



**HAL**  
open science

# Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B matures. Une cohorte de patients du CHU de Nancy

Marie Wyrwas

► **To cite this version:**

Marie Wyrwas. Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B matures. Une cohorte de patients du CHU de Nancy. Sciences pharmaceutiques. 2015. hal-01733532

**HAL Id: hal-01733532**

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733532v1>

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 DE LORRAINE  
2015**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

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

Soutenu devant le Jury Interrégional, le 8 octobre 2015

Par WYRWAS Marie  
né (e) le 10 juin 1986

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

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

**Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes  
lymphoprolifératifs B matures.**

**Une cohorte de patients du CHU de Nancy**

Membres du Jury

Président : Mme BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ Danièle,

PU-PH, Unité de thérapie cellulaire,  
CHU de Nancy

Juges : M. LESESVE Jean-François,

PH, Hématologie Biologique,  
CHU de Nancy *Directeur de thèse*  
PU-PH, Service d'Hématologie,  
CHU de Nancy

M. FEUGIER Pierre,

PU-PH, EFS,  
CHU de Besançon

Mme GARNACHE-OTTOU Francine,

MCU-PH, Hématologie Biologique,  
CHU de Strasbourg

M. MIGUET Laurent Yannick,

UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2014-2015

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine**

**Responsables de la filière Industrie**

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable de la filière Hôpital**

**Responsable Pharma Plus ENSIC**

**Responsable Pharma Plus ENSALA**

**Responsable de la Communication**

**Responsable de la Cellule de Formation Continue**

**et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément**

**des maîtres de stage**

**Responsables des échanges internationaux**

**Responsable ERASMUS**

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

<b>ENSEIGNANTS</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES</b>		
Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire
<b>MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique
<b>MAITRES DE CONFÉRENCES</b>		
Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
<b>PROFESSEUR ASSOCIE</b>		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
<b>PROFESSEUR AGREGE</b>		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

**\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en 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.

**D'**e 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**

### **A notre Présidente de jury**

*Madame BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ Danièle,*

PU-PH, Unité de thérapie cellulaire, CHU de Nancy.

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Nous vous remercions pour l'intérêt manifesté envers ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

### **A notre Directeur de thèse**

*Monsieur LESESVE Jean-François*

PH, Hématologie Biologique, CHU de Nancy.

Nous vous remercions de nous avoir confié et guidé tout au long de ce travail mais également de nous avoir conseillé et écouté.

Nous tenons à vous témoigner notre profonde reconnaissance.

Nous vous remercions de nous avoir consacré tout le temps nécessaire et de nous avoir éclairé sur vos connaissances.

C'est pour nous un grand honneur de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de votre savoir.

Nous vous exprimons toute notre gratitude.

Grazie mille per la Sua disponibilità e la Sua gentilezza.

## **A nos juges,**

***Monsieur FEUGIER Pierre,***

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

Nous sommes particulièrement sensible à l'honneur que vous nous faites d'accepter de juger ce travail.

Nous vous remercions très sincèrement d'être présent parmi nous.

Soyez assuré de toute notre gratitude et de notre profond respect.

***Madame GARNACHE-OTTOU Francine,***

PU-PH, EFS, CHU de Besançon

Nous vous remercions chaleureusement de l'honneur que vous nous faites d'avoir accepté de juger ce travail.

C'est pour nous un grand honneur d'avoir suivi votre enseignement à la Faculté de Besançon, de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de votre savoir.

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous portez à ce sujet.

Trouvez ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect

***Monsieur MIGUET Laurent Yannick,***

MCU-PH, Hématologie Biologique, CHU de Strasbourg

C'est pour nous un grand honneur de vous compter parmi nos juges.

Nous connaissons l'intérêt que vous portez à ce sujet, et espérons que vous serez satisfait de ce travail.

Nous vous exprimons toute notre gratitude.

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

*Dr LATGER-CANNARD Véronique*

Responsable de la plateforme de cytométrie en flux, Hématologie Biologique, CHU de Nancy

Je vous remercie pour votre accueil au sein de la plateforme, ainsi que pour vos conseils que vous m'avez apportés tout au long de ce travail.

*Dr Frédéric MASSIN*

Ingénieur de la plateforme de cytométrie en flux, Hématologie Biologique, CHU de Nancy

Je te remercie pour les connaissances que tu m'as transmises sur la cytométrie en flux.

Merci de m'avoir permis de me former sur le logiciel Infinicyt.

Tes conseils et ta grande disponibilité ont été précieux.

*Aux techniciens et techniciennes de la plateforme de cytométrie en flux*

Je vous remercie pour votre accueil dans le service, votre disponibilité, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Votre travail rigoureux a permis la réalisation de ce projet.

## **Un grand merci,**

A toutes les équipes des laboratoires qui m'ont accueillie durant mes stages d'internat en biochimie, en hématologie, en bactériologie, en parasitologie/mycologie, à Remiremont, à Metz et à Epinal, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris.

A Elodie, merci pour ta générosité et tes petits pains au chocolat les lendemains de garde !

## **A ma famille, mes amis**

*A mes parents*, c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui, je vous remercie pour les valeurs que vous m'avez transmises, votre gentillesse et votre soutien tout au long de mes études.

*A mon frère*, Nicolas, même si on n'était pas proche pendant notre enfance, tu as toujours veillé sur moi et je t'en remercie. Avec les années, la complicité s'est installée ! Je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour la suite ! Une pensée pour Julie.

*A mes grands-parents*, merci de m'avoir entourée de votre amour et de votre tendresse pendant mon enfance. Ces moments restent gravés dans ma mémoire. Une pensée pour mes grands-mères qui sont déjà parties.

*A mes oncles et tantes*, Jean-Pierre, Maryline, Bertrand, Nicole, Jamy et Anne-Marie, merci pour votre gentillesse et votre soutien.

*A la famille Zanusso*, je vous remercie pour votre accueil dans votre famille, votre bonté. Merci de me faire partager la culture italienne. Grazie per tutto.

*A Anne*, ma bobette, que de chemin parcouru depuis les bancs de Ste Marie à Belfort ! Je te remercie pour cette amitié durable qui compte beaucoup pour moi.

*A mes boudins adorés, mes pink ladies*, les années « studieuses » bisontines n'auraient pas été les mêmes sans vous. Chaque moment passé ensemble est précieux. Ne changez rien, restez comme vous êtes ! « Because we are your friends, you'll never be alone again, well come on !! »

*Alix*, mon binôme de TP du vendredi matin ! Un grand merci pour tes conseils, ta patience, ton dynamisme et ton écoute (surtout les trajets Lure/Besançon !). Un bisou à ton Tugnerot !

*Elise*, une femme pressée ! Merci pour tous ces moments partagés à Nancy pendant mon internat, les eurocks...Bon courage pour ta prochaine thèse !

*Pôca*, notre pocate ! Une enfant artiste de 8 ans avec une grande gentillesse et une grande générosité qui a trouvé son Jean-Phil !

*Julie*, notre chorégraphe pink ! Ton dynamisme et ta bonne humeur ont rythmé nos quatre années bisontines ! Une pensée pour Hicham.

*Sabrina*, notre Sabou ! J'ai été touchée par ta gentillesse et ta sensibilité. Bonne route et bon vent avec Dimitri !

*Sarah*, notre boudin kiwi ! Même si tu es loin de nous, je pense toujours à toi boudinus !!

*Anne-Hélène*, notre chonchon ! Merci pour toutes ces soirées dans ton appart bisontin, pour ta bonté et ta sincérité. Bonne continuation avec Sébastien.

*A Océane*, une si belle bouche ! Merci pour ta spontanéité, ton naturel et ta gentillesse. Un bisou à Nico et à la petite Diane !

*A Gaël*, parti trop tôt...

*A Julien P, Alexandre, Julien G, Damien, Florent, Jon, Harry* les Haut-Saônois ! Je vous remercie pour tous ces moments de rigolade passés ensemble et pour tous ceux à venir. Un retour aux sources qui fait du bien...

*A mes experts-comptables adorés : Thomas et Julien*, merci pour les repas à la maison, les apéros experts-comptables, la/les mirabelle(s). De belles amitiés nancéiennes naissantes et véritables, on vous attend à La Réunion ! Votre dynamisme et votre rigueur sont source d'inspiration pour moi.

*A mes co-internes : Alain, Loïc, Lucile, Julien, Alexandra, Lucille, Anthony, Cynthia*, merci de m'avoir accompagné pendant ces quatre années.

*A toi, Andrea*, un grand merci du fond du cœur pour ta patience, ton soutien quotidien, ton amour et la confiance que tu me portes. Merci de faire partie de ma vie. A notre amour et nos beaux projets...

Merci à mes relecteurs, ma Maman, Raffaella, Louis-Charles et Andrea. Vous avez eu du courage !

Et tous ceux que j'ai oublié de citer.

Un grand merci à vous tous pour tout ce que vous m'apporté.

## Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>20</b>
<b>PARTIE 1 : LES SYNDROMES LYMPROLIFERATIFS CHRONIQUES B.....</b>	<b>21</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>22</b>
A. Lymphomagénèse.....	22
B. Les syndromes lymphoprolifératifs B chroniques .....	25
1. La leucémie lymphoïde chronique .....	25
2. Le lymphome du manteau .....	27
3. Le lymphome de la zone marginale .....	30
a) Le lymphome des tissus associés aux muqueuses.....	30
b) Lymphome splénique de la zone marginale .....	32
c) Lymphome de la zone marginale ganglionnaire .....	34
d) Lymphome/leucémie spléniques B inclassables .....	34
• Lymphome B diffus splénique de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux .....	34
• Leucémie à tricholeucocytes variante .....	36
4. Leucémie à tricholeucocytes .....	37
5. Lymphome folliculaire .....	39
6. Leucémie à prolymphocytes.....	41
7. Lymphome lymphoplasmocytaire ou maladie de Waldenström.....	42
<b>II. Immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs B chroniques.....</b>	<b>45</b>
A. Principe de la cytométrie en flux.....	45
1. Historique de la cytométrie en flux .....	45
2. Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux.....	46
a) Système fluide .....	47
b) L'excitation lumineuse .....	48
c) Le système optique .....	48
d) Traitement du signal lumineux.....	50
e) Les fluorochromes.....	51
f) Préparation et analyse des échantillons .....	52

B.	Application en hématologie .....	53
1.	Objectifs de la CMF dans les SLP-B .....	53
2.	Panel lymphocytaire B en CMF .....	53
C.	Immunophénotypage des différents SLP-B .....	59
1.	SLP-B CD5+ / CD10- .....	62
a)	La leucémie lymphoïde chronique .....	62
b)	Le lymphome du manteau .....	63
c)	Le lymphome de zone marginale .....	64
d)	Le lymphome lymphoplasmocytaire .....	64
e)	La leucémie prolymphocytaire B .....	65
2.	SLP-B CD5- / CD10+ .....	65
a)	Le lymphome folliculaire .....	65
3.	SLP-B CD5- / CD10- .....	66
a)	La leucémie à tricholeucocytes .....	66
b)	Le lymphome de zone marginale SMZL, le SRPL et la HCLv .....	68
c)	Le lymphome lymphoplasmocytaire .....	73
4.	SLP-B CD5+ / CD10+ .....	74
5.	Récapitulatif immunophénotypage des SLP-B .....	75
D.	Revue de la littérature sur l'expression des différents marqueurs en fonction de chaque entité .....	76

**PARTIE 2 : APPORT DES « NOUVEAUX MARQUEURS » POUR L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES SLP-B ET ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES INTENSITES DE FLUORESCENCE DES DIFFERENTS MARQUEURS DU PANEL D'EXPLORATION DES SLP-B..... 80**

<b>I.</b>	<b>Présentation des nouveaux marqueurs .....</b>	<b>81</b>
A.	CD148 .....	81
B.	CD180 .....	81
C.	CD200 .....	82
<b>II.</b>	<b>Etablissement de valeurs de référence pour l'ensemble des marqueurs utilisés dans le panel d'exploration des SLP-B.....</b>	<b>83</b>
A.	Objectifs .....	83

B.	Matériels et méthodes.....	83
1.	Sélection des échantillons .....	83
2.	Appareil d'analyse.....	84
a)	Caractéristiques .....	84
b)	Maintenance quotidienne .....	86
c)	Protocole d'analyse cytométrique des SLP-B.....	87
3.	Traitement des données cytométriques .....	88
C.	Résultats .....	89
D.	Discussion .....	92
<b>III.</b>	<b>Etude de la répartition des différents marqueurs en fonction des SLP-B.....</b>	<b>93</b>
A.	Objectifs de l'étude .....	93
B.	Matériels et méthodes.....	93
1.	Sélection des échantillons et appareil de mesure .....	93
2.	Traitement des données de cytométrie .....	93
C.	Résultats .....	94
D.	Discussion .....	98
<b>IV.</b>	<b>Exploration des marqueurs du panel SLP-B au moyen du logiciel INFINICYT.....</b>	<b>102</b>
A.	Objectifs .....	102
B.	Sélection des échantillons et appareil de mesure .....	102
C.	Présentation du logiciel INFINICYT .....	103
D.	Traitement des données cytométriques .....	104
E.	Résultats .....	105
1.	Comparaison des IMF entre Diva et Infinicyt.....	105
2.	Etudes des différents marqueurs à l'aide du logiciel Infinicyt.....	107
F.	Discussion .....	112
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>118</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>120</b>
	<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>128</b>
	<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>137</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.....	57
Tableau 2 : Approche diagnostique en cytométrie de flux et classification des SLP-B .....	60
Tableau 3 : Score de Matutes/Moreau pour le diagnostic de la CLL.....	62
Tableau 4 : Score des marqueurs de la HCL.....	67
Tableau 5 : Score pour distinguer le SRPL du SMZL .....	69
Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques des SRPL, SMZL, HCL, HCLv.....	70
Tableau 7 : Profil immunophénotypique dans la maladie de Waldenström .....	73
Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques des SLP-B.....	75
Tableau 9 : Revue de la littérature sur l'expression des différents CD en fonction de chaque entité (expression en pourcentage).....	76
Tableau 10 : Panel des anticorps des SLP-B.....	88
Tableau 11 : Exploitation statistique des résultats obtenus pour les IFM des différents CD au cours des 45 CLL, 14 MZL et 9 MCL .....	89
Tableau 12 : Profils immunophénotypiques CLL, MZL et MCL .....	91
Tableau 13 : Seuils décisionnels proposés par l'équipe de Strasbourg et seuils de Nancy ....	100
Tableau 14 : Spécificités et sensibilités pour les seuils proposés par l'équipe de Strasbourg	101
Tableau 15 : Comparaison des résultats entre Diva et Infinicyt .....	106
Tableau 16 : Statistiques APS tube 2 .....	114
Tableau 17 : Statistiques APS tube 1 .....	115

## Liste des figures

Figure 1 : Recombinaison des gènes VDJ et synthèse du BCR.....	22
Figure 2 : Précurseurs des cellules néoplasiques B.....	24
Figure 3 : Leucémie lymphoïde chronique .....	26
Figure 4 : Forme classique du lymphome du manteau.....	28
Figure 5 : Forme blastoïde du lymphome du manteau.....	29
Figure 6 : Cellules d'aspect monocytoïde du SMZL .....	33
Figure 7 : Lymphocytes villeux des SRPL, SMZL .....	35
Figure 8 : Leucémie à tricholeucocytes variante.....	37
Figure 9 : Tricholeucocyte .....	38
Figure 10 : Centrocytes du lymphome folliculaire.....	41
Figure 11 : Leucémie à prolymphocytes .....	42
Figure 12 : Lymphome lymphoplasmocytaire .....	44
Figure 13 : Principe de fonctionnement des analyseurs-trieurs .....	46
Figure 14 : Effet de la pression et de la concentration exercées sur l'échantillon.....	47
Figure 15 : Informations "morphologiques" des cellules analysées et séparation des différentes populations sanguines .....	49
Figure 16 : Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux.....	49
Figure 17 : Chevauchement des spectres de fluorescences FITC et PE.....	50
Figure 18 : Fluorochromes les plus utilisés en CMF .....	51
Figure 19 : Principe de la fluorescence en cytométrie de flux .....	52
Figure 20 : Le cytomètre BD FACS Canto II .....	84
Figure 21 : Caractéristiques du banc optique et des fluorochromes utilisés sur le FACS CANTO II .....	85
Figure 22 : Interprétation des différents cas de la fonction compas.....	104
Figure 23 : Expression des marqueurs CD148, CD180 et CD200 dans la CLL, MZL et MCL .....	108
Figure 24 : Expression des marqueurs FMC7, CD23 et CD5 dans la CLL, MZL et MCL ...	109

Figure 25 : Expression des marqueurs CD19, CD10 et CD20 dans la CLL, MZL et MCL ..	110
Figure 26 : Expression des marqueurs CD38, CD81 et CD25 dans la CLL, MZL et MCL ..	111
Figure 27 : Représentation APS tube 2 avec CD148, CD180, CD200, CD5, CD81, CD25, CD19 et CD45 .....	114
Figure 28 : Représentation APS tube 1 avec CD20, CD38, FMC7, CD23, CD5, CD10, CD19, CD45 .....	115
Figure 29 : Test de la fonction compas sur la base de données .....	116

## Liste des abréviations

aCLL: leucémie lymphoïde chronique atypique

ADC: analogic to Digital Converter

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénopathies

AID : activation induced cytidine deaminase

APC : allophycocyanine

APC-Cy7 : APC-cyanine 7

APS : Automatic Population Separator

BCR : B Cell Receptor

B-PPL : leucémie à prolymphocytes

CD : cluster de différenciation

cIg : immunoglobuline intracytoplasmique

CLL : leucémie lymphoïde chronique

CMF : cytométrie en flux

DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FL : lymphome folliculaire

HCL : leucémie à tricholeucocytes

HCLv : leucémie à tricholeucocytes variante

Ig : immunoglobuline

IgG : immunoglobuline de type G

IgM : immunoglobuline de type M

Igs : immunoglobulines

IHC : immunohistochimie

IMF : intensité moyenne de fluorescence

K : kappa

$\lambda$  : lambda

LPL : lymphome lymphoplasmocytaire

LV : lymphocyte villeux

MALT : mucosa-associated lymphoid tissue

MBL : lymphocytose B monoclonale

MCL : lymphome du manteau

MW : maladie de Waldenström

MZL : lymphome de zone marginale

MZLN : lymphome de zone marginale ganglionnaire

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : tampon phosphate buffer Saline

PE : R-phycoérythrine

PE-Cy5 : PE-cyanine 5

PE-Cy7 : PE-cyanine 7

PerCP : peridinine chlorophylle-protéine

PerCP-Cy5.5 : PerCP-cyanine 5.5

PMT : photomultiplicateur

RAG : recombination activating genes

SFH : société française d'hématologie

sIg : immunoglobulines de surface

SLPB : syndrome lymphoprolifératifs B

SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villeux

SMZL : lymphome splénique de zone marginale

SRPL : lymphome B diffus splénique de la pulpe rouge

SLL : lymphome lymphocytaire

TRAP : phosphatase acide tartrate résistante

## **INTRODUCTION**

La distinction entre lymphome et leucémie est un concept ancien. Par convention, le terme de lymphome est utilisé quand la tumeur est confinée à un ou des organes avec absence de passage sanguin et d'infiltration médullaire (ou à minima seulement). La tumeur prend naissance dans le système lymphatique. Quelques fois, les cellules lymphomateuses peuvent passer dans le sang on parlera de phase leucémique du lymphome. Dans ces cas-là, l'immunophénotypage lymphocytaire prend une place prépondérante dans le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B) en étant réalisé en première intention lors de la découverte fortuite d'une hyperlymphocytose chronique.

Selon l'expérience strasbourgeoise, dans le cadre de ces hyperlymphocytoses et en absence d'examen histologique (« gold standard » pour le diagnostic des lymphomes), le diagnostic peut se révéler difficile dans environ 20% des cas. Ceci est particulièrement dû au manque de marqueur spécifique ou non discriminant.<sup>1;2</sup> Le choix des marqueurs lymphoïdes analysés, la recherche de nouveaux marqueurs, et l'interprétation de l'immunophénotypage prennent alors une place importante dans la démarche diagnostique.

Seul le score de Matutes/Moreau (RMH) pose le diagnostic de certitude de la leucémie lymphoïde chronique car il n'existe pas d'autre score validé à grande échelle pour les autres SLP-B. L'absence de marqueurs cytométriques spécifiques diminue la précision diagnostique et par la même occasion, la qualité de la prise en charge du patient.

Mon travail a consisté à évaluer l'intérêt diagnostique des médianes des intensités moyennes de fluorescence des différents marqueurs du panel lymphocytaire utilisé au CHU de Nancy. Simultanément, ces données sur les médianes ont permis l'étude de la distribution de ces marqueurs pour chaque SLP-B dans le but d'aider le biologiste dans l'interprétation des immunophénotypes et de mettre en évidence les marqueurs les plus discriminants. Ce travail a évalué également trois nouveaux marqueurs (CD148, CD180 et CD200) dans le panel lymphocytaire et leur apport diagnostique dans la cytométrie en flux.<sup>3</sup>

## **Partie 1 : Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B**

# I. Généralités

## A. Lymphomagenèse

La lymphopoïèse B débute dans la moelle osseuse à partir des lymphocytes Pro-B. A ce stade le lymphocyte Pro-B réalise une recombinaison de ses gènes *VDJ* (gènes des immunoglobulines) médiée par les recombinases RAG1 et RAG2 pour aboutir à la synthèse du récepteur B (BCR) et donc au stade lymphocyte B mature naïf. Ces cellules vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, lieu de rencontre de l'antigène.

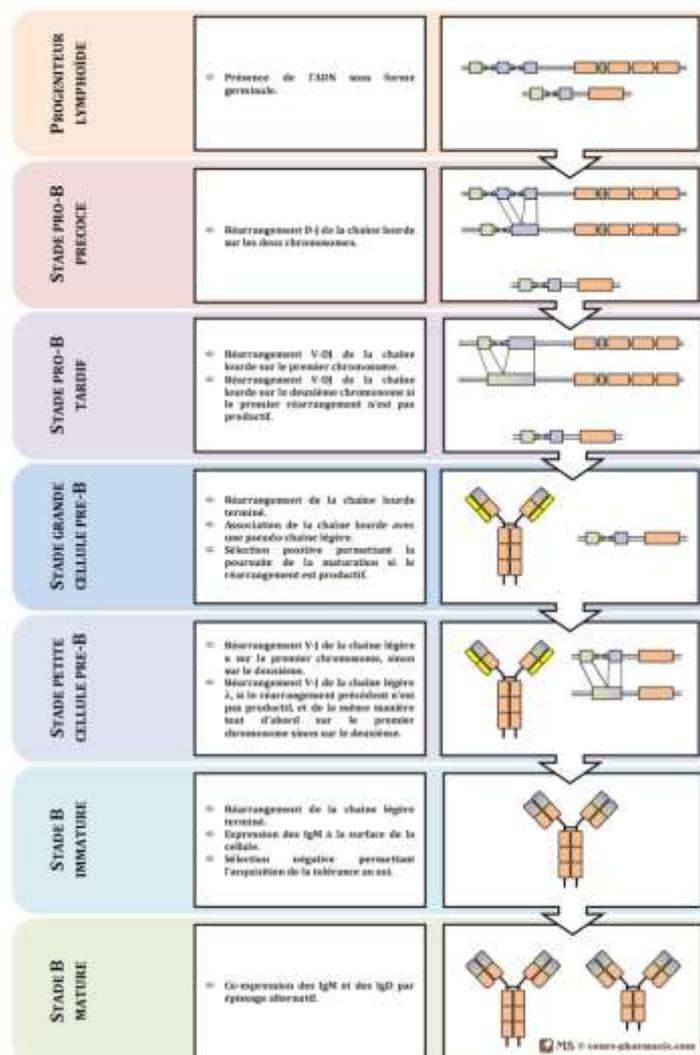


Figure 1 : Recombinaison des gènes VDJ et synthèse du BCR

(<http://www.cours-pharmacie.com>)

Dans les organes lymphoïdes secondaires, le lymphocyte T présente l'antigène au lymphocyte B mature naïf. Cette présentation provoque l'activation du BCR suivie par les hypermutations somatiques (processus de mutations ponctuelles aléatoires sur les lourdes et légères des immunoglobulines du BCR) afin d'augmenter l'affinité pour l'antigène. Le lymphocyte B subit ensuite un switch des immunoglobulines (Igs) qui produit un réarrangement irréversible de l'ADN par excision des séquences d'ADN situées entre le gène J et le gène codant pour la chaîne lourde souhaitée via des enzymes AID.

Les lymphomes B sont fréquemment caractérisés par des translocations réciproques impliquant un gène des immunoglobulines et un pro-oncogène qui se positionnent au niveau du contrôle du locus de cette immunoglobuline entraînant une dérégulation de l'expression de celle-ci. Le microenvironnement autour des cellules lymphomateuses joue un rôle important et contribue à leur survie et leur prolifération via l'activation de leur BCR par la présentation de l'antigène.<sup>4</sup>

Dans la moelle osseuse, la recombinaison des gènes *VDJ* des Igs est sous la dépendance de plusieurs enzymes : recombinaisons RAG1 et RAG2 enzymes qui coupent l'ADN double brin et l'ADN ligase qui relie les brins. Cette étape de cassures de l'ADN est très propice à l'apparition de translocations qui sont à l'origine des lymphomes. Par exemple les translocations t(11;14) (retrouvées dans les lymphomes du manteau) et t(14;18) (retrouvées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules et les lymphomes folliculaires) s'effectuent pendant la recombinaison des gènes *VDJ*. La translocation t(11;14) juxtapose le gène *CCND1* au locus *IgH* et aboutit à une surexpression de la Cycline D1.

Le centre germinale des ganglions lymphoïdes reste la source la plus probable des différents lymphomes, car l'hypermutation somatique et la commutation isotypique des immunoglobulines par les AID entraînent des modifications de l'ADN qui peuvent s'avérer pathologiques et qui peuvent donner naissance à des cellules lymphomateuses. Par exemple, le gène *BCL6* est souvent muté lors d'une hypermutation somatique aberrante.<sup>5</sup>

Plusieurs étapes de l'ontogénie des lymphocytes B sont sources de multiples altérations de l'ADN qui peuvent donner naissance à une cellule lymphomateuse, comme nous le présente la figure 1.

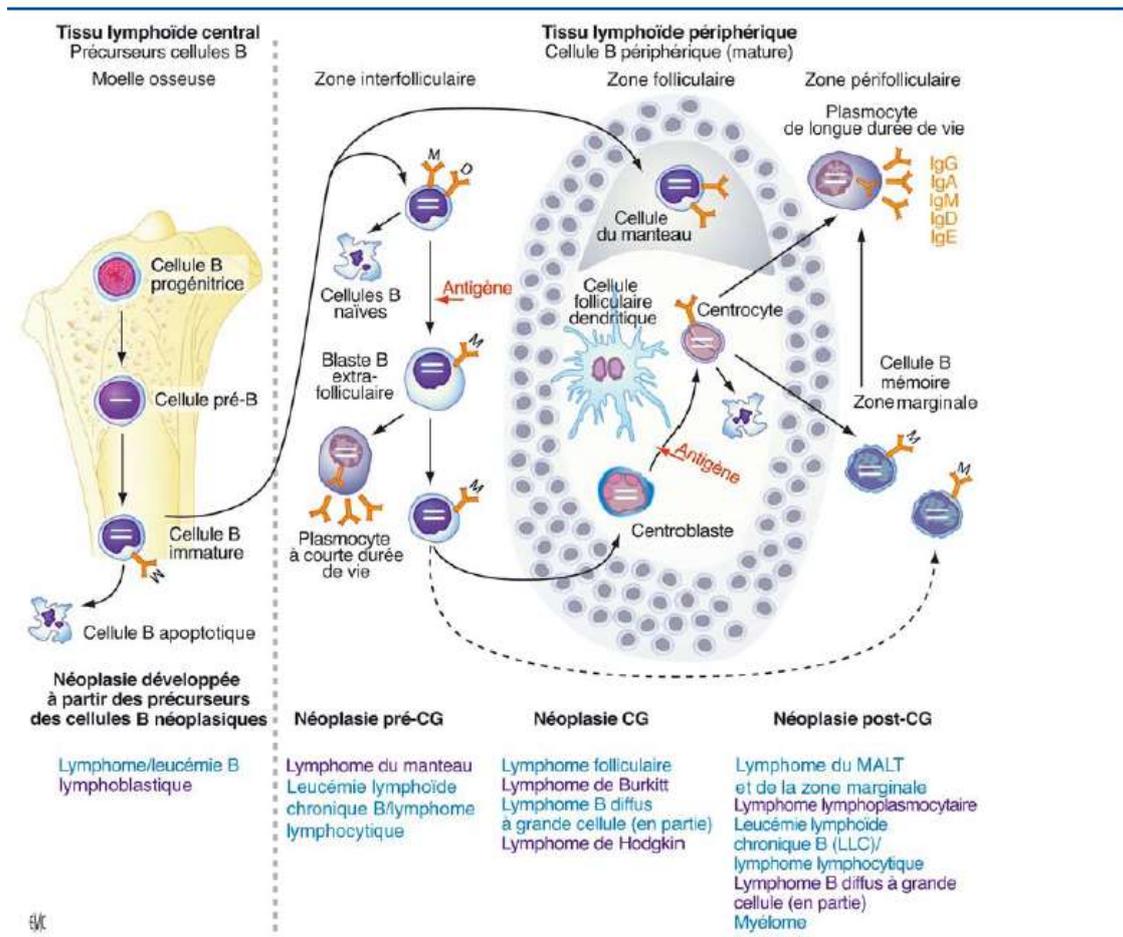


Figure 2 : Précurseurs des cellules néoplasiques B<sup>3</sup>

Cette figure permet de comprendre de manière simplifiée l'origine des différents lymphomes B les plus connus. En revanche les leucémies lymphoblastiques et les lymphomes lymphoblastiques sont des « néoplasies » (OMS) issus de précurseurs B infiltrant la moelle osseuse, le sang, et parfois avec des localisations nodulaires ou extra-nodales.

## **B. Les syndromes lymphoprolifératifs B chroniques**

Par souci de clarté, nous utiliserons les abréviations anglo-saxonnes validées par l'OMS.

### **1. La leucémie lymphoïde chronique**

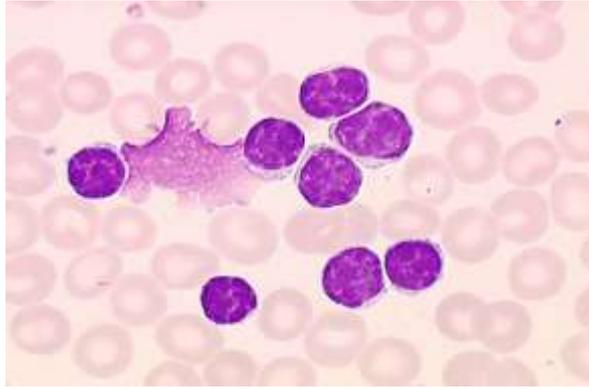
La leucémie lymphoïde chronique (CLL) est définie par une accumulation sanguine de petits lymphocytes matures avec un noyau arrondi à chromatine mature mottée. Le diagnostic est réalisé par la présence d'une hyperlymphocytose supérieure à 5 G/L depuis plus de trois mois avec un score de Matutes supérieur ou égal à quatre.

La CLL est la leucémie la plus fréquente avec un âge moyen de 65 ans. L'incidence est de 2 à 6 cas/100000 personnes et augmente avec l'âge pour atteindre 13/100000 personnes à 65 ans. Une prédisposition familiale est retrouvée dans 5 à 10 % des cas. En revanche, si on observe la fréquence relative des lymphomes B chez les adultes, le sous-groupe de CLL ne représente que 12% des entités.<sup>6</sup>

Le diagnostic est le plus couramment fortuit, lors de la réalisation d'un hémogramme systématique qui révèle d'une hyperlymphocytose sanguine. Seulement 10% des CLL se présentent avec des symptômes B : fièvre inexplicée, perte supérieure à 10% du poids en 6 mois, sueurs nocturnes. A l'examen clinique, les ganglions peuvent être hypertrophiés et palpables. Une hépatosplénomégalie est présente dans 20 à 50% des cas. Le temps de doublement de la lymphocytose en moins d'un an est un facteur péjoratif de la maladie.<sup>7</sup>

Le plus souvent, le frottis sanguin est monomorphe avec une proportion de prolymphocytes inférieure à 2%.<sup>6</sup> Parfois, la morphologie est plus atypique : lymphocyte avec un noyau au contour irrégulier, encoché, ou cellules lymphoplasmocytoïdes ou une composante prolymphocytaire plus importante (> 10 % et < 55 % des cellules lymphoïdes). Ces CLL sont appelées CLL atypiques.<sup>8</sup> L'interprétation rigoureuse de l'immunophénotypage est alors indispensable pour la classification de la pathologie, les CLL atypiques ayant score de Matutes inférieur à 4. La présence de cellules éclatées dites « Ombres de Gümprecht » provient de la lyse des lymphocytes lors de la réalisation du frottis sanguin.

La transformation en leucémie prolymphocytaire (>55% de prolymphocytes circulants) est rare et seulement 2 à 8% des CLL se transforment en lymphome B diffus à grandes cellules.<sup>6</sup>



**Figure 3 : Leucémie lymphoïde chronique**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

Concernant la cytogénétique, des délétions sur les bras longs des chromosomes 6, 11 et 13, et sur le bras court du chromosome 17 sont les cas les plus fréquents. La délétion 13q14 est retrouvée dans 50% des CLL mais n'est pas spécifique, car elle est également présente dans les lymphomes du manteau, les myélomes, et d'autres hémopathies. L'anomalie est de bon pronostic quand elle est isolée. La délétion 11q22 est la deuxième anomalie la plus fréquente, le plus souvent dans les formes progressives de CLL et associée à un mauvais pronostic. La délétion 17p13.1 est retrouvée dans 10% des diagnostics des CLL, principalement chez les patients avec une forte masse tumorale. Elle confère une résistance à la fludarabine et est associée fréquemment à d'autres anomalies et à un caryotype complexe. La recherche du statut mutationnel du gène *TP53* est également préconisée dans la prise en charge des CLL, les anomalies de *TP53* sont retrouvées dans 10 à 15 % des CLL non traitées et dans 40 à 50 % des CLL résistantes à la fludarabine.<sup>9</sup> La trisomie 12 est le plus habituellement associée aux CLL atypiques avec noyau encoché et/ou une composante lymphoplasmocytoïde.<sup>8</sup>

Les mutations des gènes des immunoglobulines sont considérées actuellement comme un marqueur important. Il existe deux groupes patients : un groupe de patients dont les gènes *IGHV* n'ont pas acquis de mutations somatiques, associé à une progression plus agressive de la CLL, et l'autre groupe où les gènes *IGHV* ont acquis ces mutations et sont le plus couramment associés à une maladie peu évolutive.<sup>10</sup>

Le terme de « lymphome lymphocytaire » (SLL) est employé pour les formes non leucémiques avec une morphologie tissulaire et immunophénotypique de CLL. La définition du SLL par l'International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia (IWCLL) nécessite des lymphadénopathies, une absence de cytopénies liées à une infiltration médullaire et un taux de lymphocytes B sanguins circulants inférieur à 5 Giga/L.<sup>6</sup>

Récemment, une nouvelle notion est apparue : la lymphocytose B monoclonale (MBL). Elle est définie par la circulation dans le sang périphérique d'un clone lymphocytaire inférieur à 5 Giga/L, possédant un immunophénotypage de clone CLL sans signe d'évolution de la maladie. La MBL est présente chez 3,5% de la population générale et l'incidence augmente avec l'âge. Elle est plus fréquemment retrouvée chez les apparentés des patients présentant une CLL. Environ 1% par an des MBL progresse en CLL mais le risque est majoré quand le taux de lymphocytes au diagnostic est supérieur à 1,9 Giga/L. L'immunophénotypage possède les mêmes caractéristiques que celui observé dans la CLL.<sup>6;11</sup>

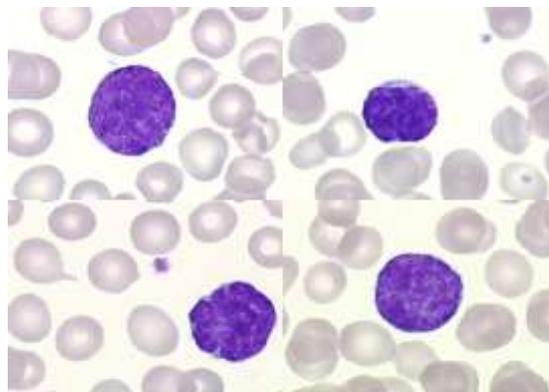
## **2. Le lymphome du manteau**

Le lymphome du manteau (MCL) est défini par la présence de cellules de taille petite à moyenne possédant un noyau avec des contours irréguliers. Il est caractérisé par la translocation du gène *CCND1* et représente 3 à 10% des lymphomes non hodgkiniens avec un âge médian au diagnostic de 68 ans.<sup>6;12</sup>

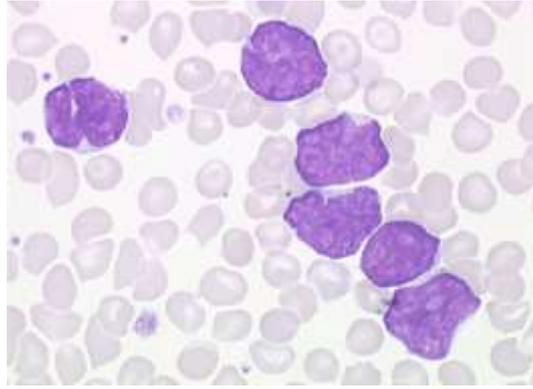
Au niveau clinique, certains patients se présentent sans syndrome tumoral avec uniquement une atteinte médullo-sanguine et plus ou moins une splénomégalie. A l'inverse, on observe des formes tumorales avec une évolution plus agressive.<sup>12;13</sup> La diffusion sanguine est fréquente (50-80%), mais une hyperlymphocytose est présente chez seulement 30-50% des patients.<sup>8</sup>

Concernant la morphologie, il existe différentes présentations :

- Dans la forme classique (majoritaire) : les lymphocytes sont très hétérogènes, de taille petite à moyenne avec un noyau irrégulier et une chromatine lâche ;
- Les formes variantes à petites cellules (minoritaires) : une forme variante lymphocytoïde composée de petits lymphocytes à chromatine mature avec un noyau aux contours irréguliers et une forme variante monocytoïde ressemblant aux lymphocytes du lymphome de la zone marginale ;
- Les formes variantes blastoïdes (minoritaires) : une variante forme classique avec des lymphocytes ressemblant à des lymphoblastes et une autre variante pleiomorphe avec des cellules de grandes tailles. Ces formes blastoïdes sont associées à un pronostic plus défavorable.



**Figure 4 : Forme classique du lymphome du manteau**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)



**Figure 5 : Forme blastoïde du lymphome du manteau**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

Le plus souvent, les patients se présentent à un stade III ou IV de la classification d'Ann Arbor au moment du diagnostic. Les infiltrations lymphomateuses se localisent fréquemment au niveau médullaire (50-80% des cas), du tube digestif, la rate et le foie avec ou sans phase leucémique. Les atteintes du système nerveux central sont très rares et plus couramment associées aux formes blastoïdes.

La translocation  $t(11;14)(q13;q32)$  entre le gène *IGH* et le gène *CCND1* aboutit à l'hyperexpression de la cycline D1. Il s'agit du premier évènement génétique qui se produit dans la lymphomagenèse. Cette translocation est présente dans la quasi-totalité des cas de lymphome du manteau.<sup>6</sup> La surexpression de la cycline D1 est à elle seule insuffisante pour induire une prolifération lymphomateuse. La perte génétique de gènes suppresseurs de tumeurs (*ATM*, *CDKN21*, *TP53*) et des gains d'oncogènes (*MYC*, *SYK*, *BCL2*) aboutissent à la naissance de la cellule tumorale. Les cas de forme variante blastoïde ont une fréquence plus élevée de tétraploïdie et de mutations du gène codant pour la p53. La translocation du gène *MYC* a été associée à une survie plus courte.<sup>9</sup>

La translocation  $t(11;14)$  peut être retrouvée dans d'autres hémopathies. Dans les formes sans hyperexpression de la cycline D1, la surexpression de la cycline D2 ou D3 et/ou la présence du facteur de transcription SOX11 en cas de cytologie atypique peuvent contribuer au diagnostic de lymphome du manteau. L'impact pronostique du niveau d'expression de SOX11 n'est pas encore établi.<sup>8;14</sup> Les facteurs pronostiques reconnus dans le MCL sont : le score MIPI, l'index de prolifération (Ki67) et les formes blastoïdes/pleïomorphes.<sup>15</sup>

### 3. Le lymphome de la zone marginale

Le lymphome de zone marginale (MZL) est une entité générale qui regroupe plusieurs sous-types de lymphomes initialement décrits séparément. Il représente environ 15% de l'ensemble des lymphomes non hodgkiniens. Les différentes formes de lymphomes sont les suivantes :

- 70% : lymphomes des tissus associés aux muqueuses (MALT) retrouvés dans les sites extra-ganglionnaires ;
- 20% : lymphomes de la zone marginale splénique avec ou sans lymphocytes villeux (SMZL et SLVL) qui sont caractérisés par la présence d'une splénomégalie ;
- 10% : lymphomes de la zone marginale ganglionnaire (NMZL) sans splénomégalie ou d'infiltration du MALT.

L'OMS a créé deux entités, pour le moment classées à part :

- Le lymphome de la pulpe rouge à petites cellules B (SRPL) présentant une forte proportion de lymphocytes villeux ;
- La leucémie à tricholeucocytes variante (HCLv).

#### *a) Le lymphome des tissus associés aux muqueuses*

Ce lymphome extra-ganglionnaire est caractérisé par des petites cellules B de morphologie hétérogène incluant, entre autres, des cellules de la zone marginale et des cellules monocytoïdes. Il représente 7 à 8% des lymphomes B, et plus de 50% des lymphomes gastriques. La moyenne d'âge de survenue est de 61 ans.

Les lymphomes du MALT se développent au sein des organes dépourvus de follicules lymphoïdes, par accumulation de lymphocytes B suite à une stimulation antigénique, une maladie auto-immune ou un stimulus inconnu. Par la suite ces lymphocytes acquièrent des anomalies génétiques en perdant leur dépendance à la stimulation antigénique, ce qui conduit à leur transformation en clone tumoral.

Les étiologies infectieuses du lymphome du MALT sont souvent associées à des agents pathogènes en fonction de la localisation :

- Lymphome gastrique et *Helicobacter pylori* (90% des lymphomes gastriques sont associés à cette bactérie) ;
- Lymphome oculaire et *Chlamydia psittaci* ;
- Lymphome digestif et *Campilobacter jejuni* ;
- Lymphome cutané et *Borrelia burgdoferi*.

Les maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjögren et la thyroïdite d'Hashimoto sont connues pour précéder les lymphomes du MALT de type salivaire et thyroïdien.<sup>6</sup>

La dissémination de la maladie se fait principalement aux autres tissus muqueux, ou à d'autres sites non muqueux tels que la rate, le foie et la moelle osseuse, principalement en cas de lymphomes extra-digestifs. L'infiltration médullaire est retrouvée dans 20% des cas. La dissémination sanguine est rare et ces lymphomes ne bénéficient donc pas d'un immunophénotypage sur sang en première intention.<sup>13</sup>

Les translocations impliquées dans le lymphome du MALT le plus fréquemment retrouvées sont t(11;18), t(1;14), t(14;18) et t(3;14). La première translocation aboutit à la synthèse d'un transcrit de fusion API2-MALT1 qui confirme le diagnostic notamment dans les cas où il existe une faible infiltration tissulaire.<sup>9</sup>

L'évolution de la maladie est souvent indolente et la dissémination est lente. Le traitement de ces lymphomes est basé sur l'éradication de l'agent pathogène quand il a été identifié. La transformation du lymphome du MALT en lymphome B diffus à grandes cellules est possible en cas de résistance aux traitements.

### ***b) Lymphome splénique de la zone marginale***

Le lymphome splénique de la zone marginale (SMZL) est caractérisé par l'infiltration de la pulpe blanche de la rate par des petits lymphocytes B. La moelle osseuse et le sang sont souvent infiltrés par les cellules lymphomateuses (83 à 100%).<sup>16</sup>

Les patients présentent fréquemment une splénomégalie associée à une anémie ou une thrombopénie d'origine auto-immune. Une association avec le virus de l'hépatite C a été décrite dans le sud de l'Europe.<sup>6</sup> Ce lymphome est plus souvent retrouvé chez les femmes avec une médiane d'âge d'environ 65 ans.

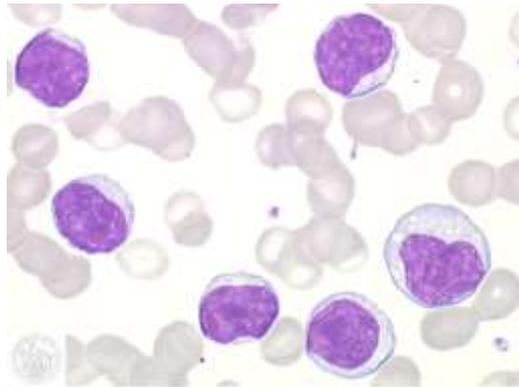
Le diagnostic de ce lymphome est basé sur la combinaison de différents critères qui incluent la morphologie, l'immunophénotypage des lymphocytes, les anomalies génétiques, l'histologie de moelle osseuse et quand cela est possible une histologie de la rate :

- Soit une histologie de rate accompagnée d'un immunophénotypage avec un score de Matutes inférieur ou égale à 2 ;
- Soit une morphologie sanguine typique et médullaire associée à un immunophénotypage et à une infiltration intrasinusoïdale de la moelle osseuse par des cellules CD20 positives.<sup>17</sup>

Dans 75% des cas de SMZL, une splénomégalie et une lymphocytose chronique supérieure à 4 G/L sont présentes.<sup>18</sup>

L'examen du frottis sanguin retrouve une cytologie lymphocytaire hétérogène. Les cellules lymphoïdes ont une chromatine dense et les contours cytoplasmiques comportent des villosités polaires pour « les lymphocytes villeux » caractéristiques. Néanmoins, les lymphocytes villeux sont en proportion variable et sont associés à d'autres cellules comme des petits lymphocytes, des cellules lymphoplasmocytaires, des cellules d'allure monocytoïdes voire des plasmocytes.<sup>11</sup> Le terme de lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL) est d'ailleurs utilisé quand le taux de lymphocytes villeux circulant dépasse 20%. Cependant, un délai trop long avant la réalisation du frottis sanguin peut faire disparaître ces villosités polaires et ainsi fausser le décompte de ces lymphocytes villeux sanguins. Dans la classification actuelle, on utilise le terme général de lymphome splénique de la zone marginale plus ou moins associé à des lymphocytes villeux.<sup>17</sup>

La présence de seulement quelques lymphocytes villosités typiques, l'absence d'ombres nucléaires, la présence de rouleaux d'hématies sont des arguments en faveur d'un MZL mais ne permettent pas d'exclure une CLL atypique, un lymphome folliculaire atypique ou un lymphome du manteau, d'où l'intérêt de l'immunophénotypage sanguin.<sup>8</sup>



**Figure 6 : Cellules d'aspect monocytoïde du SMZL**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

Concernant les anomalies génétiques, il n'y a pas de signature génétique du SMZL mais des anomalies évocatrices. Les aberrations cytogénétiques les plus fréquemment retrouvées sont des gains du 3q (20 à 30%) et 12q (15 à 20%) ainsi que des délétions 7q (30 à 40%). Plusieurs anomalies observées dans des autres hémopathies B ont été rapportées dans le SMZL, comme la translocation t(11;14)(q13;q32) caractéristique du lymphome du manteau, ou des trisomies 12 et 3q plus souvent retrouvées dans les CLL et les MCL. La moitié des cas possèdent des mutations somatiques des gènes des immunoglobulines.<sup>6;11;17</sup>

Il est particulièrement important de combiner tous les éléments biologiques dont l'immunophénotypage pour aboutir au diagnostic de SMZL et ainsi éliminer les diagnostics différentiels.

En général l'évolution clinique est indolente. La splénectomie augmente la survie globale. Il existe une possibilité de transformation en lymphome de haut grade.

### *c) Lymphome de la zone marginale ganglionnaire*

Le lymphome de la zone marginale ganglionnaire (MZLN) représente environ 1,5% des hémopathies lymphoïdes. Il ressemble aux lymphomes de zone marginale splénique et extra-ganglionnaire sans la mise en évidence d'atteinte de la rate ou du MALT.

Les infiltrations médullaires et les phases leucémiques sont rares. La plupart des patients sont asymptomatiques et présentent des adénopathies localisées ou généralisées.

Les anomalies génétiques observées sont de même type que celles du SMZL et la transformation en lymphome de haut est également possible.

Il existe des formes pédiatriques du MZLN qui possèdent des caractéristiques cliniques et morphologiques propres. Elles sont associées à bon pronostic après traitement.<sup>6</sup>

### *d) Lymphome/leucémie spléniques B inclassables*

Cette entité provisoire est divisée en deux groupes : le lymphome B diffus splénique de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux et la leucémie à tricholeucocytes variante.

- **Lymphome B diffus splénique de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux**

Cette entité est provisoire dans la classification de l'OMS, dans l'attente de définir les principaux caractères et les marqueurs diagnostiques.

Le lymphome B diffus splénique de la pulpe rouge avec des lymphocytes villeux (SRPL) est un lymphome rare (< 1% des lymphomes non hodgkiniens) caractérisé par une infiltration diffuse de la pulpe rouge de la rate. Le lymphome infiltre également la moelle osseuse et le sang par des lymphocytes villeux.<sup>6</sup> Le SRPL est diagnostiqué dans 10% des splénectomies réalisées dans le cadre des syndromes tumoraux.

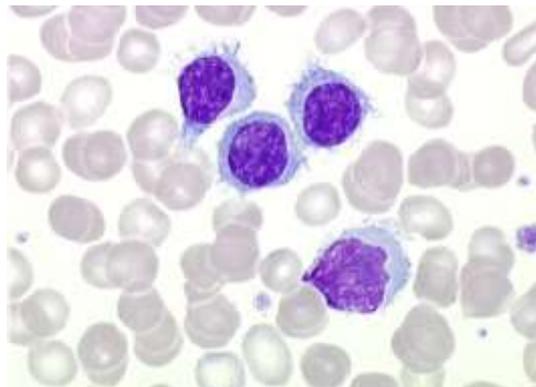
Les patients ont souvent un faible taux de lymphocytes sanguins associé à une leucopénie et thrombopénie qui sont rattachées à la splénomégalie. En général, les patients sont plus âgés que dans le SMZL.

Le pourcentage de lymphocytes villeux dans le sang dépasse nettement 20% des lymphocytes totaux. On observe ainsi quelques cellules lymphoplasmocytoïdes et des cellules plus grandes avec un noyau monocytoïde. Les lymphocytes villeux sont caractérisés par un noyau rond à chromatine mottée et un cytoplasme basophile présentant des villosités franches réparties sur un ou plusieurs pôles de la cellule. La distinction avec la leucémie à tricholeucocytes variante est faite par l'absence de nucléole prédominant. L'observation d'un faible nombre de lymphocytes villeux avec un nucléole proéminent oriente vers une progression tumorale clinique.

La population lymphoïde se distingue du SMZL par son homogénéité, mais il faut rester critique par rapport aux villosités qui sont très dépendantes de l'étalement et de la rapidité de réalisation du frottis.<sup>8;16</sup>

Les données génétiques sont encore limitées. La plupart des cas montrent une absence d'aberrations chromosomiques (66%) et les anomalies les plus fréquentes concernent des délétions du chromosome 7q, des trisomies 18 et des trisomies partielles 3q.

L'immunophénotypage est plus contributif pour le diagnostic (CD180 fort), mais une corrélation entre la cytologie sanguine, l'histologie de la rate, l'immunophénotypage et la clinique du patient restent indispensable pour obtenir un diagnostic précis.<sup>16</sup>



**Figure 7 : Lymphocytes villeux des SRPL, SMZL**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

- **Leucémie à tricholeucocytes variante**

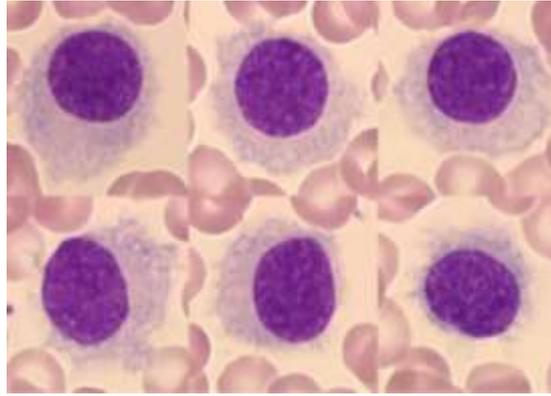
Le terme de leucémie à tricholeucocytes variante (HCLv) englobe les désordres lymphoprolifératifs chroniques B qui ressemblent à la leucémie à tricholeucocytes mais possèdent des caractéristiques cyto-hématologiques différentes, des immunophénotypes différents ou une résistance aux traitements classiques des leucémies à tricholeucocytes.<sup>6</sup>

Cette leucémie représente environ 0,4% des hémopathies lymphoïdes malignes et 10% des leucémies tricholeucocytes.<sup>16</sup> Dans la majorité des cas, la moelle osseuse et le sang sont infiltrés. La pulpe rouge de la rate est également infiltrée avec une régression de la pulpe blanche.<sup>11</sup>

Cliniquement, les patients présentent une splénomégalie (85%), mais très rarement une hépatomégalie. Le point marquant pour différencier la leucémie à tricholeucocytes et sa forme variante repose sur la présence d'une hyperleucocytose supérieure à 10 G/L dans 90% des cas et une absence de monocytopenie souvent caractéristique dans la forme classique lors du diagnostic.<sup>19;18</sup>

Le frottis sanguin montre une prolifération de cellules villeuses (20 à 95%), des cellules lymphoïdes qui ont des caractéristiques hybrides entre une leucémie à prolymphocytes et une leucémie à tricholeucocytes. Les lymphocytes sont de taille moyenne à grande, avec un noyau à chromatine condensée et un nucléole unique prédominant central le plus souvent. Le cytoplasme des cellules possède des projections villeuses.<sup>6;18;19</sup>

Il existe peu de données sur les caractéristiques génétiques de cette leucémie, le taux d'hypermutation somatique des gènes des *IGHV* est faible, des cas de délétions 8q, 17p, et de trisomie 12 ont été rapportés. L'absence de la mutation BRAFV600E caractéristique de la leucémie à tricholeucocytes suggère que cette entité provisoire est bien distincte de celle-ci.<sup>16</sup>



**Figure 8 : Leucémie à tricholeucocytes variante** <sup>8</sup>

#### **4. Leucémie à tricholeucocytes**

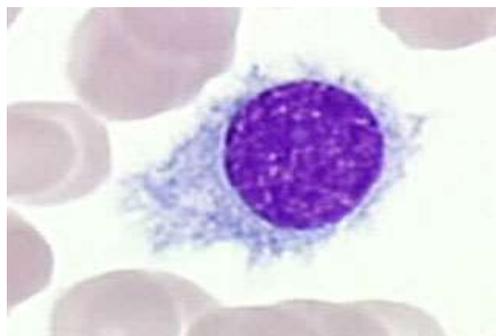
La leucémie à tricholeucocytes (HCL) est une hémopathie en générale indolente, caractérisée par la présence de cellules “chevelues” qui infiltrent le sang, la moelle osseuse et la pulpe rouge de la rate. Ces cellules lymphomateuses diffèrent des cellules B mémoires par l’altération de l’expression de chimiokines et de récepteurs d’adhésion. Il s’agit d’une maladie rare qui représente environ 2% des SLP-B avec une médiane d’âge de 50 ans.<sup>6</sup>

La biopsie ostéomédullaire montre très fréquemment une infiltration par les cellules lymphomateuses soit diffuse ou interstitielle, soit focale faite de cellules avec un aspect « œuf au plat » et le noyau ovale ou réniforme. La biopsie de moelle osseuse reste un prélèvement de choix pour le diagnostic. Il existe souvent une fibrose qui entraîne une difficulté à l’aspiration.<sup>11</sup> Au niveau de la rate, la pulpe rouge est infiltrée avec une hypoplasie de la pulpe blanche. Le foie et ganglions lymphatiques sont souvent envahis dans les stades avancés de la maladie.<sup>6;16</sup>

La plupart des patients se présentent avec une splénomégalie et une pancytopénie, parfois seulement avec une neutropénie, une thrombopénie ou une anémie. Le caractère quasi constant reste la monocytopénie sanguine qui s’observe sur le frottis sanguin, car très souvent les appareils de numération comptabilisent les tricholeucocytes dans les monocytes.

Sur le frottis sanguin, les tricholeucocytes sont très souvent en faible nombre et il convient donc de réaliser une recherche attentive de ces cellules. Les tricholeucocytes sont des cellules lymphoïdes de grande taille avec un cytoplasme étendu, faiblement ou irrégulièrement basophile et présentant de fines projections cytoplasmiques. Parfois, la présence d'inclusions granulo-lamellaires ayant l'aspect de bâtonnets discrètement basophiles à zone centrale clair est retrouvée dans le cytoplasme. Le noyau est souvent excentré, ovale ou réniforme. La chromatine est finement dispersée, homogène et le nucléole peu ou pas visible, est petit et souvent unique. L'immunohistochimie des HCL met en évidence une positivité à la coloration TRAP des granulations cytoplasmiques et la présence d'un marqueur très spécifique de HCL : l'annexine A1. L'expression de l'annexine A1 permet de distinguer les HCL des autres hémopathies lymphoïdes B, comme le SMZL et la HCLv qui ne l'expriment pas. Son expression doit être corrélée aux antigènes des cellules lymphoïdes B (CD20), car l'annexine A1 est également exprimée par les granulocytes et les lymphocytes T. <sup>6;11;19</sup>

Concernant les données génétiques, les gènes des *IGVH* ont subi des hypermutations somatiques dans 85% des cas. Des anomalies numériques des chromosomes 5 (40%) et 7 ont été décrites. Une augmentation de l'expression de la cycline D1 est observée en l'absence de la translocation t(11;14). La mutation BRAFV600E est retrouvée dans toutes les HCL et est absente des autres SLP-B, ce qui en fait une mutation spécifique de la HCL. Selon les recommandations de SFH, la mutation doit être recherchée dans les cas de diagnostic incertain ou dans les cas présentant des thérapeutiques complexes. <sup>11;18;19</sup>



**Figure 9 : Tricholeucocyte**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

## 5. Lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire (FL) est issu de cellules B centro-folliculaires, (centrocytes et centroblastes) qui prolifèrent dans le ganglion folliculaire et donnent l'architecture typique de ce lymphome.

Le lymphome folliculaire représente 20% des lymphomes. Son incidence est très forte aux Etats-Unis et dans l'ouest de l'Europe avec un âge médian de 60 ans. De très rares cas ont été décrits chez les patients de moins de 20 ans.

Ce lymphome a une forte prédominance ganglionnaire, mais la rate, la moelle osseuse (40 à 70% des cas) et le sang peuvent être infiltrés. Occasionnellement des sites primaires extra-ganglionnaires ont été décrits.<sup>6</sup> La phase leucémique reste rare au diagnostic, ne dépassant pas 10% des cas. Le taux de lymphocytes est variable et peut parfois aboutir à une hyperlymphocytose.

Les cellules lymphomateuses observées dans le sang sont généralement des centrocytes. Ils ont un noyau un peu plus grand que celui d'un lymphocyte normal, présentent une encoche étroite et profonde, parfois réduite à un simple coup d'ongle, et une chromatine très compacte mais non mottée, sans nucléole visible. Le cytoplasme est faiblement basophile et très peu abondant, parfois visible uniquement dans l'échancrure du noyau.<sup>8</sup>

La majorité des patients ont une infiltration étendue au diagnostic avec des adénopathies périphériques et centrales (abdominales et thoraciques) ainsi qu'une splénomégalie. Seulement un tiers des patients sont au stade I et II de la classification de Ann Harbor au moment du diagnostic.

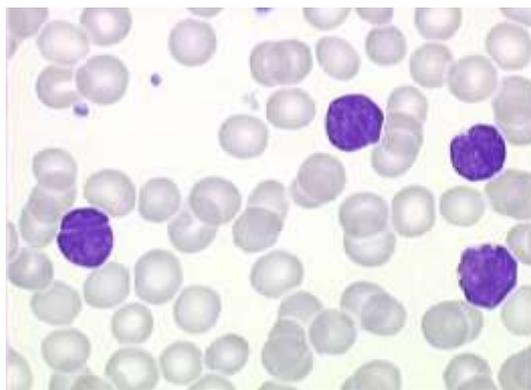
Le lymphome folliculaire est typiquement composé de deux types de cellules B retrouvés dans les centres germinatifs. Les cellules de taille petite à moyenne avec un noyau angulaire, allongé, clivé avec un très discret nucléole et un cytoplasme pâle sont des centrocytes. Les cellules larges avec un noyau rond ou ovale, mais occasionnellement réniforme ou multilobé avec une chromatine vésiculée contenant un à trois nucléoles périphériques et un cytoplasme à bord étroit sont des centroblastes. En général les centrocytes sont prédominant et les centroblastes minoritaires. La gradation du stade de la maladie a un impact pronostique, les biopsies avec un plus grand nombre de grandes cellules ont une progression plus forte vers les lymphomes à grandes cellules.

Le grade de l'hémopathie est déterminé en fonction du nombre de centroblastes comptés par champs au grossissement X40.<sup>6</sup> Le grade de l'hémopathie ne fournit pas un pronostic clair, car il n'existe pas de consensus sur la nature des grades 3B qui ressemblent aux lymphomes *de novo* B diffus à grandes cellules et arborent des caractéristiques immunophénotypiques et moléculaires différentes des grades 1 à 3A.<sup>20</sup>

En immunohistochimie, la protéine BCL2 est exprimée par une proportion variable des cellules tumorales, environ 85% dans les grades 1 et 2, et seulement 50% dans les grades 3. Cette expression de BCL2 n'est pas utilisée pour différencier le FL des autres hémopathies lymphoïdes B qui peuvent également exprimer cette protéine (DLBCL, lymphomes inclassables...<sup>6</sup>).

Le premier évènement oncogénique apparaît pendant la recombinaison des gènes *VDJ* dans la moelle osseuse. Il aboutit à la translocation t(14;18)(q32;q21) qui correspond à un réarrangement du gène *BCL2* conduisant à la surexpression de la protéine BCL2. Cette translocation est présente dans 90% des cas de grades 1 et 2 lors de la mise en évidence par FISH, et est moins fréquente dans les grades 3B. Le réarrangement de *BCL2/IGH* est retrouvé dans le sang périphérique chez 25 à 75% des témoins, particulièrement si on utilise la RT-PCR pour la détection. Des études récentes suggèrent que ce réarrangement est retrouvé dans les cellules B mémoires. Des anomalies en 3q et des réarrangements du gène *BCL6* (environ 10% des cas) ont également été mis en évidence, en particulier dans les grades 3B. Le plus souvent, les anomalies sont associées et peuvent avoir une incidence pronostique comme une délétion 17p ou une délétion en 6q.<sup>6;8;20</sup>

Le pronostic est étroitement relié à l'étendue de la maladie au moment du diagnostic. Environ 3% par an des FL se transforment en lymphomes de haut grade (fréquemment en DLBCL), mais quelques fois en lymphome B avec les caractéristiques intermédiaires entre le lymphome de Burkitt et le DLBCL (lymphomes double hit/triple hit). En général les transformations font suite à des additions d'anomalies génétiques, comme par exemple des translocations du gène *c-MYC*.<sup>6;20</sup>



**Figure 10 : Centrocytes du lymphome folliculaire**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

## **6. Leucémie à prolymphocytes**

La leucémie à prolymphocytes (B-PLL) est définie par un taux sanguin de prolymphocytes supérieur à 55%. Les cas de transformations de CLL, les CLL avec un taux croissant de prolymphocytes et les cellules lymphoïdes chroniques avec des morphologies similaires mais portant la t(11;14) sont exclus de cette entité.

La B-PPL est une pathologie très rare et représente environ 1% des leucémies lymphoïdes et touche principalement les sujets âgés avec un âge médian de 65 à 69 ans.<sup>6</sup>

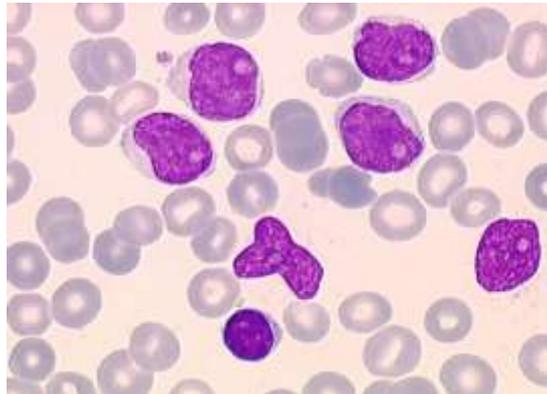
Les patients se présentent avec une splénomégalie et des adénopathies périphériques minimales. Le taux de lymphocytes sanguins est généralement très élevé et souvent supérieur à 100 G/L, accompagné d'une anémie et d'une thrombopénie dans 50% des cas qui reflètent le degré d'infiltration médullaire. Le clone tumoral envahit principalement la moelle osseuse, le sang et la rate.<sup>6;21</sup>

La quasi-totalité de la population lymphoïde est constituée de prolymphocytes. Le prolymphocyte est une cellule de grande taille (environ deux fois plus grand qu'un petit lymphocyte) avec un noyau rond, une chromatine modérément condensée et un nucléole prédominant central. En général, les contours du noyau sont plus uniformes que ceux des prolymphocytes retrouvés dans la CLL. Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, le cytoplasme est clair, abondant et faiblement basophile.<sup>22;23</sup>

La cytogénétique montre fréquemment un caryotype complexe, les délétions 17p sont détectées dans 50% des cas et souvent associées à des mutations du gène *TP53* ou *c-MYC*. Les délétions 13q et 11q sont assez fréquentes.

La distinction avec des MCL blastoïdes, des SMZL, et des CLL avec un taux croissant de prolymphocytes est morphologiquement difficile. Le diagnostic différentiel requiert des études immunophénotypiques et génétiques, en partie par exclusion de la t(11;14) et/ou l'expression de la cycline D1.<sup>6</sup>

Les cas présentant une translocation t(11;14) doivent être classés dans les lymphomes du manteau variant.<sup>21</sup>



**Figure 11 : Leucémie à prolymphocytes**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

## 7. Lymphome lymphoplasmocytaire ou maladie de Waldenström

Le lymphome lymphoplasmocytaire (LPL) est une hémopathie composée de petits lymphocytes, de lymphocytes plasmocytoïdes et de plasmocytes qui infiltrent particulièrement la moelle osseuse, et quelques fois les ganglions et la rate. Il ne satisfait pas les critères pour un autre SLP-B avec une différenciation plasmocytaire. Ce lymphome est souvent associé à une paraprotéine, fréquemment une IgM mais qui n'est pas indispensable pour le diagnostic.<sup>6</sup>

La maladie de Waldenström (MW) est définie selon la classification de l'OMS par la présence d'un LPL avec une infiltration médullaire et une gammopathie IgM monoclonale quelle que soit sa concentration sanguine.

Le LPL touche en priorité les adultes avec une incidence qui augmente après 60 ans. L'étiologie reste ignorée mais l'existence de formes familiales est connue depuis longtemps : 20 % des patients ont des apparentés avec cas de MW ou de syndromes lymphoprolifératifs B dans la famille. Ces patients sont diagnostiqués à un âge précoce et souvent avec une forte infiltration médullaire. Il a été décrit des associations avec le virus de l'hépatite C.<sup>24;25</sup>

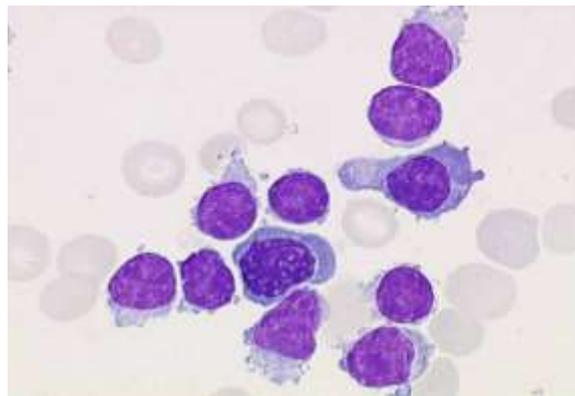
Les patients décrivent une fatigue liée à l'anémie. Environ 15 à 30% des patients ont une splénomégalie, une hépatomégalie et des adénopathies. Le type de paraprotéine le plus couramment décrit est une IgM qui peut être l'origine d'un syndrome d'hyperviscosité chez 30% des patients avec céphalées, des troubles visuels, des épistaxis, et hémorragies rétiniennes. Une IgM monoclonale peut être observée dans la leucémie lymphoïde chronique, dans les lymphomes non hodgkiniens, cependant l'anatomopathologie et l'immunophénotypage permettent facilement d'en faire le diagnostic.

L'hémogramme montre dans 60 % des cas une hémoglobine inférieure à 12 g/dL. L'anémie est le plus souvent normochrome, normocytaire. Une neutropénie n'est observée que chez 3% des patients lors du diagnostic. Une hyperlymphocytose peut être présente, mais les leucocytes dépassent rarement 15 G/L. Dans la majorité des cas, la formule leucocytaire est normale mais une population clonale circulante peut être détectée en immunophénotypage.

La plupart des cas présentent une infiltration de la moelle variable (20 à 100 % des cellules médullaires). L'atteinte médullaire est caractérisée par un infiltrat nodulaire, diffus et/ou interstitiel, constitué de petits lymphocytes prédominants mêlés en proportions variables à des lymphoplasmocytes et plasmocytes. Cet infiltrat est à l'origine de l'anémie. La morphologie médullaire est similaire à celle retrouvée dans le sang. Parfois le clone tumoral est retrouvé dans les organes lymphoïdes et dans les sites extra-ganglionnaires. Dans la rate, on peut observer un infiltrat lymphoplasmocytaire formant des nodules dans la pulpe rouge ou se développant de façon plus diffuse. La présence de rouleaux d'hématies sur le frottis sanguin est fréquemment observée.

Concernant la génétique, il n'y a pas d'anomalie chromosomique et/ou oncogénique spécifique identifiée. Toutefois, la délétion 6q a été retrouvée avec une prévalence de 30 à 50% en fonction des études. La trisomie 4 a été reportée dans environ 20% des MW; les trisomies 3 et 18 sont rares. Les LPL ne présentent aucune des translocations associées aux autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B impliquant les gènes *CCND1*, *MALT1*, *BCL10* ou *BCL2*. Une mutation somatique récurrente (MYD88 L265P) a été récemment identifiée et est exprimée dans 91 % des cellules de LPL. Elle est observée chez 6,5 % des patients avec un MZL, et représente donc un marqueur spécifique de la MW et une future cible thérapeutique.

Ce lymphome a une évolution clinique indolente et une petite proportion peut se transformer en lymphome de haut grade.<sup>6;13;24</sup>



**Figure 12 : Lymphome lymphoplasmocytaire**  
(<http://hematocell.univ-angers.fr>)

Ces différentes pathologies ont des événements oncogéniques différents qui entraînent une variation de l'expression d'antigènes membranaires (intra ou extracellulaire) sur le clone lymphomateux. Ces différents antigènes pourront être étudiés en cytométrie en flux.

Confronté aux multiples difficultés de diagnostics différentiels tant sur le plan clinique, que morphologique, la réalisation d'un immunophénotypage sanguin est utile et contribue par son interprétation précise à la classification des différents SLP-B. Le phénotypage reste une investigation indispensable, associé à l'étude morphologique sanguine. Il affirme la monotypie (« monoclonalité ») et oriente le diagnostic.

## **II. Immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs B chroniques**

### **A. Principe de la cytométrie en flux**

#### **1. Historique de la cytométrie en flux**

Les premiers prémices de la cytométrie en flux (CMF) débutent avec MOLDAVAN (1934) qui introduit le concept de comptage des cellules par la mesure d'extinction des signaux après leur passage dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique.

L'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes apparaît dans les années 1940, puis se développe ensuite par la découverte de nouveaux fluorochromes (ex : FITC). En 1949, COULTER crée un analyseur de cellules qui utilise des flux constitués de liquides ionisés. Les cellules font varier l'impédance de part et d'autre d'un micro-orifice au travers duquel elles passent, la variation d'impédance étant proportionnelle à leur volume.

Durant les années 1970, l'utilisation des photomultiplicateurs permet d'améliorer la quantification des signaux lumineux. Les cytographes et cytofluorographes sont les premiers appareils équipés d'une source laser, le fluorocytographe permet d'ailleurs de mesurer la taille de la cellule via la collection des signaux diffusés aux petits angles « *forward scatter* » et la mesure des fluorescences verte et rouge.

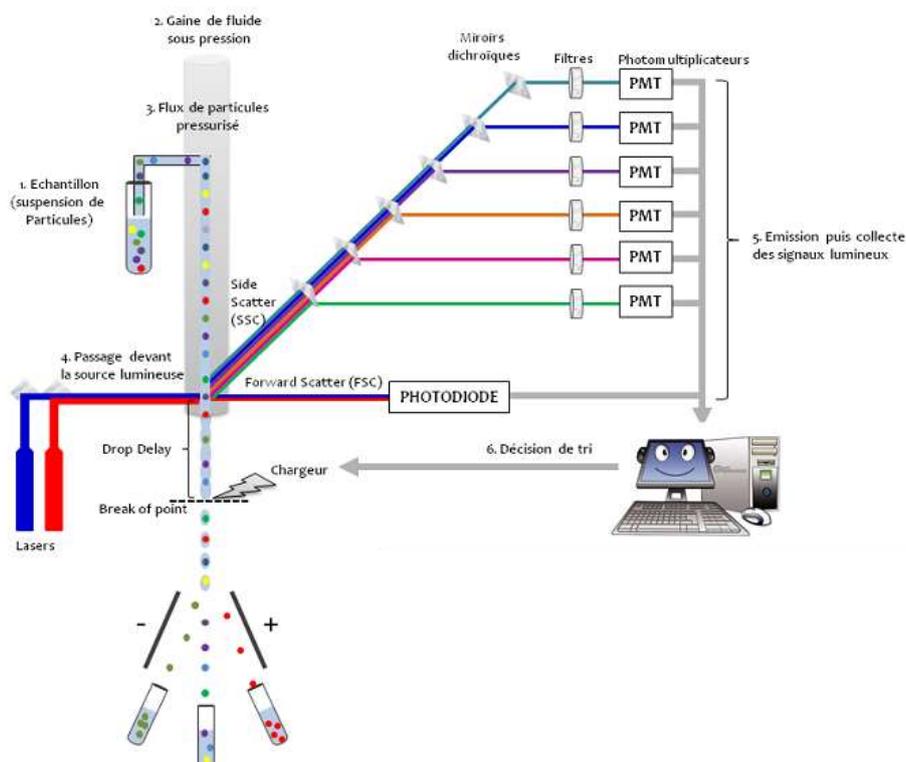
En 1972, HERZENBERG développe un nouvel appareil, le « *fluorescence activated cell sorter* » (FACS) qui permet de séparer et de trier les populations cellulaires. Ce concept est repris par la société BECTON DICKINSON qui commercialise une version de cet instrument (FACS II).

Jusqu'aux années 1980, les cytomètres expérimentent plusieurs types de laser avec l'utilisation d'un nombre croissant de fluorochromes différents. L'arrivée des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules lymphoïdes du sang a révolutionné la pratique de la cytométrie en flux, en passant du stade de recherche à la pratique en routine de ces analyses, ce qui a amené à rechercher de nouveaux fluorochromes utilisables en cytométrie de routine.<sup>26</sup>

Depuis les années 1980, le traitement des informations est réalisé par des systèmes informatiques et le nombre de couleurs analysées ne cessent d'augmenter. Les nouveaux analyseurs peuvent combiner jusqu'à 16 paramètres simultanément, et analyser les cellules à la vitesse de 100 000 événements par seconde.<sup>27,28</sup>

## 2. Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

La CMF repose sur l'analyse de cellules en suspension marquées par des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Les cellules sont injectées dans un flux laminaire continu et vont passer les unes derrière les autres devant plusieurs lasers. Leurs irradiations provoquent l'excitation des fluorochromes qui vont émettre leurs fluorescences respectives. Ces signaux sont captés par des détecteurs spécifiques et amplifiés par des photomultiplicateurs puis intégrés informatiquement pour étudier les différentes populations cellulaires de l'échantillon. Après l'analyse, les cellules peuvent être ensuite triées en fonction des différents paramètres analysés.



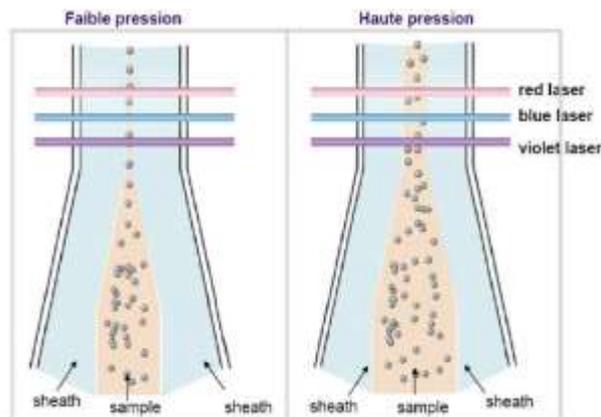
**Figure 13 : Principe de fonctionnement des analyseurs-trieurs**  
<http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>

### a) *Système fluide*

La focalisation hydrodynamique permet d'effectuer une analyse multiparamétrique des cellules individualisées. Le défilement des cellules les unes derrière les autres est possible grâce à un principe de mécanique des fluides : l'hydrofocalisation. L'échantillon est introduit via la buse d'un injecteur qui permet de former un jet dans un liquide de gaine de la taille de l'orifice de la buse.

Pour réaliser le flux, une pression plus faible est appliquée sur le liquide de gaine par rapport à celle appliquée sur l'échantillon ce qui permet de générer un flux et donc une analyse individuelle de chaque cellule. Si la pression appliquée sur l'échantillon est trop forte, le diamètre du jet dans le liquide de gaine est augmenté ce qui engendre un centrage incorrect des cellules et une qualité d'analyse insuffisante.

La concentration cellulaire de l'échantillon doit être ajustée à la vitesse d'analyse de l'appareil pour conserver le même diamètre de jet dans le liquide de gaine et ainsi garder le centrage de la cellule dans le jet. Une concentration de  $10^6$  cellules par mL est adaptée pour une vitesse de 1000 à 2000 cellules par seconde.<sup>28</sup>



**Figure 14 : Effet de la pression et de la concentration exercées sur l'échantillon**  
(<http://www.bdbiosciences.com>)

### **b) L'excitation lumineuse**

Le rayon du laser vient frapper perpendiculairement la cellule contenue dans le jet via des prismes et des lentilles optiques qui permettent de positionner avec précision le point d'intersection entre la cellule et le laser. Ce rayon permet d'exciter les fluorochromes couplés aux anticorps qui sont fixés sur la cellule.

Les lasers d'Argon sont les plus utilisés en CMF car ils produisent plusieurs raies d'excitation dont deux très utilisées : 488 nm (très souvent utilisée) et 514 nm. La sensibilité de la détection de fluorescence émise est proportionnelle à l'intensité d'excitation du laser.

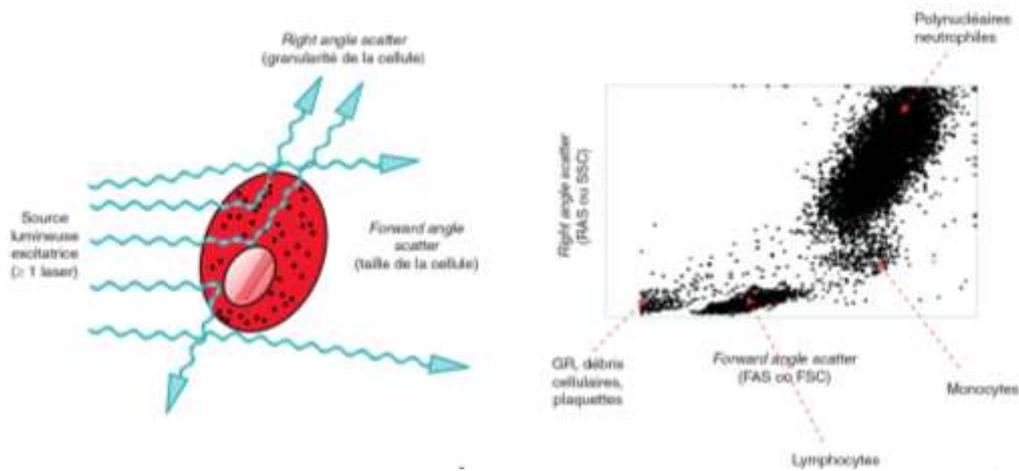
Les cytomètres actuels peuvent être équipés de plusieurs lasers ce qui augmente le nombre de fluorochromes excitables et de ce fait le nombre de paramètres analysables. Ces lasers peuvent frapper en même temps la cellule (sources colinéaires) ce qui facilite leurs alignements mais augmente la difficulté de séparation des différentes fluorescences émises, ou frappent la cellule en des points d'impact différents (sources non colinéaires) ce qui facilite la séparation des fluorescences. Dans le second cas, les systèmes informatiques prennent en compte ce décalage temporel pour synchroniser les différentes fluorescences d'une même cellule.<sup>28</sup>

### **c) Le système optique**

Les signaux lumineux émis après l'excitation par les lasers sont de différentes natures :

- La diffusion des signaux aux petits angles « *forward scatter* » (*FSC*) collectée dans l'axe du faisceau laser, donne des indications sur la taille de la cellule analysée ;
- La diffusion des signaux aux grands angles « *side scatter* » (*SSC*) collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux du laser, donne des informations sur la structure interne de la cellule (granularité et rapport nucléocytoplasmique) et permet de discriminer les différentes populations du sang. Le signal est faible pour les lymphocytes, un peu plus fort pour les monocytes, et élevé pour les granulocytes ;
- La fluorescence émise par les cellules marquées est récoltée à 90° par rapport au faisceau lumineux du laser.

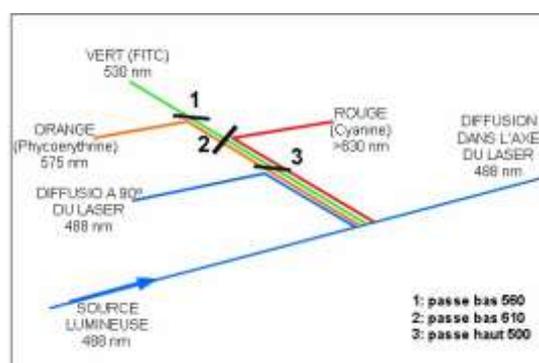
Les deux premières informations FSC et SSC permettent déjà de différencier les différentes populations cellulaires sanguines comme le montre la figure 15.



**Figure 15 : Informations "morphologiques" des cellules analysées et séparation des différentes populations sanguines<sup>29</sup>**

Le banc optique du cytomètre dirige les différentes fluorescences vers leurs détecteurs spécifiques. Le système est composé de lentilles optiques, de miroirs dichroïques et de filtres qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes désirées, dans le but de les acheminer vers les collecteurs.

Les miroirs dichroïques permettent de sélectionner les longueurs d'ondes, les passe-bas réfléchissent les longueurs en dessous de leur seuil de sélection (ceux à 560 nm renvoient tous les signaux inférieurs à cette valeur) et inversement pour les miroirs passe-haut. Puis la fluorescence est captée par des filtres qui sont soit passe-haut ou passe-bas (même principe que les miroirs), ou passe-bande qui sélectionnent la fluorescence entre deux longueurs d'ondes précises.<sup>28</sup>



**Figure 16 : Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux**  
<http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>

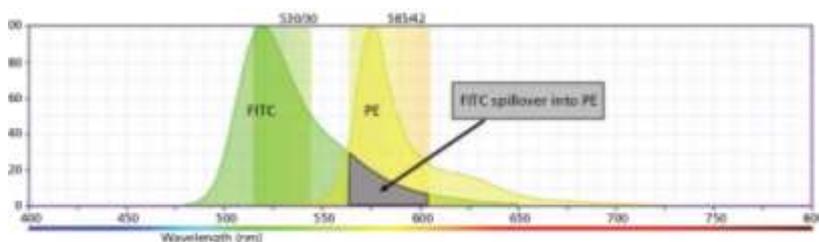
#### d) *Traitement du signal lumineux*

Les signaux lumineux reçus par les détecteurs vont être convertis en signaux électriques par des photomultiplicateurs ou des photodiodes. Les photodiodes sont utilisées pour la collecte des signaux diffusés aux petits angles. Les photomultiplicateurs collectent les signaux diffusés aux grands angles et les différentes fluorescences.

Ces deux détecteurs transforment le signal lumineux en signaux électriques (signal analogique) qui ne sont pas assimilables par le système informatique. Le convertisseur analogico-numérique (« *Analogic to Digital Converter* », ADC) transforme la valeur analogique (volts) en valeur numérique (canaux). Ainsi, la fluorescence d'une cellule sera transformée en signal électrique dont la valeur est comprise entre 0 et 10 Volts. L'ADC va ensuite digitaliser les signaux électriques et quantifier chaque amplitude de chaque signal en un numéro de canal entre 0 et 255. La valeur de chaque signal est codée en bits qui pourront ensuite être utilisables par les logiciels informatiques.

Certaines données sont trop petites pour être visualisées. Dans ce cas, on utilise une échelle logarithmique afin de mieux inclure des petites cellules importantes comme des lymphocytes. Le voltage des photomultiplicateurs doit être optimisé pour obtenir la meilleure sensibilité de détection de la fluorescence.

Les spectres d'émission des différentes fluorescences étant plus ou moins étendus, ils peuvent se chevaucher et créer des interférences. Deux fluorochromes avec des spectres d'émission proches vont se « polluer », donc une matrice de compensation est mise en place pour limiter au mieux ces phénomènes d'interférences. Comme dans la figure 16, il faut retirer un pourcentage de fluorescence du FITC qui interfère avec la fluorescence du PE.<sup>28;30;31</sup>



**Figure 17 : Chevauchement des spectres de fluorescences FITC et PE**

([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))

### e) *Les fluorochromes*

La fluorescence est une émission de lumière résultant de l'excitation d'une molécule. Cette molécule absorbe l'énergie lors de son excitation à une longueur d'onde caractéristique puis émet cette énergie sous forme de lumière presque instantanément à une longueur d'onde plus grande. Les principales molécules fluorescentes sont composées de noyaux aromatiques.

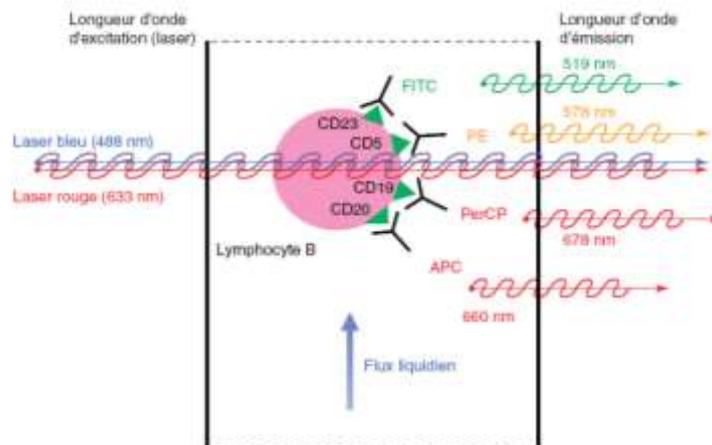
Les spectres d'absorption et d'émission sont propres à chaque fluorochrome, l'excitation est générée par les lasers des cytomètres et les fluorescences plus ou moins brillantes sont captées par les détecteurs spécifiques. Pour optimiser le marquage des différents clusters de différenciation, on privilégie les fluorochromes de forte brillance pour des marqueurs peu représentés sur les cellules et inversement.<sup>28</sup>

Les différents fluorochromes les plus utilisés en CMF sont les suivants :

Fluorochrome	Laser (nm)	Émission maximale (nm)
Alexa Fluor® 405	360, 405, 407	421
Pacific Blue®	360, 405, 407	455
AmCyan	405, 407	491
Alexa Fluor® 488	488	519
FITC	488	519
PE	488, 532	578
PE-Texas Red® (ECD®)	488, 532	615
Texas Red®	595	615
APC	595, 633, 635, 647	660
Alexa Fluor® 647	595, 633, 635, 647	668
PE-Cy5	488, 532	667
PerCP	488, 532	678
PerCP-Cy5.5	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	633, 635	719
PE-Cy7	488, 532	785
APC-Cy7	595, 633, 635, 647	785

FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; PE : R-phycoérythrine ; APC : allophycocyanine ; PE-Cy5 : PE-cyanine 5 ; PerCP : peridinine chlorophylle-protéine ; PerCP-Cy5.5 : PerCP-cyanine 5.5 ; PE-Cy7 : PE-cyanine 7 ; APC-Cy7 : APC-cyanine 7 (d'après <http://bdbiosciences.com>).

**Figure 18 : Fluorochromes les plus utilisés en CMF** <sup>32</sup>



**Figure 19 : Principe de la fluorescence dans la cytométrie en flux** <sup>32</sup>

### *f) Préparation et analyse des échantillons*

Les échantillons analysables en CMF doivent être composés de cellules en suspension. Le sang et la moelle osseuse sont donc des prélèvements de choix pour l'analyse par CMF. L'utilisation de tubes avec anticoagulant (EDTA ou héparinate de lithium) est à privilégier. L'analyse doit être réalisée dans les 24 heures avec une conservation à température ambiante afin d'éviter la dégradation des cellules, ainsi que pour obtenir des résultats optimaux.

La lyse des globules rouges (éléments mille fois plus représentés que les leucocytes) permet de les éliminer et de limiter les interférences pendant l'analyse. La centrifugation du prélèvement sur un gradient de densité enrichit la population d'intérêt en isolant les cellules mononuclées.<sup>26</sup>

Le lavage des échantillons dans un tampon isotonique est recommandé pour éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères Kappa/Lambda ou des chaînes lourdes des immunoglobulines. L'étude des cellules avec un taux élevé de récepteurs aux fragments Fc (ex : lymphocytes B) est difficile, la saturation des récepteurs par du sérum (animal ou humain) peut éviter un marquage non spécifique.

Le marquage des cellules est réalisé à l'aide d'anticorps le plus souvent monoclonaux couplés à un fluorochrome, à concentration saturante après une incubation d'environ 15 à 30 minutes dans l'obscurité, suivi de lavages successifs pour éliminer l'excès d'anticorps. Des perméabilisants de membranes sont utilisés pour permettre le marquage d'antigènes intracellulaires.<sup>28;32</sup>

## **B. Application en hématologie**

Historiquement, la morphologie fut le critère principal de classification des SLP-B. Les nouvelles méthodes d'investigation comme l'immunohistochimie, la génétique et l'immunophénotypage ont permis d'acquérir de nouvelles précisions sur le développement et les fonctions des différentes cellules hématopoïétiques pour contribuer à une classification plus précise des différentes entités pathologiques (comme précédemment indiqué). La combinaison de ces différentes informations est indispensable pour orienter le diagnostic.<sup>26</sup>

### **1. Objectifs de la CMF dans les SLP-B**

Lors de la suspicion d'un SLP-B sur des arguments cliniques, ou sur une hyperlymphocytose persistante (supérieure à trois mois) complétée parfois par la découverte de lymphocytes atypiques sur le frottis sanguin, l'immunophénotypage lymphocytaire apporte des arguments pour affirmer la présence d'un clone malin lymphocytaire circulant dans un délai court (48 heures), contrairement aux autres examens comme la génétique ou l'anatomopathologie.

La CMF a pris une place prépondérante dans le diagnostic des SLP-B comme le montre la dernière classification de l'OMS en 2008.<sup>6</sup>

### **2. Panel lymphocytaire B en CMF**

L'analyse des lymphocytes B par CMF est réalisée en plusieurs étapes afin d'obtenir une démarche pertinente et de limiter le coût de l'analyse. La construction du panel d'anticorps de marquage est donc une étape clé de l'analyse. Tout commence par l'identification de la population lymphocytaire B, puis en fonction du stade de maturation, l'affirmation de la clonalité de la population B, et enfin la caractérisation détaillée de la population pathologique.

En général les hémopathies lymphoïdes B matures diffèrent des cellules normales B par la présence de deux caractéristiques anormales : une restriction des chaînes légères et l'expression antigénique de marqueurs aberrants. Les lymphocytes expriment des clusters de différenciation (CD) qui sont des antigènes de surface membranaire. Ces CD déterminent le type cellulaire et éventuellement leur fonction.

Les CD sont regroupés dans une liste internationale régulièrement mise à jour ([www.hcdm.org](http://www.hcdm.org)). Leur propriété antigénique est mise à profit en CMF par l'utilisation d'anticorps spécifiques.

- Identification de la population lymphocytaire B

Le CD20 est la première molécule historiquement décrite et utilisée dans la caractérisation des lymphocytes B. La découverte de plusieurs antigènes pan-B comme le CD19, CD22, CD79a et le CD79b a permis de mieux cerner la population des lymphocytes B.<sup>26</sup>

La plupart des cellules B matures expriment le CD20. L'expression du CD20 est plus restrictive que celle du CD19. En effet, le CD19 est présent tout au long de la maturation du lymphocyte B à partir du lymphoblaste jusqu'au plasmocyte et met en évidence les lymphocytes B immatures. Malheureusement, certaines hémopathies B expriment faiblement le CD20 ou le CD19, ce qui rend difficile leur identification d'appartenance de lignée et nécessite la présence d'autres marqueurs de malignité pour aboutir au diagnostic. Par exemple, le CD19 est faiblement exprimé dans le lymphome folliculaire alors que le CD20 est fortement exprimé. Inversement le CD20 est faiblement exprimé dans la CLL. La détermination de valeurs de référence d'intensité est donc un prérequis pour l'interprétation phénotypique. L'utilisation du CD19 reste la plus courante pour fenêtrer la population lymphocytaire B.<sup>26;33;34</sup>

- Stade de maturation du lymphocyte B

L'utilisation de différents marqueurs de maturation permet de déterminer le stade de maturation du clone pathologique. Le plus important est le CD10. Le CD10 est exprimé par les cellules B immatures et les lymphocytes B de la zone folliculaire du centre germinatif des ganglions, d'où l'expression forte du CD10 dans les LF. Les cellules B matures ont une faible expression du CD10.<sup>26;33</sup>

- Clonalité de la population B

La majeure partie des SLP-B exprime une seule des deux chaînes légères des immunoglobulines Kappa ou Lambda. Cette restriction des chaînes légères est facilement observable en CMF et constitue un marqueur de clonalité indispensable dans l'analyse de la population lymphoïde B. Le ratio Kappa/Lambda est alors déséquilibré (normalement 2/3 Kappa et 1/3 Lambda).

L'étude de la restriction des chaînes légères doit être corrélée à un antigène de lignée cellulaire B comme le CD19 ou CD20, et nécessite un lavage préalable de l'échantillon afin d'éliminer les immunoglobulines circulantes qui pourraient interférer avec l'analyse.

L'utilisation de ce seul caractère de restriction des chaînes légères peut être insuffisante en cas d'un faible clone circulant. La combinaison avec des marqueurs aberrants de lignée lymphoïde B comme le CD5 permet de mettre en évidence de petites populations clonales qui se détachent de la population normale lymphocytaire B. Ceci est utile notamment dans la détection de clone qui exprime très faiblement les épitopes, ou lorsque les épitopes sont altérés par des mutations hypersomatiques comme dans le lymphome folliculaire. Par exemple, dans la CLL les expressions très faibles des chaînes légères, des CD20, CD22, CD79b sont probablement causées par une faible densité de récepteurs B à la surface membranaire.

La présence d'une restriction monoclonale dans le sang n'est pas toujours le signe d'une hémopathie lymphoïde. En effet, des populations clonales sans origine tumorale sont détectées chez les patients, par exemple chez certains malades porteurs du VIH.<sup>26;35;36</sup>

- Marqueurs aberrants de la population clonale

Après avoir fenêtré correctement la population clonale d'intérêt, la recherche d'expression des différents antigènes pathologiques permet de caractériser le clone et d'orienter dans la classification des hémopathies lymphoïdes. Le clone pathologique se distingue des cellules B normales par l'absence de marqueurs physiologiques des lymphocytes B ou par l'expression de marqueurs aberrants, par exemple le CD10 dans le lymphome folliculaire, les CD5 et CD23 dans la leucémie lymphoïde chronique, ou encore les CD103, CD25, CD11c dans la leucémie à tricholeucocytes.

L'expression du CD5 est souvent associée un phénotype aberrant, mais dans de rares cas il existe des personnes porteuses de maladies auto-immunes qui développent des cellules B non tumorales porteuses du CD5. L'expression du CD5 doit donc être interprétée en présence d'autres marqueurs, en particulier la restriction des chaînes légères et les intensités anormales des CD20, CD22 et CD79b.

L'immunophénotypage permet également de rechercher des marqueurs pronostiques de la maladie, comme le CD38 ou l'expression de ZAP70 dans la CLL. Il détaille également les intensités d'expression des antigènes physiologiques et aberrants : faible, moyenne ou forte. Il peut influencer sur les traitements thérapeutiques du patient, notamment lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme l'anti-CD20 (Rituximab) ou anti-CD52 (Alemtuzamab).<sup>26;34;35</sup>

La construction du panel d'anticorps d'exploration des SLP-B est complexe. En général, un premier panel composé de quelques anticorps permet la mise en évidence d'une éventuelle population clonale (« tube d'orientation »). Si la recherche s'avère positive, un panel étendu est déclenché, permettant de rechercher le stade maturation, la présence d'aberrations phénotypiques et de révéler des expressions caractéristiques d'une entité.

L'analyse morphologique de la population lymphocytaire reste indispensable et doit être simultanée à la réalisation de l'immunophénotypage. Cette étude morphologique doit être réalisée par un cytologiste expérimenté, car elle peut également orienter le panel d'anticorps du fait de la présence de cellules caractéristiques comme les tricholeucocytes. L'interprétation conjointe de la cytologie et de l'immunophénotypage est indispensable, car elle permet de détecter les résultats faussement négatifs obtenus en CMF causés par un fenêtrage incorrect des données cytométriques.

La signification de la détection de faibles clones pathologiques circulants (<5% du total des cellules analysées) chez les patients sans antécédents de SLP-B n'est pas clairement établie à l'heure actuelle.

En conclusion, l'immunophénotypage de la population lymphoïde B doit prendre en compte les informations cytologiques, les renseignements cliniques fournis par le prescripteur, les données génétiques, les résultats d'immunohistochimie pour aboutir à une analyse optimale des lymphocytes B et la classification de l'hémopathie.<sup>26;34;35;36</sup>

**Tableau 1 : Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B<sup>35</sup>**

Marqueur	Expression normale	Intérêt dans les SLPc
<b>CD5</b>	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	CLL, MCL
<b>CD10</b>	Lymphocytes B et T immatures (centre germinatif), polynucléaires neutrophiles	FL
<b>CD11c</b>	Quelques lymphocytes B et T	HCL, parfois faible expression dans CLL, LPL, MZL, SLVL
<b>CD19</b>	Lymphocytes B et plasmocytes	Marqueur de la lignée B
<b>CD20</b>	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B, faible intensité d'expression dans CLL
<b>Chaînes légères (κ et λ) en surface</b>	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
<b>Chaînes légères (κ et λ) en intracytoplasmique</b>	Plasmocytes, lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
<b>CD22</b>	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B, faible intensité d'expression dans CLL
<b>CD23</b>	Faiblement positif dans les lymphocytes B matures, expression augmentée lors de l'activation	Diagnostic différentiel CLL et autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques CD5 <sup>+</sup>
<b>CD24</b>	Expression intermédiaire sur précurseurs B et T	MZL
<b>CD25</b>	Lymphocytes B et T activés	HCL en combinaison avec CD103 et CD11c, rares LPL, MZL, MCL, MW
<b>CD27</b>	Marqueur d'activation des lymphocytes T Lymphocytes B mémoires	CLL, SLVL, MZL, MW

Marqueur	Expression normale	Intérêt dans les SLPC
<b>CD38</b>	Cellules centrofolliculaires, cellules T immatures, plasmocytes	Différenciation plasmocytaire, marqueur pronostique dans la CLL
<b>CD43</b>	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	Expression aberrante dans la CLL, rares MCL et MZL
<b>CD45</b>	Marqueur panleucocytaire	Intérêt pour la distinction des hémopathies matures et immatures
<b>CD49d</b>	Lymphocytes B, T, NK, monocytes, plasmocytes	Marqueur pronostique dans la CLL
<b>CD79b</b>	Précurseurs B, plasmocytes, expression variable sur lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans la CLL
<b>CD81</b>	Lymphocytes B et T	Intérêt diagnostique dans le MM, rôle MRD CLL
<b>CD103</b>	Minorité de lymphocytes B	HCL et rares MZL
<b>CD200</b>	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires, lymphocytes	Diagnostic différentiel CLL/MCL, intérêt diagnostique dans MM
<b>FMC7</b>	Lymphocytes B matures	Diagnostic différentiel CLL/MCL et autres syndromes lymphoprolifératifs CD5 <sup>+</sup>
<b>Bcl-2</b>	Lymphocytes T, minorité de lymphocytes B	FL
<b>ZAP-70</b>	Lymphocytes T, NK, précurseurs B	Marqueur pronostique dans la CLL
<b>CD160</b>	Lymphocytes NK et T CD8	HCL (CLL)

Légende : MRD : maladie résiduelle ; CLL : leucémie lymphoïde chronique ; FL : lymphome folliculaire ; MCL : lymphome du manteau ; MZL : lymphome de la zone marginale ; LPL : leucémie à polylmphocytes ; MM : myélome multiple ; MW : maladie de Waldenström ; SLPC : syndrome lymphoprolifératif chronique ; SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villeux ; HCL : hairy cell leukemia (leucémie à tricholeucocytes).

### C. Immunophénotypage des différents SLP-B

Les SPLB ont des expressions des CD plus ou moins définis dans la cytométrie en flux. On peut séparer ces différents syndromes en quatre groupes en fonction de leurs expressions du CD5 et du CD10 :

- CD5+ / CD10- : représenté majoritairement par la CLL et le MCL ;
- CD5- / CD10+ : plus souvent pour le FL ;
- CD5- / CD10- : majoritairement représenté par le MZL, HCL ;
- CD5+ / CD10+ : coexpression rare.

Cette séparation en quatre groupes se rapproche de la pratique quotidienne d'interprétation des phénotypes des SLP-B, mais l'addition de marqueurs supplémentaires ainsi que l'étude cytologique, génétique, et anatomopathologique conduisent à un diagnostic plus précis.<sup>35</sup>

**Tableau 2 : Approche diagnostique immunophénotypique et classification des SLP-B<sup>35</sup>**

Entité pathologique	Caractéristiques phénotypiques	Informations complémentaires diagnostiques
<b>CD5+ CD10-</b>		
Leucémie lymphoïde chronique	Phénotype typique : CD20 (d), CD22 (d), sIg (d), CD23+, FMC7 (- ou d)	Morphologie caractéristique
Lymphome du manteau	Phénotype variable souvent CD20 (i), sIg (i), CD23+/-, FMC7+/-	Cycline-D1 IHC, réarrangement t(11;14)/CCND
Leucémie à prolymphocytes	Phénotype variable, possibilité de recoupement avec CLL et MCL CD20 (+i), sIg (+i), FMC-7+/-, CD5+/-	Cellules larges avec nucléole prédominant ; exclure un MCL blastique
Lymphome de zone marginale	Phénotype variable : CD23-; souvent CD11c+/-, CD103+/- non typique de la HCL, quelques fois cIg seulement	Développement dans les follicules, possibilité de différenciation lymphoplasmocytaire, réarrangement t(11;18), t(1;14), t(14;18)/MALT-1
Lymphome lymphoplasmocytaire	Phénotype : souvent CD23(-/d), quelques fois sIg- mais cIg+	Petites cellules avec une partie de différenciation lymphoplasmocytaire Principalement PB et BM
<b>CD5- CD10+</b>		
Lymphome folliculaire	Couramment bcl-2+, CD43-	Quelques développements folliculaires, réarrangement t(14;18)/BCL-2
Leucémie à tricholeucocytes	Phénotype typique : CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25+, CD103+, sIg (i), CD123+	Morphologie caractéristique; Annexin-A1+

Entité pathologique	Caractéristiques phénotypiques	Informations complémentaires diagnostiques
<b>CD5+ CD10+</b>		
Lymphome folliculaire	Couramment bcl-2+, CD43-	Quelques développements folliculaires, t(14;18)/ <i>BCL-2</i> réarrangement
Lymphome du manteau	Phénotype variable; souvent CD20 (i), sIg (i), CD23+/-, FMC-7+/-	Cycline-D1 IHC, t(11;14)/ <i>CCND</i> réarrangement
<b>CD5- CD10-</b>		
Leucémie à tricholeucocytes	Phénotype typique: CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25+, CD103+, sIg (i)	Confirmation par la morphologie caractéristique
Lymphome de zone marginale	Souvent CD11c+/-, CD103+/- non typique de la HCL, quelques fois sIg- mais cIg+	Développement dans les follicules, possibilité de différenciation lymphoplasmocytaire t(11;18), t(1;14), t(14;18)/ <i>MALT-1</i> réarrangement
Lymphome lymphoplasmocytaire	Phénotype : souvent CD23(-/d), quelques fois sIg- mais cIg+	Petites cellules avec une partie de différenciation lymphoplasmocytaire Principalement PB et BM
Lymphome folliculaire CD10-	Phénotype Variable	Quelques développements folliculaires, t(14;18)/ <i>BCL-2</i> réarrangement
Lymphome du manteau CD5-	Phénotype Variable	Cycline-D1 IHC, t(11;14)/ <i>CCND</i> réarrangement

Légende : + : généralement positive ; - : généralement négative ; +/- : peut être positive ou négative ; d : faible intensité (dim) ; i : intensité intermédiaire (intermediate) ; b : forte intensité (bright) ; sIg : immunoglobulines de surface ; cIg : immunoglobulines cytoplasmiques ; IHC : immunohistochimie ; PB : sang périphérique ; BM : moelle osseuse

## 1. SLP-B CD5+ / CD10-

Les immunophénotypes avec un CD5 positif et un CD10 négatif sont retrouvés le plus couramment au cours des CLL et des MCL. Quelques B-PLL et de rares MZL rentrent dans cette catégorie.

### a) *La leucémie lymphoïde chronique*

La CLL est un des SLP-B le mieux défini en CMF, notamment par la présence d'un score, le score de Matutes/Moreau ou RMH (Royal Marsden Hospital). Il permet d'éliminer les diagnostics des autres SLP-B quand celui-ci est supérieur ou égal à 4. Il se base sur cinq marqueurs : CD5, CD23, FMC7 et l'expression des immunoglobulines de surface.

**Tableau 3 : Score de Matutes/Moreau pour le diagnostic de la CLL<sup>37;38</sup>**

Marqueurs	1 Point	0 Point
<b>CD5</b>	Positif	Négatif
<b>CD23</b>	Positif	Négatif
<b>FMC7</b>	Négatif / Positif faible	Positif
<b>Expression des Igs de surface</b>	Faible	Modérée à forte
<b>CD22 / CD79b</b>	Positif faible ou négatif	Modéré à fort

Le premier score établi par l'équipe de Matutes *et al* comprenait le CD22 : 87% des CLL avaient un score de 4 à 5 et seulement 0,4% un score de 0 ou 1, 89% des autres SLP-B avaient un score de 0 ou 1 et seulement 0,3 % (un seul cas dans l'étude) un score de 4.<sup>39</sup>

L'article de Moreau *et al* a proposé ensuite le CD79b à la place du CD22, ce qui a permis d'affiner le potentiel de discrimination entre la CLL et autres SLP-B.<sup>38</sup>

Les cas de CLL avec un score à 3 points sont soit des CLL avec un profil immunologique atypique, soit un autre SLP-B. Ils nécessitent donc des investigations complémentaires comme l'ajout de nouveaux marqueurs comme le CD200, des études cytogénétiques et anatomopathologiques.<sup>35;40</sup>

Les faibles niveaux d'expression du CD20, CD79b et des SIg de surface par rapport aux lymphocytes B normaux sont caractéristiques et en faveur de la CLL. Le CD5 est quasiment toujours exprimé (environ 95%) dans les CLL.<sup>29;32;41;42;43</sup>

Les cas de CLL avec un profil immunologique atypique (score  $\leq 3$ ) ont fréquemment une expression forte du FMC7, des Igs de surface, du CD20 ou CD22, quelques fois une perte d'expression du CD23 mais très rarement une perte du CD5. Le CD11c et le CD10 peuvent être également exprimés.<sup>8;44;45</sup>

Certains marqueurs complémentaires ayant un impact pronostique peuvent être réalisés. Le CD38 est un marqueur d'activation et de maturation cellulaire et joue un rôle dans l'adhérence et la signalisation. Les premières études l'ont proposé comme marqueur de substitution aux statuts mutationnels des *IGVH*, mais cette corrélation a été réfutée. Il doit être considéré comme un marqueur pronostique indépendant. Son interprétation en cytométrie reste délicate car il n'existe pas de valeur seuil d'expression et celui-ci peut varier de 7 à 30% selon différentes études. Son intensité de fluorescence varie en fonction des différents fluorochromes utilisés. L'expression de ZAP70 dans la CLL est souvent associée aux formes non mutées des *IGVH*, ce statut non muté des *IGVH* est de mauvais pronostic. ZAP70 est très peu utilisé en routine par manque de standardisation de la méthode de détection.<sup>32;35;46</sup>

Le CD23 est une glycoprotéine transmembranaire qui peut être clivée en fragments solubles et dosée en CMF. Un taux élevé de CD23 solubles serait lié à un mauvais pronostic, et associé à des infiltrations médullaires et à un temps de doublement de la lymphocytose court.<sup>32;46;47</sup>

### **b) Le lymphome du manteau**

Les cellules du MCL expriment les antigènes B pan-cellulaires CD19, CD20 (expression forte ou moyenne), et CD22. Elles sont positives pour le CD5 (90% des cas)<sup>32</sup>, le FMC7 avec des Ig de surface d'expression moyenne ou forte et généralement négatives pour le CD23 et le CD10. Le MCL a un phénotype plus variable contrairement à la CLL et nécessite des études complémentaires morphologiques et génétiques afin de mettre en évidence la translocation t(11;14).

Les variations phénotypiques comme la présence du CD23 (21%), du CD10 (8%) ou la perte du CD5 (12%), du FMC7 (11%) sont souvent identifiées dans les variants blastoïdes ou pleiomorphes.<sup>6;32;48;49</sup>

La détection de la cycline D1 en CMF est possible et nécessite une amplification enzymatique préalable. La mise en évidence de la cycline D1 en CMF est bien corrélée avec la détection en FISH de la t(11;14).<sup>50;51</sup>

Une étude récente a démontré la présence de CLL « atypiques » (aCLL) ayant un immunophénotypage « typique » de MCL. Selon cette étude, 32% des phénotypes de MCL ne comportaient pas de translocation t(11;14) et présentaient des caractéristiques génétiques généralement retrouvées dans les aCLL. Ces cas de aCLL avaient une expression forte du CD20 et des Igs de surface.<sup>52</sup>

### ***c) Le lymphome de zone marginale***

Le pourcentage de MZL CD5+ varie de 5 à 20% et pose une difficulté diagnostique face aux aCLL et aux autres SLP-B. Le CD23 est généralement négatif mais peut être positif dans environ 30% des cas ce qui complexifie l'interprétation de l'immunophénotypage.

La présence d'une différenciation plasmocytaire, ou de cellules villeuses dans une partie des MZL permet d'éliminer une aCLL.<sup>35</sup>

Les MZL CD5 positif seraient le plus souvent associés à une hyperlymphocytose ainsi qu'une infiltration médullaire.<sup>53</sup>

### ***d) Le lymphome lymphoplasmocytaire***

Le LPL est une des entités les moins faciles à cerner en CMF, la cytologie avec différenciation lymphoplasmocytaire peut être retrouvée dans d'autres SLP-B notamment le MZL ce qui complexifie l'interprétation de l'immunophénotypage.

La présence du CD5 dans le LPL varie de 5 à 10%, le CD23 est très souvent négatif et son expression est faible lorsqu'il est présent.

La distinction avec les autres SLP-B CD5+ est réalisée sur la cytologie ainsi que les critères cliniques.<sup>35</sup>

### **e) La leucémie prolymphocytaire B**

La B-PLL est caractérisée par la présence d'antigènes pan-B le CD19, le CD20, ainsi que le CD79b et le FMC7. L'expression des Igs de surface est très souvent forte. Le CD5 est exprimé dans 20 à 30 % des cas et le CD23 dans 10 à 20% avec une expression faible. La présence du CD5 doit faire rechercher la t(11;14) pour éliminer les MCL blastoïdes.

Le CD79b et l'expression des chaînes légères seraient les marqueurs les plus discriminants pour différencier la B-PLL du MCL et de la CLL.<sup>54</sup>

Il existe des difficultés pour distinguer les CLL en transformation prolymphocytaire des B-PLL *de novo*, car les CLL en transformation peuvent avoir une diminution de l'expression du CD5, une augmentation de l'expression du CD20 et une acquisition du FMC7 ; mais quelques patients conservent le même immunophénotypage que leur CLL de départ même après transformation.<sup>6;21;35;55</sup>

## **2. SLP-B CD5- / CD10+**

Cette catégorie est la plus représentée par le FL, le CD10 est quelque fois présent dans d'autres SLP-B mais de façon très rare comme dans la HCL (<10%).

### **a) Le lymphome folliculaire**

La présence du CD10 est caractéristique du FL et dans la majorité des cas le CD5, le CD23 et le CD43 sont négatifs et permettent d'éliminer une CLL. Le CD10 est un marqueur physiologique des cellules du centre germinatif. Les FL de grade 3 expriment beaucoup moins le CD10.

Les cellules du FL sont typiquement CD10+, CD5-, FMC7+, mais il existe de rares cas de FL exprimant le CD5.

La détection du CD10 peut être prise en défaut en CMF et donner des résultats faussement négatifs, c'est pourquoi il est conseillé de coupler l'anticorps anti-CD10 à un fluorochrome de forte brillance.

Il existe de vrais cas de FL CD10- (jusqu'à 50% des cas<sup>56</sup>) entraînant une confusion avec le MZL en cas de cytologie atypique. Dans ces cas, il est nécessaire de compléter l'analyse avec la cytogénétique qui démontrera la présence de t(14;18) et des études anatomopathologiques pour rétablir le diagnostic.<sup>6;8;33;41</sup>

### **3. SLP-B CD5- / CD10-**

Les MZL et la HCL représentent la majeure partie de cette catégorie, puis ensuite le LPL.

#### ***a) La leucémie à tricholeucocytes***

La HCL est caractérisée par un profil immunophénotypique distinct : CD20+ fort, CD22+ fort, CD11c+ fort, CD25+ fort, CD103+, CD123+, FMC7+ et des Igs de surface d'expression moyenne à forte. Le CD5, le CD23 et le CD10 sont le plus souvent négatifs. La mise en évidence de ce profil immunophénotypique est plus sensible que la détection de la TRAP.<sup>6;35</sup>

L'immunophénotypage de la HCL est caractérisé par quatre marqueurs positifs : CD11c, CD25, CD103 et CD123 qui permettent de la distinguer des autres hémopathies ayant des cellules villeuses ou chevelues comme le SRPL, la HCLv ou le SLVL. Les recommandations de SFH préconisent de tester les CD11c, CD25, CD103 en première intention puis si un de ces marqueurs est négatif d'ajouter le CD123 afin de calculer le score associé aux HCL.<sup>19</sup>

Le score est composé de quatre marqueurs, tous positifs dans la HCL

**Tableau 4 : Score des marqueurs de la HCL<sup>57</sup>**

Marqueurs	1 Point	0 Point
<b>CD11c</b>	Positif	Négatif
<b>CD25</b>	Positif	Négatif
<b>CD103</b>	Positif	Négatif
<b>CD123</b>	Positif	Négatif

Selon la publication originale de Matutes *et al*, 98% des HCL ont un score de 3 à 4, alors que 88% des HCLv et 77% des SLVL ont un score de 1 à 2 et aucune n'avait de score de 3 à 4. Ce score peut être très utile en cas de cytologie atypique. En pratique courante, pour les scores strictement supérieurs ou égale à 3 le diagnostic de HCL est vraisemblable, et pour les scores inférieurs ou égale à 2 d'autres hypothèses doivent être évoquées.<sup>57</sup>

Ces quatre marqueurs sont généralement exprimés fortement dans la HCL typique contrairement aux HCLv et SRPL. Dans la HCLv, le CD123 et le CD25 sont soit négatifs ou soit exprimés plus faiblement.<sup>58;59</sup>

Dans les HCL véritables, on peut retrouver l'expression de certains marqueurs aberrants ou la perte de CD typiques, comme la perte du CD103 dans 6% des cas, la perte du CD25 dans 3% des cas, ou l'expression du CD10 dans 14% des cas et du CD23 dans 17% des cas. D'ailleurs dans les HCL qui expriment le CD25, 30% d'entre elles expriment le CD10 alors que dans les HCL n'exprimant pas le CD25, aucune n'exprime le CD10. Devant ces variations d'expressions immunophénotypiques, la recherche de la mutation BRAFV600E apporte une aide précieuse dans le diagnostic.<sup>60;61</sup>

### ***b) Le lymphome de zone marginale SMZL, le SRPL et la HCLv***

Parmi les différents lymphomes de zones marginales, nous traiterons principalement du SMZL qui dissémine majoritairement au niveau sanguin.

Le SMZL, le SRPL et la HCLv sont le plus souvent CD5 négatif (80%) et CD10 négatif, ce qui les distingue des CLL, MCL et FL.<sup>35</sup>

- SMZL :

Le SMZL est caractérisé par un profil dit « négatif » avec habituellement : CD5, CD10, CD23, CD103, CD123 qui sont négatifs, le CD11c (expression faible ou moyenne) et le CD25 (expression faible ou moyenne) sont variables.

- SRPL

Le SRPL exprime le CD11c (expression forte), le CD103 (expression forte) est retrouvé dans 33% des cas, le CD123 dans 15% des cas et le CD25 est généralement négatif.

- HCLv

Le profil de HCLv ressemble à celui du SRPL, avec une expression du CD11c, une expression du CD103 dans deux tiers des cas, une absence ou une faible expression du CD123 et une absence du CD25 (moins de 10% des HCLv sont CD25 positif).<sup>17;18;58;62</sup>

L'équipe de Lyon a développé un score pour distinguer le SRPL du SMZL basé sur l'expression des CD11c, CD22, CD76, CD38, et CD27 en utilisant la valeur de l'intensité d'expression du CD11c et CD25 en RFI. Le RFI représente le rapport de la fluorescence de la population pathologique sur la fluorescence d'une population témoin saine. (RFI = IMF de l'échantillon/IMF du témoin)

**Tableau 5 : Score pour distinguer le SRPL du SMZL** <sup>63</sup>

<b>Marqueurs</b>	<b>1 Point</b>	<b>0 Point</b>
<b>CD11c</b>	RFI > 25	RFI < 25
<b>CD22</b>	RFI > 130	RFI < 130
<b>CD76</b>	Positif	Négatif
<b>CD38</b>	Négatif	Positif
<b>CD27</b>	Négatif	Positif

Dans cette étude, tous les SRPL avaient un score de 3 à 5 et aucun d'entre eux n'était inférieur à 3. Les SMZL avaient un score bas de 0 à 2. Cette distinction entre les deux entités doit être complétée par des études morphologiques, cytogénétiques et moléculaires.<sup>63</sup>

Le tableau ci-dessous résume les différences cliniques, morphologiques, cytogénétiques entre les différents lymphomes à cellules villeuses ou chevelues.

**Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques des SRPL, SMZL, HCL, HCL<sub>v</sub>**<sup>16</sup>

	SMZL	SRPL	HCL <sub>v</sub>	HCL
<b>Fréquence (% des SLP-B)</b>	25	0,5	0,4	2
<b><i>Présentation clinique</i></b>				
<b>Sexe Ratio</b>	0,48	1,64	1,6	5
<b>Age moyen</b>	62	77	71	55
<b>Splénomégalie</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Lymphocytose (&gt; 4,0 G/L)</b>	51%	75%	80%	Absente
<b>Neutropénie (&lt;1,5 G/L)</b>	Absente	Absente	Absente	Présente
<b>Monocytopénie</b>	Absente	Absente	Absente	Présente
<b>Splénectomie</b>	43%	26%	36%	ND
<b>Médiane de survie</b>	10 ans	10 ans	9 ans	12 ans
<b><i>Cytologie / Histologie</i></b>				
<b>Cytologie</b>	Hétérogène	Homogène	Homogène	Homogène
<b>Cytoplasme</b>	Faible à moyenne basophilie	Très basophile	Très basophile	Translucide
<b>Projection cytoplasmique</b>	Fines villosités	Villosités franches en position polaire	Fin et faiblement définie	Fin, long et circonférentielle
<b>Nucléole</b>	Petit	Larges nucléoles occasionnels	Larges nucléoles similaires aux prolymphocytes	Petits nucléoles occasionnels

	SMZL	SRPL	HCL <sub>v</sub>	HCL
<b>Chromatine</b>	Mottée	Condensée	Condensée	Finement dispersée
<b>Sang périphérique</b>	Population lymphomateuse hétérogène LV<20%	Population lymphomateuse homogène LV>50%	Population lymphomateuse homogène LV>50% mais LV nucléolé	Population lymphomateuse homogène Tricholeucocytes Pas de LV
<b>Rate</b>	Expansion de la zone marginale (aspect biphasique forme typique)	Infiltration lymphomateuse diffuse avec congestion de la pulpe rouge; lac sanguin	Infiltration lymphomateuse diffuse avec congestion de la pulpe rouge	Infiltration lymphomateuse diffuse avec atrophie de la pulpe blanche; lac sanguin
<b>BM morphologie</b>	Infiltration lymphomateuse intrasinusoïdale et nodulaire, rarement interstitielle Hématopoïèse conservée Rare fibrose médullaire	Infiltration lymphomateuse interstitielle ou intrasinusoïdale Hématopoïèse conservée Rare fibrose médullaire	Infiltration lymphomateuse interstitielle ou intrasinusoïdale Hématopoïèse conservée Rare fibrose médullaire	Infiltration lymphomateuse diffuse et/ou nodulaire Importante fibrose de la trame réticulinique
<b>Immunophénotypage</b>				
<b>CD20</b>	Fort	Fort	Fort	Très fort
<b>CD22</b>	Modéré	Fort	Fort	Très fort
<b>CD11c</b>	33% Faible	97% Fort	87% Fort	Positif très fort (100% des cas)
<b>CD76</b>	43%	86%	Fort	Fort
<b>CD103</b>	Négatif	Négatif/Positif modéré (36% des cas)	Positif faible à modéré (60% des cas)	Positif très fort (100% des cas)

	SMZL	SRPL	HCL <sub>v</sub>	HCL
<b>CD123</b>	Négatif	Négatif/Positif modéré (10% des cas)	Négatif/Positif modéré (9% des cas)	Positif très fort (95% des cas)
<b>CD25</b>	Variable	Variable (les cas positifs sont faibles)	Variable (les cas positifs sont faibles)	Très fort
<b>CD27</b>	Positif (ordinaire)	Négatif	Négatif	Négatif
<b>ANX1</b>	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
<b>sIg</b>	M+/-D+/-G kappa>lambda	M+/-D+/-G ou IgG+/-D kappa=lambda	IgG seul ou combiné avec d'autres chaînes lourdes kappa=lambda	IgG ou multiples chaînes lourdes isotopiques kappa=lambda
<b>Cytogénétique</b>				
<b>Anomalies cytogénétiques</b>	80%	32%	Rare	Rare
<b>Réurrence d'anormalités chromosomiques</b>	+3, +18, del7q	+3, del7q	del 17p, +12	del 17p, +12, expression cycline D1 sans réarrangement CCND1
<b>Biologie moléculaire</b>				
<b>IGHV mutation (%)</b>	57	79	83	84
<b>VH1-2 (%)</b>	19 à 31	3	ND	8
<b>VH4-34 (%)</b>	8 à 12	15	17 à 40	0 à 10
<b>VH3-23 (%)</b>	14	18	ND	10 à 20
<b>VH3-30 (%)</b>	8	6	ND	19
<b>BRAF mutation</b>	Absent	Absent	Absent	Présent (100%)

c) *Le lymphome lymphoplasmocytaire*

Le LPL est caractérisé par l'expression des antigènes pan-B : CD19, CD20, CD22 (faible), CD79b, FMC7. Les Igs de surface sont fortement exprimées. Le CD5 est variable mais plus souvent négatif. Le phénotype CD5-, CD23- et CD10- est observé dans 60 à 80% des cas. Le CD25 est exprimé dans la majorité des cas, et le CD11c dans 30% des cas. Contrairement aux plasmocytes du myélome, les cellules n'expriment ni le CD38, ni le CD56.<sup>6;24;64;65;66</sup>

Le taux de l'IgM sérique serait corrélé à l'expression du CD23 dans le LPL.<sup>67</sup>

Le tableau ci-dessous résume le phénotypage du LPL.

**Tableau 7 : Profil immunophénotypique dans la maladie de Waldenström<sup>68</sup>**

Marqueurs	Protéines	%	Remarques
<b>Clonalité</b>	IgM surface +++ Chaîne légère Ig	100	Niveau d'expression élevé kappa > lambda
<b>Phénotype B</b>	CD19/CD20	100	
	CD22	100	De faible intensité
	CD79	100	
	FMC7	> 85	
	CD5/CD19	10 à 27	De faible intensité
	CD23	14 à 33	De faible intensité
	CD10	< 10	
<b>Plasmocytaires</b>	CD38	0 à 60	Variabilité importante selon les études
	CD138	< 10	
<b>Lymphocytes mémoires</b>	CD27	42	
<b>Autres</b>	CD25	90 à 100	Expression homogène
	CD103	0	Constamment négatif
	CD43	< 20	Faible niveau d'expression
	CD11c	0 à 31	Faible niveau d'expression
	CD52	100	Constamment positif

#### **4. SLP-B CD5+ / CD10+**

La coexpression du CD5 et du CD10 est rare, elle est plus souvent associée à une expression aberrante d'un des deux CD. Dans l'ordre de fréquence, on retrouve le FL puis le MCL et enfin la CLL. La morphologie ainsi que la cytogénétique apportent des informations complémentaires afin de différencier ces entités. Un des nouveaux marqueurs peut aider à différencier le MCL et la CLL : le CD200. Il est exprimé fortement dans la CLL et négatif dans le MCL.<sup>25</sup>

## 5. Récapitulatif immunophénotypage des SLP-B

Le tableau ci-dessous présente un récapitulatif des profils immunologiques des différents SLP-B rencontrés en routine. Il est classiquement présenté pour aider à l'interprétation des immunophénotypages mais son utilisation reste délicate dans certains cas car il demande à être affiné dans chaque centre en fonction de ses propres valeurs de références.

**Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques des SLP-B<sup>32</sup>**

	CLL	B-PLL	MCL	FL	MZL	HCL	SLVL	MW
<b>CD19</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CD5</b>	+	±	+	-	-/+	-	-/+	-
<b>CD23</b>	+	-	-	-/+	-	-	-/+	-
<b>sIg</b>	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
<b>CD43</b>	++	-	-/+	-	-	-/+	-	-
<b>FMC7</b>	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	±
<b>CD22</b>	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
<b>CD10</b>	-	-/+	-	±	-	-/+	-	-
<b>CD103</b>	-	-	-	-	-/+	+	+	-
<b>CD11c</b>	-/+	-	-	-	±	+	-	-
<b>CD25</b>	-/+	-	-	-	±	+	+	-
<b>CD79b</b>	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
<b>CD20</b>	Faiblement ent +	+	+	+	+	++	++	+

Légende : + généralement positif ; - généralement négatif ; ± généralement positif, mais peut être négatif ; -/+ habituellement négatif, mais peut être positif

La prise en compte des intensités d'expression de fluorescence permet d'affiner l'interprétation des marqueurs litigieux.

## D. Revue de la littérature sur l'expression des différents marqueurs en fonction de chaque entité

Nous avons recensé (non exhaustif) les données publiées en rapport avec les pourcentages d'expression des différents marqueurs. Ce tableau est proposé à titre documentaire, un document récapitulatif n'existant pas à notre connaissance (difficultés à effectuer par ailleurs, les clones utilisés et les techniques varient selon les centres).

**Tableau 9 : Revue de la littérature sur l'expression des différents CD en fonction de chaque entité (expression en pourcentage)**

CD	CLL	MCL	FL	MZL	SMZL	SRPL	HCLv	HCL	B-PLL	MW
CD5 Positif	92 <sup>39</sup> 95 <sup>49</sup>	90 <sup>32</sup> 93 <sup>47</sup>	5 <sup>47</sup>	5 <sup>47</sup> 5 <sup>35</sup>	20-25 <sup>8</sup> 31 (variable) <sup>69</sup> 20 <sup>17</sup> 22 (faible) <sup>58</sup> 14 <sup>59</sup>	14 <sup>69</sup> 30 <sup>62</sup> 36,4 <sup>62</sup>	0 <sup>69</sup> 3 <sup>58</sup> 9 <sup>59</sup> généralement négatif <sup>70;71;72</sup>	0 <sup>69</sup> 2 <sup>58</sup> 0 <sup>60</sup> 3 <sup>45</sup> 0 <sup>59</sup> 2 <sup>61</sup> 5 <sup>73</sup> généralement négatif <sup>74</sup>	50 <sup>42</sup> 20 à 30 <sup>6</sup> 33 <sup>21</sup> 67 <sup>55</sup> 20 à 30 <sup>23</sup>	20 <sup>75</sup> 5 <sup>35</sup> 9 <sup>67</sup> 5 <sup>76</sup> 10 à 27 (faible) <sup>68</sup> 11 <sup>47</sup> 20 <sup>65</sup>
CD5 négatif		12 <sup>48</sup> 10,6 <sup>77</sup>							50 à 60 <sup>32</sup>	
CD23 positif	94 <sup>34</sup> 93 <sup>47</sup>	21 <sup>48</sup> 26 <sup>47</sup>	36 <sup>47</sup>	53 <sup>47</sup>	33 (faible) <sup>53</sup> 33 (faible) <sup>69</sup> 30 <sup>17</sup> 30 <sup>8</sup> 38 <sup>58</sup> 39 <sup>59</sup>	3 <sup>69</sup> 30 <sup>62</sup>	0 <sup>69</sup> 0 <sup>59</sup> 14 (expression hétérogène/partielle) <sup>58</sup> généralement négatif <sup>74;78;59</sup> 3 <sup>78</sup>	13 <sup>69</sup> 21 <sup>58</sup> 17 <sup>60</sup> 12,5 <sup>59</sup> 14 <sup>47</sup> généralement négatif <sup>74</sup> 6 <sup>61</sup>	10 à 20 <sup>6</sup> 16 <sup>55</sup> 10 à 20 <sup>23</sup>	35 <sup>67</sup> 61 <sup>76</sup> 14 à 33 (faible) <sup>68</sup> 29 <sup>47</sup>
FMC7 positif	15 <sup>47</sup> 6,4 <sup>44</sup>	92 <sup>47</sup> 90 <sup>79</sup>	82 <sup>47</sup>	80 <sup>47</sup>	96 <sup>59</sup>	91 <sup>62</sup>	100 <sup>59</sup>	100 <sup>59</sup> 100 <sup>47</sup>	76 <sup>55</sup>	38 <sup>76</sup> >85 <sup>68</sup> 63 <sup>47</sup> 75 <sup>75</sup>
FMC7 négatif		11 <sup>48</sup>								

CD	CLL	MCL	FL	MZL	SMZL	SRPL	HCLv	HCL	B-PLL	MW
CD10 positif	10 <sup>45</sup>	8 <sup>48</sup> 3 <sup>45</sup>	87 <sup>47</sup> 50 <sup>56</sup>	0 <sup>45</sup>	33 <sup>57</sup> 0 <sup>58</sup>		15 <sup>18</sup> souvent négatif <sup>57</sup> 3 <sup>58</sup>	souvent négatif <sup>57</sup> 12 <sup>58</sup> 10 <sup>18;60</sup> 31 <sup>47</sup> littérature : 4 à 26 <sup>58</sup>	7,5 <sup>55</sup>	7 <sup>67</sup> 3 <sup>76</sup> <10 <sup>68</sup> 3 <sup>47</sup>
CD34 positif	7.7 <sup>45</sup>									
CD11c positif	4,2 <sup>44</sup>				49 <sup>63</sup> 33 (faible) <sup>69</sup> 50 <sup>17</sup> 67 (faible) <sup>58</sup> 38 <sup>59</sup> 39 <sup>24</sup>	97 <sup>63</sup> 97 (modéré) <sup>69</sup> 67 <sup>62</sup>	87 (expression faible à moyen) <sup>69</sup> 87(fort) <sup>19</sup> 66 (avec forte expression) <sup>18</sup> 100 (dont 63 avec expression forte) <sup>58</sup> 100 <sup>59</sup>	100 <sup>63</sup> 100 (fort) <sup>69</sup> 100 <sup>49</sup> 99 (dont 91 avec expression forte) <sup>58</sup> 100 <sup>59</sup>	31 <sup>55</sup>	30 <sup>75</sup> 6 <sup>24</sup> 81 <sup>76</sup> 0 à 31 (Faible) <sup>68</sup> 30 <sup>65</sup>
CD25 positif					8 <sup>63</sup> 12 <sup>69</sup> 25 <sup>17</sup> 22 (faible) <sup>58</sup> 64 <sup>59</sup> 44 <sup>24</sup>	3 <sup>63</sup> 3 <sup>69</sup> 10 <sup>62</sup> souvent absente <sup>18</sup>	10 <sup>69</sup> 6 <sup>19</sup> quasi absence <sup>18</sup> 0 <sup>58</sup> <10 (littérature) <sup>58</sup> 0 <sup>59</sup>	100 <sup>63</sup> 96 (fort) <sup>69</sup> 100 (dont 98 avec expression forte) <sup>58</sup> 96 <sup>59</sup> 97 <sup>47</sup>	43 <sup>55</sup>	90 <sup>75</sup> 88 <sup>24</sup> 71 <sup>76</sup> 90 à 100 <sup>68</sup> 90 <sup>65</sup>
CD103 positif	négatif <sup>80</sup>	négatif <sup>80</sup>	négatif <sup>80</sup>		2 <sup>63</sup> 0 <sup>69</sup> <10 <sup>17</sup> 0 <sup>58</sup> 0 <sup>59</sup> 40 <sup>24</sup> négatif <sup>80</sup>	33 <sup>63</sup> 38 (variable) <sup>69</sup> 20 à 30 <sup>8</sup> 33 <sup>18</sup> 16,7 <sup>62</sup>	60 (faible à moyen) <sup>69</sup> 60 <sup>19</sup> 66 <sup>18</sup> 100 <sup>58</sup> 36 <sup>59</sup> 100 <sup>80</sup>	100 <sup>63</sup> 100 (fort) <sup>69</sup> 100 <sup>58</sup> 100 <sup>59</sup> 97 <sup>47</sup>		0 <sup>24</sup> 0 <sup>68</sup>

CD	CLL	MCL	FL	MZL	SMZL	SRPL	HCLv	HCL	B-PLL	MW
CD123 positif	3,8 <sup>80</sup>	33 <sup>80</sup>	33 <sup>80</sup>		0 <sup>63</sup> 0 <sup>69</sup> 25 (faible) <sup>58</sup> 3 <sup>59</sup> 25 <sup>80</sup>	15 <sup>63</sup> 16 (faible) <sup>69</sup> 15 <sup>18</sup> 50 <sup>62</sup>	9 <sup>69</sup> 7 <sup>19</sup> quasi absente <sup>18</sup> 40% (faible) <sup>58</sup> 9 <sup>59</sup> 0 <sup>81</sup> 40 (partiel ou faible) <sup>80</sup>	100 <sup>63</sup> 95 (fort) <sup>69</sup> 100 (fort) <sup>58</sup> 95 <sup>59</sup> 100 <sup>81</sup> 100 <sup>80</sup>		
CD22 positif					100 <sup>63</sup> 96 <sup>59</sup> 50 (fort) <sup>24</sup>	100 <sup>63</sup>	100 <sup>59</sup>	100 <sup>63</sup> 92 <sup>47</sup> 100 <sup>59</sup>		
CD27 positif					77 <sup>63</sup> 89 <sup>69</sup>	20 <sup>63</sup> 19 <sup>69</sup>		0 <sup>63</sup> 0 <sup>69</sup>		42 <sup>68</sup>
CD38 positif	42 <sup>82</sup> 43 <sup>83</sup> 26 <sup>84</sup> 42 <sup>85</sup>	98 (présence ADP) <sup>86</sup> 48 (absence ADP) <sup>86</sup> 89 <sup>87</sup> 72 <sup>79</sup>			23 <sup>63</sup> 29 <sup>69</sup> 22 <sup>58</sup>	3 <sup>63</sup> 3 <sup>69</sup>	15 <sup>69</sup> 0 <sup>58</sup>	0 <sup>63</sup> 14 <sup>58</sup>	46 <sup>6</sup> 28 <sup>55</sup>	48 <sup>76</sup> 0 à 60 <sup>68</sup> 79 <sup>47</sup>
CD76 positif					18(faible) <sup>63</sup> 43 <sup>69</sup>	97(fort) <sup>63</sup> 86 <sup>69</sup>		100 <sup>63</sup>		
CD43 positif					14 (faible) <sup>53</sup> 15(faible) <sup>69</sup> 10 à 15 (faible) <sup>8</sup>	16 (faible) <sup>69</sup>				<20 (faible) <sup>68</sup>
CD24 positif					89 <sup>57</sup>		21 <sup>57</sup> 25 <sup>18</sup>	60 <sup>57</sup>		
CD13 positif	17.1 <sup>45</sup>									

CD	CLL	MCL	FL	MZL	SMZL	SRPL	HCLv	HCL	B-PLL	MW
CD22 positif		93 <sup>47</sup>	96 <sup>47</sup>	100 <sup>47</sup>	50 (fort) 100 ( dont 11 expression forte) <sup>58</sup>		100 (dont 97 expression forte) <sup>58</sup>	100 (dont 96 avec expression forte) <sup>58</sup>		100 (faible) <sup>24</sup> 33 <sup>76</sup> 100 (faible) <sup>68</sup> 100 <sup>47</sup>
CD56 positif										6 <sup>45</sup>
										60 à 80 % des LPL sont CD5-, CD10- CD23- <sup>35</sup>
CD138 positif										<10 <sup>68</sup>
CD52 positif										100 <sup>68</sup>

**Partie 2 : Apport des « nouveaux marqueurs » pour  
l'immunophénotypage des SLP-B et étude de la  
distribution des intensités de fluorescence des différents  
marqueurs du panel d'exploration des SLP-B**

## **I. Présentation des nouveaux marqueurs**

Les panels d'exploration des SLP-B sont établis dans leurs grandes lignes depuis une vingtaine d'années (score de Matutes<sup>37</sup>) mais ont néanmoins subi des évolutions. L'intérêt de « nouveaux marqueurs » a été testé par les équipes du CHU de Strasbourg et Nancy en particulier pour le CD5 phosphorylé, les CD160, CD200, CD148, CD180.<sup>88;89;90;91</sup> Trois marqueurs ont été plus particulièrement étudiés dans notre travail, ils seront brièvement décrits ci-dessous.

### **A. CD148**

Le CD148 est une tyrosine kinase membranaire présente sur toutes les cellules hématopoïétiques. Il est exprimé fortement sur les granulocytes par rapport aux monocytes et aux lymphocytes mais faiblement exprimé par les lymphocytes B et T sanguins.<sup>92</sup>

D'après une étude récente<sup>88</sup>, le CD148 est plus fortement exprimé dans le MCL que dans la CLL, ce qui apporte un argument complémentaire pour l'interprétation du phénotypage des SLP-B CD5+ en cas de cytologie atypique. Le diagnostic de MCL doit être suspecté (spécificité de 91% et sensibilité de 78%) en cas d'intensité de fluorescence du CD148 supérieure ou égale à deux fois la moyenne de fluorescence du CD148 dans la CLL. Le CD148 est exprimé dans une majorité des MCL et permet d'apporter une orientation pour réaliser la cytogénétique qui reste le « gold standard » pour affirmer le diagnostic (présence d'une t(11;14)). Cependant, environ 30% des MCL ont une faible expression du CD148, ce qui pondère l'utilisation pratique de ce critère pour affirmer un MCL.

### **B. CD180**

Le CD180 est une protéine membranaire qui appartient à la famille des « *Toll-like receptor* » (TLR). Il est principalement exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes comme les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. L'étude du CD180 sur des cellules CD19+ témoins et les cellules de CLL a montré une différence d'expression, les CLL expriment plus faiblement le CD180 que les cellules B CD19+.<sup>93</sup>

Les équipes de Strasbourg et de Lyon<sup>94</sup> ont étudié l'expression du CD180 dans les SLP-B. Ils ont montré que l'expression du CD180 était plus forte dans les lymphomes d'origine splénique comme le SMZL, et particulièrement fortement exprimée dans les SRPL. L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD180 ou le RFI permettrait de discriminer le MZL des CLL, LPL, et MCL avec plus de 86% de sensibilité et de spécificité. Ces premiers résultats encourageants ont été à l'origine de la création d'un projet entre les services de Strasbourg et Nancy afin de confirmer ces résultats sur une série commune de patients (protocole MALYZOMA).

### **C. CD200**

Le CD200 (anciennement appelé OX2) est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig de type 1 exprimée par les lymphocytes B et T activés, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules endothéliales et les neurones.<sup>95;89</sup>

L'expression du CD200 dans les SLP-B a déjà été étudiée récemment, montrant une forte expression homogène dans les CLL et une absence d'expression dans les MCL. Le CD200 est généralement plus fortement exprimé dans les HCL que dans les HCLv et les MZL. L'étude de son expression devient intéressante dans les SLP-B CD5+ pour différencier les MCL des aCLL, car le CD200 est positif dans les aCLL contrairement aux MCL. Mais une faible partie (<20%) d'un clone MCL peut exprimer faiblement le CD200.<sup>96;97;98;99</sup>

## **II. Etablissement de valeurs de référence pour l'ensemble des marqueurs utilisés dans le panel d'exploration des SLP-B**

### **A. Objectifs**

Suite au changement de cytomètres en flux dans le laboratoire (plateforme de cytométrie; dont le responsable est Dr. V. Latger-Cannard), après adaptation des panels d'anticorps les intensités moyennes de fluorescence (IMF) des différents marqueurs ont dû être redéfinies en fonction des différents diagnostics. L'établissement des médianes d'IMF pour chaque marqueur est une aide à l'interprétation quotidienne des immunophénotypes lymphocytaires et permet de proposer un diagnostic phénotypique au clinicien référent.

### **B. Matériels et méthodes**

#### **1. Sélection des échantillons**

Nous avons extrait dans le système informatique du laboratoire (SIL) GLIMS (Société MIPS) tous les immunophénotypes sur sang périphérique des SLP-B depuis avril 2014. Cette date a été retenue car elle fait suite à plusieurs raisons :

- La finalisation de l'installation des nouveaux cytomètres ;
- Le choix définitif du panel d'exploration des SLP-B (choix du type d'anticorps, des fluorochromes, des clones) ;
- Le calibrage quotidien des deux cytomètres et donc de la standardisation avec les cytomètres strasbourgeois.

En fonction de la conclusion de l'immunophénotypage, des données cliniques, et de la cytologie, nous avons pu classer rétrospectivement les différents SLP-B ou vérifier la classification initialement proposée. Les CLL ont été retenues sur un score de Matutes supérieur ou égal à 4.

Cette sélection d'échantillons nous a permis d'étudier :

- 45 CLL ;
- 14 MZL ;
- 9 MCL.

## 2. Appareil d'analyse

Les immunophénotypages ont été réalisés sur un des deux cytomètres BD (Becton, Dickinson and Company) FACSCanto II du laboratoire (8 couleurs) qui sont capables d'analyser simultanément jusqu'à 10 paramètres.



**Figure 20 : Le cytomètre BD FACS Canto II**  
([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))

### *a) Caractéristiques*

Il est équipé de trois lasers : bleu (488 nm), rouge (633 nm) et violet (405 nm) et d'un passeur d'échantillon haut débit permettant l'automatisation du passage des échantillons en plaque.

Le banc optique est constitué de deux parties : un système BD Octagon™ pour la réception des fluorescences émises suite à l'excitation du laser bleu et un système BD Trigon™ pour la réception des fluorescences des lasers rouge et violet.

Les fluorochromes utilisés dans le panel lymphocytaire le laboratoire sont :

- APC : allophycocyanine ;
- APC-Cy7 : APC-cyanine 7 ;
- FITC: isothiocyanate de fluorescéine ;
- PE : R-phycoérythrine ;
- PE-Cy7 : PE-cyanine 7 ;
- PerCP-Cy5.5 : PerCP-cyanine 5.5 ;
- V450 : coumarine teintée avec des propriétés spectrales similaires au Pacific Blue® ;
- V500 : nouveau colorant organique avec la même brillance que le Pacific Orange® et diminution des interférences avec le FITC ;
- BV421 : polymère coloré des plus brillants en CMF.

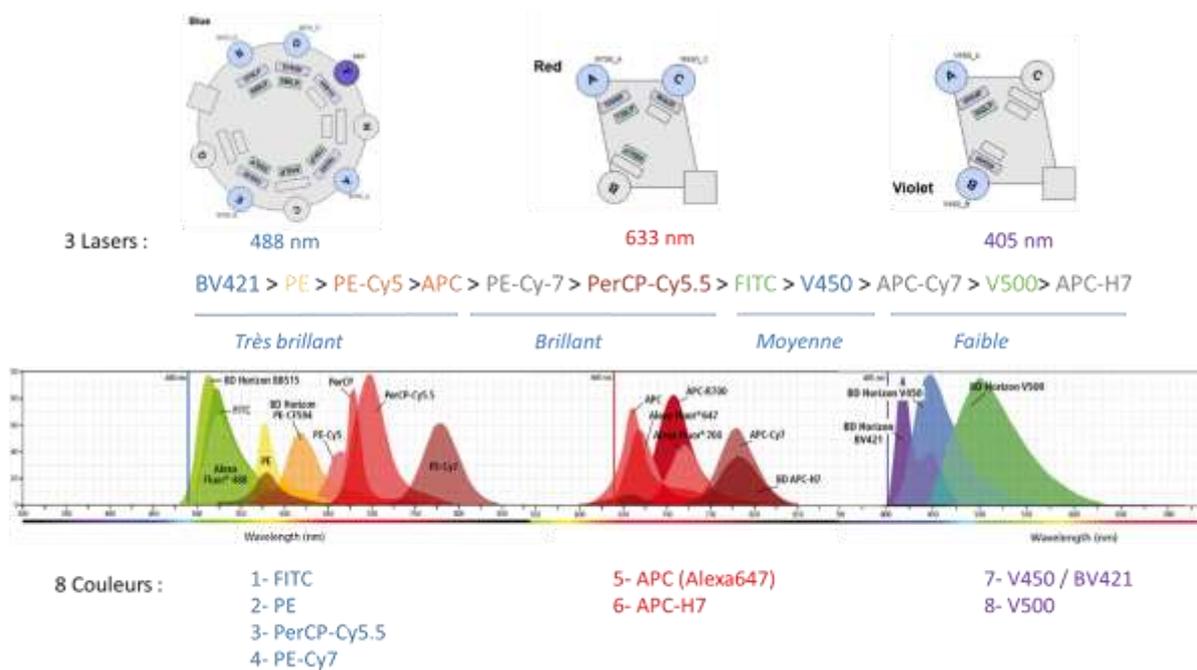


Figure 21 : Caractéristiques du banc optique et des fluorochromes utilisés sur le FACS CANTO II

### ***b) Maintenance quotidienne***

Des billes CS&T « *cytometer setup and tracking* » (BD) sont passées avec une fréquence journalière sur les deux cytomètres et permettent de caractériser l'instrument quotidiennement. La CS&T « *baseline* » caractérise l'instrument au jour J0 (c'est-à-dire à l'installation et à chaque changement de numéro de lot de billes). Elle permet d'ajuster les délais entre les lasers, elle détermine la linéarité de chaque PMT (cycle, quantification des antigènes), détermine le voltage minimum des PMT pour un coefficient de variation minimum du pic de fluorescence. Cette baseline permet également de déterminer les valeurs cibles des billes. Chaque passage journalier permet de comparer les voltages des PMT obtenus à la baseline J0 et de recalculer les variations de voltage (PMT minimum) nécessaire pour les atteindre et de suivre leurs évolutions grâce à des courbes de type Levey-Jenning. Ces variations sont enregistrées dans des applications settings qui sont utilisées à chaque immunophénotypage lymphocytaire.

Après le passage des billes C&ST, des billes Rainbow<sup>®</sup> sont passées pour vérifier les PTM minima obtenus avec les billes C&ST. Elles permettent de vérifier huit niveaux de fluorescences et ont permis de standardiser l'appareil avec les cytomètres d'autres centres (CHU de Strasbourg en particulier).<sup>100;101;102</sup>

Cette maintenance quotidienne de haut niveau garantit la maîtrise des analyses et une concordance vérifiée avec les données fournies par le laboratoire du CHU de Strasbourg.

### ***c) Protocole d'analyse cytométrique des SLP-B***

Le sang veineux est recueilli sur EDTA. Si le nombre de leucocytes est supérieur à 30 G/L, une dilution est réalisée avec du Cell Wash pour atteindre cette concentration. Le tube analysant les Igs de surface subit un lavage préalable pour limiter les interférences avec les Igs circulantes du sang.

Le traitement du tube avec lavage :

- 50µL de sang avec 2mL de PBS (tampon phosphate buffer Saline = Cell wash de BECTON DICKINSON) ;
- centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 min puis élimination du surnageant ;
- reprise du culot avec 2mL de PBS puis mélange par agitation rotative ;
- centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 min puis élimination du surnageant.

Le protocole des autres tubes et du tube avec lavage prétraité :

- ajout 10µL d'anticorps marqués en fonction du tableau 10.

Tous les tubes subissent une lyse érythrocytaire :

- 2mL de solution de lyse puis mélange par agitation rotative ;
- incubation de 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant ;
- reprise du culot avec 2mL de PBS puis mélange par agitation rotative ;
- centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant ;
- reprise du culot avec 2mL de PBS puis mélange par agitation rotative.

Les tubes sont ensuite analysés sur un des deux cytomètres.

Le tableau ci-dessous représente le panel d'anticorps utilisé au CHU de Nancy. Il est constitué d'un tube d'orientation qui permet de détecter la présence d'un clone lymphocytaire circulant, puis de tubes supplémentaires en cas de détection d'un clone (méthode d'analyse décrite dans le paragraphe II.B de la partie 1).

**Tableau 10 : Panel des anticorps des SLP-B**

	Tube orientation	SLP1	SLP2	SLP3	SLP4
<b>FITC</b>	sKappa	FMC7	CD148	x	CD103
<b>PE</b>	sLambda	CD23	CD180	CD22	CD305
<b>PerCP-Cy5.5</b>	CD5	CD5	CD5	CD5	CD11c
<b>PE-Cy7</b>	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
<b>APC</b>	CD8	CD10	CD200	CD79b	CD123
<b>APC H7 (Alexa)</b>	SmCD3/I CD3	CD20	CD81	CD43	x
<b>V450 / BV421</b>	CD4	CD38 BV421	CD25 V450	CD27	x
<b>V500</b>	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45

Légende : sKappa : Igs Kappa de surface ; sLambda : Igs Lambda de surface ; SmCD3 : CD3 de surface

### 3. Traitement des données cytométriques

Les informations cytométriques sont traitées et analysées par le logiciel BDFACSDiva software. Le tube d'orientation permet de mettre en évidence la présence d'un clone lymphocytaire B via la répartition des chaînes légères Kappa et Lambda (monotypie) et la présence d'un clone CD5 positif. Le panel lymphocytaire complémentaire complète l'immunophénotypage du clone. Le tube 4 est réalisé en cas de suspicion de leucémie à tricholeucocytes.

Les données statistiques ont été traitées sur le logiciel Microsoft Excel.

## C. Résultats

Tableau 11 : Exploitation statistique des résultats obtenus pour les IFM des différents CD au cours des 45 CLL, 14 MZL et 9 MCL

	CLL								MZL								MCL							
	n	MIN	MAX	MED	MOY	ET	Quartile 1	Quartile 3	n	MIN	MAX	MED	MOY	ET	Quartile 1	Quartile 3	n	MIN	MAX	MED	MOY	ET	Quartile 1	Quartile 3
<b>CD20</b>	42	396	2224	977	1091	500	711	1475	14	2780	33661	12890	15754	9613	8458	22453	9	7654	35425	12899	16626	9391	8699	21065
<b>CD5</b>	43	453	7561	3052	3400	1765	2261	4561	6	392	7024	1299	2537	2601	976	3580	6	1281	4562	2747	2931	1193	2340	3722
<b>CD22</b>	44	251	4156	1265	1381	887	745	1674	14	738	30765	8185	10386	7955	5512	11854	9	1280	12053	3795	4835	3146	3217	5577
<b>CD23</b>	45	281	10567	3109	3886	2467	2405	4715	10	350	6763	536	1685	2044	411	2189	9	292	5574	413	1110	1720	368	611
<b>CD25</b>	45	55	757	264	295	157	181	388	13	41	603	122	216	202	80	276	9	113	751	265	363	213	232	495
<b>CD27</b>	41	257	2861	597	755	461	481	925	12	228	3976	959	1074	988	513	1185	7	315	2039	986	975	562	634	1110
<b>CD38</b>	15	907	8828	2627	3040	2208	1482	3680	9	510	20048	1016	4267	6243	931	4145	5	918	41052	12870	16297	15114	9143	17500
<b>CD43</b>	44	614	4449	2127	2168	883	1535	2832	3	362	3084	532	1326	1245	447	1808	3	128	2130	297	852	1110	213	1214
<b>CD79b</b>	37	315	1610	653	754	336	513	948	13	1161	29946	17263	14363	11476	2421	25825	9	3355	66347	17873	21132	19496	5805	28248
<b>CD81</b>	45	53	562	231	263	125	170	336	14	319	2528	864	998	622	513	1362	9	612	3570	917	1385	1000	731	1362
<b>CD148</b>	45	157	1007	381	424	193	280	558	14	263	1539	697	805	379	533	1091	9	846	2408	1608	1583	490	1210	1926
<b>CD180</b>	45	66	1850	502	553	353	317	663	14	343	10846	1225	2076	2634	993	2006	9	271	1604	821	761	466	393	1023
<b>CD200</b>	45	1694	10396	4188	4326	1701	3003	5130	14	241	5806	1535	1743	1390	1018	1872	9	13	1176	108	436	485	27	772
<b>FMC7</b>	31	63	669	214	243	115	169	282	14	250	7845	1083	2010	2306	528	2787	9	766	4180	1915	2180	1324	1123	3082
<b>KAPPA</b>	27	229	2823	1185	1198	673	707	1723	6	1424	22639	9438	10854	9336	2706	18651	4	4756	13732	10046	9645	4441	6459	13233
<b>LAMBDA</b>	15	208	4854	891	1427	1221	596	1775	8	1203	69747	4197	16912	23832	2778	23783	5	5284	50477	16957	22677	18828	8108	32558

Légende : n = nombre dans la série, MIN = valeur minimale d'IMF de la série, MAX = valeur maximale de la série, MED = médiane des IMF de la série, MOY = moyenne des IMF de la série, ET = écart type de la série

Ce tableau permet d'illustrer les différentes mesures d'intensité de fluorescence des CD testés en fonction du diagnostic. Il ne recense que les cas positifs, ce qui explique des « n » faibles dans certains des cas (et ce de manière attendue).

On constate :

- CD20 :
  - o différence significative entre la CLL et les MZL/MCL ;
  - o IMF faibles pour la CLL (toujours inférieure à 2500) ;
  - o forte IMF >2500 élimine une CLL avec un effet seuil (valeur approximative choisie arbitrairement).
- CD5 : IMF plus faible dans les MZL ;
- CD22 : IMF CLL < IMF MCL < IMF MZL ;
- CD23 : IMF MZL et MCL < IMF CLL ;
- CD25 : expression faible, voire très faible dans les trois entités (IMF<750) ;
- CD27 : IMF CLL < IMF MZL et MCL ;
- CD38 : IMF très forte dans le MCL quand il est exprimé, marqueur souvent exprimé dans le MZL, mais exprimé dans une minorité des CLL ;
- CD43 : marqueur de la CLL, expression plus forte et plus fréquente dans la CLL que dans le MZL ou le MCL ;
- CD79b : IMF très souvent faible dans la CLL (MAX<1610) à la différence d'une expression forte dans le MZL et le MCL (en particulier dans le MCL (MIN=3355)) avec un effet seuil entre la CLL et les MZL/MCL ;
- CD81 : IMF très souvent faible dans la CLL (MAX<562) à la différence d'une expression forte dans le MZL et le MCL ;
- CD148 : expression dans les trois entités avec des IMF différentes : CLL < MZL < MCL ;
- CD180 : expression dans les trois entités avec des IMF différentes : CLL < MCL < MZL ;
- CD200 : expression dans les trois entités avec des IMF différentes : MCL (IMF très faible) < MZL < CLL ;
- FMC7 : IMF faible (<669) dans la CLL > IMF MZL > IMF MCL ;
- chaînes Kappa et Lambda : très faible expression dans la CLL et forte expression dans le MZL et MCL.

L'interprétation des marqueurs en fonction des entités indique que les IMF des marqueurs CD20, CD79b, FMC7 sont plus fortement exprimées dans le MZL (12890, 17263, 1083 respectivement) et le MCL (12899, 17873, 1915 respectivement) par rapport à la CLL (977, 653, 214 respectivement). L'IMF du CD5 est plus marquée dans la CLL (3052) et le MCL (2747) que dans le MZL (1299). Les IMF du CD22 et le CD180 sont plus intenses dans le MZL (8185, 1225 respectivement) par rapport à la CLL (1265, 502 respectivement) et le MCL (3795, 821 respectivement). La CLL exprime davantage le CD23 et CD43 (3109, 2127 respectivement) que le MCL (413, 297 respectivement) et le MZL (536, 532 respectivement). L'IMF du CD38 est très forte dans le MCL (12870) et celle CD148 (1608) est légèrement plus intense que dans la CLL (381) et le MZL (697). L'IMF du CD200 est très faible dans MCL (108) et plus forte dans la CLL (4188). Suite à ces résultats, des profils types immunophénotypiques semi-quantitatifs peuvent être déduit pour ces trois entités :

**Tableau 12 : Profils immunophénotypiques CLL, MZL et MCL**

	CLL (n=45)	MZL (n=14)	MCL (n=9)
CD20	+	+++	+++
CD5	++	-/+	++/-
CD22	+	+++	++
CD23	++	+	+
CD25	-/+	-/+	-/+
CD27	+	++	++
CD38	-/+++	+	+++
CD43	++	-/+	-/+
CD79b	-/+	+++	+++
CD81	-/+	+	+
CD148	+	++	+++
CD180	+	+++	++
CD200	+++	+	-/+
FMC7	-/+	++	++
KAPPA	+	+++	+++
LAMDA	+	+++	+++

Légende : -/+ négatif le plus souvent mais peut être positif ; +/- positif le plus souvent mais peut être négatif ; + positif faible ; ++ positif moyen ; +++ positif fort.

Certaines données sont établies à partir de faibles effectifs, notamment dans le cas du CD5 pour le MZL, le CD38 pour la CLL, le CD43 pour le MZL et MCL ainsi que le FMC7 pour la CLL. Cette absence de données s'explique par la négativité attendue du marqueur, qui n'a pas été systématiquement retranscrite dans le système informatique du laboratoire et que nous n'avons donc pas pu exploiter.

## **D. Discussion**

En remarque préalable, il est nécessaire de garder un sens critique, en particulier pour la cohorte de MZL (8 MZL documentés dans la partie III INFINICYT, dont 4 MZL exprimant le CD5). Cependant, cela indique l'hétérogénéité de la pathologie et la difficulté de porter un diagnostic de certitude.

Ces résultats concordent avec les données de la littérature, en particulier pour observer la répartition de la positivité et de la négativité des différents CD ainsi que les différentes IMF des CD comme par exemple le CD20 plus faible<sup>103</sup> dans la CLL, les CD23 et CD43 plus fortement exprimés dans la CLL. La détermination des médianes des IMF des différents marqueurs en fonction des SLP-B permet d'affiner le diagnostic. En effet, on constate des zones de chevauchements des IMF pour la plupart des CD (en dehors des CD20 et CD79b). Ces médianes restent à elles seules insuffisantes pour interpréter le phénotypage dans un but diagnostic. Elles mettent en évidence les cas atypiques et orientent sur la nécessité d'un complément d'investigation dans le but d'affirmer le diagnostic.

Cependant, comme cela a été vu précédemment, les données publiées sur les IMF sont restreintes. Ceci est attendu dans la mesure où elles sont très « techniques dépendantes » (choix de l'anticorps, du fluorochrome, du type de cytomètre et de ses calibrations techniques...). Notre travail permet donc d'établir des valeurs de référence pour notre laboratoire à partir du panel d'anticorps récemment choisi. Ces valeurs brutes ne permettent pas d'étudier plus précisément la distribution des marqueurs.

Elles peuvent néanmoins être partagées avec l'équipe de Strasbourg. Ces données sont exploitées en toute première ligne pour la validation et l'expertise des résultats lors de l'exploration de nouveaux patients (qualités des résultats rendus, première hypothèse diagnostique...).

Certains de nos résultats apparaissent plus « originaux » (moins de cas rapportés). Nos observations rapportent moins de cas de positivité du CD5 dans le MZL que dans la littérature. Le caractère quelque peu abstrait des chiffres nous a incités à chercher d'autres formes d'exploitation des résultats.

### **III. Etude de la répartition des différents marqueurs en fonction des SLP-B**

#### **A. Objectifs de l'étude**

Comme il vient d'apparaître, l'étude des médianes des IMF des différents marqueurs ne permet cependant pas d'affirmer avec certitude le diagnostic pour les cas atypiques. L'étude de la distribution des marqueurs permet de mieux cibler le domaine des valeurs attendues pour chaque marqueur en fonction du diagnostic (aide pratique). De plus, elle permet de rechercher les marqueurs les plus discriminants pour chaque SLP-B.

#### **B. Matériels et méthodes**

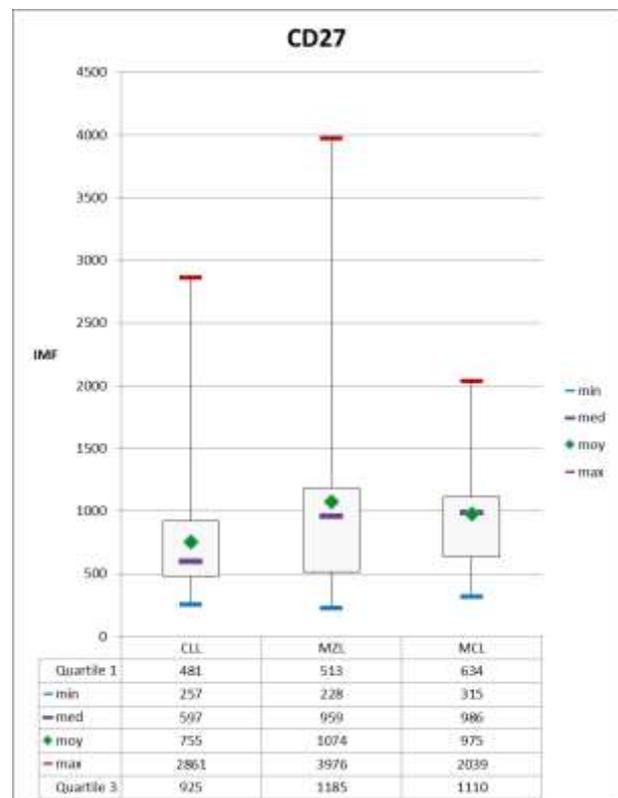
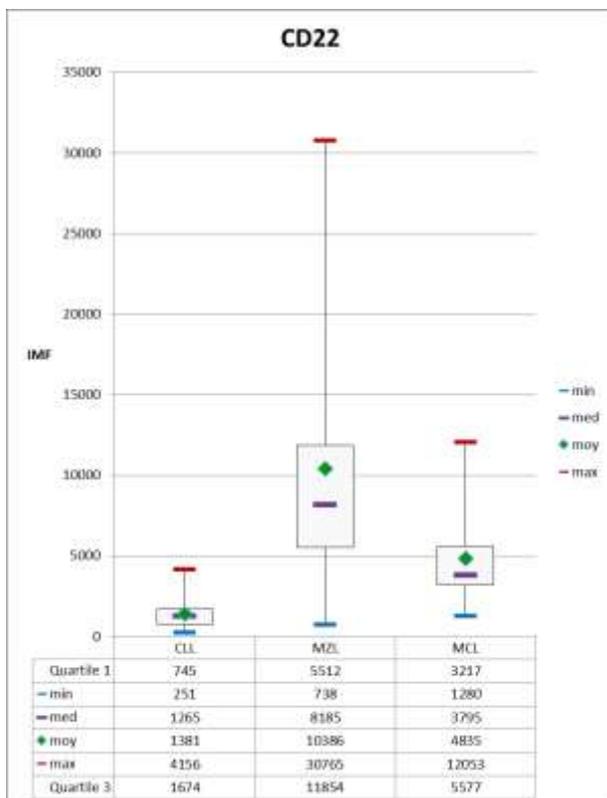
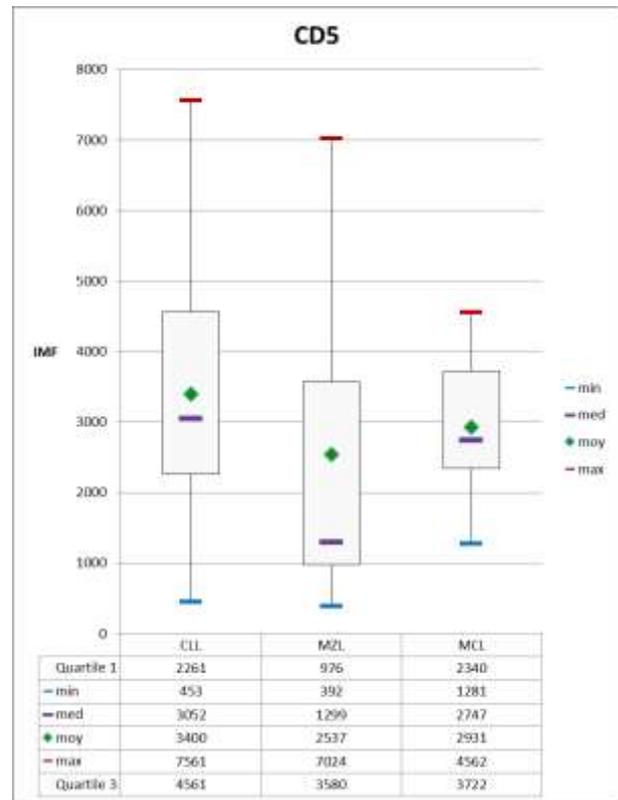
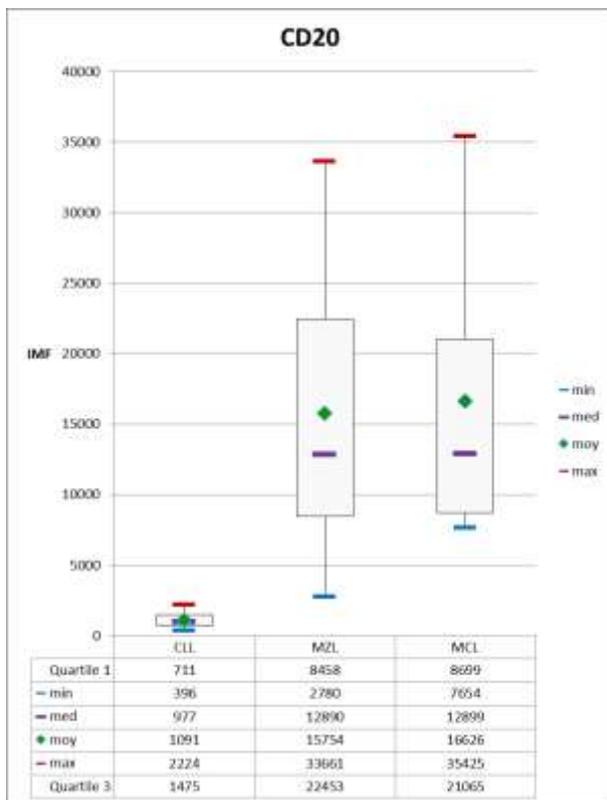
##### **1. Sélection des échantillons et appareil de mesure**

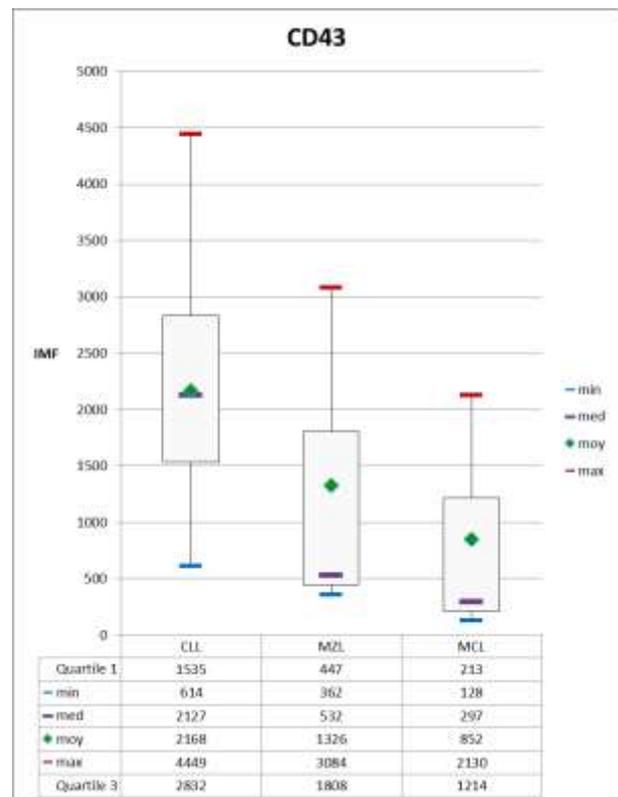
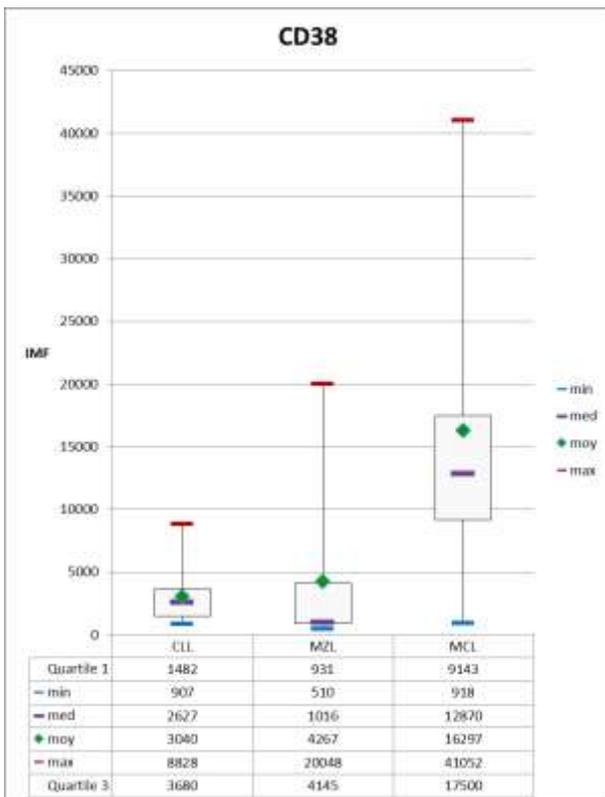
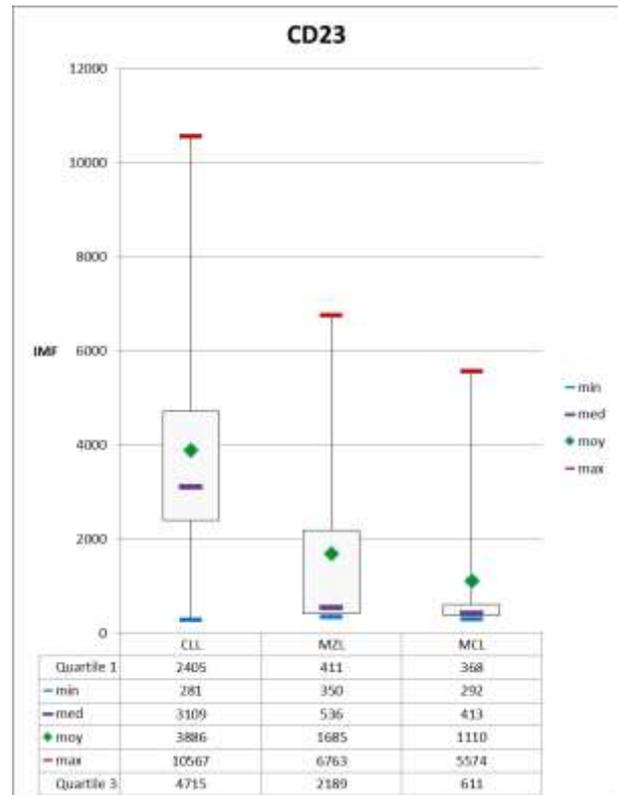
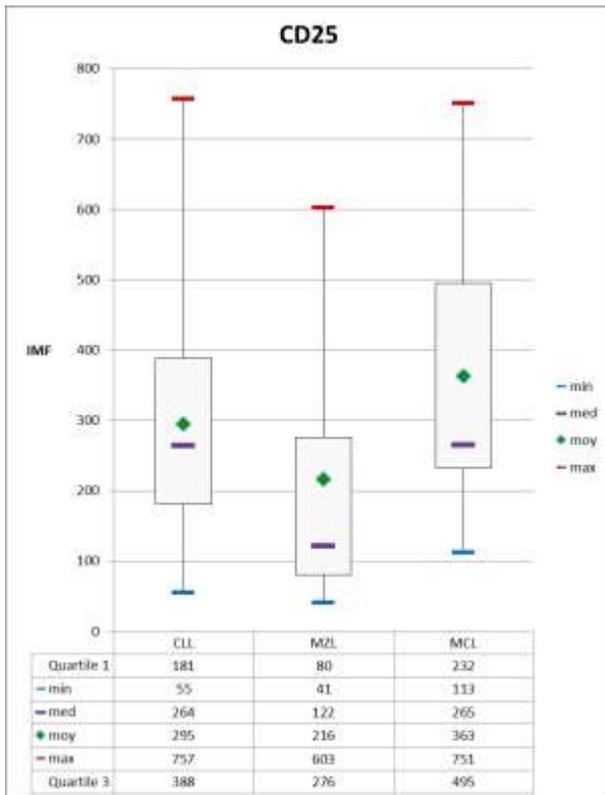
La sélection des échantillons ainsi que le cytomètre sont les mêmes que ceux décrits dans le paragraphe II.B.

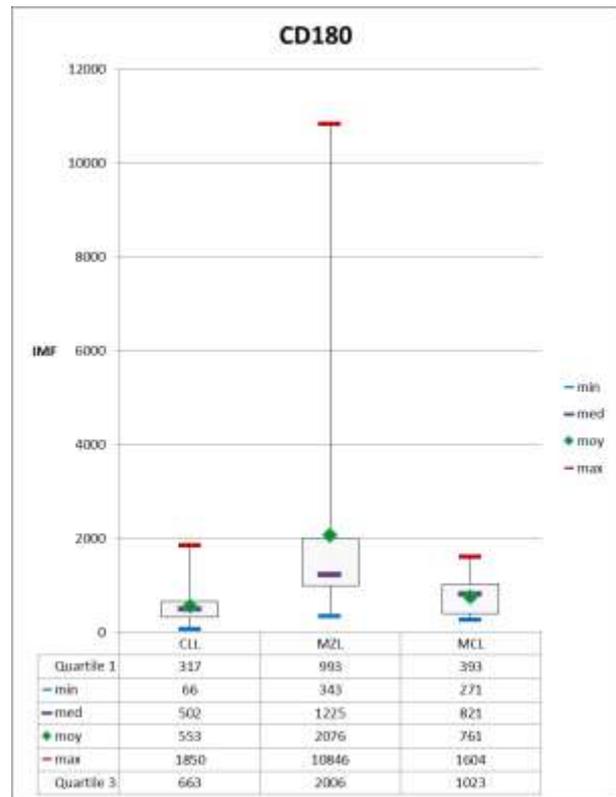
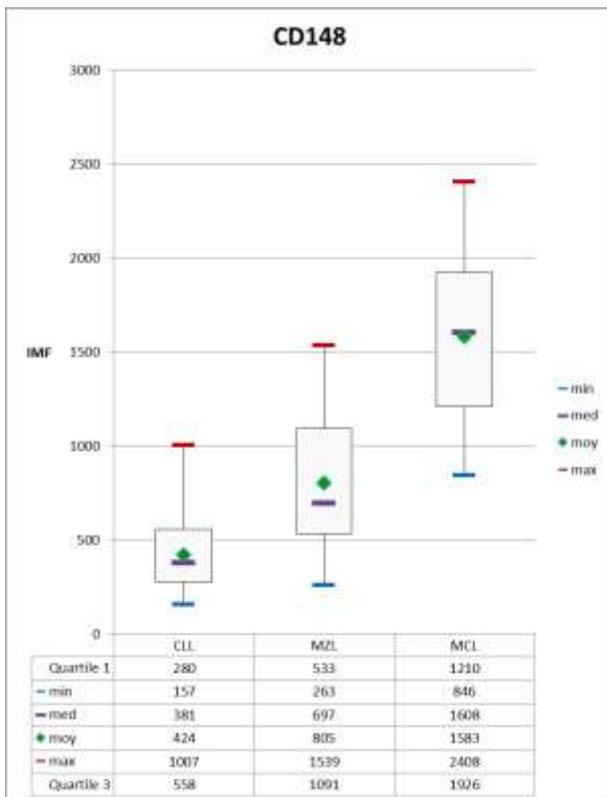
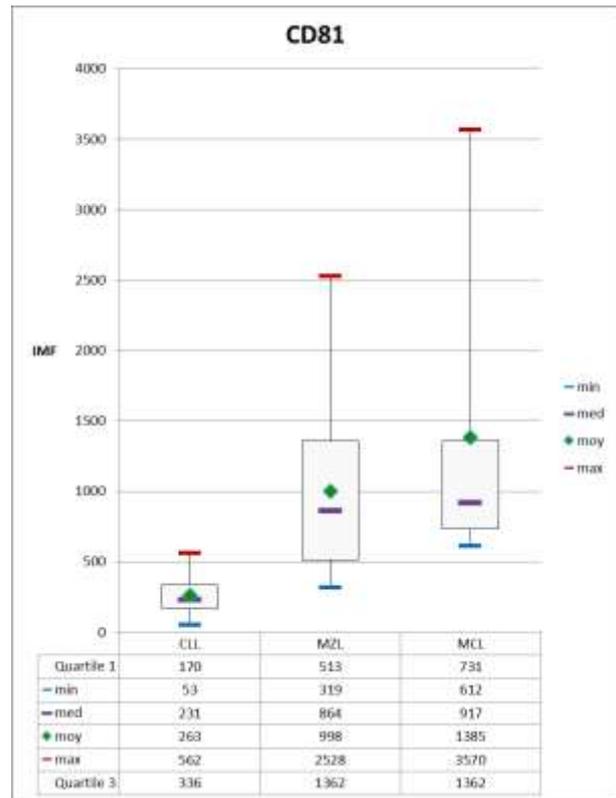
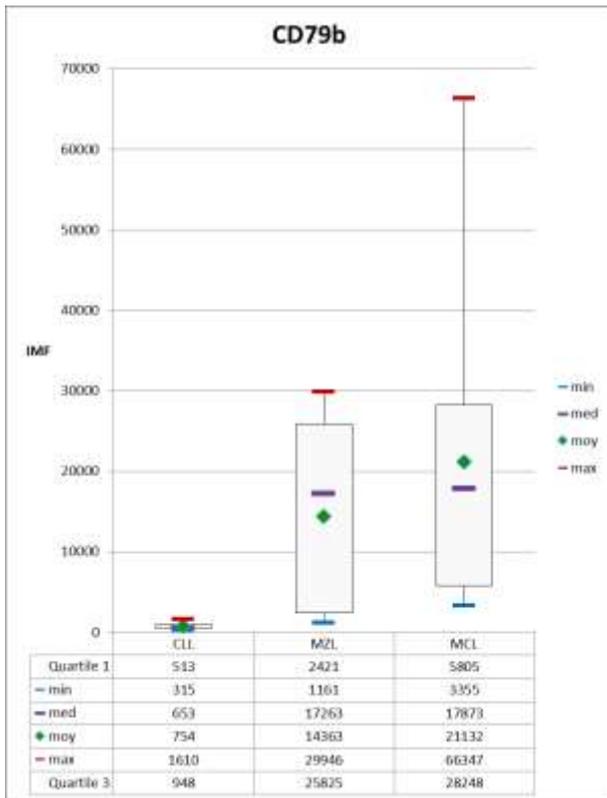
##### **2. Traitement des données de cytométrie**

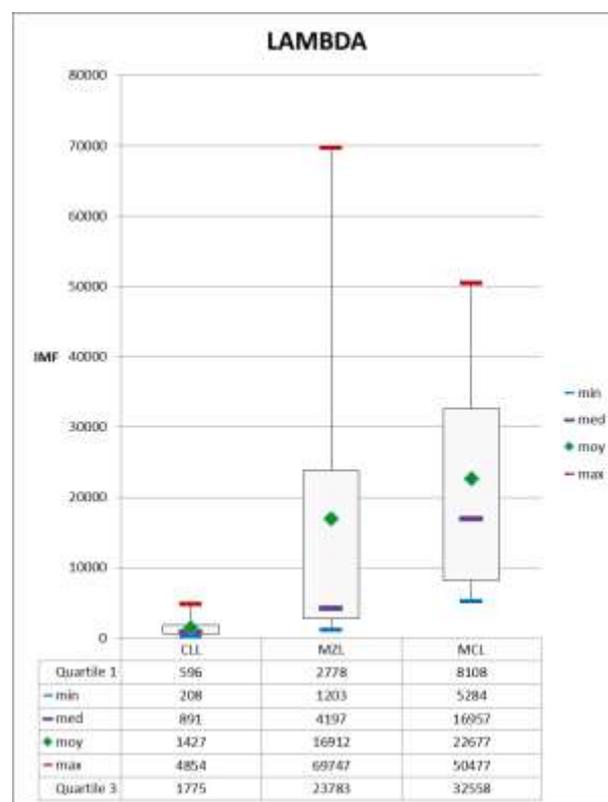
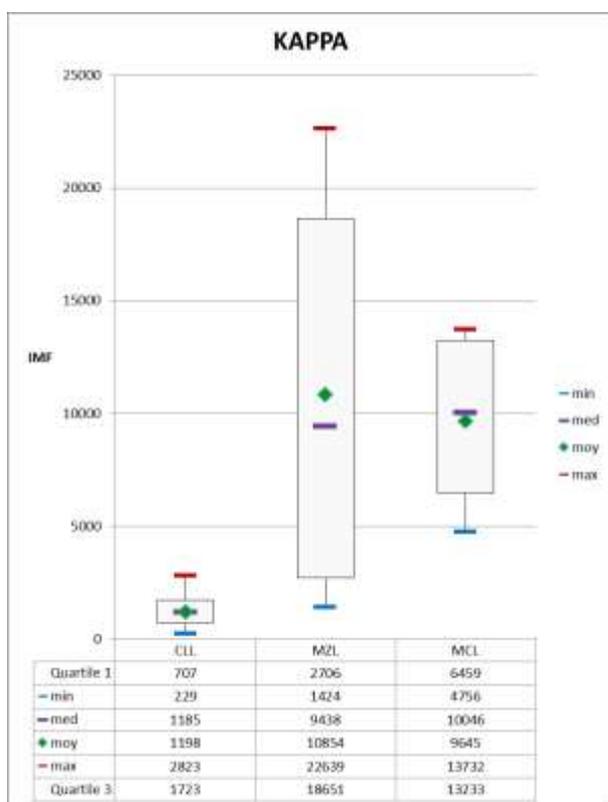
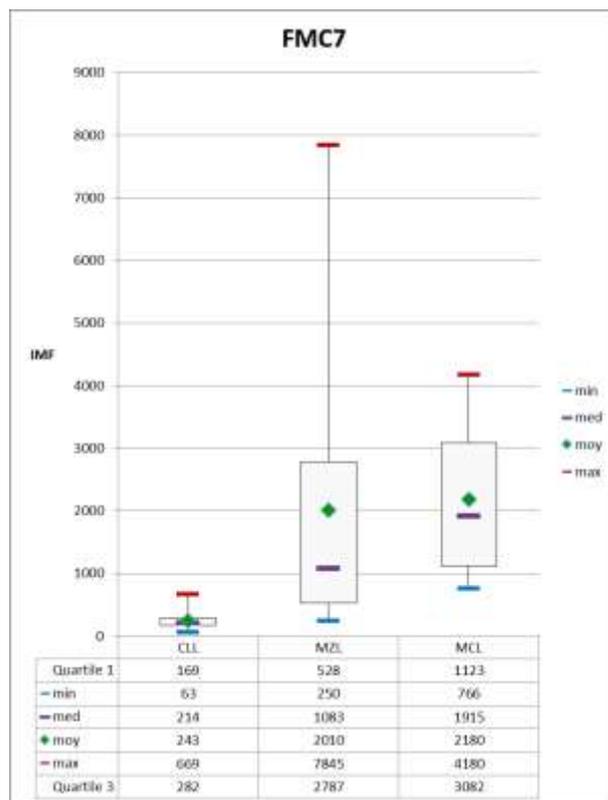
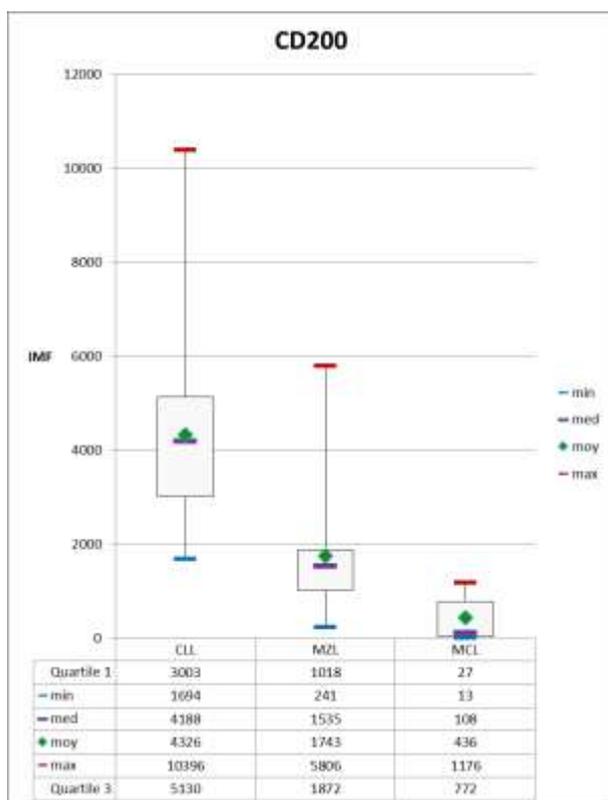
Les IMF recueillies ont été rassemblées sur un tableur (logiciel Microsoft Excel) puis, grâce aux données statistiques descriptives de la partie précédente, nous avons réalisé des diagrammes en boîtes. Un autre type de représentation en histogramme est donnée en annexe 1.

## C. Résultats









Les diagrammes en boîtes ci-dessus montrent plus aisément la dispersion des différents marqueurs en fonction du SLP-B, et permettent de dégager quelques CD plus discriminants. Le CD20 est particulièrement discriminant avec ses valeurs faibles et sa dispersion minimale dans la CLL, contrairement à ses valeurs fortes dans le MCL et MZL (seuil arbitraire à 2500). Le CD5 est plus faible dans le MZL, mais les dispersions sont équivalentes dans la CLL et le MZL. Le CD22 ressemble au profil du CD20, avec une distribution un peu plus étendue; il reste plus fort dans le MZL et intermédiaire dans le MCL. Le CD23 est un peu discriminant en étant plus fort dans la CLL, mais un CD23 négatif n'exclut pas un MCL ou MZL. Les CD25 et CD27 n'ont pas des profils différents en fonction des différents SLP-B. La majorité des MCL ont des CD38 vraiment élevés (>9000) contrairement à la CLL (sachant que toutes les CLL étudiées sont des CLL considérées CD38 positives) et au MZL. Le CD43 est majoritairement positif dans la CLL, mais quand celui-ci est négatif la discrimination avec le MCL et le MZL est faible. Le CD79b est très faible dans la CLL et peut prendre des valeurs très élevées dans le MCL. L'IMF du CD81 est plus forte dans le MCL et dans le MZL par rapport à la CLL.

Concernant les nouveaux marqueurs, globalement le CD148 est plus fortement exprimé dans le MCL, le CD180 plus fortement exprimé dans le MZL et le CD200 plus exprimé dans la CLL. Le CD200 est négatif (ou très faible) au cours des MCL. Mais pour chacun de ces nouveaux marqueurs il existe des zones de chevauchement entre les SLP-B qui peuvent rendre l'interprétation immunophénotypique délicate.

Le MZL et le MCL expriment plus le FMC7 et les chaînes légères par rapport à la CLL.

## **D. Discussion**

La représentation en diagrammes en boîtes permet de dégager les marqueurs les plus discriminants pour l'immunophénotypage des SLP-B.

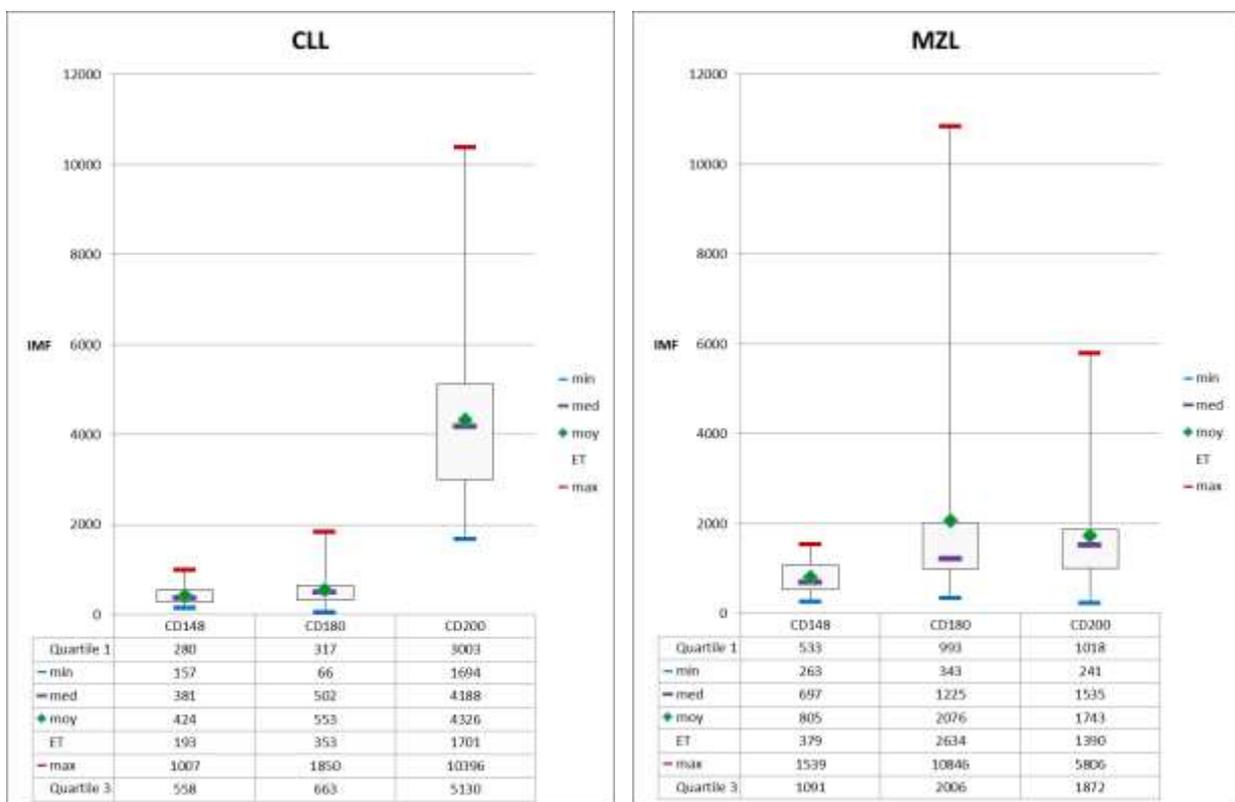
Confirmant notre première interprétation, un CD20 très faible est en faveur d'une CLL car la dispersion du marqueur dans le MCL et dans le MZL ne chevauche pas celle de la CLL<sup>103</sup>. Des valeurs faibles des IMF du CD22, du FMC7, du CD79b, du CD81 et des chaînes légères Kappa ou Lambda sont également en faveur d'une CLL. En effet, leurs distributions

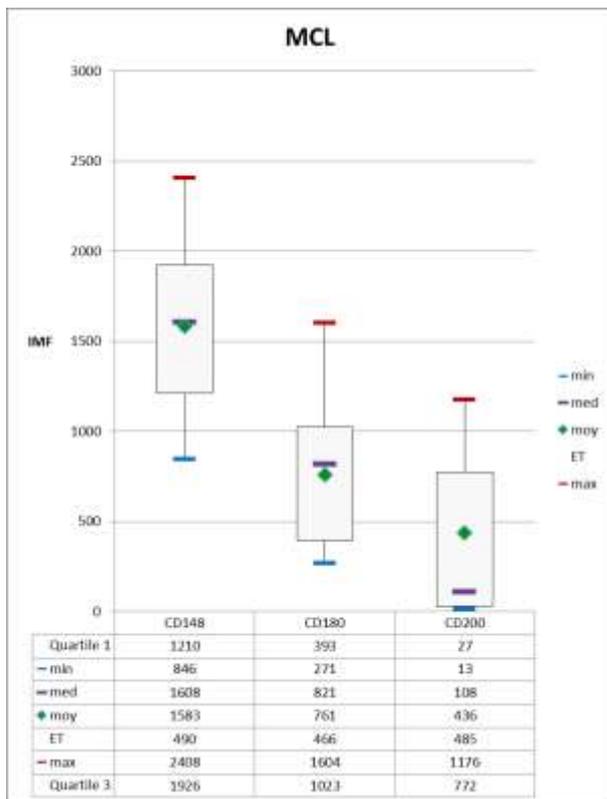
interfèrent peu avec celles du MCL et du MZL. Concernant le CD5, les valeurs des IMF lorsqu'il est positif aident peu pour orienter le diagnostic.

La détermination du CD20 et du CD81 apparaît donc justifiée et utile en plus des marqueurs du score de Matutes. Un CD23 négatif accompagné d'un CD38 très fort est en faveur d'un MCL. Le CD43 positif apporte peu au diagnostic car il peut être également positif dans le MCL et le MZL.

Pour les nouveaux marqueurs, ces diagrammes confortent les hypothèses qu'un CD148 fort est en faveur d'un MCL, un CD180 fort en faveur d'un MZL et un CD200 fort en faveur d'une CLL. Le CD148 faible serait plutôt en faveur d'une CLL ou d'un MZL. Cependant, il existe des zones de chevauchement pour chacun de ces nouveaux marqueurs. Les IMF de moyenne intensité n'apportent pas d'aide au diagnostic, comme par exemple pour un CD148 autour de 1000 ou un CD180 autour de 1600 ou un CD200 autour de 3000 qui ne permettent pas d'exclure un MZL.

Dans le but d'optimiser l'interprétation des nouveaux marqueurs dans la pratique quotidienne, nous avons voulu étudier le profil des trois CD en fonction de chaque entité.





A l'exception des seuils pour le CD180 et le CD200 dans les MZL, nous partageons les seuils (MOY-/+4SD) proposés par l'équipe de Strasbourg<sup>3</sup>, (nous avons exclu l'IMF du CD180 la plus forte (10846)<sup>\*</sup> dans le MZL pour obtenir un seuil positif).

**Tableau 13 : Seuils décisionnels proposés par l'équipe de Strasbourg et seuils de Nancy**

	CD148	CD180	CD200
<b>MCL Strasbourg</b>	>980	<1500	<900
<b>MCL Nancy</b>	>930	<1382	<1082
<b>CLL Strasbourg</b>	<680	<1150	>500
<b>CLL Nancy</b>	<539	<763	>3311
<b>MZL Strasbourg</b>	<1000	>2700	<2200
<b>MZL Nancy</b>	<1210	>532	<3228

La différence de seuils pour le CD200 s'explique par le fait que la série de Strasbourg comporte des aCLL possédant un CD200 plus faible que les CLL scores 4 ou 5 (cohorte de Nancy).

<sup>\*</sup> Par exemple, le patient avec un CD180 dont l'IMF = 10846 est un patient hors CHU de Nancy qui n'a pas bénéficié d'investigations complémentaires, donc son interprétation doit être prise avec précaution d'autant plus que le clone circulant B était de 0,5G/L. Ce patient a été exclu de la partie III Infinicyt.

Selon l'équipe de Strasbourg, ces seuils permettent d'identifier correctement les différentes entités avec des spécificités et des sensibilités décrites dans le tableau 14.

**Tableau 14 : Spécificités et sensibilités pour les seuils proposés par l'équipe de Strasbourg**

	Spécificité	Sensibilité
<b>MCL</b>	96%	65%
<b>CLL</b>	95%	79%
<b>MZL</b>	99%	52%

Pour chacune des trois entités :

- CLL : l'association des trois marqueurs dégage un profil typique avec un CD200 fort et des CD180 et CD148 faibles. Ce type de profil apporte une aide au diagnostic de CLL ;
- MZL : les médianes des IMF des CD180 et CD200 sont pratiquement proches, donc ce n'est qu'en cas de CD180 fort et de CD148 et CD200 faibles que l'immunophénotypage apporte des arguments plus spécifiques en faveur du MZL ;
- MCL : un CD148 fort et un CD200 faible sont spécifiques d'un MCL. Nous vérifions l'hypothèse de l'équipe Strasbourg<sup>88</sup>, tous les MCL ont une IMF du CD148 (MIN=846) supérieur ou égale à deux fois la moyenne des IMF du CD148 des CLL (MOY=424).

Le complément d'investigation apporté par ces trois nouveaux marqueurs, apparait donc très utile par rapport au panel Matutes CD20 positif et CD81, dans l'optique d'un classement immunophénotypique.

Néanmoins, l'interprétation de l'immunophénotypage peut s'avérer complexe dans certains cas. De nouvelles formes d'aide au diagnostic apparaissent sur le marché, notamment des logiciels de retraitement des données de cytométrie qui permettent de mieux comparer les différentes populations clonales entre elles en fonction des marqueurs et d'étudier les marqueurs les plus discriminants. Des bases de données peuvent être créées sur ces logiciels et ainsi orienter le diagnostic des nouveaux immunophénotypes à l'aide de marqueurs discriminants. Nous avons voulu tester le logiciel innovant proposé par BD : INFINICYT (Cytognos SL, Salamanca, Espagne).

## **IV. Exploration des marqueurs du panel SLP-B au moyen du logiciel INFINICYT**

### **A. Objectifs**

Dans le but d'affiner la valeur diagnostique des différents CD du panel SLP-B, nous avons utilisé le logiciel INFINICYT (Cytognos SL, Salamanca, Espagne). Cette approche innovante permet d'étudier la population clonale dans son ensemble et de comparer les différents clones de patients ayant un même diagnostic ou un diagnostic différentiel proche. Ce logiciel propose également des marqueurs discriminants pour comparer les SLP-B. Il permet de se focaliser sur les cellules pathologiques au sein d'un clone lymphocytaire.

### **B. Sélection des échantillons et appareil de mesure**

Les immunophénotypes ont été sélectionnés à partir de l'extraction du système informatique du laboratoire. Afin d'obtenir des résultats précis, nous avons travaillé avec les données issues de diagnostics validés. Les diagnostics de certitude des SLP-B ont été retenus sur les résultats des examens anatomopathologiques et génétiques (translocation t(11;14) pour le MCL) pour les MCL et les MZL ou sur l'anamnèse clinique hématologique. Les CLL ont été sélectionnées par un score de Matutes/Moreau supérieur ou égal à 4.

Nous avons repris les patients de la série précédente et vérifié les diagnostics. Plusieurs patients manquaient de compléments d'analyses en particulier les études anatomopathologiques et/ou moléculaires pour affirmer un diagnostic de certitude (perte de 6 MZL, et de 4 MCL).

Cette sélection d'échantillons nous a permis d'étudier :

- 45 CLL (nombre équivalent au chapitre précédent) ;
- 8 MZL (moins 6 MZL par rapport au chapitre précédent) ;
- 5 MCL (moins 4 MCL par rapport au chapitre précédent).

L'immunophénotypage a été réalisé sur les mêmes cytomètres (FACS CANTO II).

## C. Présentation du logiciel INFINICYT

Le logiciel INFINICYT<sup>104</sup> (Cytognos SL, Salamanca, Espagne) permet l'intégration des données cytométriques à partir de fichier type FCS et l'analyse multidimensionnelle des populations étudiées. Il ouvre un large éventail de possibilités analytiques, tels que la présentation des informations dans de multiples configurations graphiques et de tableaux à partir d'un ou plusieurs échantillons.

Les données peuvent être exploitées sous plusieurs représentations : DotPlots, histogrammes, multidimensionnels, 3D, boîtes à moustaches, bandes de populations, etc...

Le diagramme APS (Automatic Population Separator) réalise une séparation automatique de dimension n des événements, et est capable de séparer clairement la ou les populations étudiées.

Ce logiciel regroupe avec la fonction de fusion les différents échantillons, intègre les informations sur différents prélèvements dans le même fichier de données, et affiche des informations sur l'ensemble de l'immunophénotypage des cellules. Les données mesurées sont fusionnées dans un même fichier « merge » en fonction des CD conjugués avec le même fluorochrome<sup>105</sup>.

La classification automatique des immunophénotypes est possible grâce à la création d'une base de données. Elle combine la puissance de l'APS, l'image de référence et effectue des comparaisons avec les différents groupes préétablis pour donner une indication de classification par la fonction compas. La fonction compas indique avec quelle entité le clone possède le plus de similitudes comme nous l'explique la figure 22.

Grâce à la création de protocole cytométrique d'analyse des populations, l'analyse des données par le logiciel Infinicyt est « non opérateur dépendant ».

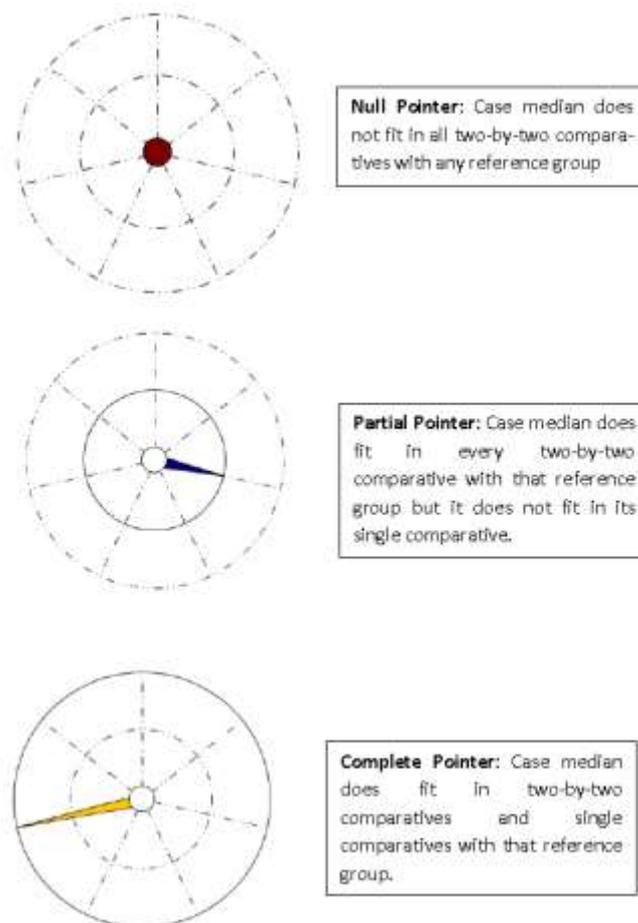


Figure 22 : Interprétation des différents cas de la fonction compas.

#### D. Traitement des données cytométriques

Les informations cytométriques ont été traitées et analysées par le logiciel BDFACSDiva software.

Les données statistiques ont été traitées sur le logiciel Microsoft Excel.

Après la sélection des patients, les dossiers des SLP-B ont été analysés sur le logiciel BDFACSDiva software pour vérifier les compensations et comparer les valeurs des PMT par rapport à la baseline. Nous avons travaillé sur le tube 2 et le tube 1 des du panel d'exploration des SLP-B.

Les données cytométriques ont été analysées sur le logiciel INFINICYT selon le protocole suivant :

- Sélection des lymphocytes totaux sur le Dot Plot SSC/FSC ;
- Sélection des lymphocytes B (CD19+) sur le Dot Plot SSC/CD19 ;
- Sélection du clone pathologique sur le Dot Plot CD19/CD5.

A chaque étape, le logiciel permet de visualiser uniquement la population sélectionnée précédemment. Cette stratégie sélectionne plus précisément le clone en évitant de prendre compte les éléments non lymphocytaires.

Après cette sélection, les données enregistrées concernent uniquement le clone « pathologique ». Le nombre d'évènements a été limité à 2500 pour optimiser la présentation des résultats et éviter l'influence d'un clone avec un grand nombre d'évènements sur un autre ayant peu d'évènements (seuil de pondération arbitrairement choisi).

Tous les clones de même nature leucémique ont été regroupés ensemble formant un « merge »<sup>105</sup> : 1 merge de CLL (n=45), 1 merge de MZL (n=8) et 1 merge de MCL (n=5). Ces trois merges ont été analysés ensemble.

## **E. Résultats**

### **1. Comparaison des IMF entre Diva et Infinicyt**

Afin de vérifier si les IMF obtenues sur Infinicyt correspondent à celles de Diva (et enregistrées sur le SIL Glims), nous avons étudié les médianes de chaque marqueur entre Infinicyt et Diva. Les valeurs de « merge » sont celles obtenues après la comparaison simultanée des trois entités.

Tableau 15 : Comparaison des résultats entre Diva et Infinicyt

	CLL							MZL							MCL						
	n	MIN	MAX	MED	CLL MERGE	MOY	ET	n	MIN	MAX	MED	MZL MERGE	MOY	ET	n	MIN	MAX	MED	MCL MERGE	MOY	ET
<b>CD5 Infinicyt Tube 1</b>	45	543	8890	3490	3240	3955	2045	8	56	2174	258	234	611	739	5	1377	4687	2995	2817	3122	1317
<b>CD5 Infinicyt Tube 2</b>	45	458	9021	3551	3087	3848	2037	8	7	2088	248	215	587	721	5	1346	4876	2968	2818	3159	1363
<b>CD5 Diva</b>	43	453	7561	3052		3400	1765	6	392	7024	1299		2537	2601	6	1281	4562	2747		2931	1193
<b>FMC7 Infinicyt</b>	45	-88	659	214	150	222	142	8	548	8298	1336	873	2566	2934	5	108	9776	4036	2160	3773	3917
<b>FMC7 Diva</b>	31	63	669	214		243	115	14	250	7845	1083		2010	2306	9	766	4180	1915		2180	1324
<b>CD10 Infinicyt</b>	45	-15	59	15	11	15	18	8	-147	307	-7	-12	6	136	5	-130	-1	-48	-48	-56	50
<b>CD19 Infinicyt Tube 1</b>	45	2136	18774	11634	10237	11282	3978	8	8349	27694	17945	16261	18474	6178	5	10349	25009	13485	13378	15276	6092
<b>CD19 Infinicyt Tube 2</b>	45	1989	17584	10575	9896	10764	3823	8	7779	26908	17499	15885	18228	6451	5	10251	23589	12546	13165	14784	5678
<b>CD20 Infinicyt</b>	45	-24	3682	1080	792	1254	766	8	7910	33111	14585	13344	16819	9227	5	7423	35885	19667	16346	19255	11770
<b>CD20 Diva</b>	42	396	2224	977		1091	500	14	2780	33661	12890		15754	9613	9	7654	35425	12899		16626	9391
<b>CD23 Infinicyt</b>	45	601	11982	4193	3101	4993	2900	8	240	2635	525	418	1199	1121	5	162	2358	482	267	792	887
<b>CD23 Diva</b>	45	281	10567	3109		3886	2467	10	350	6763	536		1685	2044	9	292	5574	413		1110	1720
<b>CD25 Infinicyt</b>	45	31	836	295	244	313	164	8	59	562	226	200	287	189	5	24	562	171	149	222	209
<b>CD25 Diva</b>	45	55	757	264		295	157	13	41	603	122		216	202	9	113	751	265		363	213
<b>CD38 Infinicyt</b>	45	-62	10048	234	140	1196	2182	8	315	21979	889	312	3530	7464	5	519	43313	16830	11018	16843	17801
<b>CD38 Diva</b>	15	907	8828	2627		3040	2208	9	510	20048	1016		4267	6243	5	918	41052	12870		16297	15114
<b>CD81 Infinicyt</b>	45	91	621	254	237	288	120	8	-30	2708	1295	937	1215	839	5	335	1558	931	794	996	551
<b>CD81 Diva</b>	45	53	562	231		263	125	14	319	2528	864		998	622	9	612	3570	917		1385	1000
<b>CD148 Infinicyt</b>	45	181	1033	430	372	468	195	8	254	1604	754	739	861	484	5	734	1968	1584	1321	1417	595
<b>CD148 Diva</b>	45	157	1007	381		424	193	14	263	1539	697		805	379	9	846	2408	1608		1583	490
<b>CD180 Infinicyt</b>	45	73	1915	547	453	619	376	8	449	2365	1678	1233	1586	641	5	296	1287	531	418	672	418
<b>CD180 Diva</b>	45	66	1850	502		553	353	14	343	10846	1225		2076	2634	9	271	1604	821		761	466
<b>CD200 Infinicyt</b>	45	2023	11086	4919	4140	4886	1742	8	51	4125	1711	1267	1793	1303	5	23	836	53	48	204	354
<b>CD200 Diva</b>	45	1694	10396	4188		4326	1701	14	241	5806	1535		1743	1390	9	13	1176	108		436	485

Après l'étude de ce tableau, nous pouvons constater que les IMF obtenues sur Infinicyt par rapport à celles de Diva sont peu différentes pour la plupart des marqueurs, notamment pour :

- CD5, FMC7, CD20, CD23, CD25, CD81, CD148, CD180 et le CD200 dans la CLL ;
- FMC7, CD20, CD23, CD25, CD81, CD148, CD180, CD200 dans le MZL ;
- CD5, CD23, CD25, CD38, CD81, CD148, CD180, CD200 dans le MCL.

Cette absence de différence significative renforce la qualité de la retranscription des données sur Infinicyt. Les quelques différences d'IMF observées proviennent de l'extraction à partir de Glims, car seul les marqueurs positifs ont été retranscrits dans le système informatique. Ces différences sont observées notamment pour :

- CD38 dans la CLL (toutes les IMF ont été prises en compte sur Infinicyt, IMF uniquement positives dans Glims) ;
- CD5 dans le MZL (idem) ;
- FMC7 dans le MCL (idem).

Après l'acquisition des données de cytométrie brutes, le logiciel applique les compensations et soustrait au signal de base, le bruit de fond électronique aboutissant à une distribution autour du zéro de la population d'intérêt voire à des IMF négatives. Cette soustraction n'entache pas la qualité des IMF car elles restent comparables à celles obtenues sur Diva. <sup>106</sup>

## **2. Etudes des différents marqueurs à l'aide du logiciel Infinicyt**

Ce logiciel de retraitement des données cytométriques permet une nouvelle approche pour l'étude des SLP-B. Il permet de visualiser l'ensemble de la population lymphocytaire clonale, de la comparer à ces pairs et aux autres SLP-B (diagnostic différentiel en particulier).

Chaque bande dans les figures représente un clone lymphocytaire. Le point central coloré au milieu des bandes de la même couleur correspond à la médiane de merge. Pour chacune des représentations, différentes couleurs ont été attribuées à chaque SLP-B :

- CLL : orange ;
- MZL : bleue ;
- MCL : vert.

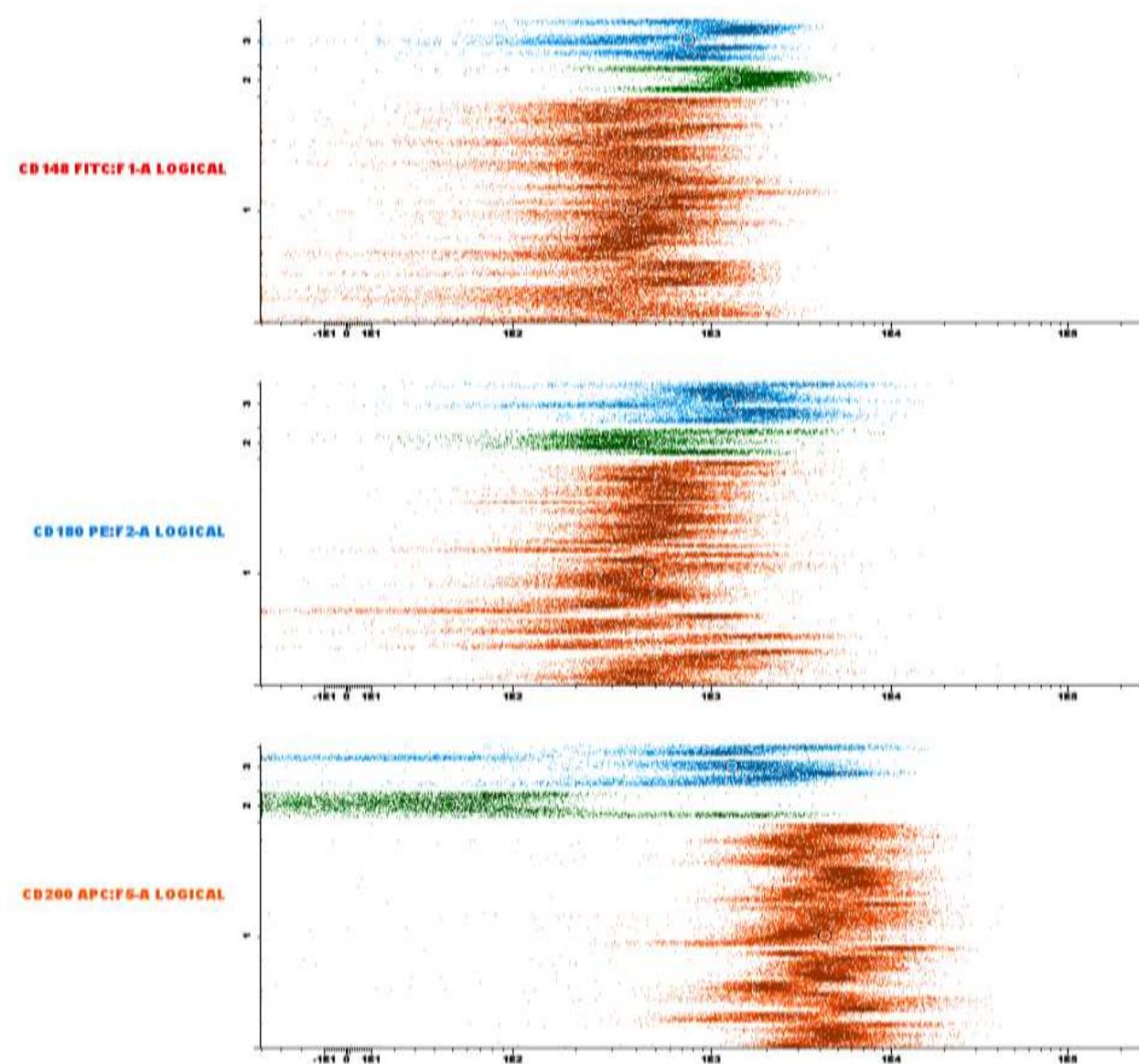


Figure 23 : Expression des marqueurs CD148, CD180 et CD200 dans la CLL, MZL et MCL

La figure 23 représente les nouveaux marqueurs d'intérêt, on constate visuellement que :

- CD148 : la moyenne des IMF des MCL est plus forte que celle des CLL et des MZL, cependant on peut noter que certaines CLL et certains MZL peuvent avoir la même IMF que certains clones MCL. Deux cas de MCL sur cinq semblent s'écarter des autres patients MCL ;

- CD180 : la moyenne des IMF des MZL est plus forte que celle des CLL et des MCL. On distingue un MZL avec une IMF faible, 2 MCL et quelques CLL qui ont une IMF proche de la moyenne des IMF des MZL. Les deux cas de MCL précédemment cités se distinguent également des autres MCL ;
- CD200 : la moyenne des IMF des CLL est plus forte que celle des MCL et des MZL. La moyenne des IMF des MCL est vraiment très faible sauf un MCL qui possède une IMF moyenne. Il s'agit d'ailleurs, là encore, un des deux cas signalés précédemment. La moyenne des IMF des MZL est intermédiaire faible sauf un MZL qui possède une IMF très faible. On remarque également que quelques CLL avec des IMF un peu plus faible que la moyenne générale, se recourent avec certains MZL qui ont un CD200 un peu fort.

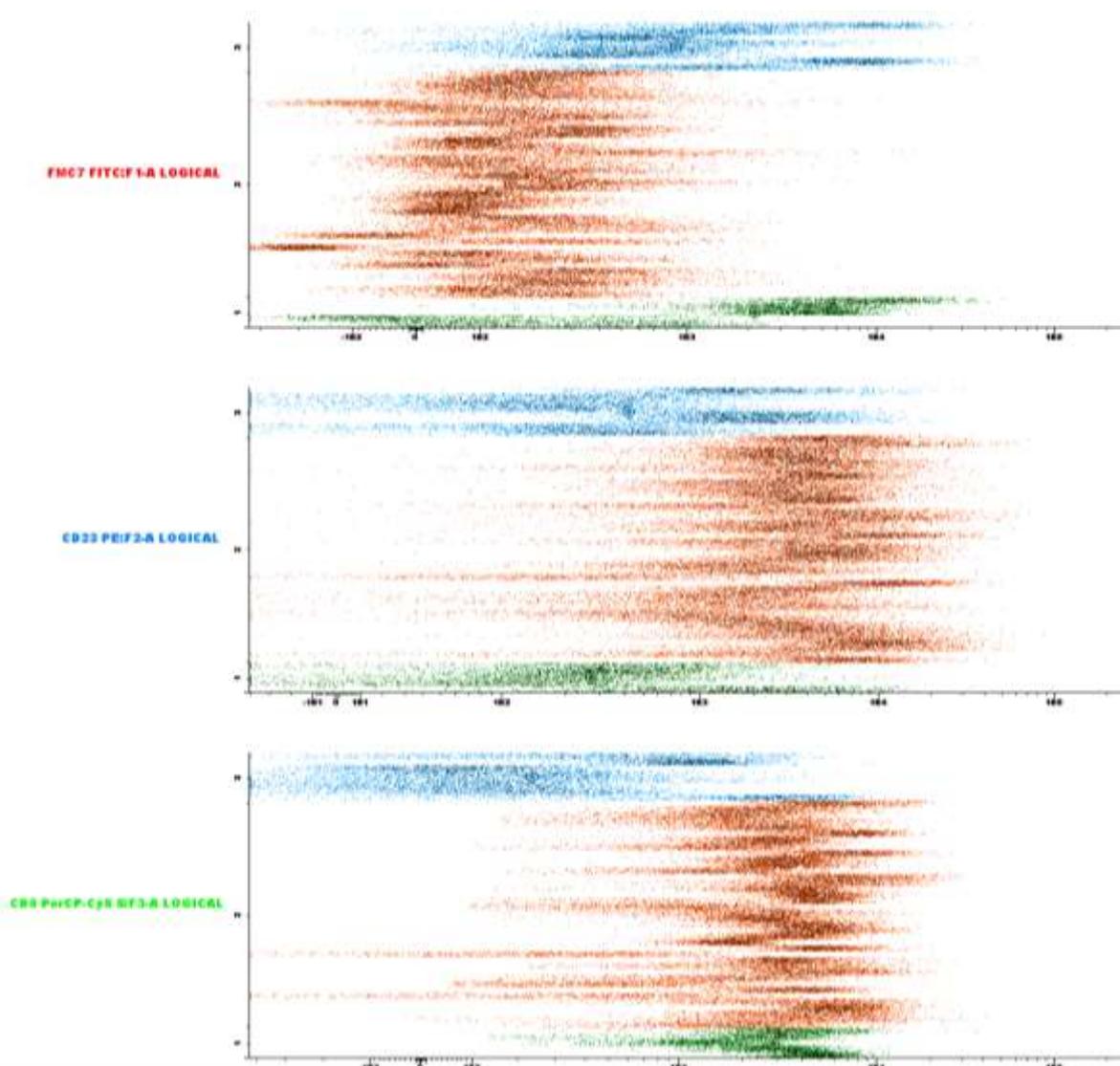


Figure 24 : Expression des marqueurs FMC7, CD23 et CD5 dans la CLL, MZL et MCL

La figure 24 représente les expressions FMC7, du CD23 et du CD5 dans les CLL, les MZL et les MCL :

- FMC7 : les CLL ont une moyenne générale plus faible que les MCL et les MZL. Deux MCL ont des IMF plus faibles qui se rapprochent de la CLL ;
- CD23 : la moyenne du merge de CLL est plus forte que celle des MCL et des MZL, cependant on retrouve un MCL et deux MZL qui ont des IMF proches de la moyenne du merge de CLL ;
- CD5 : la moyenne du merge des CLL et celle du merge des MCL sont proches, et plus fortes que la moyenne des MZL. Les MZL CD5 positifs ont des IMF un peu plus faible que les CLL CD5 positives. On observe une certaine hétérogénéité pour les CLL.

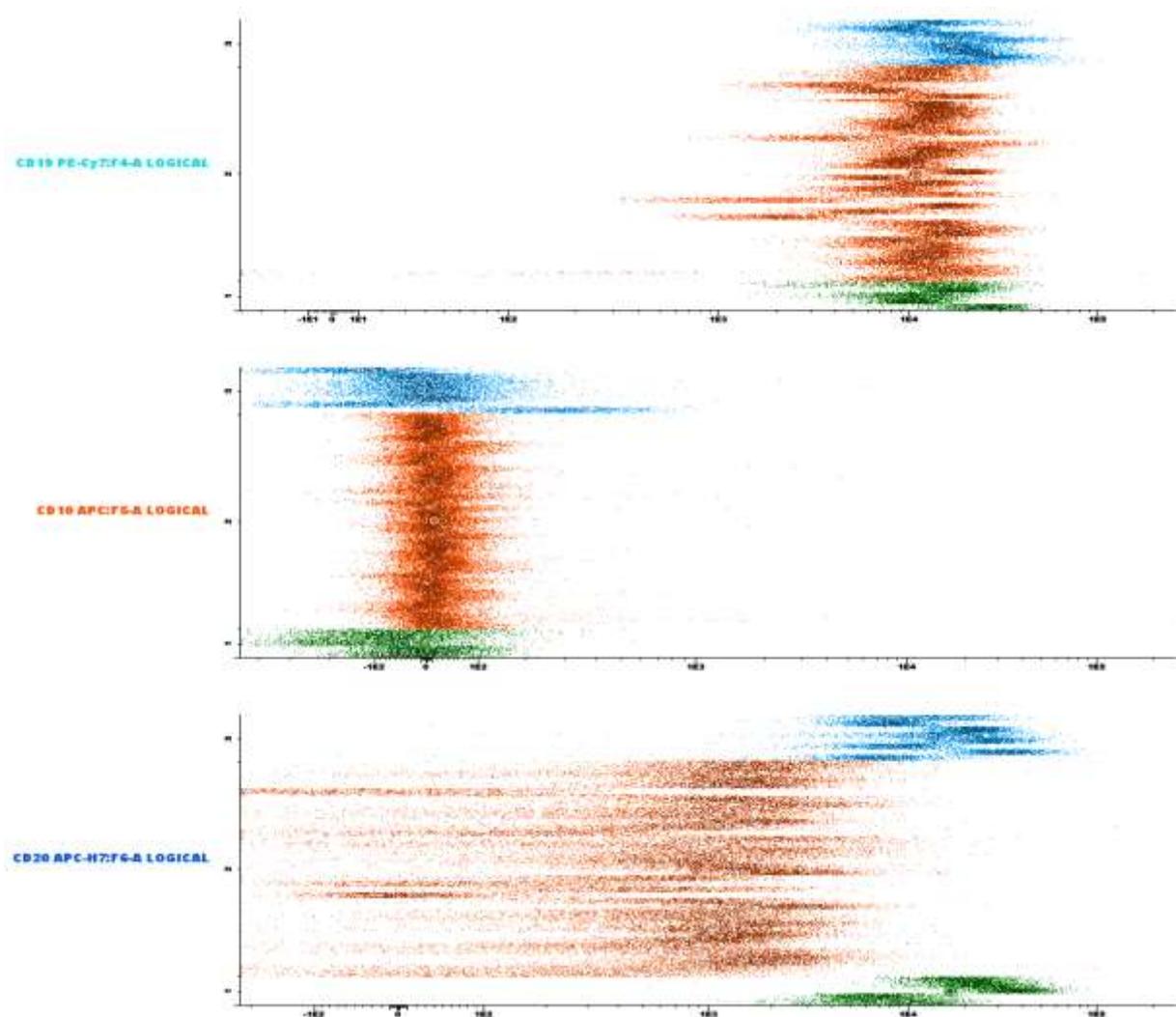


Figure 25 : Expression des marqueurs CD19, CD10 et CD20 dans la CLL, MZL et MCL

La figure 25 nous présente les expressions des marqueurs CD19, CD10 et CD20 :

- CD19 : les moyennes des trois merges sont équivalentes entre les trois SLP-B. Seulement quelques CLL présentent une IMF plus faible que la moyenne ;
- CD10 : le CD10 est très faiblement exprimé au sein des trois entités. Seul un MZL semble présenter une IMF moyenne. L'expression est très homogène pour les CLL ;
- CD20 : la moyenne du merge des CLL est beaucoup plus faible que celle des merges des MCL et MZL qui ont des moyennes fortes et proches.

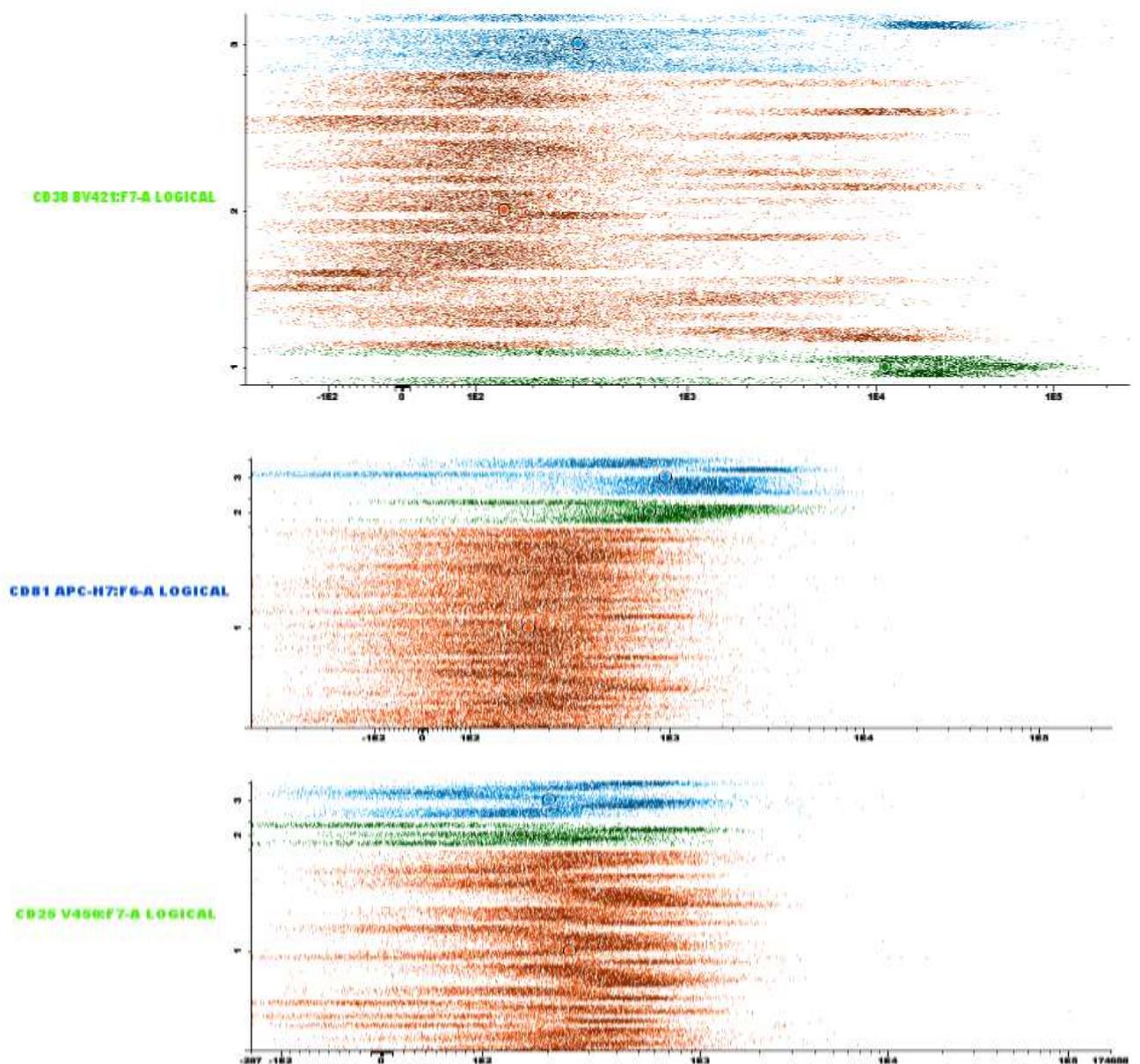


Figure 26 : Expression des marqueurs CD38, CD81 et CD25 dans la CLL, MZL et MCL

La figure 26 permet d'étudier les expressions du CD38, du CD81 et du CD25 :

- CD38 : la moyenne du merge de MCL est plus forte que celle des merges de CLL et de MZL qui ont des moyennes proches. Cette représentation permet de mettre en avant les différentes CLL CD38 positives qui ne sont pas majoritaires au sein du groupe. Par ailleurs, lorsque le CD38 est positif dans le MCL, l'IMF est très forte, en revanche lorsqu'il est négatif, l'IMF se rapproche des CLL CD38 négatives ;
- CD81 : les moyennes des merges de MZL et de MCL sont plus fortes que celle du merge de CLL. Néanmoins, un MCL et un MZL ont des IMF faibles qui se rapprochent de celles des CLL ;
- CD25 : les trois moyennes de merges sont très proches.

## **F. Discussion**

Cette forme de représentation des données de cytométrie permet d'étudier en globalité chacun des trois SLP-B et également d'observer les différents clones atypiques au sein de chaque entité.

Dans la figure 23, on remarque un MZL avec un CD200 très faible possédant une IFM proche des IFM des MCL. Dans le même cas, on observe un MCL avec un CD200 d'intensité faible qui pourrait correspondre à une IFM d'un MZL. Ces deux cas mettent en évidence toute la complexité d'interprétation des immunophénotypages lymphocytaires. Certaines CLL ont des CD200 avec des IMF moyennes, dans ces exemples, l'interprétation des autres marqueurs est alors indispensable pour conclure l'immunophénotypage. Les nouveaux cas atypiques comme ceux précédemment cités devraient essentiellement bénéficier d'une exploration complémentaire afin de valider le diagnostic retenu.

La corrélation entre la présence de lymphocytes villeux et un CD180 très fort mise en évidence par l'équipe de Lyon n'est pas retrouvé dans ce travail. Les deux MZL (MZL4 et MZL7) ayant des lymphocytes villeux n'ont pas de CD180 plus fort que les autres MZL. Cependant, aucun de nos patients MZL n'a eu d'histologie de la rate permettant de mettre en évidence un SRPL.

Dans la figure 24, le FMC7 apparait comme un marqueur discriminant car des IMF supérieures à 1000 semblent exclure une CLL (même quand le FMC7 est positif dans la CLL). Le CD23 et le CD5 sont moins discriminants, car les MZL ou les MCL CD23 positifs ou CD5 positifs ont des IMF proches des CD23 positifs ou CD5 positifs des CLL<sup>107</sup>. On remarque que peu de MCL et MZL sont CD23 positif ce qui correspond aux données de la littérature.

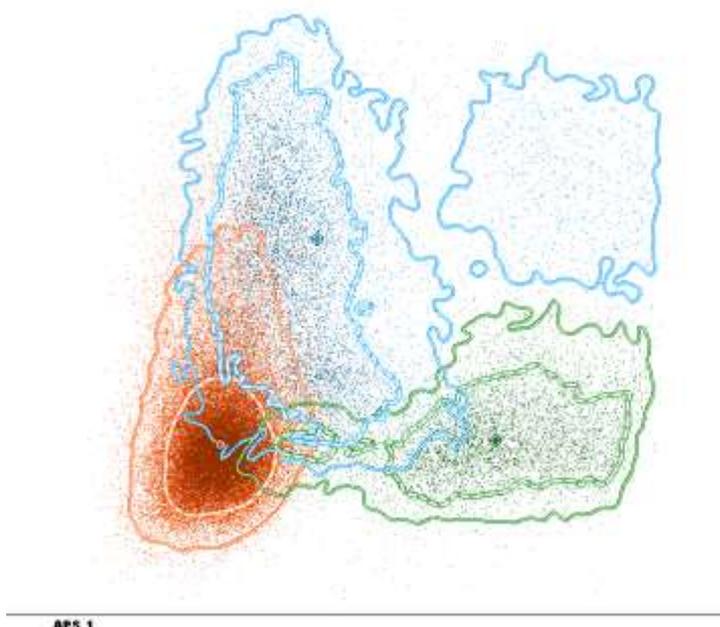
Concernant les marqueurs de la figure 25, seul le CD20 apparait comme un marqueur discriminant, en effet les médianes des merges des trois entités sont équivalentes pour le CD19 et le CD10. En revanche, les médianes des merges des MCL et des MZL pour le CD20 sont bien différentes de la médiane du merge des CLL. Cette représentation ne montre pas de chevauchement entre les différentes entités. Un CD20 avec une IMF supérieure à 3700 n'est pas en faveur d'une CLL.

Dans la figure 26, le CD38 apparait comme un marqueur discriminant lorsque son intensité est très forte (>15000) et serait en faveur d'un MCL, cependant certains MZL ont des IMF élevées, donc l'interprétation des autres marqueurs est indispensable (CD5, CD148, CD180 par exemple) pour différencier les deux entités. On peut inversement s'interroger sur les deux cas de MCL avec une IMF CD38 faible. Les MCL CD38 positif ne sont pas tous corrélés à un syndrome tumoral (présence d'adénopathies) pour notre série, car le MCL 5 a un CD38 négatif et présente un syndrome tumoral, ce qui est moins concordant aux données de la littérature (référence tableau 9 partie I). Les IMF moyennes des trois entités sont proches pour le CD81 ainsi que le CD25. Ces deux marqueurs n'apparaissent pas être discriminants.

Différentes représentations sont possibles avec le logiciel INFICYT, notamment le diagramme APS (basé sur l'Analyse en Composantes Principales<sup>108</sup>) qui effectue une séparation automatique des populations en fonction des CD les plus discriminants. Ce diagramme est très utile lors du développement de nouveaux anticorps et permet une séparation optimale des événements. Les CD les plus utiles pour la séparation et donc les plus discriminants sont donnés en pourcentage par ordre décroissant. Le logiciel propose plusieurs représentations APS mais généralement les deux premiers diagrammes sont les plus intéressants.

Le principe du diagramme APS est de séparer avec le plus de CD différents les populations étudiées dans le but de mieux les caractériser. Cette représentation est très utile lorsque l'on travaille avec plusieurs marqueurs. L'APS utilise tous les paramètres de la population et propose la meilleure séparation des événements.

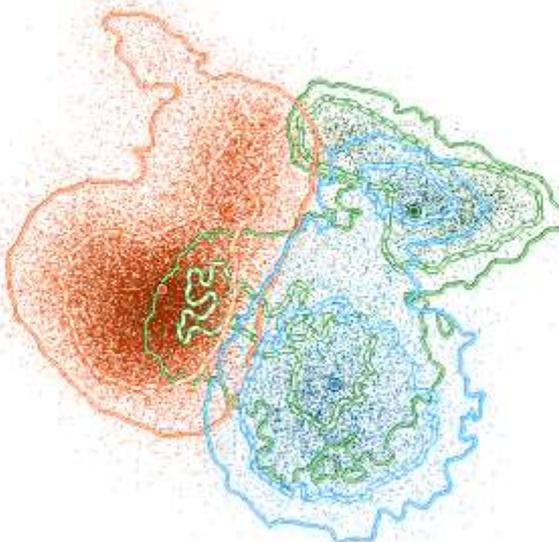
Ces représentations affichent les chevauchements entre les trois entités, les contours donnent les écarts types (1SD ; 2SD) par rapport à la moyenne des merges. Les statistiques de l'APS représentent le pourcentage du potentiel séparateur de chaque marqueur.



**Figure 27 : Représentation APS tube 2 avec CD148, CD180, CD200, CD5, CD81, CD25, CD19 et CD45**

**Tableau 16 : Statistiques APS tube 2**

PC1		PC2	
Paramètres	Signification	Paramètres	Signification
CD200 APC:F5	35.18	CD5 PerCP-Cy5 5:F3	39.33
CD5 PerCP-Cy5 5:F3	23.38	CD148 FITC:F1	18.37
CD81 APC-H7:F6	18.97	CD200 APC:F5	17.82
CD25 V450:F7	8.03	CD81 APC-H7:F6	10.98
CD148 FITC:F1	6.61	CD45 V500:F8	4.51
CD180 PE:F2	4.78	CD180 PE:F2	4.03
CD19 PE-Cy7:F4	2.11	CD25 V450:F7	3.19
CD45 V500:F8	0.94	CD19 PE-Cy7:F4	1.77



APS 1

Figure 28 : Représentation APS tube 1 avec CD20, CD38, FMC7, CD23, CD5, CD10, CD19, CD45

Tableau 17 : Statistiques APS tube 1

PC1		PC2	
Paramètres	Signification	Paramètres	Signification
CD20 APC-H7:F6	26.32	CD38 BV421:F7	41.14
CD38 BV421:F7	23.39	CD5 PerCP-Cy5 5:F3	22.32
FMC7 FITC:F1	18.26	CD20 APC-H7:F6	18.39
CD23 PE:F2	14.10	FMC7 FITC:F1	12.04
CD5 PerCP-Cy5 5:F3	9.58	CD23 PE:F2	2.94
CD19 PE-Cy7:F4	3.27	CD10 APC:F5	1.13
CD45 V500:F8	2.80	CD19 PE-Cy7:F4	1.04
CD10 APC:F5	2.29	CD45 V500:F8	0.99

Ces deux diagrammes mettent en avant les marqueurs les plus discriminants par tube pour différencier les trois entités. Les CD200, CD5, CD81 et CD148 semblent les plus discriminants pour le tube 2 avec des pourcentages supérieurs à 10% (ce seuil est arbitraire et n'a pas encore fait l'objet d'une validation scientifique). Les CD20, CD38, FMC7, et CD23 semblent les plus discriminants pour le tube 1.



L'utilisation de la base de données requiert une standardisation des protocoles de cytométrie (méthode d'analyse). L'utilisation des billes C&ST, la vérification des compensations, la standardisation de l'analyse des clones lymphocytaires sur INFINCYT (même masque, même nombre d'évènements cytométriques par clone) a permis localement la création de cette base de données. Pour le moment, elle a été conçue par tube d'analyse uniquement. Elle n'est actuellement pas utilisée en routine au laboratoire d'hématologie. Des formations sur le logiciel sont programmées pour la fin d'année 2015, début 2016 pour l'utilisation quotidienne dans l'interprétation des immunophénotypes.

Cette base de données n'est qu'une aide au diagnostic et ne remplace en aucun cas l'expérience de l'interprétation quotidienne des immunophénotypes. Cependant, elle permet de détecter rapidement les expressions atypiques de marqueurs pour un diagnostic pressenti, permettant d'avertir le clinicien référent sur le caractère inhabituel du phénotype de son patient. A l'avenir, l'interprétation du phénotype des SLP-B pourrait être effectuée à partir de ce logiciel permettant d'exploiter au plus près les données des cellules pathologiques « clonales ».

## **CONCLUSION**

L'immunophénotypage a une place prépondérante dans la démarche diagnostique des SLP-B. Il apporte des informations diagnostiques dans un délai court, mais doit être associé à l'étude cytologique du clone lymphocytaire.

L'étude des médianes des différents marqueurs du panel des SLP-B du CHU de Nancy établit des valeurs de référence qui sont une aide lors de l'interprétation et la validation des immunophénotypes au sein du laboratoire. Quelques CD montrent déjà un potentiel discriminant intéressant comme le CD20 et le CD79b qui ont des IMF très faible dans la CLL avec des effets seuils vis-à-vis du MZL et du MCL.

La distribution des marqueurs confirment les observations précédentes et montrent également d'autres marqueurs intéressants, comme le CD38 très fort dans le MCL, le CD22 faible dans la CLL, le CD81 fort dans le MZL et dans le MCL, l'expression forte des chaînes légères dans le MZL et dans le MCL. Les résultats de l'étude des nouveaux marqueurs (CD148, CD180 et CD200) concordent avec les seuils proposés par l'équipe de Strasbourg. Cette concordance fait suite à la standardisation des cytomètres de chaque centre via l'utilisation des billes C&ST. Le profil du MCL montre un CD148 fort, un CD180 faible et un CD200 très faible. La CLL est caractérisée par un CD200 fort et des CD180 et des CD148 faibles. Le MZL se distingue par un CD180 fort accompagné d'un CD200 et d'un CD148 faibles. Cependant, ce travail montre un chevauchement entre les trois marqueurs pour chaque entité et nécessite l'étude de marqueurs complémentaires. Ces nouveaux marqueurs sont davantage utilisés en complément dans les cas atypiques.

Le logiciel innovant INFINICYT permet une nouvelle approche dans l'étude des données cytométriques par ses fonctions et ses nombreuses représentations graphiques. La comparaison des populations clonales issues des différentes entités met en avant les cas atypiques de chacune. L'APS propose les marqueurs les plus discriminants au sein de chaque SLP-B. La base de données apporte une aide au biologiste dans la validation de l'immunophénotypage.

Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre ce travail en agrémentant la base de données. Il pourrait être réalisé un merge des quatre tubes du panel SLP-B afin de créer un fichier cytométrique unique grâce à la standardisation quotidienne des deux cytomètres. Ces fichiers issus des différentes entités seraient comparables entre eux et pourraient être inclus dans une base de données. Ce projet est déjà en cours de préparation par EUROFLOW. En effet, EUROFLOW souhaite créer une base de données nationale qui pourrait être utilisée par les centres adhérents. Une réflexion est en cours au sein du laboratoire.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Struski, S. *et al.* Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* **23**, 617–619 (2008).
2. Struski, S. *et al.* [A cytological, immunophenotypical and cytogenetical study of 136 consecutive cases of B-cell chronic lymphoid hemopathies]. *Pathol. Biol. (Paris)* **55**, 59–72 (2007).
3. Miguet, L. *et al.* Interest of the CD148, CD180 and CD200 Combination in Flow Cytometry Analyses for Mature B-Cell Neoplasms Diagnosis. *Blood* **124**, 5407–5407 (2014).
4. Küppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 251–262 (2005).
5. Lenz, G. & Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1417–1429 (2010).
6. Swerdlow, H. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* (2008).
7. Nabhan, C. & Rosen, S. T. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA* **312**, 2265–2276 (2014).
8. Baseggio, L. & Felman, P. Diagnostic des lymphocytoses hors LLC-typique. *Rev. Francoph. Lab.* **43**, 93–102 (2013).
9. Eclache, V. & Baran-Marszak, F. Intérêt de la cytogénétique et de la biologie moléculaire pour le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs B. *Rev. Francoph. Lab.* **43**, 49–59 (2013).
10. Cymbalist, F. LLC: physiopathologie, diagnostic et approche thérapeutique. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 61–71 (2013).
11. Troussard, X. Nouveautés sur les hémopathies lymphoïdes chroniques B matures. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **28**, 174–182 (2013).
12. Le Guill, S. Le lymphome à cellules du manteau : du diagnostic aux perspectives thérapeutiques. *Rev. Médecine Interne* **31**, 615–620 (2010).
13. Sébahoun, G. *Cahier de Formation BIOFORMA : Les lymphomes.* (2010).
14. Zhang, L.-N. *et al.* Polyclonal antibody targeting SOX11 cannot differentiate mantle cell lymphoma from B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **140**, 795–800 (2013).

15. Sarkozy, C. *et al.* Complex karyotype in mantle cell lymphoma is a strong prognostic factor for the time to treatment and overall survival, independent of the MCL international prognostic index. *Genes. Chromosomes Cancer* **53**, 106–116 (2014).
16. Traverse-Glehen, A. *et al.* Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discov. Med.* **13**, 253–265 (2012).
17. Matutes, E. *et al.* Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* **22**, 487–495 (2007).
18. Troussard, X., Belmekki, A., Malet, M. & Cornet, E. Étude des hémopathies malignes avec cellules chevelues. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 83–91 (2013).
19. Cornet, E. *et al.* Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann. Hematol.* **93**, 1977–1983 (2014).
20. Kridel, R., Sehn, L. H. & Gascoyne, R. D. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J. Clin. Invest.* **122**, 3424–3431 (2012).
21. Dungarwalla, M., Matutes, E. & Dearden, C. E. Polymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: a state-of-the-art paper. *Eur. J. Haematol.* **80**, 469–476 (2008).
22. Nguyen-Khac, F. Leucémie polymphocytaire B. *Rev. Francoph. Lab.* **2006**, 45–47 (2006).
23. Nguyen-Khac. La leucémie polymphocytaire B. *Horiz. Hémato* **04**, 127 (2014).
24. Leblond, V., Maloum, K., Garff-Tavernier, M. L., Davi, F. & Nguyen-Khac, F. La maladie de Waldenström ou macroglobulinémie. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 73–82 (2013).
25. McMaster, M. L. *et al.* Long-term evaluation of three multiple-case Waldenstrom macroglobulinemia families. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 5063–5069 (2007).
26. De Tute, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology* **58**, 90–105 (2011).
27. Jouault, H. & Imbert, M. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. *Rev. Fr. Lab.* **1995**, 29–35 (1995).
28. Ronot, X., Grunwald, D., Mayol, J.-F. & Botonnat, J. *La cytométrie en flux.* (LAVOISIER, 2006).
29. Merle-Béral, H. & Le Garff-Tavernier, M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. *EMC - Hématologie* **3**, 1–12 (2008).

30. Roederer, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* **45**, 194–205 (2001).
31. Roederer, M. *et al.* 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry* **29**, 328–339 (1997).
32. Costopoulos & Le Garff-Tavernier. Immunophénotypage lymphocytaire dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques. *Elsevier Masson* (2013).
33. Craig, F. E. Flow Cytometric Evaluation of B-cell Lymphoid Neoplasms. *Clin. Lab. Med.* **27**, 487–512 (2007).
34. Béné, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* **25**, 567–574 (2011).
35. Craig, F. E. & Foon, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* **111**, 3941–3967 (2008).
36. Wood, B. L. *et al.* 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin. Cytom.* **72B**, S14–S22 (2007).
37. Matutes, E. *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* **8**, 1640–1645 (1994).
38. Moreau, E. J. *et al.* Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* **108**, 378–382 (1997).
39. E, M. *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* **8**, 1640–1645 (1994).
40. Matutes, E., Attygalle, A., Wotherspoon, A. & Catovsky, D. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 3–20 (2010).
41. Garff-Tavernier, M. L., Costopoulos, M. & Merle-Béral, H. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. *Rev. Francoph. Lab.* **43**, 37–48 (2013).
42. Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446–5456 (2008).
43. Asplund, S. L., McKenna, R. W., Doolittle, J. E. & Kroft, S. H. CD5-positive B-cell neoplasms of indeterminate immunophenotype: a clinicopathologic analysis of 26 cases.

- Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* **13**, 311–317 (2005).
44. Criel, A. *et al.* Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br. J. Haematol.* **97**, 383–391 (1997).
  45. Kampalath, B., Barcos, M. P. & Stewart, C. Phenotypic Heterogeneity of B Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**, 824–832 (2003).
  46. Van Bockstaele, F., Verhasselt, B. & Philippé, J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Rev.* **23**, 25–47 (2009).
  47. Sarfati, M. *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **88**, 4259–4264 (1996).
  48. Gao, J., Peterson, L., Nelson, B., Goolsby, C. & Chen, Y.-H. Immunophenotypic Variations in Mantle Cell Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **132**, 699–706 (2009).
  49. Boyd, S. D., Natkunam, Y., Allen, J. R. & Warnke, R. A. Selective immunophenotyping for diagnosis of B-cell neoplasms: immunohistochemistry and flow cytometry strategies and results. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* **21**, 116–131 (2013).
  50. Elnenaï, M. O. *et al.* Cyclin D1 by flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. *Leuk. Res.* **25**, 115–123 (2001).
  51. Meyerson, H. J. *et al.* D cyclins in CD5+ B-cell lymphoproliferative disorders: cyclin D1 and cyclin D2 identify diagnostic groups and cyclin D1 correlates with ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 241–250 (2006).
  52. Ho, A. K. *et al.* Small B-cell neoplasms with typical mantle cell lymphoma immunophenotypes often include chronic lymphocytic leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 27–32 (2009).
  53. Baseggio, L. *et al.* CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* **95**, 604–612 (2010).
  54. Velden, V. H. J. van der *et al.* B-cell prolymphocytic leukemia: a specific subgroup of mantle cell lymphoma. *Blood* **124**, 412–419 (2014).
  55. Hercher, C. *et al.* A Multicentric Study of 41 Cases of B-Prolymphocytic Leukemia: Two Evolutive Forms: The Groupe Français d'Hématologie Cellulaire. *Leuk. Lymphoma* **42**, 981–987 (2001).

56. Morice, W. G. *et al.* Predictive Value of Blood and Bone Marrow Flow Cytometry in B-Cell Lymphoma Classification: Comparative Analysis of Flow Cytometry and Tissue Biopsy in 252 Patients. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 776–785 (2008).
57. Matutes, E. *et al.* The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk. Lymphoma* **14 Suppl 1**, 57–61 (1993).
58. Shao, H. *et al.* Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. *Leuk. Res.* **37**, 401–409 (2013).
59. Del Giudice, I. *et al.* The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica* **89**, 303–308 (2004).
60. Chen, Y.-H., Tallman, M. S., Goolsby, C. & Peterson, L. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 251–259 (2006).
61. Dong, H. Y., Weisberger, J., Liu, Z. & Tugulea, S. Immunophenotypic Analysis of CD103+ B-Lymphoproliferative Disorders: Hairy Cell Leukemia and Its Mimics. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 586–595 (2009).
62. Kanellis, G. *et al.* Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica* **95**, 1122–1129 (2010).
63. Baseggio, L. *et al.* Relevance of a scoring system including CD11c expression in the identification of splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SRPL). *Hematol. Oncol.* **29**, 47–51 (2011).
64. Lin, P. & Medeiros, L. J. Lymphoplasmacytic lymphoma/waldenstrom macroglobulinemia: an evolving concept. *Adv. Anat. Pathol.* **12**, 246–255 (2005).
65. Actualités sur la maladie de Waldenström. *Rev. Médecine Interne* **34**, Supplement 2, A6–A10 (2013).
66. Pangalis, G. A. *et al.* Differential Diagnosis of Waldenström’s Macroglobulinemia and Other B-Cell Disorders. *Clin. Lymphoma* **5**, 235–240 (2005).
67. Hunter, Z. R. *et al.* CD5, CD10, and CD23 Expression in Waldenström’s Macroglobulinemia. *Clin. Lymphoma* **5**, 246–249 (2005).
68. Poulain, S. *et al.* Macroglobulinémie de Waldenström. *Rev. Médecine Interne* **31**, 385–394 (2010).
69. Traverse-Glehen, A. *et al.* Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood* **111**, 2253–2260 (2008).

70. Sharpe, R. W. & Bethel, K. J. Hairy cell leukemia: diagnostic pathology. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **20**, 1023–1049 (2006).
71. Cessna, M. H., Hartung, L., Tripp, S., Perkins, S. L. & Bahler, D. W. Hairy cell leukemia variant: fact or fiction. *Am. J. Clin. Pathol.* **123**, 132–138 (2005).
72. Dunphy, C. H. & Petruska, P. J. Atypical prolymphocytic variant of hairy-cell leukemia: case report and review of the literature. *Am. J. Hematol.* **53**, 121–125 (1996).
73. Goodman, G. R., Bethel, K. J. & Saven, A. Hairy cell leukemia: an update. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 258–266 (2003).
74. Matutes, E. Immunophenotyping and differential diagnosis of hairy cell leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **20**, 1051–1063 (2006).
75. San Miguel, J. F. *et al.* Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 187–195 (2003).
76. Konoplev, S., Medeiros, L. J., Bueso-Ramos, C. E., Jorgensen, J. L. & Lin, P. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 414–420 (2005).
77. Liu, Z. *et al.* CD5– Mantle Cell Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**, 216–224 (2002).
78. Matutes, E., Wotherspoon, A., Brito-Babapulle, V. & Catovsky, D. The natural history and clinico-pathological features of the variant form of hairy cell leukemia. *Leukemia* **15**, 184–186 (2001).
79. Medd, P. G. *et al.* A novel scoring system combining expression of CD23, CD20, and CD38 with platelet count predicts for the presence of the t(11;14) translocation of mantle cell lymphoma. *Cytometry B Clin. Cytom.* **80**, 230–237 (2011).
80. Venkataraman, G., Aguhar, C., Kreitman, R. J., Yuan, C. M. & Stetler-Stevenson, M. Characteristic CD103 and CD123 Expression Pattern Defines Hairy Cell Leukemia: Usefulness of CD123 and CD103 in the Diagnosis of Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* **136**, 625–630 (2011).
81. Muñoz, L. *et al.* Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* **86**, 1261–1269 (2001).
82. Dürig, J. *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **16**, 30–35 (2002).
83. Ibrahim, S. *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181–186 (2001).

84. Visentin, A. *et al.* Integrated CLL Scoring System, a New and Simple Index to Predict Time to Treatment and Overall Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* doi:10.1016/j.clml.2015.06.001
85. Eisele, L., Haddad, T., Sellmann, L., Dührsen, U. & Dürig, J. Expression levels of CD38 on leukemic B cells but not on non-leukemic T cells are comparably stable over time and predict the course of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* **33**, 775–778 (2009).
86. Orchard, J. *et al.* A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* **101**, 4975–4981 (2003).
87. Espinet, B. *et al.* Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1007–1019 (2014).
88. Miguet, L. *et al.* Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J. Proteome Res.* **8**, 3346–3354 (2009).
89. Lesesve, J.-F. *et al.* Combination of CD160 and CD200 as a useful tool for differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Int. J. Lab. Hematol.* (2015).
90. Serrier, C. *Expression de la molécule CD5 dans une série de patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique.* (2012).
91. Frotscher, B., Lesesve JF., Bene MC., Feugier, P. & De Carvalho Bittencourt, M. Differential and tumor-specific expression of CD160 and CD200 in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Blood e-letter* (2012).
92. De la Fuente-García, M. A. *et al.* CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood* **91**, 2800–2809 (1998).
93. Porakishvili, N. *et al.* Differential expression of CD 180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br. J. Haematol.* **131**, 313–319 (2005).
94. Miguet, L. *et al.* Cell-surface expression of the TLR homolog CD180 in circulating cells from splenic and nodal marginal zone lymphomas. *Leukemia* **27**, 1748–1750 (2013).
95. Tardy, S. *Évaluation des marqueurs CD160 et CD200 pour le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs B chroniques.* (Université de Lorraine, 2012).

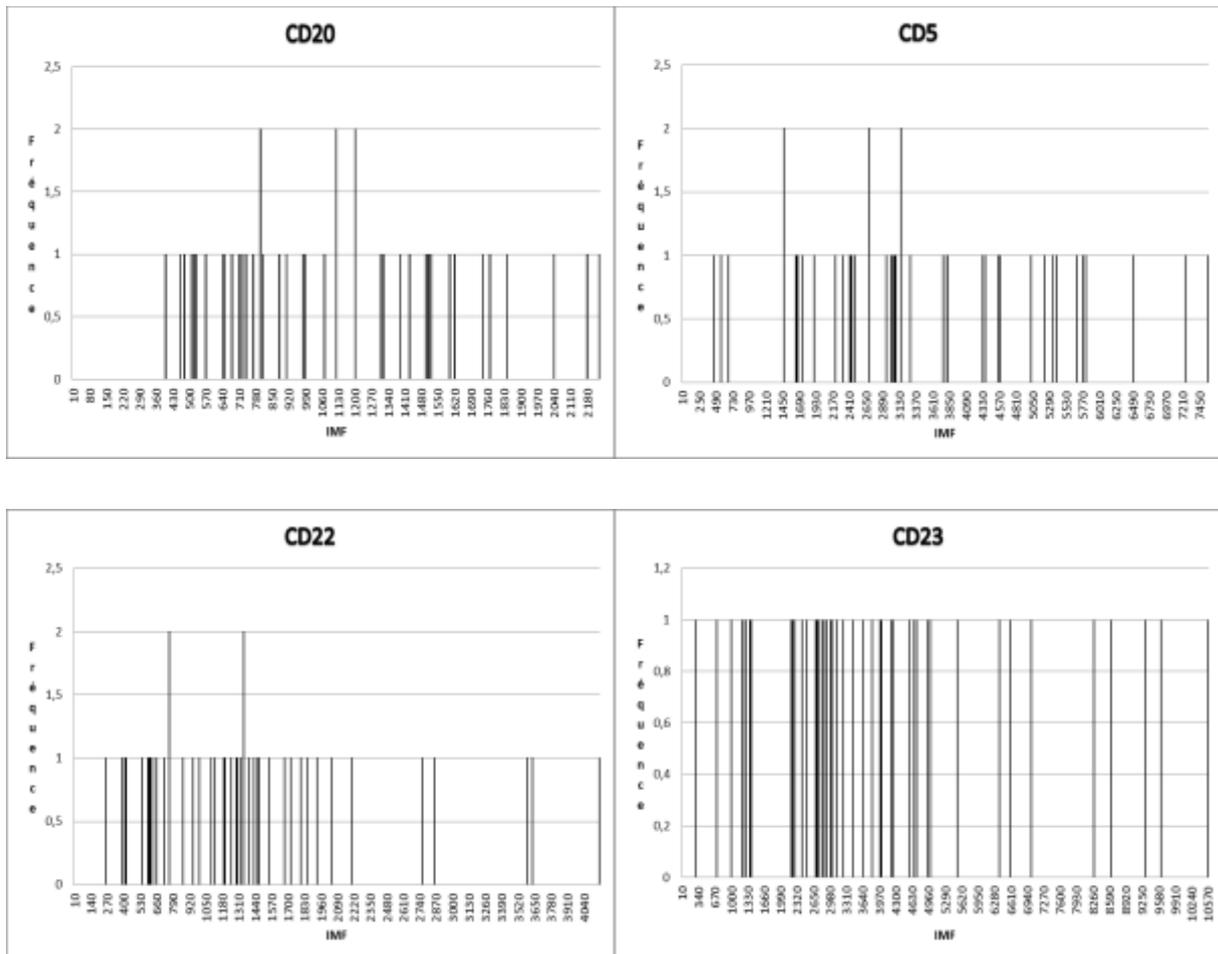
96. Palumbo, G. A. *et al.* CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* **33**, 1212–1216 (2009).
97. Pillai, V. *et al.* CD200 Flow Cytometric Assessment and Semiquantitative Immunohistochemical Staining Distinguishes Hairy Cell Leukemia From Hairy Cell Leukemia-Variant and Other B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* **140**, 536–543 (2013).
98. Sandes, A. F. *et al.* CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* **86**, 98–105 (2014).
99. Fan, L. *et al.* Expression patterns of CD200 and CD148 in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders and their potential value in differential diagnosis. *Leuk. Lymphoma* 1–29 (2015).
100. Kalina, T. *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* **26**, 1986–2010 (2012).
101. Van Dongen, J. J. M. & Orfao, A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* **26**, 1899–1907 (2012).
102. Poncelet, P. Microbilles et cytométrie : comment et pourquoi introduire la « -métrie » dans l'immuno-cytométrie ? *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **62**, 53–57 (2004).
103. Ginaldi, L. *et al.* Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J. Clin. Pathol.* **51**, 364–369 (1998).
104. Cytognos S.L. INFINICYT Users Manual. at <www.infinicyt.com>
105. Pedreira, C. E. *et al.* Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A* **73A**, 834–846 (2008).
106. Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A. & Parks, D. R. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat. Immunol.* **7**, 681–685 (2006).
107. Challagundla, P. *et al.* Utility of Quantitative Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis of CD5 Expression in Small B-Cell Neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, 903–909 (2014).
108. Jolliffe, I. in *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (eds. Balakrishnan, N. *et al.*) (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).

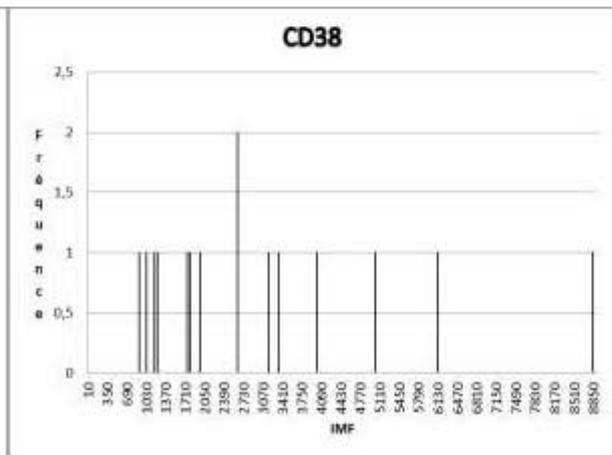
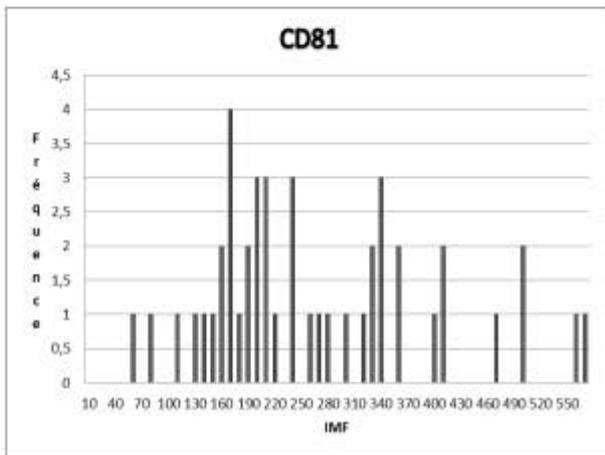
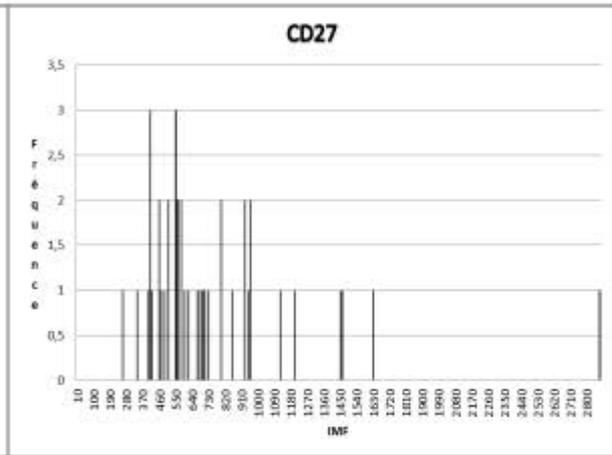
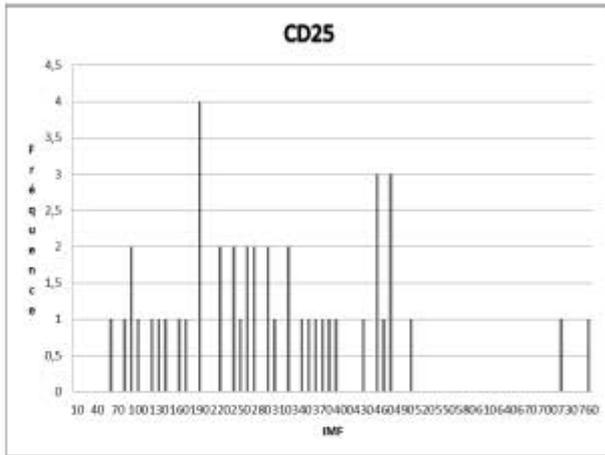
# ANNEXE 1

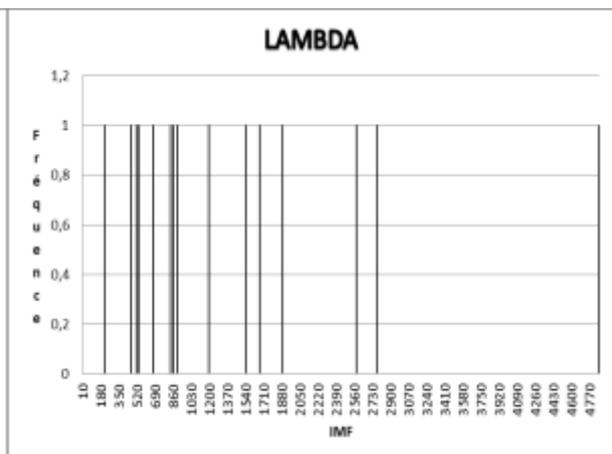
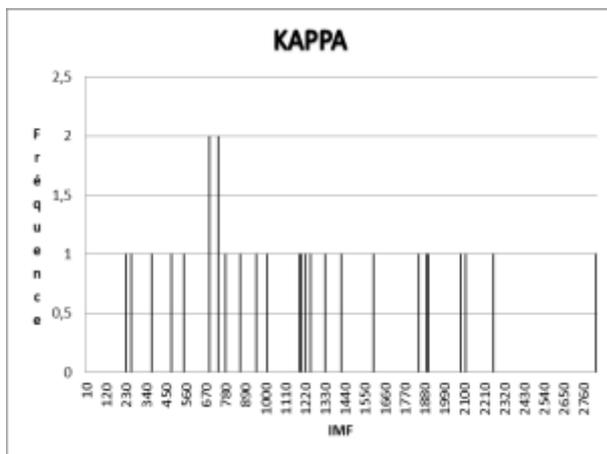
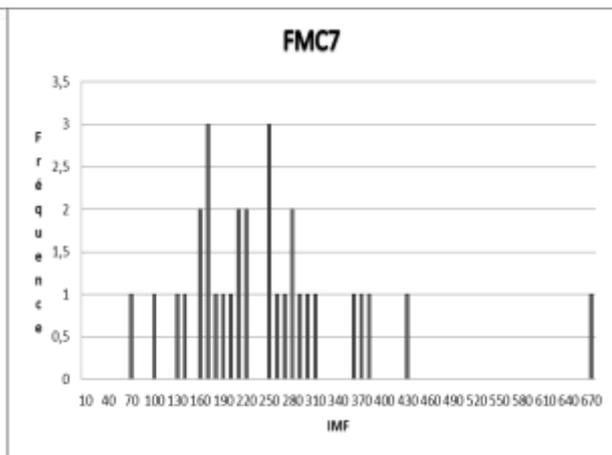
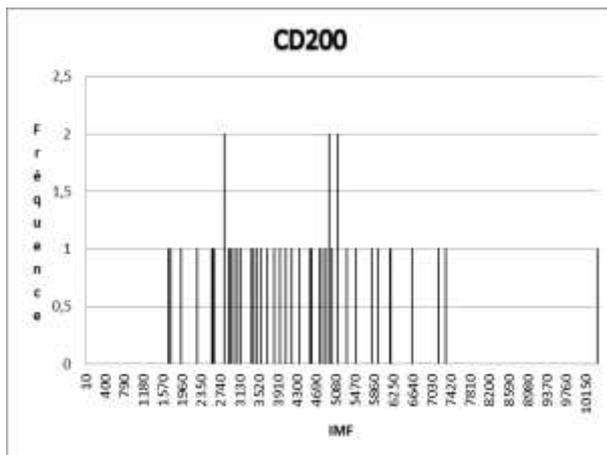
## GRAPHIQUES DE DISTRIBUTION DES MARQUEURS EN FONCTION DU SLP-B

A valeur documentaire (sans intérêt scientifique), les histogrammes sont utilisés dans le laboratoire en première intention pour la validation des immunophénotypes.

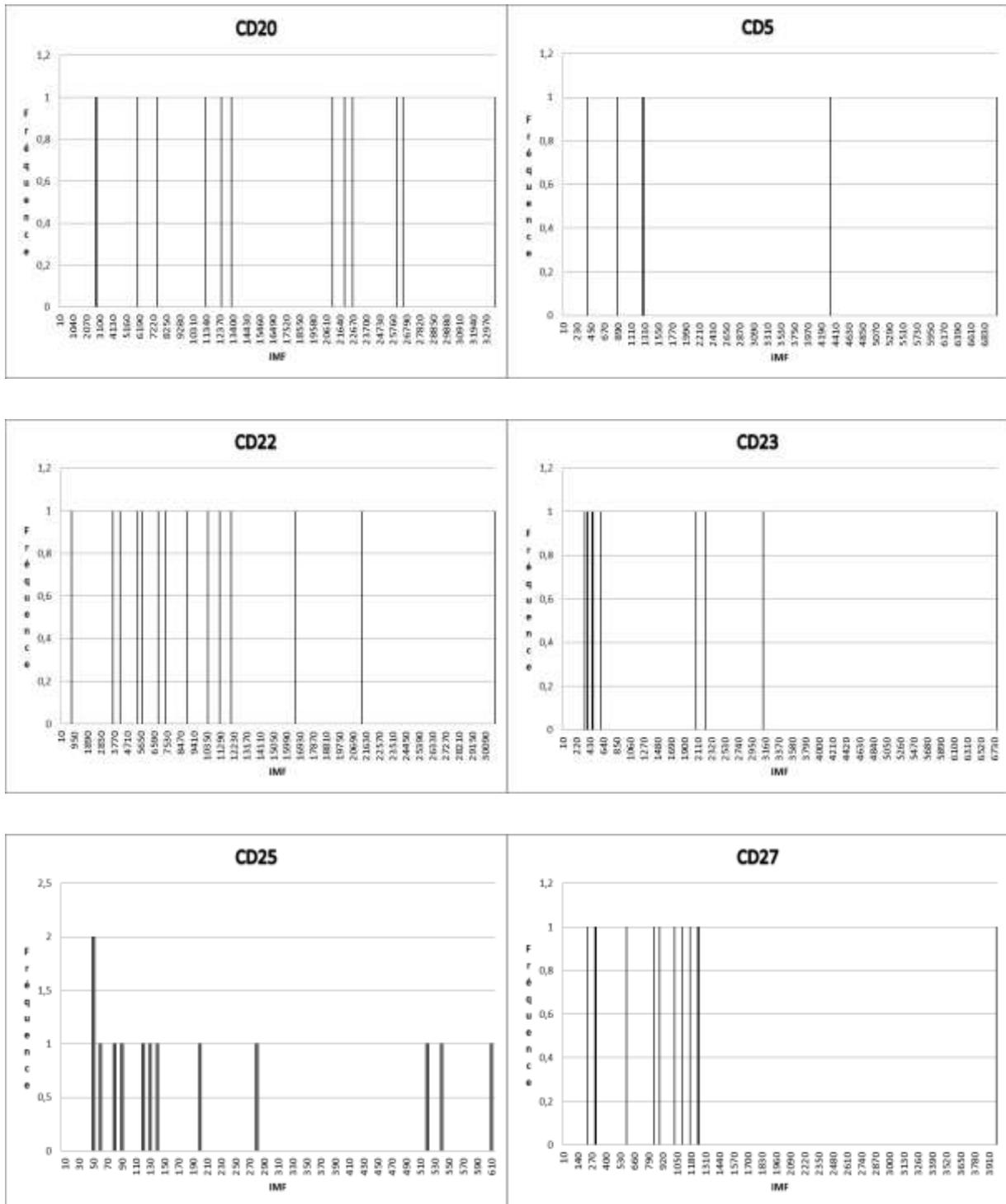
### CLL

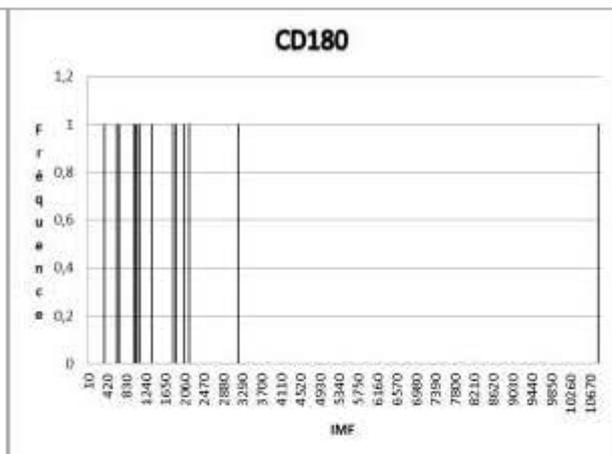
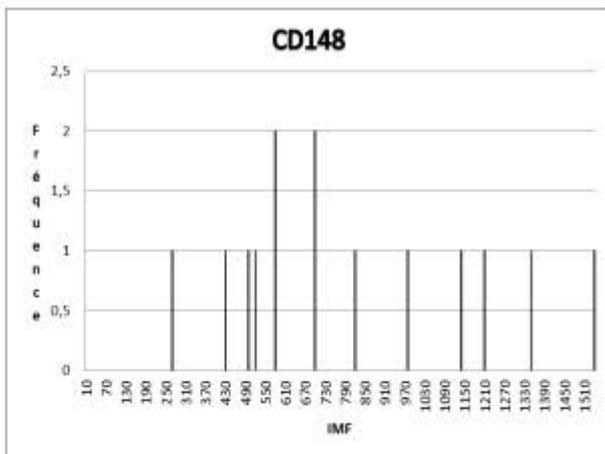
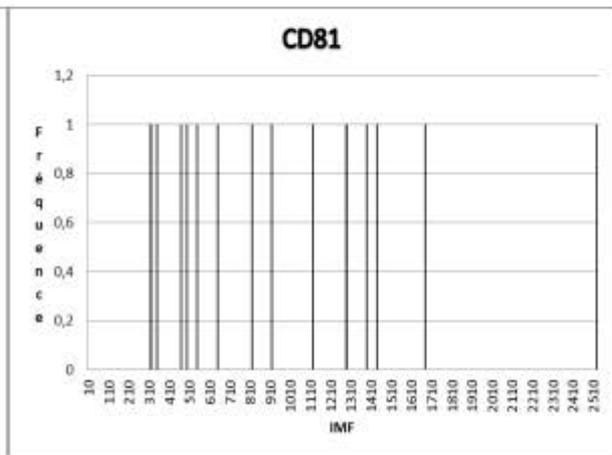
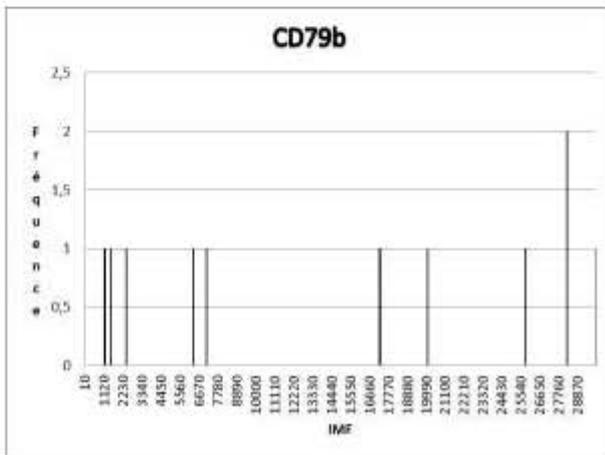
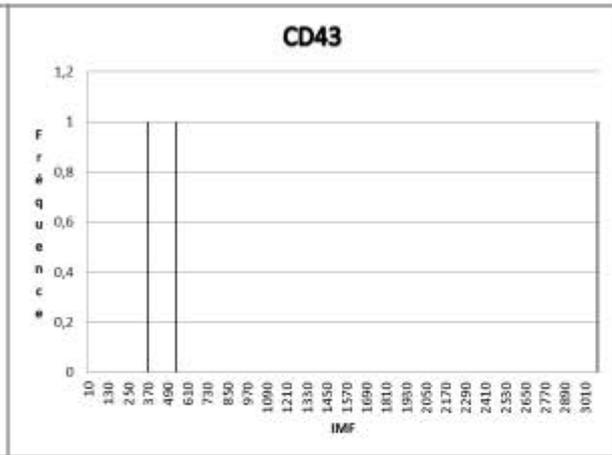
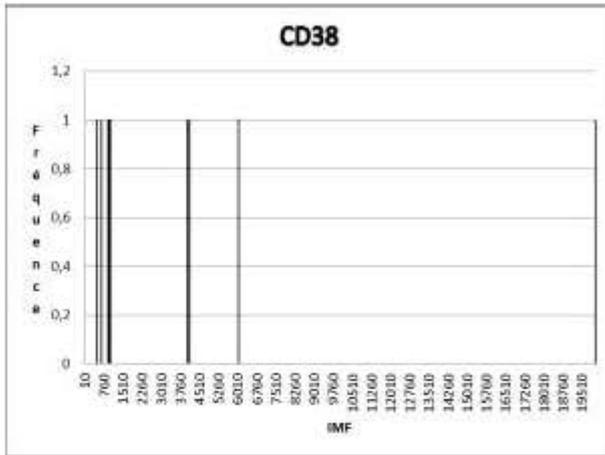


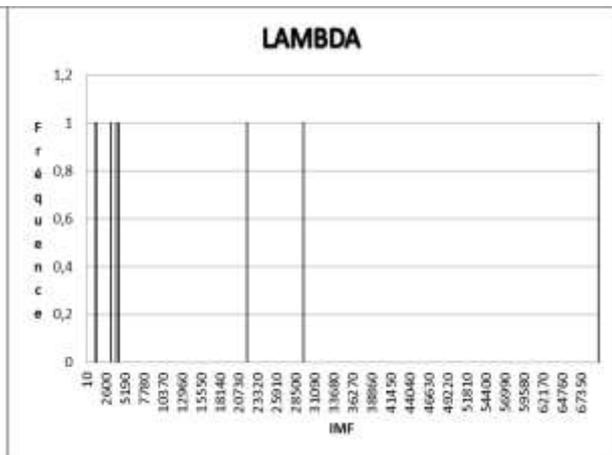
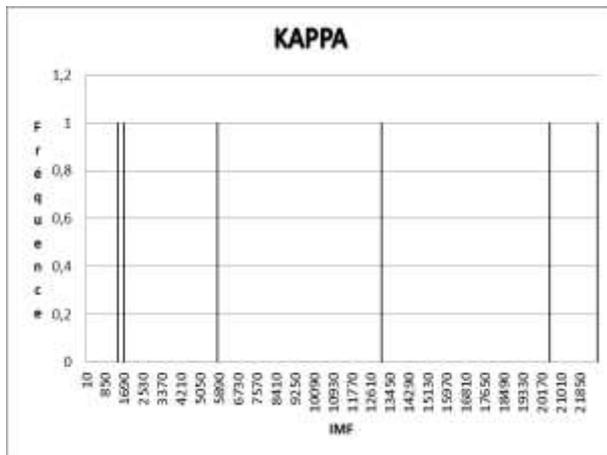
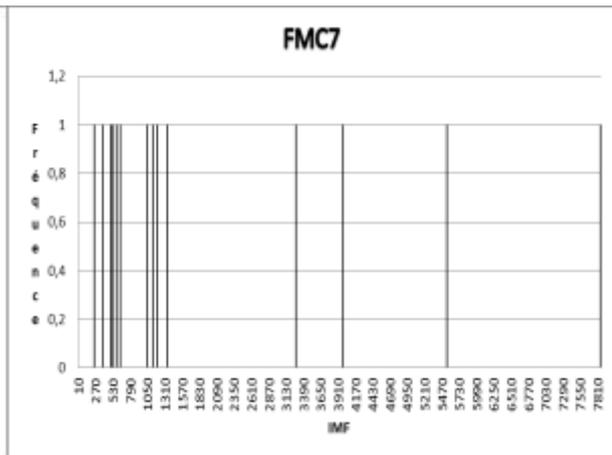
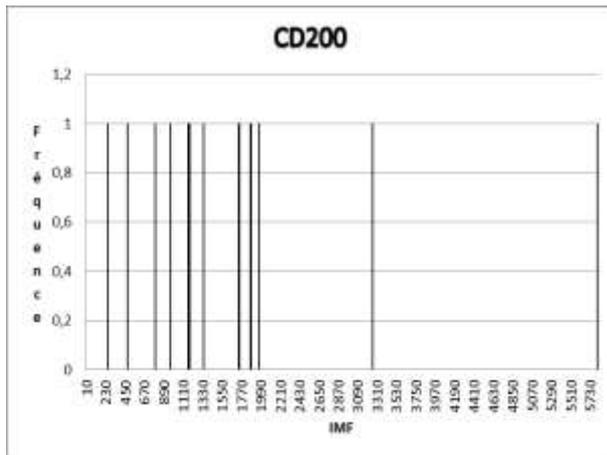




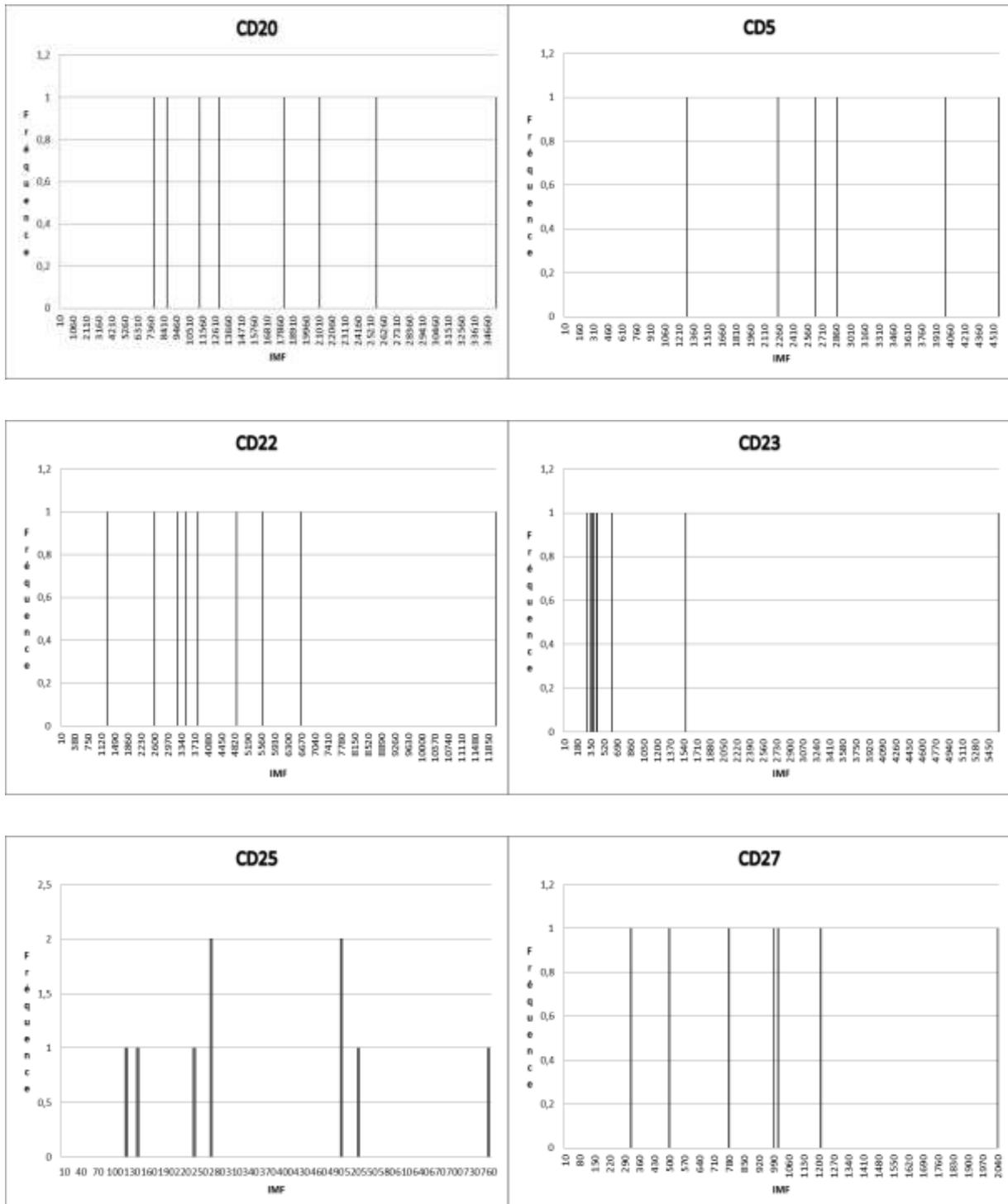
# MZL

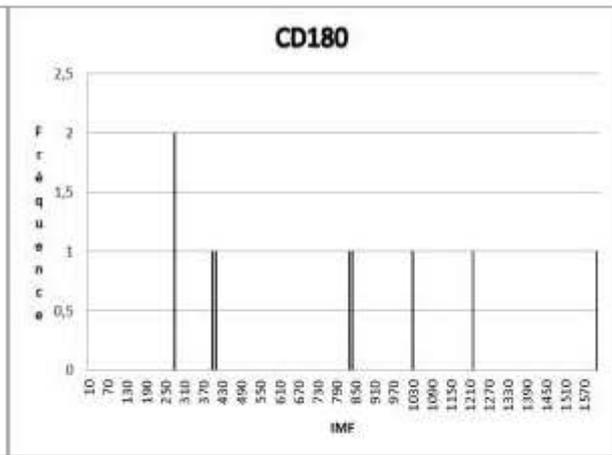
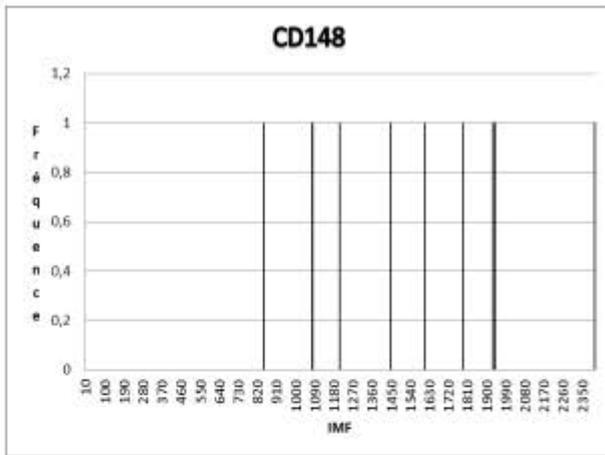
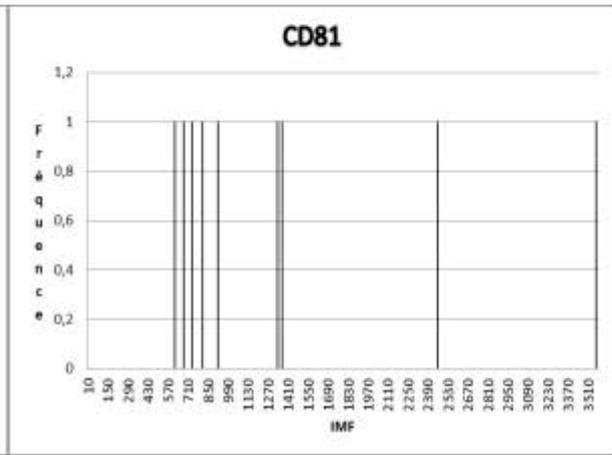
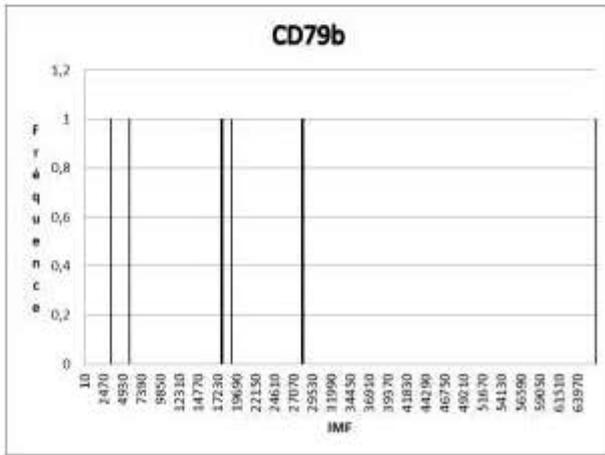
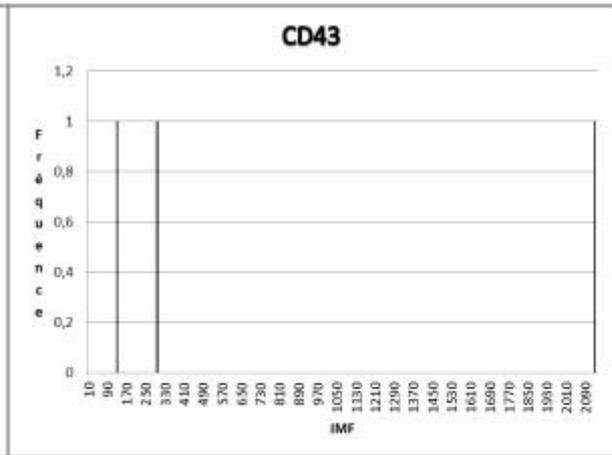
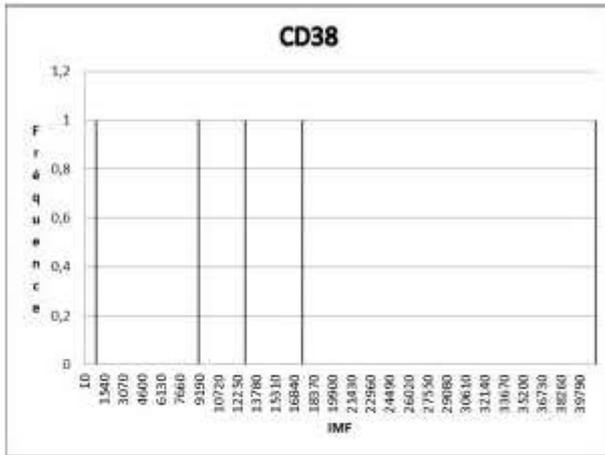


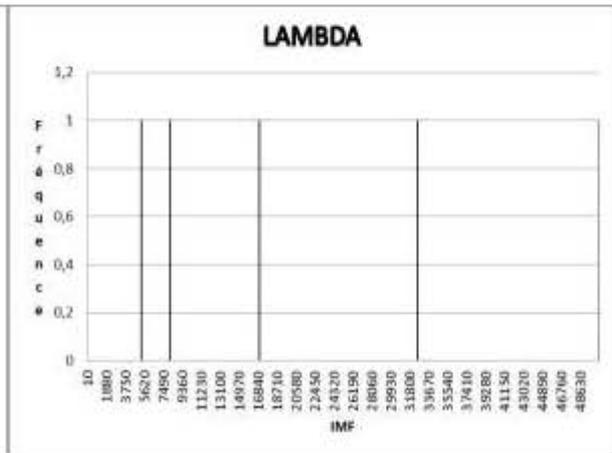
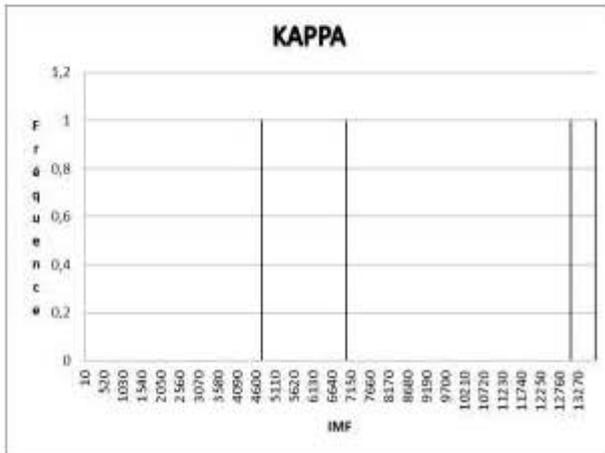
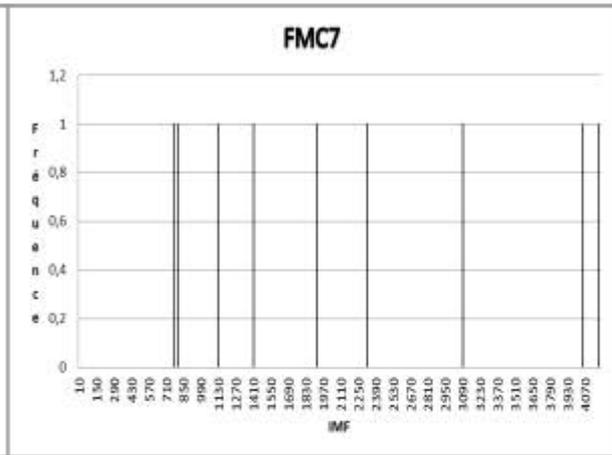
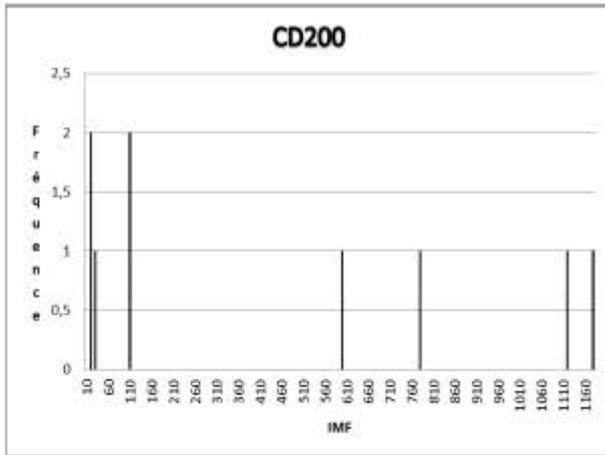




# MCL







## ANNEXE 2 : Diagnostics des MZL et MCL

MCL	Interprétation de l'immunophénotypage lymphocytaire	Résultats anatomopathologiques	Résultats génétiques	Atteintes ganglionnaires
MCL1	<p>Lymphocytose marquée. Augmentation de la population B (15,837 G/L) avec monotypie sIgL Kappa (expression forte). Positivité CD5, 11c, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 38, 43, 79b (forte), 81 (faible), 148 (faible), 180 (faible), 200 (faible), 305, FMC7 (moyenne à forte). Négativité CD10, 25, 103, 123.</p> <p>SLP-B mal classable. Cytologie atypique type lymphome de la zone marginale (55% de petits lymphocytes matures à noyau régulier ou peu déformé; 25% de petits lymphocytes à contours villeux, 14% de cellules moyennes "monocytoïdes" souvent nucléolées, 5% de lymphoplasmocytes, 1% de lymphocytes à noyau encoché (centrocytes); et ombres nucléaires « de Gümprrecht » rares &lt;10% des cellules). Phénotype score Matutes 2 avec CD5+ non en faveur d'une LLC, mais non typique non plus d'un MCL ou d'un MZL. Histologie et génétique recommandées pour classer.</p>	<p><b>BOM</b> : infiltration lymphoïde avec CD5+ et cyclineD1+ : localisation médullaire d'un MCL</p> <p><b>Biopsie ganglionnaire</b> : prolifération lymphomateuse : CD5+ cycline D1+ BCL2+ : en faveur d'un MCL</p>	RAS	RAS
MCL2	<p>Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (5,661 G/L) avec monotypie sIgL Kappa (expression forte). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (faible), 23, 25, 27, 38, 79b (forte), 81 (faible), 148 (faible), 180 (faible), FMC7 (faible). Négativité CD10, 43, 200.</p> <p>SLP-B. Cytologie atypique avec quelques grandes cellules. Phénotype Matutes 3 avec CD5+. Eliminer un lymphome du manteau.</p>	<p><b>Tissu ostéomédullaire</b> : siège d'un infiltrat interstitiel par un lymphome B à petites cellules CD5+, CD23-, avec une expression faible et partielle de la Cycline D1. L'hypothèse d'un lymphome du manteau pourrait être confirmée par la recherche de la t(11,14) en cas de cellules circulantes.</p>	RAS	RAS
MCL3	<p>Lymphocytose avec augmentation de la population B (5,532 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression très forte). Positivité CD5, 19, 20 (très forte), 22 (faible), 23, 27, 38 (très forte), 79b (forte), 81 (forte), 148 (forte), FMC7 (forte). Négativité CD10, 25, 43, 180, 200.</p> <p>SLP-B mature. Cytologie atypique (petits et moyens lymphocytes à noyau irrégulier et cellules immatures à chromatine décondensée). Phénotype score Matutes 3 avec CD5+ (et CD81 fort, CD148 fort, CD180 et CD200 négatifs). Lymphome du manteau (MCL) dans un variant blastoïde (agressive variant "blastoid", WHO 2008).</p>	<p><b>Biopsie ganglionnaire</b> : expression Cycline D1 et SOX11 : MCL</p>	RAS	<p>clinique : syndrome tumoral superficiel ADP sous-angulomandibulaire droite et splénomégalie à 4 travers de doigts</p> <p>PET SCANN : atteinte ganglionnaire sus et sous diaphragmatique avec une SUV max à 6,5 au niveau des ADP en regard du mésentère, avec atteinte splénique et médullaire et doute sur une atteinte digestive</p>

MCL4	<p>Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (5,976 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression forte). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (faible), 23, 25, 27, 38, 79b (forte), 81 (forte), 148 (forte), 180 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 43, 200.</p> <p>SLP-B. Cytologie atypique (nombreuses cellules matures à noyau irrégulier et nucléolé). Phénotype score Matutes 2 avec CD5+, CD148++, CD180 faible (limite négatif), CD200-. Rechercher un lymphome du manteau.</p>	<p><b>Biopsie inguinale :</b> prolifération lymphomateuse avec CD5+ Cycline D1+ BCL2+ SOX11 : MCL</p>	RAS	<p><b>Clinique :</b> ADP axillaires, médiastinales, inguinales.</p> <p><b>PET SCAN :</b> ADP cervicales axillaires, médiastinales, inguinales; splénomégalie hypermétabolique, ADP hilaires hépatiques rétropéritonéales</p>
MCL5	<p>Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (7,503 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression moyenne). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 79b (forte), 180 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 25, 38, 43, 81, 148, 200.</p> <p>SLP-B mature. Cytologie polymorphe mais caractérisée par des cellules matures à noyau un peu déformé et un excès de cytoplasme modérément basophiles. Présence de cellules villeuses 15% des lymphocytes. Phénotype score Matutes 2 avec CD5+, CD10-, CD43-, CD180+, CD148-, CD200-. Evoque un lymphome de la zone marginale limite SLVL (mais les cellules villeuses sont &lt;20%).</p>	<p><b>Liquide d'ascite :</b> infiltré par des cellules lymphomateuses CD5+ et Cycline D1+ : infiltration par MCL</p>	47,XY,+3,t(11;14)(q13;q32)[12]/46,XY[1]	<p><b>Clinique :</b> syndrome tumoral marqué avec une Rate palpable à 2cm sous le rebord costal</p> <p><b>PET SCANN :</b> progression des ADP jugulo-carotidiennes bilatérales, mésentériques et en fosse iliaque droite</p>

MZL	Interprétation de l'immunophénotypage lymphocytaire	Résultats anatomopathologiques	Résultats génétiques	Atteintes ganglionnaires
<b>MZL1</b>	Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (1,798 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression moyenne). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 38, 79b (forte), 81 (forte), 148 (faible), 180 (faible), 200 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 25, 43. Lymphocytose B monoclonale. Phénotype score Matutes 2 non LLC. A suivre (phase leucémique de lymphome B ?).	<b>BOM</b> : infiltration lymphomateuse de la moelle osseuse par un lymphome B à petites cellules dont le profil immunohistochimique est en faveur d'un MZL	RAS	RAS
<b>MZL2</b>	Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (2,804 G/L) avec monotypie sIgL Kappa (expression faible). Positivité CD 19, 20 (forte), 22 (forte), 27, 79b (forte), 81 (forte), 180 (forte), 200 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 23, 25, 38, 43, 148. SLP-B. Cytologie mature (avec petits lymphocytes matures à noyau un peu déformé, cytoplasme excessif modérément basophile). Phénotype score Matutes 1 avec CD5- (et CD148-, CD180+, CD200-). Evoque un lymphome de la zone marginale.	<b>BOM</b> : infiltrat interstitiel et nodulaire modéré par un MZL	46,XX,del(1)(p36),+3,del(7)(q31),del(11)(q22q23),-20[1]/46,sl,del(3)(p23)[18]/46,XX,del(1)(p36),del(7)(q31),add(10)(p13),del(11)(q22q23)[5].ish del(11)(ATM-)[19],17p13(TP53x2)[14].nuc	RAS
<b>MZL3</b>	Lymphocytose importante. Augmentation de la population B (48,891 G/L) avec monotypie sIgL Kappa (expression forte). Positivité CD 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 79b (forte), 81 (forte), 148 (forte), 180 (forte), 200 (forte), FMC7 (forte). Négativité CD 5, 10, 25, 38, 43. SLP-B. Cytologie mature pleiomorphe (petits à moyens lymphocytes à noyau irrégulier, encoché, nucléolé... cytoplasme basophile parfois à contours irréguliers; et peu d'ombres nucléaires « de Gümprrecht »). Phénotype score Matutes 1 avec CD5-. A classer avec caryotype et histologie.	<b>Rate</b> : MZL, infiltration lymphomateuse des ganglions hilaires.	RAS	RAS
<b>MZL4</b>	Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (2,599 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression forte). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 38, 79b (forte), 81 (forte), 180 (faible), 200 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 25, 43, 148, 180. MZL connu. Cytologie mature (75% de petits lymphocytes matures à noyau régulier ou peu déformé et cytoplasme de basophilie modérée; 9% de lymphoplasmocytes, 1% de cellules plasmocytoides, 15% de cellules plus grandes avec cytoplasme excessif et parfois villositaire). Phénotype score Matutes 2 avec CD5+ (et CD148-, CD180- inhabituel, CD200+).	RAS	49,XX,i(8)(q10)[1]/46~49,+3,+8,+18[cp4]/46,XY[27].	<b>Clinique</b> : pas de syndrome tumoral mis en évidence en dehors de quelques ganglions centimétriques sous diaphragmatiques, rate à la limite supérieure à 14 cm. Diagnostic Hématologique antérieur de MZL

<b>MZL5</b>	Absence de lymphocytose absolue, mais augmentation de la population B (1,210 G/L) restant <5 G/L. Monotypie sIgL Lambda (expression faible). Positivité CD 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 79b (faible), 81 (faible), 148 (faible), 180 (forte), 200 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD 5, 10, 25, 38, 43. Lymphocytose B monoclonale, cytologie type MZL, phénotype type « score Matutes 2 ». « MBL, CLL-like », phase circulante de MZL.	<b>BOM</b> : aspects morphologiques (infiltration diffuse et non pas paratrabéculaire), immunohistochimie (absence expression de CD10 et de BCL6) et en biologie moléculaire (absence t(14;18)) sont en faveur d'une localisation d'un lymphome B à petites cellules CD5- de type lymphome de la zone marginal.	41~43,XX,del(1)(p36),-3,,del(8)(p11),del(9)(q21),add(11)(q22),-12,der(15)t(?3;15)(q11;qter),-17,-18,-19,-21 or add(21)(p11),+1~2mar[cp19]/46,XX[1].	
<b>MZL6</b>	Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (10,437 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression très forte). Positivité CD 19, 20 (forte), 22 (forte), 23 (partielle), 27, 38, 79b (forte), 81 (forte), 148 (forte), 180 (mais faible), FMC7 (moyenne). Négativité CD 5, 10, 25, 43, 200. SLP-B chronique. Cytologie mature (96% de petits lymphocytes matures à noyau régulier ou peu déformé avec excès de cytoplasme modérément basophile, parfois à tendance lymphoplasmocytaire; 4% de lymphocytes plus grands à noyau binucléé (type LPLB); et rares ombres nucléaires « de Gümprécht »). Phénotype score Matutes 1 avec CD81++, CD148+, CD180-(-/+), CD200-. Hypothèse: Lymphome de la zone marginale sur Lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés.	<b>BOM</b> : infiltration modéré de la moelle sur un mode interstitiel et intrasinusoïdale, correspondant aux données cliniques et cytologiques, à la localisation d'un MZL splénique, vraisemblablement à lymphocytes villeux. <b>Biopsie hépatique</b> : infiltration du parenchyme hépatique par le LZM : CD10- BCL6- cycline D1- CD21- CD23-	<b>caryotype</b> : délétion 1q et trisomie partielle 12 (non spé du MZL)	<b>PET SCANN</b> : polyadénopathies sus et sous diaphragmatiques
<b>MZL7</b>	Lymphocytose modérée. Augmentation de la population B (5,543 G/L) avec monotypie sIgL Lambda (expression très forte). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 27, 38, 79b (forte), 81 (faible), 148 (moyenne), 180 (faible), 200 (faible), FMC7 (forte). Négativité CD10, 25, 43. SLP-B. Cytologie mature (cellules moyennes à noyau déformé, cytoplasme abondant, parfois avec petites villosités. Phénotype score Matutes 2 avec CD148+ CD180- CD200-. Evoque une phase leucémique de lymphome de la zone marginale (MZL).	RAS	RAS	Clinique : nodule hypodense splénique Diagnostic Hématologique antérieur de MZL
<b>MZL8</b>	Absence de lymphocytose, mais augmentation de la population B (1,558 G/L) restant <5 G/L. Monotypie sIgL Kappa (expression forte). Positivité CD5, 19, 20 (forte), 22 (forte), 23, 25, 27, 38, 43, 79b (forte), 81 (faible), 148 (faible), 180 (forte), 200 (forte), FMC7 (forte). Négativité CD10. Lymphocytose B monoclonale, cytologie mature (cellules de taille moyenne, noyau déformé, cytoplasme excessif et basophile), phénotype type « score Matutes 2 ». « MBL, non CLL-like ». Phase leucémique d'un lymphome B (zone marginale ?).	<b>Biopsie ganglionnaire</b> : localisation ganglionnaire d'un lymphome nodal de la zone marginal.	RAS	Clinique : adénopathies cervicales droites postérieures, des adénopathies axillaires bilatérales, splénomégalie et hépatomégalie. PET SCANN : multiples adénopathies, ganglions hypermétaboliques, axillaires, médiastinaux hilaires, rétropéritonéaux, iliaques et inguinaux, hépatosplénomégalie et un hypermétabolisme splénique diffus.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 08 Octobre 2015

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : WYRWAS Marie</p> <p>Sujet : Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B matures. Une cohorte de patients du CHU de Nancy</p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ Danièle, PU-PH      Directeur : M. LESESVE Jean-François PH      Juges : FEUGIER Pierre, PU-PH      MIGUET Laurent Yannick, MCU-PH      GARNACHE-OTTOU Francine, PU-PH</p>	<p align="right">Vu, 04/09/15</p> <p align="center">Nancy, le</p> <p>Le Président du Jury :      Mme BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ Danièle, PU-PH</p>  <p>Directeur de Thèse :      M. LESESVE Jean-François PH</p> 
<p align="center">Vu et approuvé,</p> <p align="center">Nancy, le 8-09-2015</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center"><i>Francine PAULIS</i></p>	<p align="center">Vu,</p> <p align="center">Nancy, le 18 SEP. 2015</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">- Pour le Président, et par délégation Le Vice-Président</p>  <p align="center"><b>Martial DELIGNON</b></p> <p align="center"><i>Pierre MUTZENHARDT</i></p> <p align="center">N° d'enregistrement : 8009.</p>

N° d'identification :

**TITRE : Evaluation du panel d'exploration cytométrique des syndromes lymphoprolifératifs B matures. Une cohorte de patients du CHU de Nancy**

Thèse soutenue le 8 octobre 2015

Par WYRWAS Marie

**RESUME :**

L'immunophénotypage lymphocytaire sanguin possède une place importante dans la démarche diagnostique des lymphomes en phase leucémique. Dans 20% des diagnostics, la classification de la pathologie n'est pas confirmée soit par absence de marqueur spécifique, soit parce que l'examen anatomopathologique (« gold standard ») est non disponible ou non discriminant. Le choix des marqueurs lymphoïdes, la recherche de nouveaux marqueurs, et l'interprétation de l'immunophénotypage prennent alors une place importante dans la démarche diagnostique. Nous avons donc évalué les différents marqueurs du panel lymphocytaire ainsi que de nouveaux marqueurs : CD148, CD180 et CD200. Nous avons testé un logiciel de traitement de données cytométriques ainsi que quelques-unes de ses fonctionnalités. Dans un premier temps, nous avons déterminé les intensités moyennes de fluorescence pour chaque marqueur dans la CLL, le MZL, et le MCL utile pour la validation quotidienne des immunophénotypes. Dans un second temps, l'étude du panel lymphocytaire a montré des marqueurs discriminants comme des expressions faibles dans la CLL des CD20, FMC7, CD79b, et CD81 ainsi qu'une expression faible des chaînes légères ou un CD38 très fort dans le MCL. Les nouveaux marqueurs apportent des arguments complémentaires dans l'interprétation : un CD200 fort dans la CLL, un CD180 fort dans le MZL et un CD148 fort associé à un CD200 faible dans le MCL. Le logiciel INFINICYT permet de comparer graphiquement les différentes entités entre elles, et propose des représentations permettant de mettre en avant les marqueurs les plus discriminants comme l'APS. La fonction compas apporte une aide supplémentaire dans la validation des immunophénotypes grâce à la création d'une base de données mais nécessite une standardisation des protocoles d'analyses. A l'avenir, ce type de logiciel pourra être utilisé dans la validation des immunophénotypes, et dans la recherche de nouveaux marqueurs pour la caractérisation des syndromes lymphoprolifératifs B matures.

**MOTS CLES** : Syndromes lymphoprolifératifs B, Cytométrie en flux, Immunophénotypage lymphocytaire, CD148, CD180, CD200

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
LESESVE Jean François Praticien Hospitalier	Laboratoire d'hématologie biologique CHU de Nancy Brabois	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
⑤ - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle