans le maintien des lymphocytes B mémoires, et dans le lien entre infection chronique et pathogénèse des lymphomes permettent d'évoquer l'implication éventuelle du TLR9 dans la survenue de la LPLB. Il pourrait même être envisagé de le considérer comme cible thérapeutique le cas échéant. En effet, en bloquant le TLR9, on pourrait limiter la stimulation des cellules, et ainsi limiter à la fois leur expansion mais également l'instabilité chromosomique parfois observée qui mène à une transformation lymphomateuse.

## Conclusion générale

La LPLB est une entité rare, diagnostiquée principalement chez les femmes fumeuses. Elle présente des critères de bénignité (expansion polyclonale, symptomatologie discrète, stabilité clinique) contrastant avec d'autres critères classiquement associés aux proliférations malignes (cellules morphologiquement atypiques, anomalies génétiques, infiltration de la moelle osseuse et, dans de rares cas, évolution maligne). L'intérêt porté à cette affection tient à cette singularité. Elle constitue vraisemblablement un état pré-lymphomateux.

Dans ce travail est présentée une étude phénotypique approfondie qui a permis de préciser le profil des cellules lymphoïdes. De plus, la place d'un nouvel outil performant d'analyse phénotypique, l'*Image Stream X Amnis*®, a été évaluée, indiquant que cette technique peut être d'une aide précieuse pour l'étude des lymphocytes binucléés.

Les données obtenues semblent convergentes pour apparenter les lymphocytes de la LPLB aux lymphocytes B mémoires issus de la zone marginale splénique.

D'autre part, ce travail présente les résultats de l'étude fonctionnelle des lymphocytes B binucléés via leur stimulation par un ligand du TLR9. Cette étude vient en complément de la découverte de la surexpression du TLR9 par les lymphocytes binucléés (Sokolowska-Gillois, 2009). Elle a permis d'étudier la fonctionnalité de ce récepteur et de discuter de son rôle dans la LPLB. Cependant, il conviendra d'établir le niveau d'expression de la molécule sur les cellules dans la mesure où l'exploration par l'*Image Stream X Amnis*® conduit à des résultats contradictoires.

L'apparente rareté de la LPLB ne doit pas masquer la probable sous-estimation des cas de LPLB en raison d'une présentation clinique peu caractéristique. Un suivi à long terme des patients semble indispensable, le risque d'évolution lymphomateuse et l'association à d'autres pathologies étant décrits. La constitution d'un observatoire national associé à une bibliothèque permettra le suivi à long terme des patients.

## Bibliographie

Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, Sugita K, Mori T, Kobata T, Morimoto C, Komiyama A. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol.* 1997;27(8):2073-9.

Amnis corporation. The ImageStream Imaging flow cytometer. (en ligne). Disponible sur [https://www.amnis.com/documents/brochures/ImageStreamx\\_brochure.pdf](https://www.amnis.com/documents/brochures/ImageStreamx_brochure.pdf). (Page consultée le 23/03/2011).

Amouroux L, Mossafa H, Gentilhomme O, Girot K, Flandrin G, Troussard X. Chronic lymphocytic leukaemia with binucleated lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 1997;27(5-6):533-7.

Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood.* 2003;101(11):4500-4.

Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood.* 2003;102(3):956-63.

Callet-Bauchu E, Gazzo S, Poncet C, Pagès J, Morel D, Alliot C, Coiffier B, Coeur P, Salles G, Felman P. Distinct chromosome 3 abnormalities in persistent polyclonal B cell lymphocytosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;26(3):221-8.

Callet-Bauchu E, Renard N, Gazzo S, Poncet C, Morel D, Pagès J, Salles G, Coeur P, Felman P. Distribution of the cytogenetic abnormality +i(3)(q10) in persistent polyclonal

B-cell lymphocytosis: a FICTION study in three cases. *Br J Haematol.* 1997;99(3):531-6.

Carr R, Fishlock K, Matutes E. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis 111 identical twins. *Br J Haematol.* 1997;96(2):272-4.

Carstairs KC, Francombe WH, Scott JG, Gelfand EW. Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes, induced by cigarette smoking? *Lancet.* 1985;1 (8437): 1 094.

Casasus P, Lortholary P, Komarover H, Lejeune F, Hors J. Cigarette smoking related persistent polyclonal B lymphocytosis. A premalignant state. *Arch Pathol Lab Med.*1987;111(11):1081.

Chan MA, Benedict SH, Carstairs KC, Francombe WH, Gelfand EW. Expansion of B lymphocytes with an unusual immunoglobulin rearrangement associated with atypical lymphocytosis and cigarette smoking. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Jun;2(6):549-52.

Chow KC, Nacilla JQ, Witzig TE, Li CY. Is persistent polyclonal B lymphocytosis caused by Epstein-Barr virus? A study with polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Am J Hematol.* 1992;41(4):270-5.

Cornet E, Lesesve JE, Mossafa R, Sébahoun G, Levy V, Davi F, Troussard X; Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leukemia.* 2009;23(2):419-22.

De Haan LD, Pouwels JG. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a case report. *Ann Hematol.* 2006;85(12):893-6.

Del Giudice H, Pileri S, Rossi M, Sabattini E, Campidelli C, Della Starza I, De Propriis M, Mancini F, Perrone M, Gesuiti P, Armiento D, Quattrocchi L, Tafuri A, Amendola



A, Mauro F, Guarini A, Foà R. Histopathological and molecular features of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPLB) with progressive splenomegaly. *Br J Haematol.* 2009;144:726-731.

Delage R, Jacques L, Massinga-Loembe M, Poulin J, Bilodeau D, Mignault C, Leblond PF, Darveau A. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: further evidence for a genetic disorder associated with B-cell abnormalities. *Br J Haematol.* 2001;114(3):666-70.

Delage R, Roy J, Jacques L, Bernier V, Delâge JM, Darveau A. Multiple bcl-2/Ig gene rearrangements in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 1997;97(3):589-95.

Espinet B, Florensa L, Solé F, Lloveras E, Abella E, Besses C, Sans-Sabrafen J, Woessner S. Isochromosome +i(3)(q10) in a new case of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) *Eur J Haematol.* 2000;64(5):344-6.

Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG<sup>+</sup> B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol.* 2006;177(6):3728-36.

Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol.* 2003;171(9):4621-9.

Fecteau JF, Roy A, Néron S. Peripheral blood CD27(+) IgG(+) B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction. *Immunology.* 2008;128(1): e353 - e365.

Feugier P, De March AK, Lesesve JF, Monhoven N, Dorvaux V, Braun F, Grégoire MJ, Jonveaux P, Lederlin P, Béné MC, Labouyrie E. Intravascular bone marrow accumulation in persistent polyclonal lymphocytosis: a misleading feature for B-cell neoplasm. *Mod Pathol.* 2004;17(9):1087-96.

Fujiwara M, Shimozone H, Ono H, Fujita N, Nishimura S, Ueda K, Kaneko M. Polyclonal proliferation of lymphocytes containing the Epstein-Barr virus genome in a patient dying of myocarditis in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25(5):428.

George TC, Basiji DA, Hall BE, Lynch DH, Ortyl WE, Perry DJ, Seo MJ, Zimmerman CA, Morrissey PJ. Distinguishing modes of cell death using the ImageStream multispectral imaging flow cytometer. *Cytometry A.* 2004;59(2):237-45.

Gomez P, Matutes E, Sánchez J, Garcia JM, Román J, Gruszka-Westwood A, Torres A. An unusual form of persistent polyclonal B lymphocytosis in an infant. *Br J Haematol.* 2000;110(2):430-3.

Gordon DS, Jones BM, Browning SW, Spira TJ, Lawrence DN. Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes. *N Engl J Med.* 1982;307(4):232-6.

Granados E, Llamas P, Pinilla J, Tomàs JF, Font P, Cámara K, Olmeda F, Arranz R, Fernández-Rafiada JM. Persistent polyclonal B lymphocytosis with multiple bcl-2/JgH rearrangements: a benign disorder. *Haematologica.* 1998;83(4):369-75.

Granel B, Disdier P, Serratrice J, Hubert A.M, Alessi M.C, Cannoni H, Mazodier K, de Roux-Serratrice C, Gent y J, Pache X, Camoin L, Bouabdallah R, Sanmarco M, Weiller P.J. Hyperlymphocytose B polyclonale des tabagiques et anticorps antiphospholipides : à propos de trois cas. *Rev. Méd. Interne.* 2001;21:483.

Greifenegger N, Jünger M, Kunz-Schughart LA, Wolf H, Schwarzmann F. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J Virol.* 1998;72(11):9323-8.

Grey HM, Rabellino E, Pirofsky B. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. *J Clin Invest.* 1971;50(11):2368-75.

Hafraoui K, Moutschen M, Smet J, Mascart F, Schaaf-Lafontaine N, Fillet G. Selective defect of anti-pneumococcal IgG in a patient with persistent polyclonal B cell lymphocytosis. *Eur J Intern Med.* 2009;20(3):62-5.

Heselmeyer K, Schrock E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(1):479-84.

Himmelmann A, Gautschi O, Nawrath M, Bolliger U, Fehr J, Stahel RA. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD( + )CD27( + ) memory B cells. *Br J Haematol.* 2001;114:400-405.

Himmelmann A, Rüegg R, Fehr J. Familial persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma.* 2001;41(1-2):157-60.

Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol.* 1997;159(6):2652-7.

Jacquot S, Boyer O. Hétérogénéité et fonctions des lymphocytes B chez l'homme. *Med Sci.* 2006;22(12):1075-80.

Jager M, Prang N, Mitterer M, Larcher C, Huemer HP, Reischl U, Wolf H, Schwarzmann F. Pathogenesis of chronic Epstein-Barr virus infection: detection of a virus strain with a high rate of lytic replication. *Br J Haematol.* 1996;95(4):626-36.

Jaubert D, de Jaureguiberry JP, Marlier S. Role of Epstein-Barr virus infection in polyclonal binucleated B-cell lymphocytosis. *Presse Med.* 1997;26(32):1531.

Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. biologie des récepteurs de l'immunité innée : applications cliniques et thérapeutiques. *RFL.* 2010;40(424) : 41-51.

Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188(9):1679-89.

Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med.* 2003;197(7):939-45.

Lancry L, Roulland S, Roué G, Mossafa H, Salaiün V, Chèze S, Gauduchon P, Hardouin A, Sola B, Troussard X. No BCL-2 protein over expression but BCL-2/IgH rearrangements in B cells of patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Hematol J.* 2001;2(4):228-33.

Larcher C, Bernhard D, Schaadt E, Adler B, Ausserlechner MJ, Mitterer M, Huemer HP. Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del):implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants. *Haematologica.* 2003;88(12):1324-35.

Larcher C, Fend F, Mitterer M, Prang N, Schwarzmann F, Huemer HP. Role of Epstein-Barr virus and soluble CD21 in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 1995;90(3):532-40.

Lawrie CH, Shilling R, Troussard X, Cattan H, Mossafa H, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. Expression profiling of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis suggests constitutive expression of the AP-1 transcription complex and downregulation of Fas-apoptotic and TGFbeta signalling pathways. *Leukemia.* 2009;23(3):581-3.

Leclerc M, Lesesve JF, Gaillard B, Troussard X, Tourbah A, Debouverie M, Daliphard S, Delmer A. Binucleated lymphocytes in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(5):910-2.

Lee CP, Chen JY, Wang JT, Kimura K, Takemoto A, Lu CC, Chen MR. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J Virol.* 2007;81(10):5166-80.

Lees O, Béné MC, et le GEIL. Immunophénotypage des leucocytes. Biotem éditions 1998.

Lesesve JF, Cornet E, Mossafa H, Troussard X. EDTA-dependent lymphoagglutination in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2011;154(6):668.

Lesesve JF, Cornet E, Mossafa H, Braun F, Dorvaux V, Troussard X. Familial cases of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Blood, letter,* 2011 Dec 23.

Lesesve JF, Cornet E, Mossafa H, Troussard X. Lymphocytose B polyclonale à lymphocytes binucléés. *Rev Prat.* 2009;59(1):32.

Lesesve JF, Debouverie M, Decarvalho Bittencourt M, Béné MC. CD49d blockade by natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis increases immature B-lymphocytes. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(11):1489-91.

Lesesve JF, Devignes J, Sokolowska J, Aimone-Gastin I, Jacob C, Wahl D, Troussard X, Lecompte T. IgM interference in determination of antiphospholipid antibodies and erythrocyte sedimentation rate in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(5):e9-e11.

Lesesve JF, Troussard X. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Blood.* 2011;118(25):6485.

Lin RY. Persistent polyclonal B lymphocytosis with low IgM. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;3(1).

Loembé M. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B dans la lymphocytose polyclonale chronique B. Thèse de doctorat en microbiologie. Faculté des sciences et de génie Université Laval Québec, 2004.

Loembé MM, Lamoureux J, Deslauriers N, Darveau A, Delage R. Lack of CD40-dependent B-cell proliferation in B lymphocytes isolated from patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2001;113(3):699-705.

Loembé MM, Néron S, Delage R, Darveau A. Analysis of expressed V(H) genes in persistent polyclonal B cell lymphocytosis reveals absence of selection in CD27+IgM+IgD+ memory B cells. *Eur J Immunol.* 2002;32(12):3678-88.

Marti GE, Ryan ET, Papadopoulos NM, Filling-Katz M, Barton N, Fleischer TA, Rick M, Gralnick HR. Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease. *Am J Hematol.* 1988;29(4):189-94.

Mitterer M, Pescosta N, Fend F, Larcher C, Prang N, Schwarzmann F, Coser P, Huemer HP. Chronic active Epstein-Barr virus disease in a case of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 1995;90(3):526-31.

Mossafa R Troussard X, Valensi F, Schillinger F, Maynadie M, Bulliard G, MacIntyre E, Flandrin G. Isochromosome i(3q) and premature chromosome condensation are recurrent findings in chronic B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leukemia Lymphoma.* 1996;20: 267-273.

Mossafa R Malaure H, Maynadie M, et al, et le groupe français d'hématologie cellulaire (GFHC). Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. *Br J Haematol* 1999;104: 486-93.

Mossafa R Tapia S, Flandrin G, Troussard X, et le Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Chromosomal instability and ATR amplification gene in patients with persistent and polyclonal B-Cell lymphocytosis (PPBL). *Leuk. Lymphoma* 2004;45/7:1401-1406.

Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Oh shi ma K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV -associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13(17):5124-32.

Perrault C, Boileau J, Gyger M, De Bellefeuille C, D'angelo G, Belanger R, Lacombe M, Lavalee R, Bonny Y, Paquin M, Brochu S. Chronic B-cell lymphocytosis. *European Journal of Haematology* 1989;2: 361-367.

Reeder CB, Conley CR. CD5+ persistent polyclonal B-cell lymphocytosis in a male. *Leuk Lymphoma.* 1999;33(5-6):593-6.

Rodriguez JN, Diéguez Jc, Martino ML, Prados D. Persistent polyclonal B lymphocytosis. *Am J Hematol.* 1996;51(3):246-7.

Roussel M, Mossafa H, Troussard x., GFHC. Lymphocytose polyclonale avec lymphocytes sanguins binucléés. *Hématol.* 2004;10:169-72.

Roussel M, Roué G, Sola B, Mossafa H, Troussard X. Dysfunction of the Fas apoptotic signaling pathway III persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica.* 2003;88(2):239-40.

Roy-Taranger M, Mayaud G, Davydoff-Alibert S. Binuclear lymphocytes in the blood of individuals irradiated by a low dose. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 1965;10(9):958-65.

Salcedo I, Campos-Caro A, Sampalo A, Reales E, Brieva JA. Persistent polyclonal B lymphocytosis: an expansion of cells showing IgVH gene mutations and phenotypic features of normal lymphocytes from the CD27+ marginal zone B-cell compartment. *Br J Haematol.* 2002;116(3):662-6.

Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol.* 2008;20(1):67-82.

Schmidt-Hieber M, Burmeister T, Weinmann A, Nagorsen D, Hofmann WK, Thiel E, Schwartz S. Combined automated cell and flow cytometric analysis enables recognition of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL), a study of 25 patients. *Ann Hematol* 2008;87:829-836.

Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, Marti GE. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(5):344-53.

Sokolowska-gillois J. Lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : une série monocentrique de 33 patient(e)s. Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2009.

Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon 1. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):420-4.

Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells : effectors of long-lived Immune responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2065-75.

Troussard X, Cornet E, Lesesve JF, Kourel C, Mossafa H. Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL). *Rev Prat.* 2009;59(1):32.

Troussard X, Mossafa H. Polyclonal B Lymphocytosis with Binucleated Lymphocytes (PPBL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2004.

Troussard X, Mossafa H, Flandrin G. Identity between hairy B-cell lymphoproliferative disorder and persistent polyclonal B lymphocytosis? *Blood.* 1997;90(5):2110-3.

Troussard X, Mossafa H, Flandrin G. Lymphocytose polyclonale avec lymphocytes sanguins binucléés Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Ann Biol Clin.* 2002;60(3):273-8.



Troussard X, Mossafa H, Valensi F, Maynadie M, Schillinger F, Bulliard G, Malaure H, Flandrin G. Polyclonal lymphocytosis with binucleated lymphocytes. Morphological, immunological, cytogenetic and molecular analysis in 15 cases. *Presse Med.* 1997;26(19):895-9.

Veneri D, Ortolani R, Franchini M, Tridente G, Pizzolo G, Vella A. Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood Transfus.* 2009;7(1):29-34.

Vignes S, Oksenhendler E, Quint L, Daniel MT, Mariette X, Clauvel JP. Polyclonal B lymphocytosis and hyper-IgM: immunodeficiency and/or benign lymphoid proliferation associated with tobacco? *Rev Med Interne.* 2000;21(3):236-41.

Vincenot-Blouin A, Timbely O, Abarah-Atassi W, Mossafa H, Allard C, Michel F, André-Kerneis E. Binucleated lymphocyte lymphocytosis. *Ann Biol Clin.* 2003;61(4):454-7.

Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill Je. Human blood IgM « memory » B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 2004;104(12):3647-54.

Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist F F, de Saint Basile G G, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(3):1166-70.

Wilkinson LS, Tang A, Gjedsted A. Marked lymphocytosis suggesting chronic lymphocytic leukemia in three patients with hyposplenism. *Am J Med.* 1983;75(6):1053-6.

Wolowiec D, Nowak J, Majewski M, Haus O, Duszenko E, Stella-Holowiecka B, Mika-Witkowska R, Makuch-Lasica H, Nowak G, Krawcewicz A, Kuliczkowski K, Warzocha K. High incidence of ancestral HLA haplotype 8.1 and monoclonal incomplete DH-JH immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Ann Hematol.* 2008;87:597-8.

Wong KF, So CC, Chan JCW, Kho BCS, Chan JKe. Gain of chromosome 3/3q in Bcell chronic lymphoproliferative disorder is associated with plasmacytoid differentiation with or without IgM overproduction. *Canc Genet Cytogenet.* 2002;136:82-5.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 14 Mai 2012

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Laure MARCHAL

Sujet : La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés :  
exploration phénotypique et fonctionnelle.Jury :

Président : Pr JOUZEAU Jean-Yves

Directeur : Dr LESESVE Jean-François / Dr FAIVRE Béatrice

Juges :

Pr FEUGIER Pierre

Dr DE CARVAHLO Marcelo

Dr MOSSAFA Hossein

Vu,

Nancy, le 17/04/2012

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. Pr JOUZEAU



M. Dr LESESVE



Mme Dr FAIVRE



Vu et approuvé,

Nancy, le

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,


Francine PAULUS



Vu,

Nancy, le 24.04.2012.

L'Administrateur Provisoire de l'UDL,



Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3956

N° d'identification :

**TITRE**

**La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : exploration phénotypique et fonctionnelle**

Thèse soutenue le 14 Mai 2012  
Par Laure Marchal

**RESUME :**

La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB) est une entité hématologique rare diagnostiquée principalement chez les femmes fumeuses et caractérisée par une lymphocytose chronique polyclonale qui se distingue par la présence de lymphocytes binucléés à l'examen du frottis sanguin. Elle présente des critères de bénignité (expansion polyclonale, symptomatologie discrète, stabilité clinique) contrastant avec d'autres critères classiquement associés aux proliférations malignes (cellules morphologiquement atypiques, anomalies génétiques, infiltration de la moelle osseuse et, dans de rares cas, évolution maligne). L'intérêt porté à cette affection tient à cette singularité.

La LPLB est connue depuis environ 30 ans mais elle est encore mal comprise du fait de la rareté des patients et donc des expérimentations destinées à élucider ses mécanismes. Ce travail consiste en une étude phénotypique approfondie des lymphocytes B dans la LPLB reposant sur l'analyse des immunophénotypages issus des cas de la littérature et de la cohorte lorraine, ainsi que sur l'analyse des cellules lymphoïdes par un système d'imagerie en flux innovant : l'*Image Stream X AMNIS*®. Les données obtenues semblent convergentes pour apparenter les lymphocytes de la LPLB aux lymphocytes B mémoires issus de la zone marginale splénique.

D'autre part, ce travail présente les résultats de l'étude fonctionnelle des lymphocytes B binucléés via leur stimulation par un ligand du TLR9. Cette étude a permis d'étudier la fonctionnalité de ce récepteur et de discuter de son rôle dans la LPLB.

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de préciser le profil immunologique des cellules lymphoïdes impliquées dans la survenue de la LPLB, contribuant à une meilleure connaissance des mécanismes de survenue de cette entité méconnue.

**MOTS CLES :** lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés, CpG-ODN, TLR9, Image X Stream AMNIS®, lymphocytes B mémoires.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Jean-François LESESVE	Laboratoire d'hématologie biologique CHU Brabois Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
Béatrice FAIVRE	Laboratoire d'hématologie-Génie biologique Faculté Pharmacie Nancy	Thème 5

<u>Thèmes</u>	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament 5 - Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
---------------	--	---